

9  
205



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**ESTABLECIMIENTO DE LA DOSIS LETAL 50%  
Actinobacillus pleuropneumoniae  
SEROTIPO 1 EN LA RATA**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
**P R E S E N T A :**  
**MARIA ESTHER BAUTISTA RAMIREZ**

**DIRECTORES :**  
**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ C.**  
**Q. B. F. GABRIELA BARCENAS M.**

**CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO**

**1993**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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.
INDICE DE TABLAS .....	I
INDICE DE ABREVIATURAS .....	II
RESUMEN .....	III
<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
1.1 Propiedades morfológicas y bioquímicas .....	1
1.2 Patogenia y Patología .....	1
1.3 Transmisión .....	3
1.4 Signos clínicos .....	3
1.5 Diagnóstico .....	4
1.6 Inmunidad .....	5
1.7 Distribución .....	6
1.8 Prevención y control .....	6
1.9 DL 50% .....	7
1.9.1 Justificación del problema .....	8
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
General .....	10
Particular .....	10
<b>3. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>11</b>
3.1 Bacteria .....	11
3.2 Cultivo del microorganismo .....	11

	Pag.
3.3 Pruebas bioquímicas para la identificación del microorganismo .....	11
3.4 Animales .....	13
3.5 Determinación de las UFC .....	13
3.6 Determinación de la dosis letal 50% (DL50) .....	14
3.7 Aislamiento de <u>A.pleuropneumoniae</u> a partir de ratas inoculadas .....	15
4. RESULTADOS .....	17
4.1 Pruebas bioquímicas para la identificación del microorganismo .....	17
4.2 Determinación de las UFC .....	17
4.3 Determinación de la DL50% .....	17
4.4 Aislamiento de <u>A.pleuropneumoniae</u> a partir de ratas inoculadas .....	18
5. DISCUSION .....	25
6. CONCLUSIONES .....	30
7. BIBLIOGRAFIA .....	31

INDICE DE TABLAS

TABLA	Pag.
1. Características bioquímicas de <u>Actinobacillus pleuropneumoniae</u> .....	2
2. Resultados de la pruebas bioquímicas de <u>A. pleuropneumoniae</u> .....	19
3. Determinación de ufc/ml de <u>A. pleuropneumoniae</u> serotipo 1 .....	20
4. Letalidad de <u>A. pleuropneumoniae</u> serotipo 1 en ratas inoculadas intraperitonealmente a los 8 días de edad .....	21
5. Determinación de la DL 50% .....	22
6. Curva dosis respuesta .....	23
7. Aislamiento de <u>A. pleuropneumoniae</u> a partir de sangre, bazo y pulmón de ratas inoculadas a los 8 días de edad .....	24

## INDICE DE ABREVIATURAS

<u>Actinobacillus pleuropneumoniae</u> .. <u>A. pleuropneumoniae</u>	
BHI .....	Infusión Cerebro Corazón
DL50 .....	Dosis letal 50%
DO .....	Densidad óptica
EDTA .....	Etiléndiaminotetracético
IN .....	Intranasal
IP .....	Intraperitoneal
IT .....	Intratecal
LPS .....	Lipopolisacárido
NAD .....	Nucleótido de nicotinamida
nm .....	Nanómetros
PCP .....	Pleuroneumonía Contagiosa Porcina
<u>S. aureus</u> .....	<u>Staphylococcus aureus</u>
SPF .....	Libre de patógenos específicos
SSF .....	Solución salina fisiológica

## RESUMEN.

Actinobacillus pleuropneumoniae es el agente causal de la Pleuroneumonia Contagiosa Porcina (PCP), la cual continúa siendo un problema serio en aquellas explotaciones porcinas en las que la enfermedad se presenta.

El trabajo que aquí se describe fué el primer paso en el establecimiento de un modelo experimental de la infección que permitiera un estudio de los posibles antígenos comunes entre serotipos de A. pleuropneumoniae que eventualmente permitan desarrollar un inmunógeno polivalente.

Se determinó la dosis letal 50% de A. pleuropneumoniae serotipo 1 en ratas de 8 días de edad. La bacteria se cultivó en Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) suplementado con 0.001% de dinucleótido de nicotinamida (NAD). El cultivo se ajustó a una densidad óptica de 1 a 590 nm de absorbancia que equivale a  $10^9$  UFC/ml, a partir de esta suspensión se hicieron diluciones logarítmicas y grupos de ratas fueron inoculadas intraperitonealmente (IP) con 0.5 ml de cada dilución, registrandose la mortalidad a las 24 y 48 h postinfección. La dosis letal 50% resultó ser de  $10^{6.572}$ , siendo similar a la reportada por otros investigadores para roedores (17, 38).

La ventaja potencial de este modelo es la posibilidad de inmunizar ratas adultas con diversos inmunógenos preparados a partir de los diferentes serotipos de A. pleuropneumoniae y desafiar a su progenie con el serotipo homólogo o heterólogo.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Propiedades morfológicas y bioquímicas de Actinobacillus pleuropneumoniae.

A. pleuropneumoniae es un cocobacilo o bastón pleomórfico fermentativo, Gram negativo, con formas filamentosas ocasionales, encapsulado, de aproximadamente 0.5 a 1.5  $\mu$ m de largo por 0.3  $\mu$ m de ancho, es inmóvil y no produce esporas. Depende del factor V conocido como NAD. No requiere del factor X o hemina. Crece en la cercanía de las colonias de S. aureus productoras de NAD, fenómeno que se conoce como satelitismo (6, 19).

Algunas de las características bioquímicas se muestran en el Tabla 1 (16).

### 1.2. Patogenia y patología.

La enfermedad es producida experimentalmente por inoculación intratraqueal de A. pleuropneumoniae en cerdos susceptibles (36). La enfermedad ocurre cuando el microorganismo evade los mecanismos de defensa del tracto respiratorio superior, siguiendo la colonización y multiplicación de los organismos a nivel alveolar que depende de uno o varios factores de virulencia, que parecen ser, la presencia de cápsula, exotoxinas y/o endotoxina y lipo-

TABLA 1

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL <i>A. pleuropneumoniae</i> .	
FACTOR V	+
FACTOR X	-
CATALASA	d
NITRATOS	+
OXIDASA	d
UREA	+
INDOL	-
CITRATOS	-
VOGUES-PROSKAUER	-
ROJO DE METILO	-
HEMOLISIS BETA	+
LACTOSA	-
RIBOSA	-
XILOSA	+
ARABINOSA	-
DULCITOL	-
INOSITOL	-
DEXTROSA	+
FRUCTOSA	+
FOSFATASA ALCALINA	+

(+) POSITIVO, (-) NEGATIVO, (d) DUDOSO

polisacáridos provocando la activación de varios sistemas biológicos, pudiendo causar trombosis, vasculitis, exudación y hemorragia. El LPS resulta citotóxico para los macrófagos alveolares del cerdo y células mononucleares de sangre periférica (36).

La bacteria libera una o más hemolisinas y se han identificado 3 diferentes patrones hemolíticos (10).

### 1.3. Transmisión.

A. pleuropneumoniae es transmitido por aerosol entre los cerdos en contacto estrecho. Clínicamente, el patrón de la infección se centra en ciertos chiquereros e irradia desde ellos con una severidad e incidencia disminuida. Las condiciones ideales para el aerosol pueden aumentar la velocidad de diseminación y al parecer una gran humedad y los vientos moderados muy a menudo se encuentran asociados con los brotes agudos (22, 23).

### 1.4. Signos clínicos.

Los síntomas mostrados por animales recientemente infectados depende de su estado de inmunidad y de la presencia o de la ausencia de patógenos respiratorios. La enfermedad generalmente se ve caracterizada por la pérdida de peso, que por otro lado se ve aumentada por el estrés que produce el transporte de los animales o el frío (14, 24).

La enfermedad sobreaguda usualmente se presenta como muerte súbita. Algunas veces las extremidades son cianóticas, pudiendo haber hemorragia en nariz y boca, con fiebre de 41.5 C. La muerte puede ocurrir dentro de 24 a 46 h debido probablemente a endotoxemia, aunque algunos pueden sobrevivir (14, 24).

En casos agudos los cerdos presentan síntomas respiratorios como disnea, con respiración diafragmática rápida; puede observarse anorexia; inmovilidad y generalmente presenta fiebre pudiendo ser de 40.5 - 41 C. Los casos subagudos y crónicos pueden mostrar vagos síntomas respiratorios, un incremento en la frecuencia de tos y se reduce la proporción del crecimiento (14, 24).

#### 1.5. Diagnóstico.

Hay cuatro métodos diagnósticos para la detección de la infección por A. pleuropneumoniae en el cerdo: a) los síntomas y curso de la enfermedad en el cerdo y la manada, b) hallazgos postmortem, c) aislamiento de la bacteria del tracto respiratorio y d) por serología (22). Los signos clínicos se describen anteriormente.

Las lesiones postmortem se caracterizan por fibrosis lobular junto con pleuritis. En el laboratorio el aislamiento y carac-

terización del *A. pleuropneumoniae*, es necesario para excluir a cualquier otro agente como probable causa de neumonía; la muestra puede obtenerse de los pulmones en casos sobreagudos y agudos de pleuroneumonía. En una infección generalizada pueden obtenerse crecimientos de hígado y bazo (23).

El diagnóstico serológico es muy importante para el manejo del problema infeccioso ya que permite detectar los animales enfermos crónica y subclínicamente, para eliminar posibles fuentes de infección (23).

#### 1.6. Inmunidad.

Varios factores influyen en el curso de la pleuroneumonía en el cerdo, uno muy importante es la inmunidad. Después de 2 ó 3 semanas de un brote agudo, la morbilidad decrece debido al desarrollo de inmunidad en la manada. Las hembras confieren inmunidad pasiva a sus críos, y esta inmunidad los protege durante las primeras semanas de vida. Casos agudos se observan en lechones de 3 a 8 semanas de edad cuando los niveles de anticuerpos del calostro han declinado a niveles bajos; casos severos pueden ocurrir en animales no inmunes que se introducen a la manada (23).

### 1.7. Distribución.

La Pleuroneumonia Contagiosa Porcina (PCP), producida por A. pleuropneumoniae se ha reportado prácticamente en todos los países donde hay producción de cerdos: Alemania, Argentina, Australia, Bélgica, Brasil, Canadá, Corea, Dinamarca, Estados Unidos de Norteamérica, Finlandia, Francia, Holanda, India, Inglaterra, Irlanda, Italia, Japón, México, Rumania, Suecia, Suiza, Taiwan, Venezuela y Yugoslavia (22).

### 1.8. Prevención y Control.

Para el control y prevención de la PCP deben tomarse en cuenta varios factores entre ellos la inmunidad de la granja. El serodiagnóstico proporciona la manera más fácil de localizar a los animales crónicamente enfermos y la exclusión de los animales portadores. 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 sanos (22).

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 (18).

### 1.9. Dosis Letal 50% (DL50).

La virulencia de una cepa bacteriana, debida fundamentalmente a su invasibilidad, toxigenicidad o combinación de ambas, se valora habitualmente en función de la dosis media que puede matar al 50% de los animales inoculados en un determinado período de tiempo y el número de bacterias necesarias para obtener este resultado se denomina DL50 (7).

Zbinden y Flury-Roversi (1981) han enfatizado que la DL50 depende de la especie animal, el sexo, edad, cepa y otros factores dentro de la especie, o bien de la dieta, forma de administración, factores ambientales, etc. (42).

Para estimar la DL50 se involucra primero cambiar una serie de dosis (cantidades, concentraciones de la sustancia o bacteria a probar) y segundo las dosis usualmente se realizan con una secuencia geométrica (0.08, 0.12, 0.18, 0.27) de manera que el logaritmo de las dosis esten igualmente espaciados; aunque esto no es esencial (9).

Para evitar el costo que implicaría el empleo de grandes cantidades de animales y muchas diluciones de prueba; Reed y Munch (1938), desarrollaron un método para calcular la DL50. Este método es aplicable principalmente a series completas de titulación; es decir desde un 0% de mortalidad hasta un 100% (7).

### 1.9.1. Justificación del problema.

Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae es el agente etiológico de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP), enfermedad respiratoria usualmente de presentación aguda y causante de graves pérdidas económicas en las granjas en las cuales se presenta esta enfermedad, debido a la elevada mortalidad de cerdos en crecimiento y al retraso del crecimiento de los mismos (39).

Hasta el momento se han descrito 12 serotipos de A. pleuropneumoniae en base a sus antígenos capsulares (11, 17, 21, 28, 29, 30, 31, 34). En México los serotipos prevalentes encontrados parecen ser 1, 2, 5 y 7 (4, 8).

La enorme diversidad antigénica mostrada por esta bacteria ha complicado el control de la PCP, pues se ha observado que la infección natural induce en los animales sobrevivientes una inmunidad sólida y polivalente (13, 27), mientras que los animales inmunizados artificialmente sólo quedan protegidos contra el serotipo homólogo (18, 25, 26, 27).

Dado que el único huésped natural de A. pleuropneumoniae identificado hasta el momento es el cerdo (37) y las dificultades inherentes a la experimentación con esta especie animal,

se hace interesante el desarrollo de un modelo experimental que permitiera el análisis sistemático de las características antigénicas de los diferentes serotipos de A. pleuropneumoniae con miras a desarrollar un inmunógeno polivalente.

Investigadores interesados en estudiar las propiedades biológicas de anticuerpos contra el polisacárido capsular del Haemophilus influenzae tipo b patógeno del humano (género al que anteriormente perteneció A. pleuropneumoniae) han empleado un modelo experimental en ratas lactantes (1, 12). En este caso ratas de 8 días de edad inoculadas con este microorganismo por vía intraperitoneal (IP) muestran una bacteremia detectable 24 h post-infección; esta bacteremia desaparece en animales inmunizados pasivamente con anticuerpos anticapsulares (12). Este tipo de modelo biológico sería interesante explorarlo para A. pleuropneumoniae pensando en una posible inmunización de ratas hembras adultas seguido de apareamiento y desafío a la progenie.

## 2. OBJETIVOS

### GENERAL:

Establecer la posible virulencia del Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1 en la rata de 8 días de edad inoculadas por vía intraperitoneal.

### ESPECIFICOS:

- Establecimiento de un método para cuantificar suspensiones bacterianas de A. pleuropneumoniae y poder determinar con precisión las dosis aplicadas a los animales.

- Determinar la dosis letal 50% en grupos de ratas de 8 días de edad inoculadas por vía intraperitoneal con A. pleuropneumoniae serotipo 1.

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. BACTERIA.

Se utilizó una cepa de A. pleuropneumoniae (ATCC 27088) serotipo 1 proporcionada por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN) la cual se mantuvo a -196 C (nitrógeno líquido) suspendida en suero de equino.

#### 3.2. CULTIVO DEL MICROORGANISMO.

Se utilizó medio Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) suplementado con 0.001% de NAD.

Se sembró en forma masiva la cepa de A. pleuropneumoniae en este medio incubándolo a 37 C durante 24 h.

#### 3.3. PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO.

##### a) Tinción de Gram:

Se realizó un frotis de la bacteria la cual se fijó por medio de calor, las células posteriormente se tñieron con cristal violeta por 1 min, se lavaron y se trataron con una solución de yodo por 1 min.

Posteriormente se llevó a cabo una decoloración con alcohol acetona por unos segundos y se lavó; después se empleó una concentración con safranina por 1 min (5).

**b) Prueba de Ureasa:**

Se inoculó un tubo con caldo Urea de Christensen sin NAD con un cultivo de la bacteria crecida 18 h en agar BHI complementado. Se cosechó la bacteria con SSF 0.15 M, lavando por centrifugación dos veces 15 min a 4000 rpm. Una gota de la suspensión obtenida se colocó en los tubos de urea; la obtención de un color rojo o rosado indicó ureasa positivo (19).

**c) Prueba de Satelitismo:**

Se realizó haciendo una inoculación a lo largo de toda la placa de agar BHI y colocando posteriormente un inóculo de la cepa nodriza de S. aureus perpendicular al estriado de la bacteria examinada. Una reacción positiva fué cuando el Actinobacillus creció en la periferia de la cepa nodriza (4).

**d) Fermentación de Carbohidratos:**

Se inocularon tubos conteniendo 3.0 ml de caldo Rojo fenol, con 1% del carbohidrato a probar y 10 u/ml de NAD con un cultivo de A. pleuropneumoniae de 18-24 h de crecimiento.

El cambio de coloración en el medio de rojo a amarillo indicó una prueba positiva al carbohidrato que contenía ese tubo (19).

#### 3.4. ANIMALES.

Se utilizaron ratas cepa Wistar de 8 días de edad con un peso aproximado de 8 a 10 g, sin importar el sexo, se alimentó a las madres con alimento Purina para ratas; estas fueron criadas en el Laboratorio de Inmunología de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la FES-C.

#### 3.5. DETERMINACION DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC).

- 1) Se cultivó la bacteria en el medio BHI suplementado con NAD.
- 2) Se cosechó en solución salina fisiológica (SSF) NaCl 0.85%, estéril.
- 3) Se ajustó la suspensión bacteriana a una densidad óptica de 1.0 a 590 nm de absorbancia diluyendo con SSF estéril.
- 4) Se realizaron diluciones logarítmicas de la suspensión bacteriana con caldo BHI ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ).

- 5) Se tomaron 20  $\mu$ l de cada dilución y se sembraron en placas de BHI suplementado con NAD 0.001%.
- 6) Se incubó a 37 C.
- 7) Se determinó las UFC/ml contando el número de colonias que se encontraran en la dilución mayor y en que estas pudieran distinguirse individualmente.

### 3.6. DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL 50% (DL50).

- 1) Se cultivó la bacteria, se cosechó y se ajustó la suspensión bacteriana a una densidad óptica de 1.0 a 590 nm (17).
- 2) Se realizaron las diluciones correspondientes ajustando a la dosis deseada ( $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ).
- 3) Se formaron grupos de ratas de 8 días de edad como se muestra en la Tabla 3 y fueron inoculadas por vía IP con 0.5 ml de cada dilución.
- 4) Se inocularon 3 controles por cada dilución probada con 0.5 ml de SSF estéril por vía IP.
- 5) Se determinó la mortalidad a las 24-48 h.

- 6) Se calculó la DL 50 de acuerdo al método de Reed y Munch (32).

### 3.7. AISLAMIENTO DE A. pleuropneumoniae A PARTIR DE RATAS INOCULADAS.

- 1) El aislamiento de A. pleuropneumoniae se realizó en muestras de bazo, de pulmón y de sangre de las ratas inoculadas a los 8 días de edad que pudieron ser muestreadas dentro de las 2 h posteriores a la muerte y de las ratas sobrevivientes.
- 2) El órgano completo de bazo y de pulmón, por separado, fueron maceraron en mortero en condiciones de esterilidad.
- 3) Los animales sobrevivientes fueron anesteciados con éter para obtener muestras de sangre por punción cardiaca empleando una aguja de tuberculina, y recolectandola en tubos que contenian EDTA.
- 4) Del macerado de bazo, de pulmón y de la muestra sanguínea se tomó una asada haciendo una inoculación a lo largo de toda la placa de agar BHI y se colocó el inóculo de la cepa nodriza de S. aureus perpendicular al estriado de la placa.

4) Se incubó a 37 C, 24 h.

5) El aislamiento fué positivo cuando se aislaron colonias pequeñas, de aspecto opaco y de bordes redondeados, que mostraron dependencia hacia la cepa nodriza de S. aureus (4).

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO.

En la Tabla 1 se resumen los resultados de las pruebas realizadas para identificar al microorganismo en estudio. Encontrándose que el microorganismo corresponde de acuerdo a la literatura a A. pleuropneumoniae (6, 16, 19).

##### 4.2. DETERMINACION DE LAS UFC.

En la Tabla 2 se resumen los resultados de la determinación de UFC encontrándose que a una longitud de onda de 590 nm y un valor de absorbancia de 1 el número de UFC/ml es  $10^9$ .

##### 4.3. DETERMINACION DE LA DL50%.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la letalidad del A. pleuropneumoniae serotipo 1.

En la Tabla 4 se muestran los cálculos de la DL 50% según Reed y Munch (1976) encontrándose una DL50% de  $10^{6.572}$  con una desviación estándar de +/- 0.4.

En la Figura 1 se muestra la curva dosis respuesta utilizada

para valorar la virulencia bacteriana, el aspecto sigmoide de la curva se debe a un comportamiento estadístico normal.

#### 4.4. AISLAMIENTO DE A. pleuropneumoniae EN RATAS DESAFIADAS.

En la Tabla 5 se muestran los resultados del aislamiento de A. pleuropneumoniae encontrándose que sólo fué posible aislarlo en las muestras de bazo.

## TABLA 2

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DE  
Actinobacillus pleuropneumoniae.

P R U E B A S	RESULTADOS
Gram	-
Ureasa	+
Satelitismo	+
Indol	-
Citratos	-
D-Lactosa	d
Dextrosa	+
Maltosa	+
Manitol	+
Sacarosa	+
Nitratos	+

(+) POSITIVO, (-) NEGATIVO, (d) DUDOSO.

**TABLA 3**DETERMINACION DE UFC/ml DE A. pleuropneumoniae SEROTIPO 1.

REPETICION	DILUCION*	# DE COLONIAS	UFC/ml
1	$10^{-6}$	328	$1.60 \times 10^9$
2	$10^{-6}$	224	$1.12 \times 10^9$
3	$10^{-7}$	93	$4.60 \times 10^{10}$
4	$10^{-6}$	85	$1.40 \times 10^9$
5	$10^{-6}$	161	$8.00 \times 10^9$
6	$10^{-6}$	20	$1.05 \times 10^9$
7	$10^{-6}$	29	$1.47 \times 10^9$
8	$10^{-7}$	154	$7.00 \times 10^9$
9	$10^{-6}$	116	$5.00 \times 10^9$
10	$10^{-6}$	269	$1.30 \times 10^9$
11	$10^{-6}$	144	$7.20 \times 10^9$

\* DILUCION MAYOR EN LAS QUE LAS COLONIAS PUDERAN DISTINGUIRSE INDIVIDUALMENTE.  
LA LECTURA SE REALIZO A UNA LONGITUD DE ONDA DE 590 nm.

**TABLA 4**

**LETALIDAD DE *A. pleuropneumoniae* SEROTIPO 1 EN RATAS INOCULADAS INTRAPERITONEALMENTE A LOS 8 DIAS DE EDAD.**

DOSIS/RATA	No. DE MUERTOS	
	TOTAL	
$10^{10}$	9/10	
$10^9$	13/13	
$10^8$	23/27	
$10^7$	18/23	
$10^6$	7/13	
$10^5$	5/13	
$10^4$	8/13	
$10^3$	1/5	
$10^2$	1/5	
$10^1$	0/5	

## TABLA 5

### DETERMINACION DE LA DL50%

DOSES	LETALIDAD	No. DE MUERTOS	No. DE VIVOS	MUERTOS *	VIVOS *	MUERTOS / TOTAL	% MUERTOS
10 <sup>10</sup>	9/10	9	1	85	1	85/86	98.83
10 <sup>9</sup>	13/13	13	0	76	1	76/77	98.70
10 <sup>8</sup>	23/27	23	4	63	5	63/68	92.64
10 <sup>7</sup>	18/23	18	5	40	10	40/50	80.00
10 <sup>6</sup>	7/13	7	6	22	16	22/38	57.89
10 <sup>5</sup>	5/13	5	8	15	24	15/34	44.11
10 <sup>4</sup>	8/13	8	5	10	29	10/39	25.64
10 <sup>3</sup>	1/5	1	4	2	33	2/35	5.71
10 <sup>2</sup>	1/5	1	4	1	37	1/38	2.63
10 <sup>1</sup>	0/5	0	5	0	42	0/42	0.00

\* ACUMULADOS

% DE MORTALIDAD A LA DILUCION SIGUIENTE POR ENCIMA DEL 50% - 50%

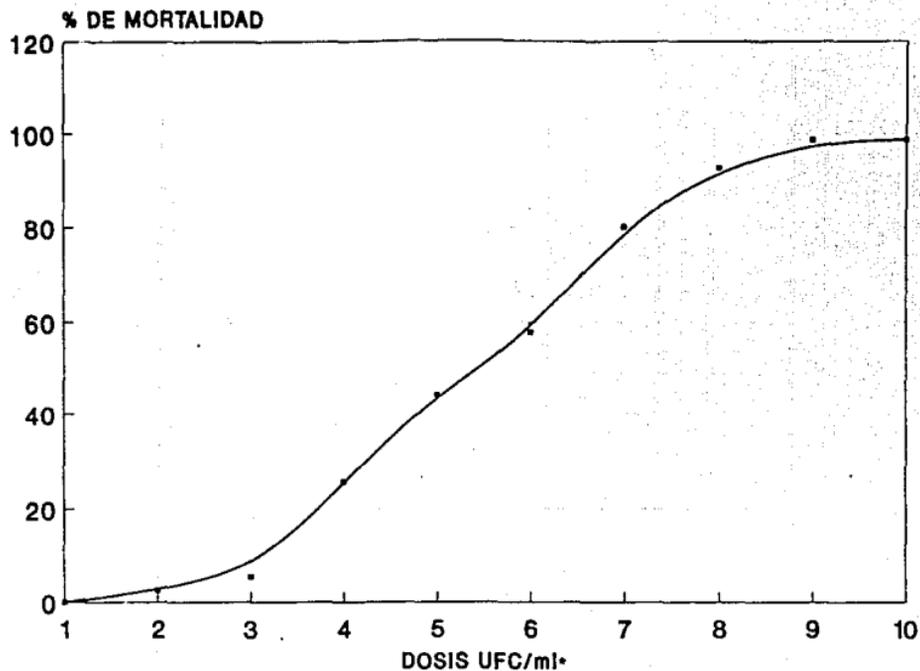
$$DL\ 50\% = \frac{\% \text{ DE MORTALIDAD A LA DILUCION SIGUIENTE POR ENCIMA DEL 50\% - 50\%}{\% \text{ DE MORTALIDAD A LA DILUCION POR ENCIMA DEL 50\%} - \% \text{ DE MORTALIDAD A LA DILUCION POR DEBAJO DEL 50\%}}$$

$$DL\ 50\% = \frac{57.89 - 50\%}{57.89 - 44.11} = \frac{7.89}{13.78} = 0.572$$

$$DL\ 50\% = 10^{0.572}$$

≈ 0.44

**TABLA 6**  
**CURVA DOSIS RESPUESTA**



•Log. DE BASE 10

## TABLA 7

AISLAMIENTO DE *A. pleuropneumoniae* A PARTIR DE SANGRE,  
BAZO Y PULMÓN DE RATA INOCULADA A LOS 8 DIAS  
DE EDAD.

No.DE AISLAMIENTOS / TOTAL DE RATAS MUESTREADAS		
SANGRE	BAZO	PULMON
8/8	8/8	0/8

\* SOLO SE INTENTO EL AISLAMIENTO EN AQUELLOS ANIMALES QUE PUDIERON SER MUESTREADOS DENTRO DE LAS PRIMERAS DOS HORAS POST-MORTEM.

## 5. DISCUSION..

Los resultados aquí presentados representan los primeros de este tipo en los que se utiliza la rata como modelo animal experimental para la infección con A. pleuropneumoniae. Varios investigadores han utilizado otros animales de laboratorio para el desarrollo de un modelo animal:

- Sebunya 1982, desarrolló un modelo utilizando ratones albinos de 15-25 semanas de edad, los cuales fueron inoculados intranasalmente (IN) con A. pleuropneumoniae serotipos 1 y 5 con lo que se encontró una DL entre  $1.4 \times 10^6$  y  $5,4 \times 10^7$  la cual producía lesiones hemorrágicas en pulmón. En este modelo se evaluó la eficacia de vacunas experimentales en las que la vacunación no fué efectiva (38).

- Nakai 1989, analizó la susceptibilidad a la cepa SH-15 de A. pleuropneumoniae serotipo 2 en cuyos de 5 semanas de edad, ratones libres de patógenos específicos (SPF) de 5 semanas de edad, "cotton rats" de 2 meses de edad y pikas afganas de 3 meses de edad, los cuales fueron inoculadas por vía IN, IP, intratecal (IT). Los cuyos, cotton rats y pikas afganas murieron 2 días después de la inoculación IT o IP pero no murieron por la IN, los ratones albinos fueron refractarios al microorganismo (20).

Recientemente Komal y Mittal 1990, evaluaron la variación de la virulencia de diferentes serotipos de A. pleuropneumoniae del 1 al 12 por inoculación IN o IP en el ratón observándose que los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11 fueron más virulentos que los serotipos 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 12 (17).

La razón de haber utilizado a la rata como modelo experimental se derivó de los estudios con H. influenzae en los que se usó un modelo muy similar al aquí descrito para estudiar algunos aspectos relacionados con la actividad inmunogénica de componentes de esta bacteria (12).

La DL 50% de A. pleuropneumoniae para la rata de 8 días de edad es mucho mayor que la reportada para H. influenzae (12). Sin embargo, es similar a la que otros investigadores han reportado para roedores (38, 17).

Los resultados aquí reportados sientan las bases para trabajos futuros en los que puede empezar a analizarse sistemáticamente componentes de A. pleuropneumoniae asociados con una respuesta inmune polivalente. En este sentido, puede ahora inmunizarse ratas hembras adultas con diversos inmunógenos y llevar a cabo un desafío de la progenie con el serotipo homólogo o heterólogo. De hecho, trabajos de este tipo ya se están realizando con resultados promisorios utilizando extractos capsulares o proteícos como inmunógenos.

Es importante tomar en cuenta las diferencias biológicas entre el animal experimental y el huésped natural, que por ejemplo, se reflejan en las cuentas leucocitarias (Tabla 6) entre ambos. Así, en promedio y en términos porcentuales, el cerdo tiene menor cantidad de linfocitos que la rata y esta última un poco más de la mitad de neutrófilos que el primero (2, 40). No obstante, el mérito de un modelo experimental es evaluar en primera instancia y en condiciones fácilmente reproducibles y controladas parámetros que de ser relevantes a la respuesta inmune en estudio, tendrán que ser eventualmente corroborados en el huésped natural (41).

Desde luego este modelo tiene una limitante importante, sólo evalúa la inmunidad asociada con anticuerpos circulantes (que son los que la rata pasivamente transfiere a su progenie) dejando de lado la participación de la inmunidad celular, en este sentido se pueden citar los resultados de Bhatia y Mittal 1991 quienes no pudieron asociar la inmunidad celular con protección en el ratón (3).

Así mismo podría pensarse que dado que se está induciendo una infección sistémica el efecto inmune contra esta podría no ser relevante por la infección natural que hasta donde se sabe afecta fundamentalmente al tracto respiratorio. En este sentido lo que puede decirse es que hay casos bien documentados en donde

esta aparente incongruencia no es tal. Así Bordetella pertussis produce en los niños una infección del tracto respiratorio, la tosferina que normalmente se previene con una bacterina; el ensayo que internacionalmente se acepta para evaluar la potencia de estas bacterinas, básicamente por su alto grado de correlación con el comportamiento del biológico en niños, es el desafío por vía intracerebral de ratones inmunizados, en donde el grupo control eventualmente muere al cabo de unos cuantos días postinfección (15, 33).

Este ejemplo ilustra y sustenta la posibilidad de definir experimentalmente un mecanismo inmune mediante un tipo de infección distinto al de la infección natural.

En conclusión, los resultados que aquí se presentan además de ser los primeros de su tipo dan pie a estudios futuros en donde pueda empezar a estudiarse la actividad inmunogénica de diversos componentes de A. pleuropneumoniae con miras a proponer un inmunógeno polivalente.

## TABLA 8

### PORCENTAJE LEUCOSITARIO DEL CERDO Y LA RATA

CELULAS (%)	C E R D O	R A T A
LEUCOCITOS	$(15-22) \times 10^3/\mu\text{l}$	$(5-25) \times 10^3/\mu\text{l}$
NEUTROFILOS	30-35	9-34
LINFOCITOS	55-60	65-84
MONOCITOS	5-6	0-5
EOSINOFILOS	2-5	0-6
BASOFILOS	< 1	0-1.5

(2, 40)

ESTA TESIS  
NO DEBE  
SALIR DE LA  
BIBLIOTECA

## 6. CONCLUSIONES

1. Se demuestra, por primera vez, la letalidad de A. pleuropneumoniae serotipo 1 para la rata de 8 días de edad, encontrándose una dosis letal 50% de  $10^{6.572}$  inculada por vía intraperitoneal.
2. Este tipo de resultados sientan las bases para un modelo experimental que permita la evaluación de diversos componentes de A. pleuropneumoniae mediante la inmunización de ratas hembras adultas seguido del desafío de su proge nie.

## 7. BIBLIOGRAFIA.

1. Anderson P. A., Peter G. and Jhonston R. B. Immunization of humans with polyribophosphate the capsular antigen of Haemophilus influenzae tipo b. Jour. Clin. Invest., 51:1972; 39-44.
2. BaKer H.J., Russell L.J. and Weisbroth S.H. The Laboratory Rat, Biology and diseases. American Press, USA, 1979, Vol. 1, pp 411-412.
3. Bhatia B., Mittal K.R., Frey J. Factors involved in immunity against Actinobacillus pleuropneumoniae in mice. Vet. Micro., 29:1991; 147-158.
4. Ciprian C.A., Medina A.G., Fuentes R.M., Pijoan A.C., Torres A.O., Colmenares V.G., Camacho M.J. Serotipificación de Haemophilus pleuropneumoniae aislados de cerdos en México. Vet. Méx., 19:1988; 205-210.
5. Brock T.D., Smith D.W., Madigan M.T. Microbiología. PHH Americana, 4a. edición, México 1987;19-20.
6. Cowan S.T. et. al. Manual for identification of medical bacteria. 2th. ed. Cambridge Univ. Press, 1974; 137-142.

7. Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S., Wood W.B., McCarty M. Tratado de microbiología, Salvat editores, Barcelona España 1979;662, 686-687, 1066.

8. Diaz C., González M., Jiménez E. y Sthephano A. Identificación de diferentes serotipos de Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae aislados en México de cerdos con pleuroneumonia de 1985 a 1988. Vet. Méx. XX. 2:1989; 157-160.

9. Finney D.J. The median lethal dose and its estimation. Arch. Toxicol. 56:1985; 215-218.

10. Frey J., Nicolet J. Hemolysin patterns of Actinobacillus pleuropneumoniae. J. Clin. Microbiol. 28:1990; 232-236.

11. Gunnarson A., Hervell B. and Biberstein E.L. Serologic studies on porcine strain of H. parahemolyticus (pleuropneumoniae): Agglutination reactions. Am. Jour. Vet. Res. 38:1977; 1111-1114.

12. Hansen E.J., Gulig P.A., Robertson S.M., Frish C.F., Hanes E.J. Immunoprotection of rats against Haemophilus influenzae type b disease mediated by monoclonal antibody against a Haemophilus outer-membrane protein. The Lancet, 1982; 366-367.

13. Inzana T.J., Mathison B. Type-specificity and immunogenicity of the capsular polymer of Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae. Infect. Immun. 55:1987; 1580-1587.

14. Jones M.A. Haemophilus pleuropneumoniae infection in pigs. The Veterinary Manual. 24 ed. scientechnica 1984.

15. Kendrick P.L., Eldering G., Dixon M.K. and Misner J. Mouse protection test in the study of pertussis vaccine: a comparative series using the intracerebral route for challenge. A. J. Public Health. 37:1947; 803.

16. Killian M., Nicolet J. and Biberstein E.L. Biochemical and serological characterization of Haemophilus pleuropneumoniae (Mathews and Patisson, 1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain. Int. J. Syst. Bacteriol. 28:1978; 20-26.

17. Komal J.P.S. and Mittal K.R. Grouping of Actinobacillus pleuropneumoniae strain of serotypes 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. Vet. Microbiol. 25:1990; 229-240.

18. Kume K. Efficacy of Haemophilus pleuropneumoniae vaccine in pigs. Jpn. Vet. Snci. 44:1985; 201-206.

19. MaccFaddin F.J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica., Ed. Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 1980; 274.

20. Nakai T., Sawata A., Kume K. Pathogenicity of Haemophilus pleuropneumoniae for Laboratory animals and possible role of its hemolysin for production of pleuropneumonia. Jpn. J. Vet. Sci. 46:1984; 851-858.

21. Nicolet J. Sur l'hémophilose du porc. III. Differentiation serologique H. parahemolyticus Zentralbl. Bakteriol. (1): 216:1986; 487-895.

22. Nicolet J. Haemophilus pleuropneumoniae bacteriology and epidemiology. Compendium on swine Haemophilus pleuropneumoniae Roy Schultz. Ed. Avoca, Iowa. 1985; 7-11.

23. Nielsen R. Diagnosis, Immunity and control of Haemophilus pleuropneumoniae. Compendium on swine Haemophilus pleuropneumoniae Roy Schultz. Ed. Avoca, Iowa. 1985; 18-22.

24. Nielsen R., Mandrup M. Pleuropneumonia in swine caused by Haemophilus parahaemolyticus. A study of the epidemiology of the infection. Nord. Vet. Med. 29:1977; 465-473.

25. Nielsen R. Serological and immunological studies of pleuropneumonia of swine caused by Haemophilus parahemolyticus. Acta. Vet. Scand. 15:1974; 80-89.

26. Nielsen R. Pleuropneumonia of swine caused by H. parahemolyticus. Studies on the protection obtained by vaccination. Acta. Vet. Med. 23:1976; 337-348.

27. Nielsen R. H. parahemolyticus serotypes Pathogenicity and cross immunity. Nord. Vet. Med. 31:1979; 413-417.

28. Nielsen R. Serological characterization of 8 H. pleuropneumoniae strains and proposal of new serotype: 8 Acta. Vet. Scand. 25:1984; 93-106.

29. Nielsen R. Serological characterization of Haemophilus pleuropneumoniae strains and proposal of a new serotype: serotype 9. Acta. Vet. Scand. 26:1985; 501-512.

30. Nielsen R. Serological characterization of Haemophilus pleuropneumoniae (Actinobacillus pleuropneumoniae) strains and proposal of a new serotype: 10. Acta. Vet. Scand. 26:1985; 581-585.

31. Nielsen R. Serological characterization of A. pleuropneumoniae and proposal of a new serotype: serotype 12. Acta. Vet. Scand. 26:1986; 453-455.

32. Reed L.J. and Munch. A simple method of estimating 50 percent endpoints. Am. J. Hyg. 27:1938;493-497.

33. Robinson A. Potency testing of cellular pertussis vaccines. Vaccine, 10:1992; 139-141.

34. Rosendal S. and Boyd D.A. H. pleuropneumoniae serotyping. Jour. Clin. Microbiol. 16:1982; 840-843.

35. Rosendal S. and Boyd D.A, Gilbride K.A. Comparative virulence of porcine Haemophilus bacteria. Can. J. Comp. Med. 49:1985; 68-74.

36. Sanford S.E. and Josephson G.K.A. Porcine Haemophilus pleuropneumonia epizootic in southwestern Ontario. Clinical, microbiological, pathological and some epidemiological findings. Can. J. Comp. Med. 45:1981; 2-7.

37. Schultz R.A. Haemophilus pleuropneumoniae infections of swine: Prevalence, treatment control and prevention. Annual Meeting of American Association of swine Practitioners. Des Moines Iowa 1985: 34-38.

38. Sebunya T.N.K. and Saunders J.R. Studies on immunity to Haemophilus pleuropneumoniae infections in mice. Am. J. Vet. Res. 43:1982; 1793-1798.

39. Shope R.E. Porcine contagious pleuropneumoniae I. Experimental transmission, etiology and pathology. J. Exp. Med., 119: 1964; 357-368.

40. Swenson M.J. Dukes' Physiology of Domestic Animals. Cornell University Press LTD, London 1984, 10a. ed., pp 28.

41. Tanzer J.M. Animals Models in Cariology. Information Retrieval Inc. USA 1981, pp 5-10.

42. Zbinden G., Flury-Roversi M. Significance of the LD 50-test for the toxicological evaluation of chemical substances. Arch. toxicol. 47:1981; 77-99.