

25  
2eje



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD  
INMUNIZANTE DE CELULAS VIVAS DE  
Actinobacillus pleuropneumoniae SEROTIPOS  
1, 3, 5, 7, 9 Y 12 EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL DE LA INFECCION:  
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 N :  
MARIA DE LOURDES HERRERA DIAZ  
EDITH MONTIEL VAZQUEZ

**Asesores:**

Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo  
M. C. Gabriela Barcenas Morales

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1994

**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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
SECRETARIA ACADEMICA  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT\*N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Evaluación de la actividad inmunizante de células vivas de

Actinobacillus pleuropneumoniae serotipos 1,3,5,7,9 y 12

en un modelo experimental de la infección en la rata.

que presenta la pasante: Herrera Díaz María de Lourdes  
con número de cuenta: 8205791-0 para obtener el TITULO de  
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con  
Montiel Vázquez Edith

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 11 de Octubre de 1993

PRESIDENTE	<u>Dr. Juan A. Montaraz Crespo</u>	<i>[Firma]</i>
VOCAL	<u>Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya</u>	<i>[Firma]</i>
SECRETARIO	<u>Dr. Marco A. Vega López</u>	<i>[Firma]</i>
PRIMER SUPLENTE	<u>M.enC. Alma V. Lara Sarahón</u>	<i>[Firma]</i>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.enC. Víctor M. Zendejas Buitron</u>	<i>[Firma]</i>

*[Firma]*  
*[Firma]*  
*[Firma]*  
*[Firma]*  
*[Firma]*



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C-

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Evaluación de la actividad inmunizante de células vivas de  
Actinobacillus pleuropneumoniae serotipos 1,3,5,7,9 y 12  
en un modelo experimental de la infección en la rata.

que presenta la pasante: Montiel Vázquez Edith  
con número de cuenta: 8309398-6 para obtener el TÍTULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :  
Herrera Díaz María de Lourdes

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 11 de Octubre de 1993

PRESIDENTE Dr. Juan A. Montaraz Crespo

VOCAL Q.F.I. Andrea Becerril Osaya

SECRETARIO Dr. Marco A. Vega López

PRIMER SUPLENTE M.enC. Alma V. Lara Sagahón

SEGUNDO SUPLENTE M.enC. Victor M. Zendejas Eutrón

*[Handwritten signatures and initials over the list of names]*

*Nuestro más sincero agradecimiento al Director  
y Coasesor de Tesis:*

*Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo*

*M.C. Gabriela Barcenas Morales*

*por habernos proporcionado su ayuda y colabora  
ción en la realización de este trabajo.*

*La distancia física que nos separa representa un abismo,  
pero no existe distancia espiritual entre tu y yo, porque  
siempre estamos juntos y tu recuerdo guía mi camino.*

*Con todo mi amor y mi veneración, dedico este trabajo  
a la memoria de mi padre el Sr. Rodolfo Eustorgio Montiel  
Cedeño, de sus enseñanzas y de su infinito amor paternal.*

Mi eterno agradecimiento a mi madre: la Sr. María Reyes Vázquez Vda. de Montiel porque día a día me entrega todo su amor.

• Profra. Silvia Montiel Vázquez  
• Lic. Ma. Leticia Montiel Vázquez  
• Sec. Araceli Montiel Vázquez

Con amor y agradecimiento a mis tres queridas hermanas, porque siempre me apoyaron y me motivaron para la realización de esta Tesis.

Estas líneas, las dedico a Ma. de Lourdes Herrera Díaz gracias por tu amistad y tu apoyo.

## I N D I C E

I.	LISTA DE ABREVIATURAS .....	I
II.	INDICE DE TABLAS .....	II
III.	INDICE DE FIGURAS .....	III
IV.	RESUMEN .....	IV
		Pag
1.	INTRODUCCION .....	1
1.1.	Antecedentes .....	1
1.2.	Características Bioquímicas .....	4
1.3.	Factores de Virulencia .....	6
1.4.	Patogenesis .....	10
1.5.	Serotipificación y diagnóstico .....	14
1.6.	Reactividad Inmunológica Cruzada .....	16
1.7.	Vacunas e Inmunidad .....	18
2.	OBJETIVOS .....	23
3.	MATERIAL Y METODOS .....	24
3.1.	Cepas Bacterianas .....	24
3.2.	Cultivo y Cuantificación de A.p. ....	24
3.3.	Preparación del Inmunógeno .....	26
3.4.	Dosis de Desafío .....	27

3.5. Prueba de Aglutinación en Tubo .....	27
3.6. Modelo Experimental .....	29
4. RESULTADOS .....	32
4.1. Cuentas Viables .....	32
4.2. Mortalidad de las Progenies Desafiadas .....	34
4.3. Títulos de Anticuerpos .....	52
5. DISCUSION .....	54
6. CONCLUSION .....	59
7. BIBLIOGRAFIA .....	60

## I. LISTA DE ABREVIATURAS

- A. p. = Actinobacillus pleuropneumoniae  
D.O. = Densidad Optica  
NAD = Dinucleotido de Nicotinamida  
DL 50 = Dosis letal 50%  
C = Grados Centígrados  
BHI = Infusión Cerebro - Corazón  
LPS = Lipopolisacarido  
ul = Microlitros  
nm = Nanometros  
PS = Polisacárido  
rpm = Revoluciones por minuto  
SSF = Solución Salina Fisiológica  
UFC/ml = Unidades Formadoras de Colonias por mililitro

## II. INDICE DE TABLAS

	Pag.
1. CUENTAS VIABLES DE <u>Actinobacillus pleuropneumoniae</u> SEROTIPOS 1, 3, 5, 7, 9 y 12 .....	33
2. MORTALIDAD DE LA PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON <u>A. pleuropneumoniae</u> serotipo 1 .....	35
3. MORTALIDAD DE LA PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON <u>A. pleuropneumoniae</u> serotipo 3 .....	38
4. MORTALIDAD DE LA PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON <u>A. pleuropneumoniae</u> serotipo 5 .....	41
5. MORTALIDAD DE LA PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON <u>A. pleuropneumoniae</u> serotipo 7 .....	44
6. MORTALIDAD DE LA PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON <u>A. pleuropneumoniae</u> serotipo 9 .....	47
7. MORTALIDAD DE LA PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON <u>A. pleuropneumoniae</u> serotipo 12 .....	50

8. TITULOS DE ANTICUERPOS EN RATAS INMUNIZADAS .....	53
--	----

### III. INDICE DE FIGURAS

	Pag
1. DIAGRAMA DE FLUJO .....	31
2. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON A.P. SEROTIPO 1 .....	36
3. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON A.P. SEROTIPO 3 .....	39
4. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON A.P. SEROTIPO 5 .....	42
5. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON A.P. SEROTIPO 7 .....	45
6. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON A.P. SEROTIPO 9 .....	48
7. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON A.P. SEROTIPO 12 .....	51

## VI. RESUMEN

La pleuroneumonía porcina causada por Actinobacillus pleuropneumoniae es una enfermedad de gran importancia a nivel mundial.

En los últimos 20 años los estudiosos de éste problema se han dedicado a investigar diferentes aspectos relacionados con la enfermedad y el agente etiológico. Se han propuesto diferentes modelos experimentales de la infección con animales de laboratorio encaminados a replicar la infección y buscar alternativas de mejoramiento en el control y cura de la enfermedad. Sin embargo el problema se complica debido a la presencia de 12 diferentes serotipos bacterianos.

En el presente trabajo se propone un modelo experimental de pleuropneumonía producida por Actinobacillus pleuropneumoniae en ratas Wistar de 8 días de nacidas.

Se inmunizaron ratas hembras jóvenes con células vivas de 6 serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae, se aparearon y se esperó el nacimiento de las progenies para ser desafiadas con serotipo 1, evaluando así el efecto inmunizante de células vivas de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1, 3, 5, 7, 9 y 12 contra el desafío con un serotipo heterólogo.

Los resultados indicaron que los serotipos 5, 7, y 9 inducen inmunidad polivalente protectora con respecto al serotipo 1, siendo evidente una mejor protección con los serotipo 5 y 9.

Se concluye que es posible replicar el fenómeno de inmunidad polivalente inducido con bacterias vivas usando a la rata como modelo experimental.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Antecedentes

Actinobacillus pleuropneumoniae es un importante patógeno primario causante de pleuroneumonía, esta enfermedad es altamente contagiosa en cerdos de todas las edades, afectando principalmente el crecimiento normal de cerdos de 2 a 6 semanas de nacidos. Esta enfermedad afecta la porcicultura en todo el mundo, ya que el crecimiento indiscriminado de la misma, trae consigo elevados niveles de mortalidad, y por lo tanto, disminución de la producción traduciendo esto en considerables pérdidas económicas (5,6,7).

La infección en cerdos causada por el genero Haemophilus, ha sido reconocida desde hace muchos años y se han descrito diferentes especies. Glässer en 1910 (16) describe un bacilo en sueros de exudaciones de la enfermedad que llevaba su nombre. Schermer y Ehrlich en 1922 (16), aislan por primera vez el bacilo causante de la enfermedad de Glässer. Shanks 1939 (16) en Irlanda del Norte aisla un Haemophilus influenzae suis. Pattison, Howell y Elliot en 1957 (16), describen a un Haemophilus como la causa de neumonía en cerdos, y lo identifican en 1961 como Haemophilus parainfluenzae (9,16).

Biberstein y Cameron también en 1961 (16) reportan la existencia de una enfermedad septisémica en cerdos de California causada por un Haemophilus dependiente de factor V. Estos reportes fueron ampliados por Olander en 1963 (16) quien describió e identificó al organismo causal como Haemophilus parahaemolyticus. La enfermedad fue caracterizada como aguda y mortal, con artritis sobreaguda, disturbios nerviosos y neumonía aguda crónica (9,16).

Shope en 1964 (9,16) nombro Haemophilus pleuropneumoniae al agente etiológico de la pleuroneumonía aguda causante de la muerte masiva de cerdos (9,16).

Olander, 1963 y Nicolet en 1968 (16,36) demuestran que Haemophilus parahamolyticus y Haemophilus pleuropneumoniae eran idénticos (16,36).

Así mismo Kilian en 1976 (9,25,29) detectó diferencias entre las características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos procedentes de cultivos de origen humano y porcino; en base a estas diferencias y a que la pleuroneumonía es el cuadro principal que causa el microorganismo de origen porcino, Kilian propuso dar el nombre de Haemophilus pleuropneumoniae (9,25,29).

En todo el mundo, a partir de la década de los 70's, surgió el interés por Haemophilus pleuropneumoniae incrementándose el número de reportes de éste agente, asociado con severos brotes de pleuropneumonía en Europa, Australia, Taiwan, Japón, Estados Unidos y Canadá (16,36).

La enfermedad se transmite por vía respiratoria entre animales enfermos y sanos, puede presentarse en forma aguda o crónica en cerdos infectados natural o experimentalmente (14).

Esta enfermedad es fatal en los animales que la padecen, y los cerdos que sobreviven sufren problemas en el crecimiento normal y frecuentemente son portadores asintomáticos, siendo una importante fuente de transmisión debido a que poseen a Actinobacillus pleuropneumoniae en tracto respiratorio superior (6,7,16,20).

La pleuroneumonía porcina está siendo controlada por vacunación o programas de control que consisten en evitar la movilización de los animales en la granja, así como la eliminación de cerdos infectados. Estas medidas de control requieren del conocimiento de los serotipos prevalentes en la zona afectada, sin embargo todas estas medidas resultan ser insuficientes.

Por otra parte la eficiencia de la inmunoprofilaxis está en función de diferentes factores como son el uso de vacunas preparadas con cepas y serotipos homólogos, la vía de vacunación, la dosis, el estado inmune del animal, pero sobre todo la protección inducida por la vacuna (25,32).

## 1.2. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS Y MORFOLOGICAS

Actinobacillus pleuropneumoniae es una bacteria anaerobia facultativa, pleomorfica que se agrupa en pares, en cadenas cortas o en formas filamentosas en cultivos viejos, es una bacteria inmóvil, no esporulada, mide de 0.5 a 1.5 micras, es Gram negativa y requiere de factor V (dinucleótido nicotiamida) o suero para su crecimiento. Es una bacteria capsulada, lo cual le facilita la colonización de tejidos y le provee protección contra los mecanismos de defensa del hospedero.

Actinobacillus pleuropneumoniae suele producir colonias lisas, mucoides, redondas, translúcidas, convexas y brillantes en BHI. Es una bacteria beta-hemolítica, fermentadora de varios azúcares sin producción de gas (8,14).

Actinobacillus pleuropneumoniae produce dos tipos de hemolisinas que reaccionan sobre glóbulos rojos de carnero o bovino, siendo ésto evidente al formar zonas de marcada hemólisis en placas de agar sangre, la cual es una característica de las bacterias Gram negativas anaerobias facultativas. También da prueba de CAMP positiva lo cual es un importante criterio en la diferenciación de éste y otros Haemophilus spp en cerdos (5,6,7,8,9,12,39).

Los medios de cultivo que requiere para su aislamiento deben ser ricos, tales como BHI, Todd-Hewit, gelosa sangre, gelosa chocolate y soya tripticaseina enriquecidos con 0.01% de NAD y 1% de extracto de levadura. Al aislar una cepa de Haemophilus en BHI o gelosa sangre es necesario utilizar una cepa nodriza de Staphylococcus aureus la cual proporciona el factor V, el tamaño de las colonias bacterianas va disminuyendo conforme se aleja de la cepa nodriza, fenómeno conocido como satelitismo (8).

La resistencia de A. pleuropneumoniae a factores físicos y químicos es muy variable. En agua es viable durante 3 horas, el formol al 0.25 % lo inactiva, puede mantenerse en los medios habituales para su crecimiento a nivel de laboratorio, mediante pases durante 5 días en cultivos jóvenes(3,25,26).

El género Haemophilus está compuesto por tres especies diferentes de importancia veterinaria en la industria porcina: H. pleuropneumoniae, H. suis y H. parasuis los cuales se pueden diferenciar con pruebas bioquímicas.

### 1.3. FACTORES DE VIRULENCIA

La virulencia de las diferentes cepas y serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae varía considerablemente y es posible que esté en relación a la composición y estructura de la cápsula, o bien con la cantidad de cápsula adherente a la célula y del material tóxico (12).

La infección con cepas virulentas desarrolla una severa pleuroneumonía necrohemorrágica mientras que la infección con cepas avirulentas no causa lesiones a dosis similares (12).

Se ha reportado que las cepas de los serotipos 1 y 5 son más virulentas que las cepas de los serotipos 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9 (39).

Dentro de los factores de virulencia podemos encontrar:

a) Un par de exotoxinas: una hemolisina termolábil y una citotoxina que produce necrosis (39).

b) Una endotoxina termoestable (LPS) la cual produce neumonía variable (39).

c) La cápsula.

La virulencia de A. pleuropneumoniae se relaciona principalmente con determinantes antigénicos de origen capsular. Las cepas virulentas de A. pleuropneumoniae poseen cápsulas adherentes,

lo cual se ha comprobado por microscopia electrónica, las cuales son capaces de proteger a la bacteria contra la acción bactericida del complemento y los anticuerpos. Por otra parte facilita la colonización o proliferación bacteriana.

El polisacárido capsular confiere especificidad a la bacteria, y es posible que esté involucrado en la fijación de la cápsula a la pared celular; contiene gran cantidad de hexosas principalmente glucosa. Es de naturaleza hapténica y requiere la presencia de un antígeno termolábil que le sirva como acarreador para inducir una buena o eficiente respuesta inmune humoral. La pérdida de la cápsula contribuye a la variación de fase de colonia lisa o rugosa y a la pérdida de la virulencia (25,33).

Devenish identificó dos hemolisinas que son comunes en todos los serotipos de A. pleuropneumoniae, mientras que Kamp y Van Leengoed identificaron una hemolisina termolábil común en serotipos 1, 5, 9, 10 y 11; y una citotóxica termolábil en todos los serotipos excepto en el 6 (5,19,39).

La actividad de las hemolisinas así como la de los LPS (lipopolisacáridos) se asocian con la virulencia de A. pleuropneumoniae. Esta demostrado que las hemolisinas extracelulares de A. pleuropneumoniae son filtrables a través de membranas de 0.22 micras, son termoestables, resistentes a la formalina y a la actividad proteolítica, se encuentran presentes en los sobrena-

dantes de cultivos bacterianos frescos y son capaces de producir severas lesiones pulmonares hemorrágicas similares a las inducidas por células viables, al inocularse intraperitonealmente en ratones (12,19,20).

Se ha establecido que el LPS de Actinobacillus pleuropneumoniae está implicado en la patogenesis de la infección en cerdos, principalmente en la lesión pulmonar (6,12).

El LPS de las bacterias Gram negativas, como el de Actinobacillus pleuropneumoniae está constituido por heptosa, 2-ceto-3-desoxioctanato, lipido A, glucosamina y ácidos grasos, es toxico y altamente inmunogenico (2,3,6,7), sin embargo, está demostrado que una significativa respuesta inmune contra el LPS de Actinobacillus pleuropneumoniae ocurre sólo como resultado de la infección, viendose muy limitada cuando se inmuniza con bacterinas (3,7).

Mittal ha establecido que los antígenos termoestables del LPS de Actinobacillus pleuropneumoniae requieren la presencia de antígenos termolábiles, probablemente proteínas para ser inmunogenicos e inducir una significativa respuesta inmune humoral tipo-especifica contra estos antígenos. Lo cual se observa al utilizar bacteria completa (7).

El daño que un componente de superficie toxico semejante al LPS puede causar en el tejido del hospedero, depende de la cantidad en la que es liberado durante la infección (39).

Las cepas virulentas contienen aproximadamente 10 mg más de LPS por gramo que las cepas avirulentas. También se ha sugerido que la porción somática del LPS de cepas virulentas poseen un grupo inmunodeterminante dominante, mientras que las avirulentas poseen dos (12).

#### 1.4. PATOGENESIS

Actinobacillus pleuropneumoniae es el agente etiológico de pleuroneumonía en cerdos, ésta enfermedad respiratoria es severa y generalmente de consecuencias fatales. Los cerdos infectados desarrollan una aguda pleuroneumonía fibrinohemorrágica necrotizante o una necrosis pulmonar localizada con adhesiones pulmonares (6).

La enfermedad causada es transmitida por vía respiratoria mediante aerosoles entre animales enfermos y sanos o, a partir de casos inaparentes, siendo éstos una importante fuente de transmisión debido a que poseen al A. pleuropneumoniae como un comensal en tracto respiratorio superior, de tal forma que pueden diseminarlo a través de aire, agua o alimentos contaminados expandiéndose la enfermedad rápidamente en toda la piara (6,40).

Durante el desarrollo de la enfermedad, se pueden presentar tres cuadros clínicos diferentes: una forma sobreaguda, una aguda y una crónica; todo esto en función de la virulencia del agente infectante, la dosis infectiva, el estado inmune del animal infectado y el estado de estrés causado por adversidades en las condiciones ambientales (3,6,7).

La forma sobreaguda es la más común de las infecciones primarias, se caracteriza por presentar temperaturas de 41 C , som-

nolencia, anorexia, disnea y una intensa respuesta inflamatoria evidenciada por hemorragia, edema, fibrosis, exudación por un aumento en la permeabilidad vascular y una infiltración de neutrófilos en tejido pulmonar, y finalmente la muerte a las 24 horas. La forma aguda es menos fulminante y se caracteriza por fibrosis pleural hemorrágica necrotizante, bacteremia y complicaciones como meningitis, artritis, endocarditis y abscesos en varios tejidos. La evolución de ésta forma puede llevar a la cronicidad o dar lugar a la muerte en uno o dos días. La forma crónica es difícil de diagnosticar clínicamente ya que los animales infectados suelen ser portadores asintomáticos, en estos casos la enfermedad se presenta en forma localizada y necrotizante (3,6).

Las evidencias implican a los polisacáridos capsulares, el lipopolisacárido (endotoxina), las hemolisinas y otras proteínas de membrana en la patogenesis de la enfermedad (3).

A diferencia de los cerdos, los animales de laboratorio no son hospederos naturales del Actinobacillus pleuropneumoniae, sin embargo, algunos de ellos (como el ratón y la rata) son utilizados como modelos experimentales ya que es posible reproducir la infección o las lesiones pulmonares producidas por A. pleuropneumoniae, todo esto en función de la vía de inoculación (12,20).

En los animales de laboratorio la muerte por A. pleuropneumoniae ocurre a los dos días postinoculación, y las lesiones

hemorrágicas pulmonares que se observan son similares en cuanto a severidad y patogenicidad a las lesiones inducidas en cerdos infectados natural o experimentalmente en su forma aguda; así mismo es posible recuperar a la bacteria de las lesiones pulmonares y de muestras sanguíneas (12,20).

Rosendal ha demostrado que tanto las hemolisinas contenidas en los sobrenadantes de cultivos de A. pleuropneumoniae así como las bacterias muertas por sonicación y administradas por vía endobronquial en cerdos, inducen una neumonía aguda localizada. Estos mismos factores administrados intraperitonealmente en ratones, inducen lesiones pulmonares hemorrágicas, las cuales son similares microscópicamente a las que se producen en cerdos infectados en forma natural. Este tipo de toxinas pueden ser neutralizadas por anticuerpos presentes en el suero de cerdos con infección crónica (1,20).

En 1964 Shope reportó que los cerdos inoculados subcutáneamente con organismos vivos de A. pleuropneumoniae desarrollan inmunidad contra una subsecuente infección intranasal (14).

Sebuya y Sauder desarrollaron un modelo para la pleuroneumonía porcina en ratones, a los cuales inocularon vía intranasal, produciéndoles lesiones pulmonares hemorrágicas tanto en forma aguda como en forma crónica (20). Así mismo indujeron la

enfermedad mediante la inoculación intraperitoneal o intranasal con células viables (20).

Se ha demostrado "in vitro" e "in vivo" que la bacteria viva es tóxica para las células pulmonares, monocitos de sangre periférica y células testiculares, lo cual contribuye al rápido y fulminante curso de esta enfermedad (1,12).

La administración intravascular o intraperitoneal de la endotoxina (LPS) resulta en la secuestro de neutrófilos en el parénquima pulmonar, los capilares endobronquiales incrementan la permeabilidad y la deposición de fibrina, también se ha observado que la endotoxina está presente en la sangre (39).

### 1.5. SEROTIPIFICACION Y DIAGNOSTICO

Hasta el momento se han reportado 12 serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae (Nielsen, y O'Connor 1984), los cuales son reconocidos con base a polisacaridos capsulares (26,28).

La serotipificación así como el aislamiento y el diagnóstico serológico de A. pleuropneumoniae son importantes en la prevención y control de la pleuroneumonía porcina. Para ello se han desarrollado una amplia variedad de pruebas de laboratorio tales como: prueba de aglutinación, inmunodifusión, inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta, utilizando para ello células completas y sueros polivalentes correspondientes a antígenos capsulares (12,16,25,27,32).

Está establecida la importancia de los antígenos termoestables y termolábiles en la serotipificación de A. pleuropneumoniae así como en el diagnóstico del mismo (6,7,9).

Las notables diferencias entre la respuesta inmune inducida por la infección así como por la inmunización con A. pleuropneumoniae, y entre los diferentes serotipos y diferentes cepas sugieren el uso potencial de subunidades polisacáridas de pared celular en el diagnóstico serológico de la infección, así como en la serotipificación de los aislamientos de A. pleuropneumoniae (6).

La serotipificación de aislamientos de A. pleuropneumoniae se realiza usualmente por pruebas de aglutinación en tubo, requiriéndose para ello células completas capsuladas en fase mucoide y antisueros de conejo (9).

## 1.6. REACTIVIDAD INMUNOLOGICA CRUZADA

Las reacciones cruzadas entre los diferentes serogrupos de Actinobacillus pleuropneumoniae se atribuyen a antígenos termolábiles y termoestables en particular a inmunodeterminantes localizados en los LPS ( antígenos tipo-específicos) de la pared celular para los cuales se observa una significativa respuesta inmune humoral y celular, como resultado de la infección natural, la cual no es inducida por inmunización con bacterinas (6,7,9,12,29).

Todas las cepas de A. pleuropneumoniae desde el serotipo 1 hasta el 12 (Nielsen 1985), son antigénicamente homogéneos y serológicamente diferentes, poseen dos antígenos tipo-específicos de origen capsular, así como antígenos comunes especie-específicos termoestables asociados a pared celular (9,25,26,27,28).

Los reportes que hasta el momento se tienen sobre reactividad serológica cruzada, indican que existe una más estrecha relación entre serotipo 1,9 y 11, que entre éstos tres serotipos y los serotipos 2,3,4,5,6,7 y 8. Las reacciones cruzadas entre serotipos 1, 9 y 11 están en función de antígenos tipo-específicos ubicados en el antígeno somático del LPS (epitopos carbohidratos termo-estables), mientras que no se observan éstas reacciones cuando se trabaja con determinantes antigénicos de natura-

leza polisacarida capsular (2,23,24,25,26,27).

También se ha establecido que existe una relación más estrecha entre los serotipos 3, 6 y 8 que entre éstos y los serotipos 1, 2, 4, 5, 7, 9 y 11 (2,23,24,25,26,27).

El serotipo 8 comparte antígenos capsulares serotipoespecíficos con los serotipos 3 y 6. Los antígenos compartidos entre serotipo 8 y 6 son de origen polisacarido mientras que los compartidos por serotipos 8 y 3 son de naturaleza LPS. (25)

Se sugiere también que los serotipos 1, 2, 4 y 5 inducen inmunidad polivalente en cerdos experimentalmente expuestos al A. pleuropneumoniae por via intranasal, lo cual se comprueba ante el desafio con serotipos heterólogos. Sin embargo sólo es posible recuperar el serotipo de inmunización y no el de desafio de los animales muertos, ésto con la excepción de que el serotipo de desafio sea el serotipo 1 (23,24).

### 1.7. VACUNAS E INMUNIDAD

La pleuropneumonia contagiosa porcina es una enfermedad que ataca a cerdos de cualquier edad, sin embargo afecta generalmente a cerdos en crecimiento entre 4 y 16 semanas de edad (41). Esto se debe a que todos los animales son muy susceptibles de adquirir enfermedades al nacer, por lo cual la naturaleza ha proporcionado el medio de transferir inmunidad o resistencia de la madre a su progenie. Esta resistencia desarrollada por la madre y transferida a la progenie inicialmente por vía trasplacentaria es debida a la producción de anticuerpos después de haber estado expuesta a la infección. Después del nacimiento el calostro materno contiene los anticuerpos que la cerda ha desarrollado en la sangre y el lechón obligadamente tiene que tomar por ser la única forma de que adquiera la inmunidad a las enfermedades que su madre a desarrollado en su propio organismo. La naturaleza de este calostro cambia en el transcurso de 48 horas perdiendo casi por completo el contenido de anticuerpos, por lo que el lechón que no reciba calostro es muy probable que sucumba ante una infección (45,46).

La gammaglobulina calostrada es absorbida intacta por las células que cubren el tracto intestinal y pasan inmediatamente a la corriente sanguínea lo cual se comprueba al titular anticuerpos a los pocos minutos de haber mamado (45,46).

Las principales causas que afectan la transferencia de inmunidad de la madre a la progenie son: que el lechón no ingiera calostro materno durante las 48 horas que siguen al parto o que la madre padezca enfermedades crónicas o subclínicas ya que éstas sólo desarrollan una inmunidad reducida o baja la cual no es protectora para las crías (45,46).

En la búsqueda de protección artificial contra la pleuroneumonía porcina, se recurre a la vacunación con bacterinas que contienen células completas de la combinación de diferentes serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae. Inactivadas químicamente y emulsionadas con adyuvantes, éstas bacterinas confieren inmunidad contra las células pero no necesariamente contra los productos de secreción involucrados en la patogénesis de la enfermedad en su forma aguda (5,14).

La inmunidad proporcionada por las bacterinas empleadas, reduce la mortalidad y severidad de la enfermedad sin prevenir la incidencia de portadores asintomáticos. La inmunización de cerdos con vacunas de células completas de A. pleuropneumoniae de cultivos bacterianos de más de 18 horas provee escasa protección ante la enfermedad, siendo ésta serotipo y posiblemente de cepa específica. Por el contrario, las vacunas producidas con cultivos jóvenes inducen mayor protección pero frecuentemente son más tóxicas. La mayor protección de este tipo de vacunas, está en

función de la exposición de componentes celulares subcapsulares y debido a que son antígenos de reactividad cruzada entre diferentes serotipos, produciéndose así una protección serotipo independiente, mientras que la mayor toxicidad se debe a la presencia de componentes tóxicos de pared celular, probablemente lipopolisacáridos que se exponen durante la rápida división celular (6).

Las subunidades polisacáridas de la pared celular de A. pleuropneumoniae juegan un papel importante en la respuesta inmune porcina después de la infección, mientras que la inmunización con vacunas de células completas no induce una significativa respuesta inmune contra éstos antígenos (6,7).

Los trabajos de Fenwick han demostrado que el LPS de la pared celular de A. pleuropneumoniae son importantes inmunógenos tipo específico que inducen una eficiente respuesta inmune humoral. Sin embargo, esto sólo ocurre como resultado de la infección natural, pero no es inducida por la inmunización con bacterinas. Así también los inmunodeterminantes que se encuentran localizados en el LPS, son antígenos de reactividad cruzada entre los diferentes serotipos capsulados de la bacteria (6,7)

Se ha establecido también que los antígenos polisacáridos termoestables extraídos de A. pleuropneumoniae no son capaces de producir anticuerpos tipo-específicos, no obstante los anticuerpos específicos para estos antígenos están presentes en el anti-

siero producido contra los organismos enteros, lo cual sugiere que éstos antígenos termoestables requieren antígenos termolábiles (probablemente proteínas) como acarreadores para ser inmunogénicos. Otro hallazgo importante en relación a lo anterior es que la respuesta inmune se ve mejorada cuando, para vacunar, se emplean oligosacaridos purificados acompañados con proteínas acarreadoras (toxoides tetánico) (7).

Una propuesta para mejorar la funcionalidad de las vacunas contra A. pleuropneumoniae y prevenir eficazmente la pleuropneumonia porcina, es reducir la toxicidad de los LPS, tratando de retener sus características antigénicas e inmunogénicas.

Muchos han sido los estudios hasta el momento realizados tanto en el hospedero natural como en animales de laboratorio para descubrir los antígenos involucrados en la protección inmune especie específica. Se han empleado diversos inmunógenos tales como polisacáridos capsulares, LPS, proteínas de membrana externa, hemolisina y conjugados entre estos mismos. Se han realizado también desafíos con serotipos heterólogos tras inmunizaciones previas, y sin embargo continúa sin dilucidarse cuáles y cuántos son los determinantes antigénicos responsables de la reacción inmunológica cruzada capaces de proteger a los animales contra la infección natural o experimental causada por cualquiera de los 12 serotipos hasta el momento conocidos.

La enorme diversidad antigénica de 12 serotipos de Actinoba-

cillus pleuropneumoniae y las dificultades inherentes a la experimentación con el hospedero natural, hacen necesario el desarrollo de un modelo experimental que permita el análisis sistemático de las características antigénicas de los diferentes serotipos de la bacteria con miras a desarrollar un inmunógeno polivalente (42).

Es importante mencionar que ningún modelo experimental es completamente ideal, debido a que no existe un 100% de semejanza inmunológica entre dos especies animales. Existen reportes en los cuales se ha inducido la infección en ratas por vía intraperitoneal e intratraqueal con Actinobacillus pleuropneumoniae, observándose que a las 12 horas post-inoculación los animales mueren por bacteremia, desarrollando severas lesiones hemorrágicas similares a las inducidas en el pulmón del cerdo por vía intratraqueal (14,20).

El presente trabajo de investigación se ubica en la búsqueda por conocer la actividad inmunizante de células vivas de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipos 1,3,5,7,9 y 12 en ratas hembras adultas para posteriormente obtener de ellas una progenie inmunizada y desafiarla a los 8 días de nacidas con células vivas de un serotipo heterólogo (serotipo 1) que es uno de los serotipos de prevalencia en México (Ciprian, C. A. 1988, Diaz, C. 1989) (42).

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad inmunizante de un cultivo vivo de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipos 1, 3, 5, 7, 9 y 12 contra un desafío con Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1, en la rata como modelo experimental de la infección.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

Inmunizar ratas hembras adultas jóvenes, con cultivos frescos de células vivas de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipos 1, 3, 5, 7, 9 y 12. Para posteriormente obtener de ellas una progenie inmunizada positivamente en forma homóloga.

Desafiar a la progenie de ratas hembras inmunizadas con 4 diferentes dosis de células vivas de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1 a los ocho días de edad.

Determinar la presencia de anticuerpos aglutinantes contra el serotipo homólogo y heterólogo en los sueros de las ratas hembras inmunizadas.

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 CEPAS BACTERIANAS

Se trabajó con 6 serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae los cuales se describen en el cuadro A. Las cepas se conservaron a -196°C.

#### 3.2 CULTIVO Y CUANTIFICACION DE A. pleuropneumoniae

Cada uno de los diferentes serotipos de A. pleuropneumoniae fue cultivado en agar chocolate complementado con 0.01% de dinucleotido de nicotinamida (NAD), a 37°C durante 24 h.

Posteriormente se cosechó con solución salina fisiológica estéril. La suspensión obtenida se colocó en tubos estériles. Se procedió a agitar y leer en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm, usando como blanco SSF estéril. La suspensión se ajustó a una densidad optica (D.O.) de 1, diluyendose con SSF estéril.

Para realizar la cuantificación de células bacterianas se hicieron cuentas viables para cada serotipo de la siguiente manera: se hicieron diluciones logaritmicas de la suspensión bacteriana ajustada a D.O. de 1. Se adicionaron 20 ul de cada

## CUADRO A

### CEPAS BACTERIANAS

SEROTIPO	ATCC*	PROPORCIONADO POR:
1	27088	ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL (IPN)
3	33378	Dr. F. ROSS DE LA UNIVERSIDAD ESTATAL DE IOWA, EUA.
6	33377	Dr. F. ROSS DE LA UNIVERSIDAD ESTATAL DE IOWA, EUA.
7	---	Dr. F. ROSS DE LA UNIVERSIDAD ESTATAL DE IOWA, EUA.
8	---	Dr. A. CIPRIAN DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, (UNAM).
12	---	EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE GUELPH, CANADA.

\*American Type Culture Collection

una de las diluciones a cajas de agar chocolate (se realizaron por duplicado). Se esperó a que la suspensión se adsorbiera antes de invertir las cajas y se procedió a incubarlas durante 24 horas a 37°C. Por último se contaron las colonias de cada caja de las cuales se obtuvo un promedio en cada dilución.

Las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), se calcularon en la dilución a la cual hubo un crecimiento de 30 a 40 colonias promedio, ya que así lo recomiendan algunos autores (8).

### 3.3 PREPARACION DEL INMUNOGENO

Cada uno de los serotipos de *A. pleuropneumoniae* se cultivó, cosechó y se ajustó a una D.O. de 1, leyendose a 590 nm. Con una alícuota se realizó una cuenta viable para verificar las UFC/ml. Simultáneamente se procedió a hacer diluciones logarítmicas con SSF estéril para obtener una suspensión de bacterias vivas de aproximadamente  $10^8$  UFC/ml, siendo la dosis individual de 0.5 ml por rata por vía subcutánea, ya que ésta es la DL50 establecida en trabajos anteriores (42).

La dosis de refuerzo consistió en 0.5 ml de la suspensión bacteriana a la misma concentración.

### 3.4 DOSIS DE DESAFIO

La suspensión de A. pleuropneumoniae serotipo 1, se ajustó a D.O. de 1 a 590 nm, y se realizaron diluciones logarítmicas para obtener las dosis de desafío deseadas. Simultáneamente a la inoculación se realizó una cuenta viable para verificar la cantidad de células por mililitro.

### 3.5 PRUEBA DE AGLUTINACION EN TUBO

#### PREPARACION DEL ANTIGENO

Cada uno de los serotipos se cultivó en agar chocolate, se cosechó con SSF estéril y la suspensión bacteriana obtenida se ajustó a una D.O. de 1 a 590 nm. Cada una fue inactivada con 0.3% de formaldehído.

#### OBTENCION DE SUEROS

Aproximadamente 10 días postparto, se obtuvo sangre por punción cardiaca de las ratas inmunizadas. La sangre se colocó en tubos y se refrigeraron durante tres horas, posteriormente se removió el coágulo y los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. Por último se separó el suero con pipetas Pasteur, se colocó en viales, se etiquetaron y se congelaron.

## **GRUPOS DE SUEROS**

Los sueros de cada grupo de ratas fueron mezclados en cantidades iguales para obtener el título de anticuerpos de cada serotipo.

## **REALIZACION DE LA PRUEBA**

Se hicieron diluciones de cada uno de los grupos de sueros con SSF, agregando al primer tubo 0.8 ml de SSF y 0.2 ml de suero (dilución 1:5). Al segundo tubo se le agregó 0.5 ml de SSF y 0.5 ml de la mezcla del primer tubo y se homogenizaba (dilución 1:10), posteriormente se tomaron 0.5 ml de ésta mezcla y se agregaron el tercer tubo con 0.5 ml de SSF, y así sucesivamente.

A cada tubo se le agregó 0.5 ml del antígeno correspondiente, se mezclaron y se incubaron a 37 ° C durante 48 horas. Después de éste tiempo se observó el título de anticuerpos por aglutinación.

Se determinaron anticuerpos homólogos y heterólogos con el serotipo correspondiente y con el serotipo 1 respectivamente.

### 3.6 MODELO EXPERIMENTAL

Se formaron grupos de tres ratas jóvenes adultas de la cepa Wistar (aproximadamente 250 gramos de peso corporal).

Grupo A: se inmunizaron con una suspensión de bacterias vivas de Actinobacillus pleuropneumoniae.

Grupo B: controles no inmunizadas.

El grupo A se infectó individualmente con 0.5 ml del inmunógeno (aproximadamente  $10^8$  UFC/ml) por vía subcutánea el día uno.

A los siete días ambos lotes se alojaron en forma individual con un macho para llevar a cabo el apareamiento (se pretendía con este manejo que los apareamientos y los partos fueran simultáneos).

Al día 15 el grupo A recibió una dosis de refuerzo de 0.5 ml (aproximadamente  $10^8$  UFC/ml) por vía subcutánea y se esperó hasta el parto.

La progenie de los diferentes grupos se desafió a los ocho días de nacidas con dosis de  $5 \times 10^6$  ,  $5 \times 10^7$  ,  $5 \times 10^8$  y  $5 \times 10^9$  UFC/ml de A. pleuropneumoniae serotipo 1. Administrando 0.5 ml de suspensión bacteriana por vía intraperitoneal y registrándose la mortalidad por un período de 48 horas postdesafío.

El modelo experimental se ilustra esquemáticamente en la figura 1.

Para estimar confiabilidad de los resultados obtenidos, se utilizó la Prueba Exacta de Fisher con un 95% de confianza.

# DIAGRAMA DE FLUJO

*Actinobacillus pleuropneumoniae*

SEROTIPOS



CULTIVO BACTERIANO

CUANTIFICACION DE *A. pleuropneumoniae*

PREPARACION DEL INMUNOGENO

PREPARACION DEL ANTIGENO

PRIMERA INMUNIZACION  
GRUPO A

CONTROLES  
GRUPO B

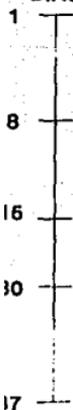
APAREAMIENTO

SEGUNDA INMUNIZACION  
GRUPO A

PARTO

DESAFIO DE LA PROGENIE

DIAS



## 4. RESULTADOS

### 4.1. CUENTAS VIABLES

Para calcular las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) de las suspensiones de cada uno de los serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae, ajustada a una D.O. de 1 a 590 nm se seleccionaron las cajas de agar en las cuales hubo un crecimiento de alrededor de 30 ó 40 colonias promedio. La prueba se realizó 3 veces y en cada ocasión se hizo por duplicado, además de verificar la concentración de bacterias cada vez que se inoculó.

Tomando en cuenta la dilución y la alicuota utilizada (que fue de 20 ul) se realizaron los calculos correspondientes, obteniendose que: en todas las determinaciones realizadas, para una suspensión bacteriana de A. pleuropneumoniae ajustada a D.O. de 1 a 590 nm de cualquiera de los serotipos trabajados (1,3,5,7,9 y 12) corresponden aproximadamente  $10^{14}$  UFC/ml.

Los resultados de esta determinación de UFC/ml se representan con detalle en la Tabla 1.

**TABLA 1**  
**CUENTAS VIABLES DE *A. pleuropneumoniae***

<b>A.pleuropneumoniae SEROTIPO</b>	<b>DILUCION</b>	<b>No.DE COLONIAS PROMEDIO</b>	<b>UFC/ml</b>
1	10 <sup>-11</sup>	31	3.1 X 10 <sup>14</sup>
3	10 <sup>-11</sup>	36	3.6 X 10 <sup>14</sup>
6	10 <sup>-11</sup>	37	3.7 X 10 <sup>14</sup>
7	10 <sup>-11</sup>	37	3.7 X 10 <sup>14</sup>
9	10 <sup>-11</sup>	37	3.7 X 10 <sup>14</sup>
12	10 <sup>-11</sup>	36	3.6 X 10 <sup>14</sup>

#### 4.2. MORTALIDAD DE LAS PROGENIES DESAFIADAS

En la Tabla 2 se registró la mortalidad de la progenie de ratas inmunizadas con A. pleuropneumoniae serotipo 1 y de la progenie de ratas control 48 horas después de ser desafiadas con diferentes dosis de A. pleuropneumoniae serotipo 1.

A todos los resultados se les realizó un análisis estadístico utilizando para ello la Prueba Exacta de Fisher.

La Figura 2, muestra el porcentaje de mortalidad a las diferentes dosis de desafío, de la progenie de ratas inmunizadas con A. pleuropneumoniae serotipo 1, comparadas con el porcentaje de mortalidad de las ratas control. En esta gráfica podemos observar que hubo una buena protección, la cual fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que en el grupo control.

El serotipo 1 fue designado el serotipo de desafío, ya que es considerado el más virulento además de ser el más común aislado en las infecciones de pleuroneumonía contagiosa en cerdos (33).

**TABLA 2**

**MORTALIDAD EN RATAS DE 8 DIAS DE EDAD NACIDAS DE MADRES  
INMUNIZADAS CON A. pleuropneumoniae SEROTIPO 1.**

DOSIS DE DESAFIO UFC/RATA*	NUMERO DE MUERTOS/TOTAL	
	CONTROLES	INMUNIZADAS***
$5 \times 10^6$	6/12 (50%)**	1/4 (25%)
$5 \times 10^7$	11/16 (69%)	2/8 (25%)
$5 \times 10^8$	11/18 (65%)	0/4 (0%)
$5 \times 10^9$	11/11 (100%)	5/5 (100%)

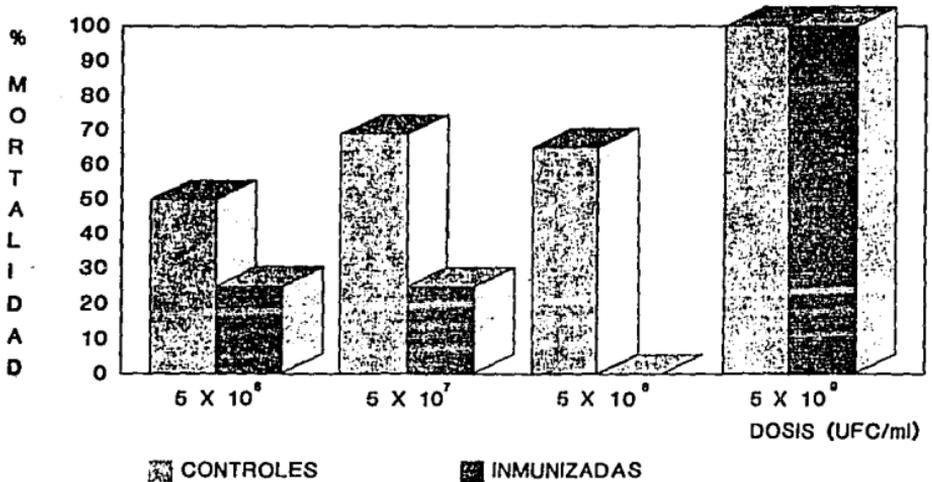
\*Desafiadas con A. pleuropneumoniae serotipo 1.

\*\* Porcentaje de mortalidad.

\*\*\*Diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con respecto al control (Prueba Exacta de Fisher)

FIGURA 2

PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1.



En la Tabla 3 se registraron los resultados de la mortalidad de la progenie de ratas inmunizadas con A. pleuropneumoniae serotipo 3, así como la mortalidad de la progenie de ratas control, 48 horas posdesafío con A. pleuropneumoniae serotipo 1, a diferentes dosis.

En la Figura 3 se muestra el porcentaje de mortalidad a las diferentes dosis de desafío, tanto para la progenie de ratas inmunizadas como para las ratas control. No se encontró diferencia significativa en la mortalidad de los 2 grupos.

**TABLA 3**

**MORTALIDAD EN RATAS DE 8 DIAS DE EDAD NACIDAS DE MADRES  
INMUNIZADAS CON A. pleuropneumoniae SEROTIPO 3.**

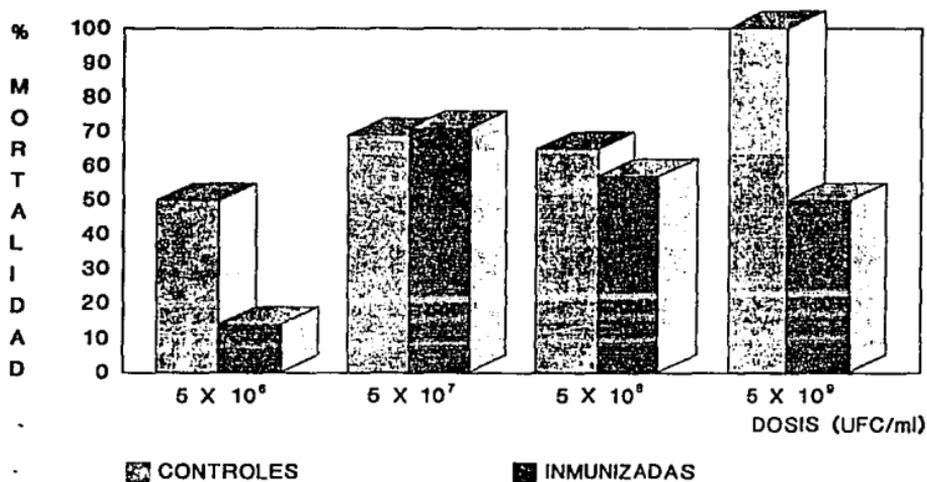
DOSIS DE DESAFIO UFC/RATA*	NUMERO DE MUERTOS/TOTAL	
	CONTROLES	INMUNIZADAS
$5 \times 10^6$	6/12 (50%)**	1/7 (14%)
$5 \times 10^7$	11/16 (69%)	6/7 (71%)
$5 \times 10^8$	11/18 (65%)	4/7 (57%)
$5 \times 10^9$	11/11 (100%)	3/6 (50%)

\*Desafiadas con A. pleuropneumoniae serotipo 3.

\*\*Por ciento de mortalidad.

FIGURA 3

PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 3.



En la Tabla 4 se muestra la mortalidad de la progenie de ratas inmunizadas con A. pleuropneumoniae serotipo 5, y la mortalidad de las ratas control 48 horas después de ser desafiadas con diferentes dosis de A. pleuropneumoniae.

Algunas veces las progenes de las ratas de un grupo no nacían el mismo día, por lo que al formar los grupos para ser desafiadas, los primeros se desafiaron utilizando las dosis más elevadas, y al observar que al disminuir la dosis en este caso, no se registró mortalidad, se optó por no realizar el desafío con la dosis más baja, por esta razón en la tabla 3 no aparece el dato de mortalidad de la progenie de ratas inmunizadas a la menor dosis.

En la Figura 4 se presenta el porcentaje de mortalidad de la progenie de ratas inmunizadas, comparada con el porcentaje de mortalidad de las ratas control a las diferentes dosis de desafío. Aquí podemos apreciar una muy buena protección de la progenie de ratas inmunizadas con el serotipo 5, ya que sólo se registró mortalidad al ser desafiadas con la dosis más elevada y ésta fue del 50% .

**TABLA 4**

**MORTALIDAD EN RATAS DE 8 DIAS DE EDAD NACIDAS DE MADRES  
INMUNIZADAS CON *A. pleuropneumoniae* SEROTIPO 5.**

DOSIS DE DESAFIO UFC/RATA*	NUMERO DE MUERTOS/TOTAL	
	CONTROLES	INMUNIZADAS***
$5 \times 10^6$	6/12 (50%)**	----
$5 \times 10^7$	11/16 (69%)	0/5 (0%)
$5 \times 10^8$	11/18 (65%)	0/5 (0%)
$5 \times 10^9$	11/11 (100%)	2/4 (50%)

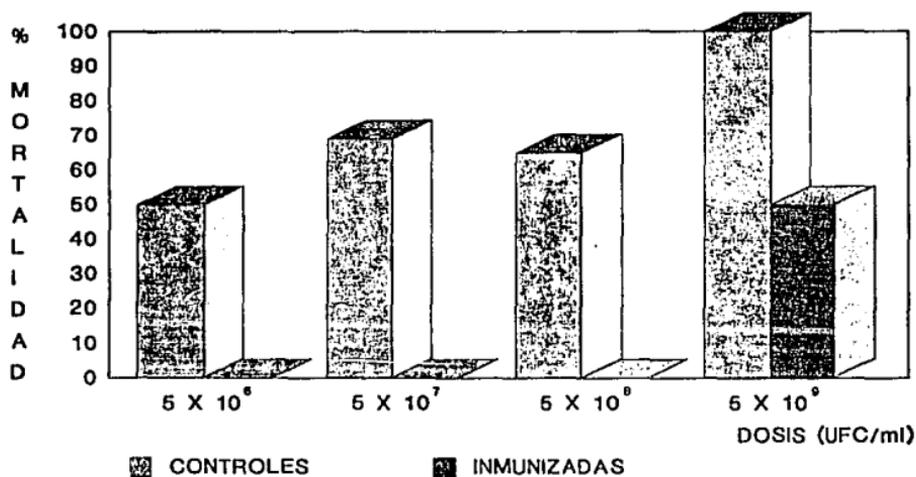
\*Desafiadas con *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.

\*\*Por ciento de mortalidad.

\*\*\*Diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con respecto al control (Prueba Exacta de Fisher)

FIGURA 4

PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 5.



En la Tabla 5 se presenta la mortalidad de la progenie de ratas inmunizadas con A. pleuropneumoniae serotipo 7, así como la mortalidad de la progenie de ratas control 48 horas después de su desafío con diferentes dosis de A. pleuropneumoniae serotipo 1.

En la Figura 5 se compara el porcentaje de mortalidad de la progenie de ratas inmunizadas con el de las ratas control, a las diferentes dosis de desafío. Y podemos apreciar que a pesar del 37% de mortalidad presentado por las ratas inmunizadas en la segunda dosis, la proporción es significativamente diferente al control, por lo que el serotipo 7 también confiere una buena protección inmune polivalente que es transferida a la progenie.

**TABLA 5**

**MORTALIDAD EN RATAS DE 8 DIAS DE EDAD NACIDAS DE MADRES  
INMUNIZADAS CON A. pleuropneumoniae SEROTIPO 7.**

DOSIS DE DESAFIO UFC/RATA*	NUMERO DE MUERTOS/TOTAL	
	CONTROLES	INMUNIZADAS***
$5 \times 10^6$	6/12 (50%)**	0/7 (0%)
$5 \times 10^7$	11/16 (69%)	3/8 (37%)
$5 \times 10^8$	11/18 (65%)	0/8 (0%)
$5 \times 10^9$	11/11 (100%)	7/8 (87%)

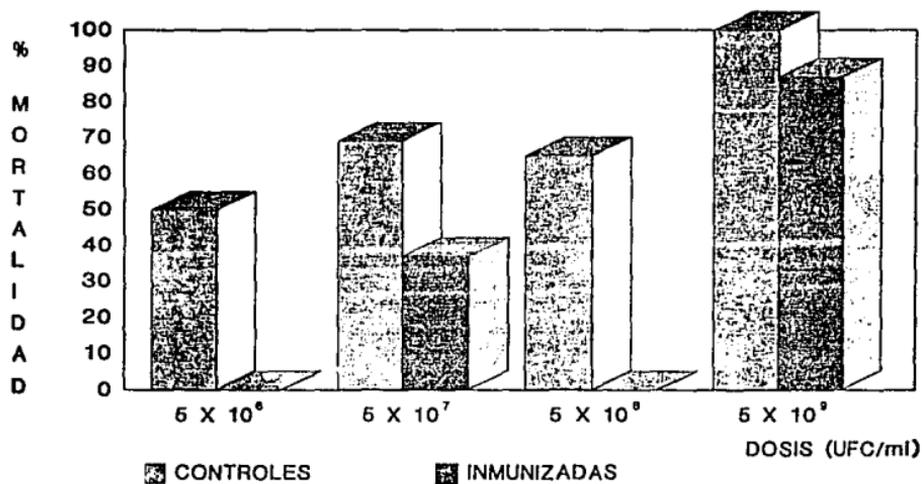
\*Desafiadas con A. pleuropneumoniae serotipo 7.

\*\*Porcentaje de mortalidad.

\*\*\*Diferencias significativas (  $p > 0.05$  ) con respecto al control (Prueba Exacta de Fisher)

FIGURA 5

PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 7.



En la Tabla 6 se registró la mortalidad de la progenie de ratas inmunizadas con A. pleuropneumoniae serotipo 9, tanto como la mortalidad de la progenie de ratas control, 48 horas después de ser desafiadas con diferentes dosis de A. pleuropneumoniae serotipo 1.

En la Figura 6 se muestran los porcentajes de mortalidad de la progenie de ratas inmunizadas comparadas con las ratas control a las diferentes dosis de desafío.

En esta grafica podemos ver que el porcentaje de mortalidad va en aumento al aumentar la dosis de desafío, pero aún así la mortalidad es baja con respecto al control, ya que a la mayor de las dosis la mortalidad es del 50%, mientras que para el control es de 100%. Por lo que este serotipo también confiere una buena protección inmune polivalente transferida a la progenie.

**TABLA 6**

**MORTALIDAD EN RATAS DE 8 DIAS DE EDAD NACIDAS DE MADRES  
INMUNIZADAS CON A. pleuropneumoniae SEROTIPO 9.**

DOSIS DE DESAFIO UFC/RATA*	NUMERO DE MUERTOS/TOTAL	
	CONTROLES	INMUNIZADAS***
$5 \times 10^6$	6/12 (50%)**	2/12 (17%)
$5 \times 10^7$	11/16 (69%)	4/14 (29%)
$5 \times 10^8$	11/18 (65%)	4/13 (31%)
$5 \times 10^9$	11/11 (100%)	5/10 (50%)

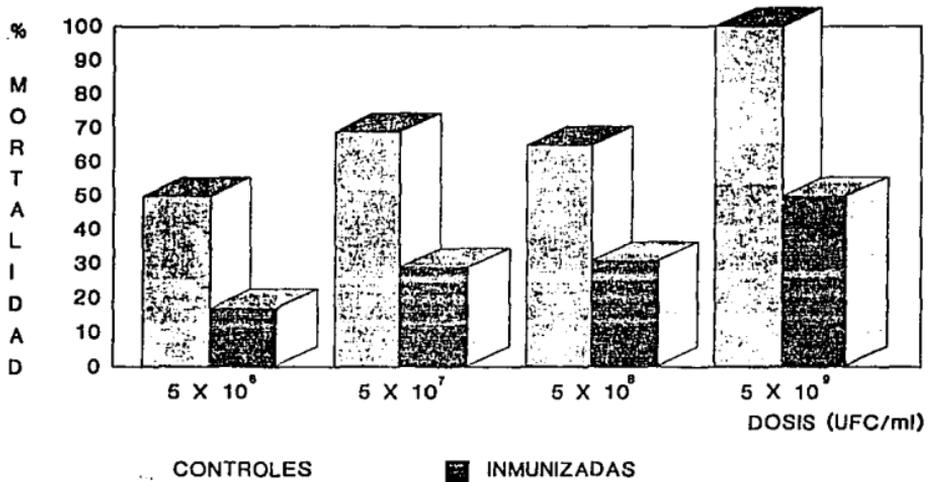
\*Desafiadas con A. pleuropneumoniae serotipo 1.

\*\*Porcentaje de mortalidad.

\*\*\*Diferencias significativas (  $p > 0.05$  ) con respecto al control (Prueba Exacta de Fisher)

FIGURA 6

PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 9.



En la Tabla 7 se presentan los resultados de mortalidad de la progenie de ratas inmunizadas con A. pleuropneumoniae serotipo 12, así como la mortalidad de la progenie de ratas control, 48 horas posdesafío con diferentes dosis de A. pleuropneumoniae serotipo 1.

Aquí la mortalidad que presentó la progenie de ratas inmunizadas fue muy elevada, incluso mayor a la presentada por las ratas control. Por lo que este serotipo no confiere importante inmunidad polivalente con respecto al serotipo 1.

En la Figura 7 se presenta el porcentaje de mortalidad de la progenie de ratas inmunizadas comparada con el de las ratas control a las diferentes dosis de desafío.

**TABLA 7**

**MORTALIDAD EN RATAS DE 8 DIAS DE EDAD NACIDAS DE MADRES  
INMUNIZADAS CON A. pleuropneumoniae SEROTIPO 12.**

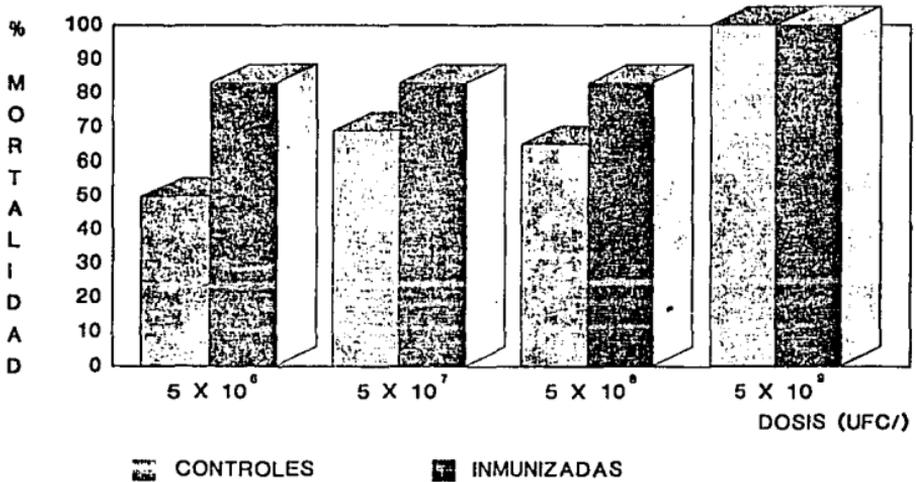
DOSIS DE DESAFIO UFC/RATA*	NUMERO DE MUERTOS/TOTAL	
	CONTROLES	INMUNIZADAS
$5 \times 10^6$	6/12 (50%)**	5/6 (83%)
$5 \times 10^7$	11/16 (69%)	5/6 (83%)
$5 \times 10^8$	11/18 (65%)	5/6 (83%)
$5 \times 10^9$	11/11 (100%)	6/6 (100%)

\*Desafiadas con A. pleuropneumoniae serotipo 1.

\*\*Porcentaje de mortalidad.

FIGURA 7

PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE PROGENIE DE RATAS INMUNIZADAS CON *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 12.



#### 4.3. TITULOS DE ANTICUERPOS DE LOS GRUPOS DE SUEROS

En la Tabla 8 se presentan los títulos de anticuerpos de los grupos de sueros de las ratas inmunizadas.

El serotipo 5 (a excepción del 12) es el que presento un mayor título de anticuerpos homólogos es decir, anticuerpos contra A. pleuropneumoniae serotipo 5, y también es uno de los que presento mayor título de anticuerpos heterólogos (contra A. pleuropneumoniae serotipo 1), por lo que confiere una buena inmunidad polivalente con respecto al serotipo 1.

Los serotipos 5, 7 y 9 son los que presentan mayores títulos de anticuerpos heterólogos, siendo éstos incluso, mayores a los títulos de anticuerpos homólogos; dichos títulos coinciden con la buena protección inmune polivalente transferida a la progenie.

El serotipo 12 presenta el mayor título de anticuerpos homólogos sin embargo, es el que presenta el menor título de anticuerpos heterólogos, por lo que no fue capaz de conferir inmunidad polivalente.

TABLA 8

TITULOS DE ANTICUERPOS EN RATAS INMUNIZADAS

GRUPO DE RATAS* INMUNIZADAS CON	TITULO** BASAL	TITULO CON SEROTIPO HOMOLOGO	TITULO CON SEROTIPO HETEROLOGO
A. pleuropneumoniae 1	-	1:320	1:320
A. pleuropneumoniae 3	-	1:320	1:320
A. pleuropneumoniae 5	-	1:640	1:5120
A. pleuropneumoniae 7	-	1:320	1:640
A. pleuropneumoniae 9	-	1:320	1:10240
A. pleuropneumoniae 12	-	1:1280	1:160

\*Grupos de sueros de ratas inmunizadas con el mismo serotipo

\*\*Con serotipo homologa y heterologa

## 5. DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, demuestran que el uso de células vivas de Actinobacillus pleuropneumoniae como inmunógeno en ratas Wistar, estimula una respuesta inmune polivalente, la cual transferida por vía transplacentaria protege a la progenie de éstas ante diferentes dosis de desafío con un serotipo heterólogo (serotipo 1). Al observar en los resultados la protección inmune en las crías, se desprende que la inmunidad pasiva desarrollada por las madres inmunizadas, protege a la progenie ante el contacto con el agente etiológico de la pleuroneumonía postparto. Si consideramos que el desafío de las crías se realizó a los ocho días postparto, se debe tomar en cuenta la presencia de la protección inmune como una consecuencia de la alimentación por calostro durante los primeros días u horas que siguen al parto; éste calostro contiene anticuerpos que la madre desarrolla en la sangre, y las crías obligadamente adquieren al ser amamantadas. De tal forma que la madre les transmite inmunidad contra las enfermedades que ha desarrollado en su propio organismo.

En los resultados se detectan algunas diferencias de protección inmune en la progenie de las ratas inmunizadas, la explicación de éstos hechos ésta en función de diferentes factores involucrados en el trabajo experimental; en primera instancia se debe considerar que el trabajo se realizó utilizando ratas hembras juvenes primerizas (que no habían sido madres) lo cual, fue un factor determinante en la variación de algunos de los resultados, dado que algunas de ellas procrearon de 3 a 4 crios mientras que otras tenían camadas de 9, 10 ó más crios. Esto pudo ser una causa de diferencia nutricional de algunos crios y entre unas otras camadas, incluso entre crios de una misma madre, además de que la calidad del calostro puede variar significativamente entre una rata y otra. Por ésta razón, se observaron diferencias de resistencia inmune por parte de algunos crios de las progenes de las ratas inmunizadas con el serotipo 1 (tabla 2, tercera dosis) y serotipo 7 (tabla 5, tercera dosis) en las cuales no se registró mortalidad mientras que a dosis menores se registraron varias muertes (45,46).

En cuanto a la titulación de anticuerpos contra el serotipo homólogo se observaron títulos reativamente bajos. Tanto la primera inmunización como el refuerzo antigénico desarrollaron en las hembras una respuesta inmune primaria y secundaria respectivamente, contra los inmunodeterminantes propios de cada serotipo. Sin embargo se debe considerar el tiempo que transcurrió desde el

refuerzo antigénico, hasta la toma de muestra para la titulación de anticuerpos, el cual fue aproximadamente de 25 días, lo cual pudo haber influido en los bajos títulos de anticuerpos contra los serotipos homólogos.

Los elevados títulos de anticuerpos contra el serotipo heterólogo (serotipo 1) que presentaron las ratas inmunizadas se pueden explicar de la siguiente manera: durante el desafío de las progenies las ratas inmunizadas compartieron el mismo espacio con sus crías enfermas y muertas, además de que, en algunas ocasiones las crías fueron devoradas por las madres, lo que mantuvo a las ratas inmunizadas en contacto directo con A. pleuropneumoniae serotipo 1, de tal manera que la respuesta inmune contra el serotipo heterólogo se vió estimulada, significando ésto un segundo refuerzo, lo cual condujo a una respuesta inmune secundaria contra antígenos comunes; dando como resultado un elevado título de anticuerpos contra el serotipo heterólogo, incluso hasta llegar a ser mucho más elevado que el título de anticuerpos contra el serotipo homólogo, lo cual se observa para los serotipos 5 y 9 confirmando ésto la protección inmune reportada para ambos serotipos.

Gutiérrez y colaboradores en 1992, han reportado que al infectar cerdos con Actinobacillus pleuropneumoniae serotipos 2 y 4 en dosis de  $10^3$  ,  $10^5$  y  $10^8$  UFC/ml; los títulos de IgG, IgM, e IgA en los sueros de los animales aumentan regularmente durante 15 semanas consecutivas. Los títulos de IgG fueron los más eleva-

dos, IgM fueron más bajos que los anteriores y los de IgA fueron los bajos, siendo detectados sólo en 4 animales. No obstante se menciona que los títulos de serotipo 4 son significativamente más altos que para serotipo 2. Por otra parte reportan que el títulos de IgG varían considerablemente entre un serotipo y otro, siendo detectados los más elevados a las 6 semanas después de la infección (43). Por todo lo anterior se puede decir que las variaciones encontradas entre los títulos de anticuerpos de las ratas inmunizadas está en función la respuesta inmunológica propia contra antígenos de cada serotipo, ésto para el serotipo homólogo, mientras que para el serotipo heterólogo la respuesta inmunológica está en función de la cantidad de determinantes antigenicos comunes entre los diferentes serotipos.

Se sabe que los serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae son antigenicamente homogéneos y serologicamente diferentes. La bibliografía reporta que los determinantes antigénicos comunes entre los diferentes serotipos son componentes capsulares.

Inzana, Mathison y Perry han demostrado mediante el uso de anticuerpos monoclonales que el antígeno somático del lipopolisacárido es uno de los determinantes antigénicos responsables de la reactividad inmunológica cruzada entre serotipos 1,9 y 11 de cepas de Actinobacillus pleuropneumoniae (44). Al decir que los antígenos capsulares son algunos de los responsables de la inmunidad polivalente, ésto implica que aún no se han identificado

a ciencia cierta todos los antígenos involucrados en este proceso. En un trabajo reciente Byrd (1992) (3) ha utilizado 2 subunidades de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1, el polisacarido capsular (CP) y el lipopolisacarido (LPS) ambos conjugados con proteína de hemolisina (HP); reporta que se detectaron en los cerdos altos títulos de inmunoglobulinas de clase IgG contra CP, LPS y HP. Los anti-CP y anti-LPS funcionan como opsoninas en la fagocitosis de Actinobacillus pleuropneumoniae por leucocitos polimorfonucleares mientras que los anticuerpos contra HP neutralizan el efecto citotóxico de la HP sobre linfocitos polimorfonucleares. Por otra parte los sueros de los cerdos experimentalmente infectados con cada uno de los 12 serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae reaccionan con la HP de serotipo 1 (3). Con base en lo anteriormente expuesto, suponemos que la poca efectividad de las bacterinas, las cuales contienen células completas muertas o inactivadas y que sólo confieren inmunidad serotipo específica puede deberse a la ausencia de los productos de secreción de A. pleuropneumoniae, ya que la utilización de células vivas han permitido replicar la inmunidad polivalente de manera experimental en animales de laboratorio. Sin embargo, para poder asegurarlo es necesario continuar los estudios para identificar él ó los antígenos responsables de la inmunidad polivalente.

## 6. CONCLUSION

Los resultados indican que los serotipos 5, 7 y 9 inducen una inmunidad polivalente con respecto al serotipo 1, notandose una mejor protección con los serotipos 5 y 9.

Aun cuando los animales de laboratorio no son los hospederos naturales de Actinobacillus pleuropneumoniae, resulta indispensable emplearlos como modelos experimentales, ya que al ser sensibles a la infección, resultan ser una herramienta útil para analizar tanto la enfermedad como la inmunidad inducida por la bacteria; por otra parte son fáciles de manejar y ahorran tiempo y dinero. En particular en este trabajo de investigación fue posible inducir en la rata Wistar una infección por Actinobacillus pleuropneumoniae y obtener una serie de resultados satisfactorios, los cuales podrían ser tratados de reproducir en el hospedero natural extrapolando éste mismo protocolo en busca de inmunidad protectora polivalente.

La importancia de lo anterior radica en que es posible considerar la producción de vacunas de bacterias vivas, utilizando los serotipos menos virulentos (33). De esta manera sería posible la obtención de una vacuna eficaz que permitiera disminuir la mortalidad por pleuroneumonía contagiosa porcina y aumentar la producción.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1.- Bendixen, P.H. and Shewen, P.E. 1981. Toxicity of Haemophilus pleuropneumoniae for porcine lung macrophages, peripheral blood monocytes, and testicular cells. *Infect. Immun.* 33: 673-676.

2.- Beynon, L.M. 1992. Characterization of the lipopolysaccharide O antigens of Actinobacillus pleuropneumoniae serotypes 9 and 11: antigenic relationships among serotypes 9, 11 and 1. *J. Bacteriol.* 173: 5324-5331.

3.- Byrd, W. and Kadis, S. 1992. Preparation, characterization and immunogenicity of conjugate vaccines directed against Actinobacillus pleuropneumoniae virulence determinants. *Infect. Immun.* 3042-3051.

4.- Didier, P. 1984. Porcine Haemophilus pleuropneumoniae: microbiologic and pathologic findings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184: 716-719.

5.- Fedorka, P. 1990. Efficacy of a cell extract from Haemophilus pleuropneumoniae serotype 1 against disease in swine. *Infect. Immun.* 58: 358-365.

6.- Fenwick, B.W. and Osburn, B.I. 1986. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of Haemophilus pleuropneumoniae in convalescent and immunized pigs. *Infect. Immun.* 54: 575-582.

7.- Fenwick,B.W. 1986. Vaccine potential of Haemophilus pleuropneumoniae oligosaccharide-tetanus toxoid conjugates. Infect. Immun. 583-586.

8.- Gilbride, K.A. and Rosendal,S. 1983. Evaluation of a selective of isolation of Haemophilus pleuropneumoniae. J. Clin. Med. 17: 445-450.

9.- Gunnarsson,A. 1978. Serologic studies of porcine strains of Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae): antigenic specificity and relationship between serotypes. Am. J. Vet. Res. 38: 1111-1114.

10.- Inzana,T.J. et. al. 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae serotype 5. Infect. Immun. 56: 1880-1889.

11.- Inzana.T.J. 1987. Purification and partial characterization of the capsular polymer of Haemophilus pleuropneumoniae serotype 5. Infect. Immun. 55: 1573-1579.

12.- Jensen,A.E. and Bertram,T.A. 1986. Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of Haemophilus pleuropneumoniae serotype 5. Infect. Immun. 51: 419-424.

13.- Korvuo,A. et.al. 1988. Use of monoclonal antibodies to serotype-specific antigens of Haemophilus pleuropneumoniae serotype 2 in passive immunization. Am. J. Vet. Res. 49: 2072-2075.

14.- Kume, K., Nakai, T. and Sawata, A. 1985. Efficacy of Haemophilus pleuropneumoniae vaccine in pigs. Jnp. J. Vet. Sci. 47:201-206.

15.- Lalonde, G. and Miller, J.F. 1989. Transformation of Actinobacillus pleuropneumoniae and analysis of R factors by electroporation. Am. J. Vet. Res. 50: 1957-1960.

16.- Little, T.W.A. 1970. Haemophilus infection in pigs. Vet. Rec. 87: 399-402.

17.- Mittal, K.R. et.al. 1984. A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of Haemophilus pleuropneumoniae infection in pigs. Am. J. Vet. Res. 45: 715-719.

18.- Mittal, K.R., Higgins, R. and Larivière, S. 1988. Quantitation of serotype-specific and cross-reacting group-specific antigens by coagglutination and immunodiffusion test for differentiating Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae strains belong to cross-reacting serotypes 3, 6 and 8. J. Clin. Microbiol. 26: 985-989.

19.- Nakai, T. and Sawata, A. 1983. Characterization of the hemolysin produced by Haemophilus pleuropneumoniae. Am. J. Vet. Res. 44: 344-347.

20.- 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: 851-858.

21.- Nielsen,R. 1974. Serological and immunological studies of pleuropneumonia of swine caused by H. parahaemolyticus. Acta Vet. Scand. 15: 80-89.

22.- Nielsen,R. 1976. Pleuropneumonia of swine caused by H. parahaemolyticus: studies on the protection obtained by vaccination. Nord. Vet. Med. 28: 337-348.

23.- Nielsen,R. 1979. Haemophilus parahaemolyticus serotypes. Serological response. J. Am. Vet. Med. 31: 401-406.

24.- Nielsen,R. 1979. Haemophilus parahaemolyticus serotypes, pathogenicity and cross immunity. Nord. Vet. Med. 31: 107-113.

25.- Nielsen,R. and O'connor,P.J. 1984. Serological characterization of 8 Haemophilus pleuropneumoniae strains and proposal of a new serotype: serotype 8. Acta Vet. Scand. 25: 96-106.

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

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

28.- Nielsen,R. 1987. Serological characterization of Actinobacillus pleuropneumoniae strains and proposal of a new serotype: serotype 12. Acta Vet. Scand. 27: 453-455.

29.- O'reilly,T. and Rosendal,S. 1984. Porcine haemophili and actinobacilli: characterization by means of API test strips and possible taxonomic implications. Can. J. Microbiol. 30: 1229-1238.

30.- Rapp,V.J. and Ross,R.F. 1986. Antibody response of swine to outer membrane components of Haemophilus pleuropneumoniae during infection. Infect. Immun. 54: 751-760.

31.- Rosendal,S., Lombin,L. and De Moor,J. 1981. Serotyping and detection of Haemophilus pleuropneumoniae by indirect fluorescent antibody technique. Can. J. Comp. Med. 45: 271-274.

32.- Rosendal,S. and Boyd,D.A. 1982. Haemophilus pleuropneumoniae serotyping. J. Clin. Microbiol. 26: 840-843.

33.- Rosendal,S., Boyd,D.A. and Gilbride,K.A. 1985. Comparative virulence of porcine Haemophilus bacteria. Can. J. Comp. Med. 99: 68-74.

34.- Rosendal,S. and Mac Innes,J.I. 1990. Characterization of an attenuated strains of Actinobacillus pleuropneumoniae,

35.- Rycroft,A.N. and Culler,J.M. 1990. Complement resistance in Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae infection of swine. Am. J. Vet. Res. 51: 1449-1453.

36.- Sanford,S.E. and Josephson,G.K.A. 1981. Porcine Haemophilus pleuropneumoniae Epizootic in southwestern Ontario: clinical, microbiological. pathological and some epidemiological findigs. Can. J. Comp. Med. 45: 2-7.

37.- Stine,D.L. et. al. 1991. Actinobacillus pleuropneumoniae-induced thymic lesions in mice and pigs. Infect. Immun. 59: 2885-2891.

38.- Thawaitis,R.N. and Kadis,S. 1991. Immunogenicity of Actinobacillus pleuropneumoniae outer membrane proteins and enhancement of phagocytosis by antibodies to the proteins. Infect. Immun. 59: 544-549.

39.- 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: 768-773.

40.- Udeze,F.A. and Kadis,S. 1992. Inhibition of bactericidal activity of anticapsular antibody by nonspecific antibodies reactive with surface-exposed antigenic determinants on Actinobacillus pleuropneumoniae. Infect. Immun. 60: 3852-3860.

41.- Van Leengoed,L. and Kamp,E.M. 1989. Endobronchial inoculation of various doses of Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae in pigs. Am. J. Vet. Res. 50: 2054-2059.

42.- Bautista Ramirez,M.E. 1993. Establecimiento de la dosis letal 50% Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1 en la rata. Tesis. Realizada en FES-C, UNAM.

43.- Gutierrez,C.B. et. al. 1992. Quantifying by monoclonal antibodies of specific IgG, IgM and IgA in the serum of minipigs

experimentally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae.  
Vet. Sci. Res. 53:254-256.

44.- Nakai, T. 1992. Identification of the cross-reacting antigen among Actinobacillus pleuropneumoniae strains of serotype 1, 9 and 11 by use of monoclonal antibodies. J. Vet. Med. Sci. 54:707-710.

45.- Morrilla, G. A. Inmunología Veterinaria. 1989. 1a. edición. Diana. México. p.p. 155-160.

46.- Nielsen, R. 1975. Colostral transfer of immunity to Haemophilus parahaemolyticus in pigs. Nord. Vet. Med. 27:319-328.