

47  
201



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN



**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA HEMOLISINA DE  
BORDETELLA BRONCHISEPTICA**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
SANDRA PORTUGAL QUINIERO

**ASESORES:**

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
M. en C. **GABRIELA BARCENAS MORALES**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

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

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de  
Exámenes Profesionales

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 revolvamos la TESIS TITULADA:

Estudio Preliminar de la Hemolisina de Bordetella  
bronchiseptica.

que presenta la pasante: Sandra Portugal Quintero  
con número de cuenta: 8857385 - 6 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

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"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 26 de Mayo de 199 5

PRESIDENTE Q. F. I. Andrea Becerril Osnaya *[Firma]*  
VOCAL M. en C. Alma Virginia Lara Sagahón *[Firma]*  
SECRETARIO Q. F. B. Marcela Hernández Vargas *[Firma]*  
PRIMER SUPLENTE M. en C. Víctor M. Zendejas Buitrago *[Firma]*  
SEGUNDO SUPLENTE M. V. Z. Angel G. Martínez SOSA *[Firma]*

## **AGRADECIMIENTOS.**

**MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO A MIS DIRECTORES DE TESIS:**

***DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO.***

***MC. GABRIELA BARCENAS MORALES.***

**POR PROPORCIONARME SU AYUDA Y DEDICACION PARA LA REALIZACION DE  
ESTE TRABAJO.**

**A MA. EUGENIA ROSALES, VIRGINIA LARA Y PATRICIA MIRANDA**

**POR BRINDARME SU INVALUABLE AYUDA Y SU SINCERA AMISTAD**

**PARA LOGRAR ESTE OBJETIVO.**

**AL HONORABLE JURADO, POR LA MEJOR DISPOSICION QUE PRESTO  
EN LA REVISION DE ESTE TRABAJO.**

**DEDICO ESTE TRABAJO A .....**

**MIS PADRES:**

***JOSE PORTUGAL MARTINEZ***

***ROSA MA. QUINTERO DE PORTUGAL***

**POR MI EXISTENCIA Y FORMACION PROFESIONAL, GRACIAS A SU CARÍÑO GUIA Y APOYO ESTE PRESENTE SIMBOLIZA MI GRATITUD POR TODA LA RESPONSABLE E INVALUABLE AYUDA QUE SIEMPRE ME HAN PROPORCIONADO.**

**MIS HEMANOS:**

**MA. DE LOURDES**

**SONIA**

**JOSE ANGEL**

**POR QUE SIEMPRE HAN ESTADO AHI PARA  
ALENTARME.**

**MIS DOS GRANDES AMORES:**

***ARTURO LOPEZ MARTINEZ***

***SANDRA ELIZABETH LOPEZ PORTUGAL***

**POR QUE CON SU AYUDA, COMPRESION Y CARÍÑO HAN SABIDO ALENTARME EN  
LOS MOMENTOS MAS DIFICILES....**

**GRACIAS.**

# INDICE

	pp.
I. LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
II. INDICE DE TABLAS .....	II
III. INDICE DE FIGURAS .....	III
IV. RESUMEN .....	V
V. JUSTIFICACION .....	VI
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Antecedentes.....	2
1.3. <i>Bordetella bronchiseptica</i> .....	3
1.4. Rinitis Atr6fica Porcina .....	4
1.5. Transmisi6n.....	6
1.6. Aislamiento y Cultivo .....	6
1.7. Factores de virulencia.....	7
1.8. Susceptibilidad a agentes antimicrobianos.....	9
1.9. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	10
1.10. Pleuroneumonía Contagiosa Porcina .....	11
1.11. Transmisi6n.....	12
1.12. Factores de virulencia.....	13
2. OBJETIVOS .....	16

<b>3. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1. Material biológico</b> .....	<b>17</b>
3.1.1. Cepas.....	17
3.2. Medios de cultivo.....	17
3.3. Reactivos.....	17
3.4. Pruebas bioquímicas para la identificación del microorganismo.....	19
3.5. Prueba de sensibilidad a antibióticos.....	19
3.6. Cinética de crecimiento.....	19
3.7. Producción de hemólisis en agar sangre.....	20
3.8. Extracción de la hemolisina.....	20
3.8.1. Precipitación con sulfato de amonio.....	21
3.8.2. Análisis del extracto del sobrenadante bacteriano.....	22
3.9. Obtención del suero hiperinmune.....	22
3.9.1. Determinación del Título de Anticuerpos aglutinantes.....	24
3.10. Electroforesis de los extractos bacterianos en geles de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS).....	24
3.10.1. Preparación y corrimiento de las muestras.....	25
3.10.2. Tinción de geles de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio con azul de Coomassie R-250.....	26
3.10.3. Deshidratación de los geles de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio.....	26
3.10.4. Curva patrón de la movilidad relativa de proteínas.....	27

3.10.5. Cálculo del coeficiente de movilidad relativa (Rf) de las proteínas.....	27
<b>3.11. Prueba de inmunoelectrotransferencia (IET) en</b>	
papel de nitrocelulosa.....	28
3.11.1. Tinción con negro de amido de las proteínas transferidas.....	29
3.11.2. Ensayo inmunoenzimático .....	29
<b>A) Reacción de los extractos de los sobrenadantes bacterianos</b>	
con el suero hiperinmune.....	29
<b>B) Reacción con el suero problema.....</b>	30
<b>4. RESULTADOS .....</b>	31
4.1. Pruebas bioquímicas para la identificación del microorganismo.....	31
4.2. Prueba de sensibilidad de <i>Bordetella bronchiseptica</i> a antibióticos.....	31
4.3. Cinética de crecimiento .....	34
4.4. Actividad hemolítica del sobrenadante de <i>B. bronchiseptica</i> .....	34
4.5. Obtención del extracto del sobrenadante de <i>B. bronchiseptica</i> .....	39
4.6. Análisis del extracto del sobrenadante bacteriano.....	41
4.7. Electroforesis del sobrenadante bacteriano.....	41
4.8. Reacción del suero de conejo con los extractos	
bacterianos en la prueba de IET.....	49
<b>5. DISCUSION.....</b>	51
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	56
<b>7. APENDICE .....</b>	57
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	63



## I. LISTA DE ABREVIATURAS

Rf =	Coficiente de movilidad relativa
Log =	Logaritmo
PM =	Peso molecular
SDS =	Duodecil sulfato de sodio
Kd =	Kilodalton
RAP =	Rinitis atr6fica porcina
um =	micras
ug =	microgramos
AMPc =	Monofosfato de adenosina ciclico
d =	Daltons
U =	unidades
BHI =	Infusi6n cerebro - coraz6n
rpm =	revoluciones por minuto
SSF =	Soluci6n salina fisiol6gica
D.O. =	densidad 6ptica
TBS =	Soluci6n amortiguadora de trietanolamida
ul =	microlitro
IET =	inmunoelctrotransferencia
NAD =	Dinucle6tido de nicotinamida

## II. INDICE DE TABLAS

1. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS A LA CEPA LBF DE <i>Bordetella bronchiseptica</i> UTILIZADA EN ESTE TRABAJO .....	32
2. RESULTADOS CUALITATIVOS DEL ANTIBIOGRAMA REALIZADO A LA CEPA LBF DE <i>Bordetella bronchiseptica</i> .....	33
3. RESULTADOS DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO DE <i>Bordetella bronchiseptica</i> CEPA LBF.....	35
4. IDENTIFICACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA DEL SOBRENADANTE DEL CULTIVO DE <i>Bordetella bronchiseptica</i> CEPA LBF.....	40
5. VALORES PARA LA CURVA PATRON DE PROTEINAS (595 nm) CALCULADOS SIGUIENDO LA METODOLOGIA DE BRADFORD, USANDO ALBUMINA SERICA BOVINA COMO PROTEINA PATRON.....	42
6. VALORES DEL COEFICIENTE DE MOVILIDAD RELATIVA (Rf)Y LOGARITMO DE PM (Log PM) DE LAS PROTEINAS PATRON .....	44
7. PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS DEL EXTRACTO DEL SOBRENADANTE BACTERIANO DE LA CEPA LBF DE <i>Bordetella</i> <i>bronchiseptica</i> OBTENIDOS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA .....	47

### III. INDICE DE FIGURAS

1. CINETICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO .....	36
2. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE HEMOLISIS EN AGAR SANGRE CLORANFENICOL .....	37
3. COMPARACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA DEL SOBRENADANTE DEL CULTIVO DE <i>Bordetella bronchiseptica</i> EN AGAR SANGRE CON RITROCITOS DE CARNERO Y EN AGAR SANGRE CON ERITROCITOS DE BOVINO.....	38
4. CURVA PATRON DE PROTEINAS .....	43
5. CURVA PATRON DE PESOS MOLECULARES .....	45
6. PATRON ELECTROFORETICO DEL EXTRACTO DEL SOBRENADANTE BACTERIANO DE <i>Bordetella bronchiseptica</i> CEPA LBF.....	46
7. PATRON ELECTROFORETICO DE LOS EXTRACTOS BACTERIANOS DE <i>Bordetella bronchiseptica</i> CEPA LBF Y <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> SEROTIPO 1 .....	48
8. PATRON ANTIGENICO DE <i>Bordetella bronchiseptica</i> CEPA LBF Y <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> SEROTIPO.....	50

#### IV. RESUMEN

La porcicultura es afectada generalmente por enfermedades infecciosas, encontrándose entre las más importantes las respiratorias; aun cuando existen dudas acerca de su etiología, estas son atribuidas principalmente a las bacterias del género *Pasteurella*, *Bordetella* y *Actinobacillus* (Leman, 1986; Taylor, 1981).

Recientemente se ha centrado la atención en varios factores de virulencia entre los cuales se encuentran las exotoxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En los serotipos estudiados de esta bacteria se han descrito toxinas con actividad hemolítica y/o citotóxica (Montaraz).

Bathia y cols. (1991) observaron que la hemolisina purificada (104Kd) confirió protección parcial al desafiar a ratones intranasalmente con una dosis letal de *Actinobacillus pleuropneumoniae*; esta hemolisina pertenece a un grupo de toxinas denominadas RTx (estructuralmente similares), presentes en un amplio rango de bacterias.

Por otra parte se sabe que existen cepas virulentas de *Bordetella bronchiseptica* que son hemolíticas *in vitro*, sin embargo es poco lo que se sabe acerca de ellas; por lo que el presente trabajo pretende establecer una posible identidad serológica entre las hemolisinas de *Actinobacillus* y *Bordetella* (Comunicación personal).

Se utilizó la cepa LBF de *Bordetella bronchiseptica*, la cual se sabe que es hemolítica, determinando primeramente el tiempo máximo de mayor producción de la

hemolisina para posteriormente realizar su aislamiento, purificación e identificación en geles SDS-poliacrilamida. Posteriormente se produjo un suero hiperinmune de conejo contra dicha hemolisina.

La hemolisina de *Actinobacillus* pleuropneumonia de 104 Kd fue purificada previamente en un trabajo anterior.

Por último se determinó el patrón antigénico de ambas hemolisinas para determinar su posible identidad serológica; sin embargo los resultados obtenidos indican que no existe dicha identidad entre ambas hemolisinas.

## V. JUSTIFICACION

*Actinobacillus pleuropneumoniae* es el agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP), enfermedad aguda que causa grandes pérdidas económicas a la porcicultura debido al alto índice de mortalidad. Actualmente se ha prestado atención a las citotoxinas bacterianas asociadas a procesos neumónicos del cerdo, particularmente a las hemolisinas (Inzana, 1991). Se ha reportado que las hemolisinas de *Actinobacillus* pertenecen a una familia de citotoxinas estructuralmente similares (RTx) a varios géneros bacterianos (Weich, 1991). Estas hemolisinas han sido empleadas como antígenos en pruebas serológicas enfocadas a identificar animales infectados, sin embargo se ha observado que infecciones con otros microorganismos pueden presentar falsos positivos; por lo que en el presente trabajo se pretende establecer si existe similitud estructural entre la hemolisina de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y la(s) hemolisina(s) de *Bordetella bronchiseptica*. Ya que este último microorganismo se encuentra presente en enfermedades respiratorias del cerdo (Rinitis atrófica porcina).

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 GENERALIDADES.

En las granjas porcinas la producción animal se encuentra regularmente afectada por las enfermedades infecciosas, encontrando principalmente dos tipos de afecciones: entéricas y respiratorias. En los países de América y Europa entre las causas de morbilidad y mortalidad en el ganado porcino se encuentran las respiratorias, que han sido reconocidas como un factor importante en la producción porcina intensiva (Jericho K.F.W., 1968; Muirhead M.R., 1979; Pijoan C. and Cols., 1979). En los últimos años, la atención sobre problemas respiratorios en cerdos ha sido enfocada a las neumonías, que aunque de etiología variable se atribuyen principalmente a bacterias de los géneros *Pasteurella*, *Bordetella* y *Actinobacillus*, sin que se reste importancia a Micoplasmas, Virus o interacciones entre éstos (Leman A.D., 1986; Taylor D.J., 1981).

La neumonía en el cerdo representa uno de los más graves problemas infecciosos de esta especie animal. Típicamente entre el 30-60 % de los cerdos de abasto presenta alguna lesión neumónica (Morrison R.B., 1989). El costo de esta enfermedad para la porcicultura es enorme, debido al carácter crónico que usualmente presenta, ocasionando con esto importantes pérdidas debido a las deficientes ganancias de peso, anexando esto a las pérdidas económicas asociadas a la muerte de animales y a los elevados gastos de medicamentos; por lo que se ha considerado como la principal causa de disminución de la

productividad, especialmente en cerdos de engorda (Little T.W.A., 1975; Lombin L.H., 1982; Straw B.E., 1983).

En México, las neumonías representan grandes pérdidas económicas para la porcicultura. Estudios realizados en distintos estados de la República Mexicana revelaron que un 50 % de los cerdos sacrificados en rastro presentaban lesión pulmonar (Maqueda A.J., 1977; Necoechea R., 1980).

## 1.2. ANTECEDENTES.

*Bordetella bronchiseptica* fue originalmente aislada del tracto respiratorio de perros e identificada como *Bacillus bronchicans* por Ferry en 1910, desde entonces ha sido reconocida como patógeno del tracto respiratorio en mamíferos. Entre 1912 y 1913 microorganismos con características idénticas a los microorganismos descritos por Ferry fueron aislados de cueros, simios y humanos; por lo que el microorganismo fue renombrado *Bacterium bronchisepticus*, posteriormente, en 1925 por Bergey como *Alcaligenes bronchisepticus*, en 1929 por Topley y Wilson como *Brucella bronchiseptica*, en 1935 por Haupt como *Alcaligenes bronchicanis* y en 1946 por Wilson y Miles como *Haemophilus bronchisepticus* (Barcenas, G., 1993). Fue colocada en el género de *Alcaligenes*, *Brucella* y *Haemophilus*-debido a las características morfológicas y bioquímicas las cuales son muy similares a las que presentan estos géneros. Finalmente esta bacteria lleva el actual nombre debido a que Moreno López describió el género *Bordetella* (en honor a Jules Bordet) y la



especie *Bordetella bronchiseptica* (Pittman, 1974). En 1940 Thorp y Tanner aislaron por primera vez a *B. bronchiseptica* de pulmones neumónicos de cerdos y aunque este microorganismo es patógeno ocasional en las bronconeumonías primarias de cerdos jóvenes, puede también actuar como un patógeno del tracto respiratorio inferior en animales viejos. En 1956 Switzer logró aislarla de la cavidad nasal, demostrando la habilidad de este microorganismo para inducir atrofia en los cornetes nasales, por lo que a partir de este momento se le consideró como patógeno primario de la rinitis atrófica porcina (RAP) (Barceñas, G., 1993).

### **1.3. BORDETELLA BRONCHISEPTICA.**

*Bordetella bronchiseptica* es una bacteria pleomórfica que se observa generalmente como un cocobacilo gram negativo, no produce esporas y presenta motilidad por flagelos peritricos. Estudios de microscopía electrónica, han mostrado flagelos en forma de triple hélice con dirección a la izquierda, de aproximadamente 13.9 nm de diámetro. En medio sólido crece principalmente en forma cocoide, lantes, circulares, cuando estas bacterias crecen sobre agar sangre las colonias suelen ser hemolíticas desarrollando un diámetro de 0.2 mm en dos días aproximadamente (Pittman, 1974).

En las investigaciones realizadas en torno a *B. bronchiseptica* sobresalen estudios en relación a sus factores de virulencia y las diferencias que en este sentido se presentan entre cepas patógenas y apatógenas. Cuando la bacteria fue crecida en agar, se observaron

colonias lisas y colonias rugosas, denominando a las primeras Fase I como virulentas, y a las segundas como Fase IV avirulentas (Barcnas, G., 1993). Posteriormente otras investigaciones revelaron fases intermedias (II y III). Se encontró que la Fase I es extremadamente inestable y se transforma rápidamente a la Fase II, III y IV después de varios pases en medio artificial (Nakase, 1957a, 1957b).

#### 1.4. RINITIS ATROFICA PORCINA

La rinitis atrófica porcina (RAP) es una enfermedad respiratoria crónica, infecciosa y contagiosa, que se caracteriza por rinitis y atrofia de los cornetes nasales, lo que generalmente provoca deformaciones de las estructuras óseas de la trompa, y ocasionalmente retraso en el crecimiento (Pedersen y Barford, 1981b; Backstrom y cols., 1982a). El primero en asociar a *B. bronchiseptica* con la enfermedad fue Switzer en 1956 quién reprodujo la enfermedad inoculando la bacteria aislada de un caso clínico de RAP (Ross y cols., 1963; Duncan y cols., 1966; Ross y cols., 1967; Cross y Claffin, 1962). Martineau y cols. determinaron que la dosis mínima infectiva para inducir la RAP es de  $3.0 \times 10^3$  células por ml cuando el organismo es inoculado intranasalmente a cerdos por tres días consecutivos (1982).

*Bordetella bronchiseptica* ha sido aislada de cerdos con manifestaciones clínicas de la enfermedad en varios países, incluyendo Estados Unidos (Cross y Claffin, 1962; Switzer y Farrington, 1972; Backstrom y cols., 1982b), Japón (Maeda y cols., 1971), Dinamarca

(Tornøe y cols., 1976), Inglaterra (Giles y cols., 1980a) y Holanda (Akkermans y cols., 1969); en nuestro país la enfermedad ha sido identificada a nivel de rastro, logrando aislar la bacteria de casos clínicos de RAP (Koronfield-kleiman, 1977).

Existen dos microorganismos involucrados en la etiología de la enfermedad: *B. bronchiseptica* y *Pasteurella multocida* con las que se ha logrado desarrollar experimentalmente la atrofia de los cornetes nasales de cerdo y ratón cuando estos han sido inoculados con cultivos puros por vía intranasal (Sawata y Kume, 1982; Semjén y Magyar, 1985; Montaraz y cols., 1985; Switzer, 1956). Además esta enfermedad se ha asociado a las toxinas de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*, reportadas como responsables del cuadro rinitico (Roope II y cols., 1987). En el trabajo de Harris y Switzer en 1968 observaron que lechones inoculados a los tres días de edad con *P. multocida* serotipo D, desarrollaron sólo leves lesiones microscópicas en los cornetes y la bacteria era eliminada rápidamente. Sin embargo, si la infección era seguida por inoculación con *B. bronchiseptica*, *P. multocida* se establecía y permanecía en la cavidad nasal del cerdo. Se ha observado que cuando *B. bronchiseptica* es el único agente etiológico involucrado, la lesión en los cornetes nasales es leve y tiende a regenerar espontáneamente (Nielsen y cols., 1976; Smith y cols., 1982; Rutter y Rojas, 1982).

Pedersen y Elling (1984) sugieren que la infección con *B. bronchiseptica* deprime la resistencia de la mucosa nasal y facilita el establecimiento de cepas de *P. multocida* productoras de toxina presentándose las manifestaciones clínicas de la RAP.

## 1.5. TRANSMISION.

La principal forma de transmisión de la enfermedad es por contacto directo a través de aerosoles infectados, los cerdos expuestos pueden desarrollar rinitis catarral, faringitis y otras alteraciones antes de manifestar la RAP (Harris y Switzer, 1968; Martineau y cols., 1982).

## 1.6. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE *B. bronchiseptica*.

*Bordetella bronchiseptica* puede ser aislada del tracto respiratorio de animales con RAP por medio de raspado nasal o traqueal. Los aislamientos primarios son inoculadas usualmente sobre medios selectivos conteniendo penicilina, estreptomycinina y nistatina (Füzi, 1973; Farrington y Switzer, 1977). Generalmente las placas son incubadas a 35-37° C por 40 a 72 h, y las colonias resultantes presentan un color cremoso brillante y borde liso. A las colonias presuntivas se les realiza una tinción de Gram, y las reacciones bioquímicas para el género y especie específicas. *B. bronchiseptica* es diferenciada de otros cocobacilos gram negativos por la utilización de 200 ug de nitrofurantoina por ml en agar (Füzi, 1975).

Esta bacteria puede crece en agar o medio liquido conteniendo un mínimo de proteína. Para un crecimiento máximo en medio liquido necesita aireación, temperatura de 35 a 37° C y controlar el pH con un amortiguador de sales. Cuando crece en agar sangre las

colonias son generalmente hemolíticas y brillantes, de un diámetro de 1.0 a 2.0 mm (Goodnow, 1980).

Sin embargo, existen reportes de aislamientos primarios nasofaríngeos de roedores que produjeron colonias no hemolíticas con un diámetro de 0.2 mm después de un cultivo de 24 h. de incubación, además la movilidad de estos aislamientos fue detectada en cultivos de tres días (Simpson y Simmons, 1976).

### **1.7. FACTORES DE VIRULENCIA.**

La primera descripción detallada de una toxina intracelular de *B. bronchiseptica* se realizó en 1939 por Evans y Maitland (cit. en Barcenas, 1993).

Estudios recientes muestran que la capacidad de producir la toxina dermonecrotica esta altamente correlacionada con el grado de virulencia de las cepas. Esta toxina se caracteriza por producir eritema, edema, induración y necrosis cuando es inyectada en forma intradérmica en el cuye (Collings y Rutter, 1985; Hanada y cols., 1979; Roop II y cols., 1987).

La endotoxina de *B. bronchiseptica* altera algunos procesos respiratorios y la acumulación de calcio en mitocondrias; este efecto era parecido al producido por un estado de hiperparatiroidismo, el cual produce resorción ósea con lesiones similares a las

observadas en los cornetes nasales de cerdos con RAP (Harris y cols., 1968; 1971). Existe en forma de complejo proteína-lipopolisacárido en membranas vesiculares, esta endotoxina membranaral al parecer interactúa con membranas mitocondriales y así modifica los procesos enzimáticos mitocondriales y morfológicos (Harris y Switzer, 1968). Otro factor de virulencia de descripción reciente para el género *Bordetella* es la enzima adenil ciclasa la cual cataliza la formación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (Novotny y cols., 1985). La adenil ciclasa puede jugar un papel tal como evasión de la respuesta inmune del hospedador (Demostraron que sobrenadantes de *B. pertussis* contenían un factor que inducía una disminución en la producción de iones superóxido en macrófagos alveolares y neutrófilos alterando la capacidad bactericida de estos últimos en los que se observaba un incremento substancial en el contenido intracelular de AMPc) en la neumonía asociada a *B. bronchiseptica* (Montaraz y cols., 1985; Novotny y cols., 1985).

Con respecto a factores de adherencia, estudios *in vitro* revelaron que sólo cepas virulentas de esta bacteria se adhieren a células epiteliales de la mucosa nasal del cerdo mientras que cepas avirulentas lo hacían en forma débil (Yokomizo y Shimizu, 1979).

Así mismo la infección experimental de lechones susceptibles resulta en una pérdida marcada de cilios en el epitelio respiratorio. La afinidad de *B. bronchiseptica* por el epitelio nasal ha sido también observada en otras especies animales como conejo y perro (Bemis y Appel, 1977a; Matsumaya y Takino, 1980).

Se ha observado que cepas patógenas de este microorganismo aglutinan eritrocitos de bovino mientras que cepas apatógenas no, corroborando así la existencia de factores de adherencia (Semjén y Magyar, 1985).

## 1.8. SUSCEPTIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS.

*Bordetella bronchiseptica* es susceptible a varios agentes antimicrobianos in vivo e *in vitro* (Azeci y cols., 1973; Frost y cols., 1976; Switzer y Farrington, 1975). Switzer y Farrington reportaron que *B. bronchiseptica* fue susceptible a las drogas sulfonamidas, en particular a la sulfametazina y sulfonatazol (1975). Estas drogas fueron efectivas en el control de infecciones con *Bordetella* en hatos de cerdos; sin embargo, investigaciones posteriores probaron que se desarrollaron cepas resistentes. Wilkins y Helland (1973) establecieron que aislamientos de *B. bronchiseptica* recuperadas de perros con traqueobronquitis fueron resistentes a lincomicina, penicilina, estreptomocina, nitrofurantoina y tilosina. En contraste, muchas de estas cepas bacterianas de perros fueron susceptibles a novobiocina, tetraciclina, ampicilina, cloramfenicol, eritromicina y kanamicina (Wilkins y Helland, 1973).

Más recientemente Bemis y Appel (1977) fundamentaron que cepas de *B. bronchiseptica* fueron susceptibles a clorhexidina (Nolvason) cuando se evaluó *in vitro*, mientras que el nolvason no fue valioso en reducir el número de células de *Bordetella* en el tracto respiratorio de perros infectados. El fracaso eventual de muchos agentes

antimicrobianos para el control de enfermedades respiratorias producidas por *B. bronchiseptica* en cerdos posiblemente es mediada por factores R (plasmidos). Hedges y cols. aislaron un plasmido de 34.6 megadalton de una cepa silvestre de *B. bronchiseptica*; este plásmido confiere resistencia a la ampicilina, estreptomycin, sulfonamidas y sales de mercurio (1974).

Terakado y cols. demostraron que los factores R acarrear resistencia a sulfadimetoxina, estreptomycin y aminobenzil penicilina presentados en cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de cerdos (1973).

En general *Bordetella* es sensible a eritromicina, cloranfenicol, bacitracina, benzilpenicilina, tetraciclina, novobiocina o trimetroprin (Ohmae y cols, 1973).

### 1.9. *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* es una bacteria anaerobia facultativa, pleomórfica 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  $\mu\text{m}$ , es Gram negativa y requiere de factor V (dinucleótido nicotinamida) o plasma 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 (Gilbride, 1983; Kume, 1985).



*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 (Gilbride y Rosendal, 1983; Kume y cols, 1985).

Los medios de cultivo que requiere para su aislamiento deben ser ricos tales como: BHI, Todd-Hewitt, gelosa sangre, gelosa chocolate y soya tripticaseina enriquecidos con 0.01% de NAD y 1% de extracto de levadura. Al aislar una cepa de *Actinobacillus* 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 (Gilbride y Rosendal, 1983).

#### 1.10. PLEURONEUMONIA CONTAGIOSA PORCINA

*Actinobacillus pleuropneumoniae* es el agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP). La manifestación más aparente de esta enfermedad es la muerte repentina de los animales y la presencia de hemorragia nasal, debidas al proceso inflamatorio del parénquima del pulmón, con un incremento en la permeabilidad vascular, resultando una hemorragia y exudación de fibrina (Devenish J., Rosedal S, 1990; Barcenás G. y Rodríguez M., 1990).

En México se reportó el primer brote en el estado de Tlaxcala y posteriormente en los estados porcicultores del Bajío (Chan Ch. and cols., 1978; Mylrea P. Cols., 1974; Nielsen R., Olander H.J., 1963; Shiefer B. and Greenfield J., 1974; Necoechea R., 1980).

Existen factores que predisponen a los problemas respiratorios entre los que se encuentran: cambios bruscos de temperatura, malas condiciones de higiene, estrés ocasionado por el manejo de los animales, así como la densidad de la población animal; juegan un importante papel en la incidencia y gravedad de la enfermedad (Landquist J.O., 1974; Shultz R.A., 1985).

#### **1.11. TRANSMISION**

La transmisión de *A. pleuropneumoniae* se lleva acabo principalmente por contacto directo de cerdo a cerdo a través de aerosoles, esta forma de transmisión se intensifica cuando:

- a) Se utilizan corrales o jaulas que permiten el contacto.
- b) Se mezclan constantemente animales de diferentes grupos.

Los brotes se presentan súbitamente y se detectan por la muerte de algunos cerdos en la granja o pira (Shultz R.A., 1985) ya que existen animales que poseen a la bacteria como un comensal del tracto respiratorio superior, de tal manera que puede diseminarse a

través del aire, agua o alimentos expandiéndose de esta forma a toda la para (Byrd W. and Kadis S, 1992; Fenwick B.W. and Osburn B.L., 1986; Fenwick B.W., 1986).

#### **1.12. FACTORES DE VIRULENCIA.**

Varios factores de virulencia han sido asociados con la patogenia de *A. pleuropneumoniae*, los cuales son: hemolisinas, polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos, factor de permeabilidad y proteínas de membrana externa, incluyendo proteínas reguladoras de hierro. Los polisacáridos capsulares son serotipo-específico y pobremente inmunogénicos (Frey J., 1988; Kume K.T., 1986; Piojan C., 1986; Uedeze F.A., 1987).

De los 12 serotipos de *A. pleuropneumoniae* el serotipo 1 muestra una alta virulencia en cerdos, la cual es reflejada por la gran zona de hemólisis observada en agar sangre (Devenish J., Rosedal S., 1990). La hemolisina del serotipo 1 es una proteína con un peso molecular de 104 kd, tiene actividad tóxica para neutrófilos; los cerdos convalescientes con pleuroneumonía tienen anticuerpos neutralizantes contra esta hemolisina (Devenish J., Rosedal S., 1990; Frank A., 1992).

Varios patógenos producen proteínas que son capaces de actuar sobre la membrana de las células animales induciendo su lisis y, por consiguiente su muerte. La acción de estas toxinas se puede detectar más fácilmente con los eritrocitos, y por ello suelen denominarse hemolisinas; sin embargo, probablemente en todos los casos también tienen efecto sobre

otras células, además de los eritrocitos. La producción de tales toxinas se puede demostrar con facilidad activando el microorganismo en una caja de cultivo con agar sangre. Durante el crecimiento de las colonias se libera parte de la hemolisina y se destruyen los eritrocitos que la rodean, formando una típica zona clara. Pueden encontrarse diferentes grados de hemólisis:

Alfa - hemólisis: es una hemólisis incompleta se presenta con un halo de color verde alrededor de la colonia.

Beta - hemólisis: es una hemólisis completa se presenta por medio de un halo transparente (zona clara) alrededor de la colonia.

Gamma - hemólisis: no se observa ningún cambio alrededor de la colonia; no hay hemólisis (Brock y cols., 1987).

Estas hemolisinas no solo parecen intervenir en la patogenia de la enfermedad, sino que también se les ha utilizado como antígenos en pruebas serológicas enfocadas a identificar animales infectados (Devenish J. Cols., 1990).

Devenish determinó la respuesta humoral y la inmunoprotección en cerdos inmunizados con la hemolisina purificada del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* y desafiados posteriormente con la bacteria virulenta. La asociación entre anticuerpos neutralizantes y la inmunoprotección indican que la hemolisina es un importante factor de virulencia. Se ha reportado que las hemolisinas de *A. pleuropneumoniae* pertenecen a una

familia de toxinas estructuralmente similares, presentes en varios géneros bacterianos (Welch R.A., 1991).

Esto último puede acarrear problemas en las pruebas serológicas, pues infecciones con otros microorganismos pueden producir resultados falsos positivos. *Bordetella bronchiseptica* es un patógeno del tracto respiratorio cuyas cepas virulentas son hemolíticas *in vitro*; es poco lo que se sabe acerca de la(s) hemolisina(s) de *B. bronchiseptica* de manera que los objetivos de este trabajo son:

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Obtener la hemolisina de la cepa LBF de *Bordetella bronchiseptica* y establecer una posible identidad serológica entre las hemolisinas de *Bordetella bronchiseptica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar mediante la cinética de crecimiento de *Bordetella bronchiseptica* el tiempo de máxima producción de hemolisina y si es excretada al medio de cultivo.
- Obtener la hemolisina de una cepa hemolítica de *Bordetella bronchiseptica* mediante la técnica de precipitación de proteínas con sulfato de amonio en frío.
- Establecer el patrón electroforético del sobrenadante de la cepa hemolítica de *Bordetella bronchiseptica*.
- Intentar su identificación serológica con la técnica de inmunoelectrotransferencia.
- Establecer una posible identidad serológica con la hemolisina de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un modelo experimental de infección: en el conejo.

### **3. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

#### **3.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

##### **3.1.1. Cepas.**

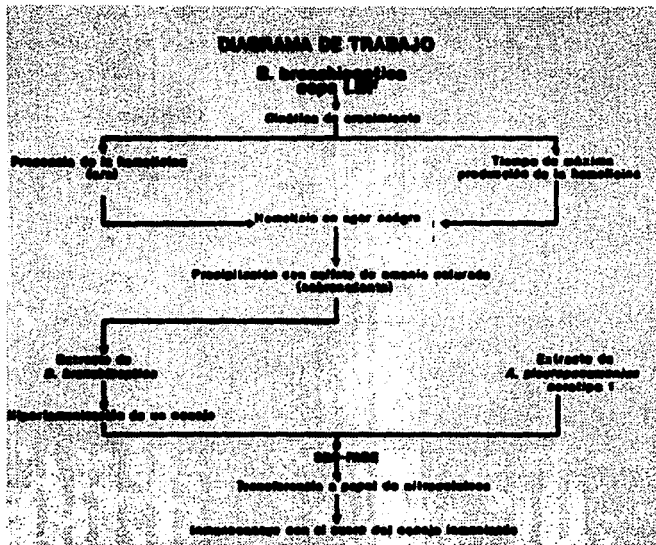
Se trabajó con la cepa de *Bordetella bronchiseptica* LBF, aislada de un cerdo con signos clínicos de RAP (proporcionada por Wellcome Research Laboratories Beckenham, Inglaterra). La cepa se conservó a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

##### **3.2. MEDIOS DE CULTIVO.**

Los medios de cultivo empleados fueron placas de agar Mac Conkey, base de agar sangre y medio líquido de infusión de cerebro y corazón (BHI).

##### **3.3. REACTIVOS.**

Todos los reactivos empleados para la elaboración de este trabajo fueron de marca Baker, Merck y Sigma de grado reactivo y los medios de cultivo fueron marca Bioxon. El conjugado (anticerdo peroxidado) marca Sigma fue donado por los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios, NVSL, Unidad de Reactivos Virales, Ames, Iowa, E.U.





### **3.4 PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO**

La cepa de *B. bronchiseptica* se cultivo en agar Mac Conkey, a la cual se le realizaron las siguientes pruebas para verificar su taxonomía: Tinción de Gram, catalasa, oxidasa, producción de H<sub>2</sub>S, indol, motilidad, ureasa, citrato, nitrato, oxidación /fermentación e hidrólisis de carbohidratos (sacarosa, lactosa, maltosa y manitol) (Cowan, 1974; Macc Faddin, 1980).

### **3.5. PRUEBA DE SENSIBILIDAD DE *B. bronchiseptica* A ANTIBIOTICOS.**

En una placa con medio Mac Conkey se sembró la bacteria en forma masiva y se procedio a colocar un sensidisco sobre la superficie de la placa, se incubo a 37° C durante 48 h.

### **3.6. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Bordetella bronchiseptica*.**

Se sembró la cepa de *B. bronchiseptica* en una placa de agar Mac Conkey en forma masiva incubándose a 37° C durante 48 h. Posteriormente se inoculó un matraz que contenía 50 ml de caldo BHI con una asada de bacterias tomada del crecimiento bacteriano anterior y se incubó durante 48 h a 37° C en agitación constante a 160 U/min.

Posteriormente a las 48 h de incubación se inocularon matraces que contenían 300 ml. de caldo BHI con un volumen equivalente al 10% v/v del total del mismo medio, incubándose a 37° C en agitación constante a 150 rpm. Posteriormente se tomaron muestras al tiempo cero y cada dos horas para determinar la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm; así como para verificar la pureza del cultivo (en una caja de agar Mac Conkey se colocaron 20 ul de sobrenadante y se incubó a 37° C durante 48 h).

### **3.7. PRODUCCION DE HEMOLISIS EN AGAR SANGRE**

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el punto 3.6. El volumen extraído de cada muestra se centrifugó a 3 500 rpm durante 15 minutos al sobrenadante obtenido se le determinó la actividad hemolítica de la siguiente manera :Se colocaron 20 ul del sobrenadante en placas de agar sangre al 3%, empleándose eritrocitos de diferentes especies (bovino, carnero); las placas se incubaron a 37° C durante 48 h. Posteriormente se observó la producción de hemólisis.

### **3.8. EXTRACCION DE LA HEMOLISINA DE *B. bronchiseptica***

Conocido el tiempo óptimo para producir el mayor grado de hemólisis, se procedió de la misma forma que se describe en el punto 3.6. Transcurrido el lapso de tiempo establecido se procedió a la extracción de la hemolisina, mediante la siguiente técnica:

### **3.8.1. PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.**

El cultivo bacteriano se centrifugó a 18 000 rpm durante 15 min, para obtener el sobrenadante.

Al sobrenadante se le adicionaron lentamente 300 ml de la solución saturada de sulfato de amonio (pH 7.8), con agitación constante y en cámara de hielo. Se continuó agitando durante 25 minutos después de terminada la adición del sulfato de amonio.

La suspensión se dejó reposar durante 15 minutos a 4° C. Posteriormente se centrifugó a 4 000 rpm durante 15 min, el precipitado obtenido se resuspendió en solución salina fisiológica (SSF), y se dializó 48 h en SSF en frío manteniéndose en agitación; durante este lapso de tiempo se le realizaron dos cambios diarios de la solución para eliminar completamente el sulfato de amonio (se tomaban alícuotas de la SSF y se le realizaba la prueba con cloruro de bario [0.1 M] para detectar la ausencia de sulfato de amonio).

La muestra dializada fue concentrada mediante el método de azúcar glass, guardándose hasta su utilización a 5° C.

### **3.8.2. ANALISIS DEL EXTRACTO DEL SOBRENADANTE BACTERIANO**

Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976) al sobrenadante bacteriano de la cepa de *B. bronchiseptica* trabajada, así como la prueba de homólisis en agar sangre (anteriormente descrita).

### **3.9. OBTENCION DEL SUERO DE CONEJO HIPERINMUNE**

Se emplearon dos conejos Nueva Zelanda de aproximadamente 2 kg de peso corporal para la obtención de suero hiperinmune; empleando el antígeno de *B. bronchiseptica* cepa LBF preparado como se describió en el punto 3.8; mediante el siguiente protocolo de inmunización:

## PROTOCOLO DE INMUNIZACION:

Tomado del Manual de Prácticas de Inmunología (del IPN)

Inyección #	Día	Dosis
(1)	0	5.0 mg del antígeno disuelto en 1ml de salina, emulsionados en el mismo volumen de adyuvante completo de Freund. Via I.D.
(2)	15	5.0 mg del antígeno disuelto en 1ml de salina, emulsificados en el mismo volumen de adyuvante incompleto de Freund. Via I.D.
(3)	30	0.250 mg del antígeno en solución salina. Via I.V.
(4)	31	0.500 mg del antígeno en solución salina. Via I.V.
(5)	32	1.0 mg del antígeno en solución salina, via I.V.
sangrar	39	

### **3.9.1. DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS AGLUTINANTES**

La titulación del suero hiperinmune obtenido se realizó por medio de la prueba de aglutinación en microplaca, de la siguiente manera: Se colocaron 20  $\mu$ l del suero problema en el primer pozo de una de las hileras de la microplaca y se agregaron 80  $\mu$ l de PBS pH 7.2. Posteriormente se realizaron diluciones dobles en el resto de los pozos de la misma hilera, considerando un volumen final de 50  $\mu$ l por pozo y después se añadieron 50  $\mu$ l de la suspensión de *B. bronchiseptica* cepa LBF inactivada con formaldehído al 0.3% a cada pozo, se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante 24-48 h aproximadamente y se procedió a realizar la lectura. Se consideró una prueba positiva cuando se observó una clara aglutinación, y negativa cuando se observó la formación de un botón de bacterias. El título se reportó como máxima dilución donde se observó aglutinación.

### **3.10. ELECTROFORESIS DE LOS EXTRACTOS BACTERIANOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DUODECIL-SULFATO DE SODIO (SDS).**

Se empleó un sistema de geles discontinuos de acuerdo al procedimiento de Laemmli (1970); se utilizó un gel de separación al 12.5%, uno de concentración al 3.7% y la solución amortiguadora de corrida fue Tris 0.025 M, glicina 0.192 M-SDS al 0.1%, pH 8.3 (ver apéndice). La mezcla del gel de separación se vertió rápidamente al molde de electroforesis. Una vez que el gel polimerizó se adicionó la mezcla del gel de concentración, se colocó el

peine de 15 dientes, el cual se retiró cuando el gel hubo polimerizado, quedando de esta forma los carriles bien definidos.

### 3.10.1. PREPARACIÓN Y CORRIMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Se colocaron los  $\mu$ l suficientes de muestra que contuvieran aproximadamente 20  $\mu$ g de proteína en tubos Eppendorf debidamente etiquetados, se les agregó el mismo volumen de solución digestora (ver apéndice) se mezclaron y se mantuvieron en ebullición en Baño María durante 3 min. Posteriormente con la ayuda de una jeringa Hamilton se colocó el volumen preparado de la muestra en los carriles del gel de concentración, junto con la muestra problema se corrió en carriles adyacentes marcadores de peso molecular (Fosforilasa b, 94 Kd; Albúmina sérica bovina, 67 Kd; Ovoalbúmina, 43 Kd; Anhidrasa carbónica, 30 Kd; Inhibidor de tripsina de soya, 20.1 Kd y Alfa-lactoalbúmina, 14.4 Kd), con el fin de tomarlos de referencia y poder realizar el cálculo de los pesos moleculares de la proteínas desconocidas presentes en la muestra. Junto con la muestra problema de *B. bronchiseptica* se corrió un concentrado del extracto del sobrenadante de un cultivo de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 (muestra preparada anteriormente por medio de la técnica de precipitación con sulfato de amonio, para otro estudio).

La electrofóresis se corrió a 20 mA hasta que las muestras penetraron en el gel de separación y posteriormente a 25 mA hasta el momento en que el colorante que sirve de referencia llegó al final del gel de separación.

### **3.10.2. TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA DUODECILSULFATO DE SODIO CON AZUL DE COOMASSIE R-250 (A.C.).**

Se desensamblaron los moldes del gel cuidadosamente, se separó el gel concentrador del gel separador y se colocó este último en la solución teñidora (ver apéndice) durante 12 h. Una vez transcurrido el tiempo se sacó cuidadosamente y se colocó en agitación en la solución desteñidora I (ver apéndice) durante 1 h aproximadamente. Posteriormente se transfirió a la solución desteñidora II (ver apéndice) hasta que el colorante en el gel se eliminó y las bandas de proteínas se distinguieron perfectamente.

### **3.10.3. DESHIDRATACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA DUODECILSULFATO DE SODIO**

Una vez desteñidos los geles se sumergieron en la solución conservadora (Metanol 50%; Glicerol 10%; Agua 40%) en refrigeración durante 12 h. Después se colocaron en el aparato secador de geles (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS -drygeljr- Modelo SE540), que consiste en una parrilla sobre la cual se colocaron 2 hojas de papel filtro Whatman No. 1, sobre éstas los geles, después una placa de plástico dura y por último una de plástico flexible. Esta última permitió que al momento de conectar la bomba de vacío el sistema se sellara y con el calentamiento de la parrilla, en 1 h aproximadamente los geles se deshidrataron, para de esta forma analizarlos y conservarlos.



### **3.10.4. CURVA PATRÓN DE LA MOVILIDAD RELATIVA DE PROTEÍNAS.**

Se elaboró una curva patrón que mostró la relación entre el logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas estándares (eje de las Y) y la movilidad relativa de estas proteínas en el gel de poliacrilamida (eje de las X). La recta fue ajustada mediante el tratamiento matemático de mínimos cuadrados y a través de una regresión lineal se determinaron los valores de los pesos moleculares de las proteínas problemas de las diferentes muestras trabajadas.

### **3.10.5. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE MOVILIDAD RELATIVA (Rf) DE LAS PROTEINAS**

La movilidad relativa de las proteínas contenidas en las muestras consiste en el desplazamiento que tienen éstas con respecto a la distancia total que corre la muestra, este dato se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por las proteínas (banda).}}{\text{Distancia total recorrida por la muestra}}$$

### 3.11. PRUEBA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET) EN PAPEL DE NITROCELULOSA

Se colocó con cuidado el gel de poliacrilamida con las proteínas a transferir sobre un papel filtro previamente humedecido con el amortiguador de transferencia (ver apéndice) y se procedió a colocar a los integrantes del sistema en el siguiente orden:

Acrílico -----  
Fibra -----  
Papel filtro -----  
Nitrocelulosa -----  
Gel de poliacrilamida -----  
Papel filtro -----  
Fibra -----  
Acrílico -----

Lo anterior se colocó en el cassette del aparato de electrotransferencia (GENIE BLOTTER Modelo 4017, Idea Scientific Company). Al colocar el papel sobre el gel se verificó que no existan burbujas entre ambas superficies ya que esto evita una transferencia óptima. Posteriormente se colocó el cassette en la cámara de transferencia, se conectaron los electrodos de tal manera que el cátodo quede del lado del gel y se conectó el sistema a la fuente de poder (BATTERY CHARGER SCHAUER MOD. 4612, Idea Scientific Company). La transferencia se realizó durante hora y media a 12 volts. Al término de la

transferencia se cortó una tira de 0.5 mm de ancho y se procesó para detectar las proteínas transferidas mediante la tinción con negro de amido.

### **3.11.1. TINCION CON NEGRO DE AMIDO DE LAS PROTEINAS TRANSFERIDAS.**

Se colocó la tira de papel de nitrocelulosa (NC) en un recipiente con solución de negro de amido al 0.1% (ver apéndice) por un lapso de 5 min, transcurrido este tiempo se lavó con agua destilada por 1 min y posteriormente con la solución desteñidora (la misma para la tinción sin el colorante) las veces que fueron necesarias para observar la aparición de las bandas. Por último se enjuagó con agua destilada para remover los residuos de la solución desteñidora.

### **3.11.2. ENSAYO INMUNOENZIMATICO**

**A) Reacción de los extractos de los sobrenadantes bacterianos con el suero hiperimmune. Los reactivos utilizados en esta técnica fueron :**

- Suero anti-conejo peroxidado (Sigma & Chemicals Co.).
- TBS, pH=7.2 (ver apéndice).
- Solución reveladora (ver apéndice).
- Suero de conejo.

## **B) Reacción con el suero problema**

El papel de NC con las proteínas transferidas se colocó en un recipiente con la solución de bloqueo (leche descremada al 5%) durante 1 hora en agitación. Se realizaron 3 lavados con buffer TBS-Tween 20 al 0.05% y posteriormente se cortaron tiras de 5 mm de ancho y se colocaron dentro de tubos de ensayo. Posteriormente se agregó 2 ml de los diferentes sueros problemas diluidos 1:50 y se incubó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Después las tiras se lavaron 7 veces con buffer TBS-Tween 20 al 0.05%. En seguida se agregó 1 ml del conjugado a cada tubo, se incubaron 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se les realizó una serie de lavados, después se les agregó 1 ml de solución de revelado, se incubaron 15 minutos, se lavaron las tiras con TBS y por último se dejaron secar a temperatura ambiente.

Las bandas se tificaron de color violeta.

## 4. RESULTADOS

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

En la Tabla 1 se presentan las pruebas bioquímicas correspondientes a la identificación de la cepa LBF de *B. bronchiseptica* empleada en este estudio y los resultados obtenidos concuerdan completamente con los reportados en la bibliografía (Cowan, 1974). Con respecto a la morfología colonial en agar Mac Conkey a las 48 h la cepa LBF presentó colonias pequeñas de forma circular, brillantes, con elevación convexa y bordes regulares.

### 4.2. PRUEBA DE SENSIBILIDAD DE *B. bronchiseptica* A ANTIBIOTICOS.

En la Tabla 2 se describen los resultados obtenidos para esta prueba, de la cual se desprende que el cloranfenicol es el antibiótico de elección ya que se observó una mayor zona de inhibición del crecimiento de *B. bronchiseptica*. La concentración de antibiótico a la cual se observó una mayor inhibición del crecimiento bacteriano en agar sangre fue de 1200 ug/ml de medio.

**TABLA 1**

Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa LBF de *Bordetella  
bronchiseptica*

PRUEBA	RESULTADO
GRAM	-
CATALASA	+
OXIDASA	+
PRODUC. H <sub>2</sub> S	-
INDOL	-
MOTILIDAD	+
UREASA	+
CITRATO	+
NITRATO	+
O/F	F
SACAROSA	-
MALTOSA	-

(-) Negativo

(+) Positivo

(F) Fermentativo

**TABLA 2**

**Resultados Cualitativos del antibiograma realizado a la cepa LBF de *Bordetella  
bronchiseptica***

<b>ANTIBIOTICO</b>	<b>SENSIBILIDAD</b>
Cloranfenicol	S
Amikacina	S
Netilmicina	I
Pefloxacina	I
Gentamicina	I
Carbericilina	R
CRD	R
Sulfametoxazol	R
Cefalotina	R

(S) Sensible

(I) Intermedio

(R) Resistente

#### **4.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO.**

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento de la cepa LBF de *B. bronchiseptica* y en la Figura 1 la curva correspondiente. De estas se desprende que a las 24 h se observó el mayor crecimiento bacteriano.

#### **4.4. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL SOBRENADANTE DE *B. bronchiseptica***

Para esta prueba se realizaron una serie de modificaciones, debido a que se observó que la bacteria se encontraba presente en el sobrenadante aún cuando era centrifugado a 18 000 g durante 15 minutos. Esto impedía determinar si la hemolisina se excretaba o no. Por lo que se procedió a trabajar con medios de agar sangre que contuvieran Cloranfenicol, el cual inhibe el crecimiento de la bacteria.

Después de realizado lo anterior no se observó crecimiento bacteriano en agar sangre-cloranfenicol, pero si se presentó zona de hemólisis (B-hemólisis) la cual se muestra en la Figura 2; con lo cual se establece que la hemolisina de *B. bronchiseptica* es un producto de excreción. Con respecto a los tipos de eritrocitos empleados en la preparación de agar sangre se observó que en el agar preparado con los eritrocitos de carnero, la zona de hemólisis fue más visible que en el medio que se preparó con los eritrocitos de bovino Figura 3. Por lo que la prueba de hemólisis se realizó con agar sangre de carnero.

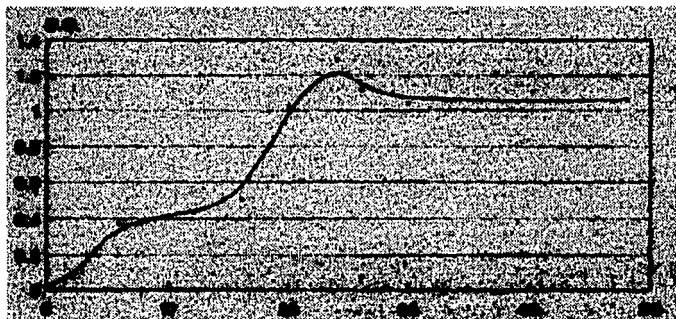


**TABLA 3****Resultados de la cinética de crecimiento de la cepa LBF de *Bordetella* brochiseptica**

HORA	DENSIDAD OPTICA*
0	.025
2	.079
4	.214
6	.372
12	.434
16	.505
20	1.017
24	1.285
26	1.118
30	1.042
48	1.062

\* Los valores son la media de las repeticiones

**FIGURA 1**

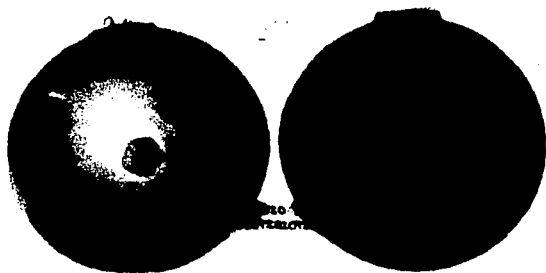


**HORA**

— Media de los valores

**Resultados de la cinética de crecimiento de la cepa LBF de *B. bronchiseptica***

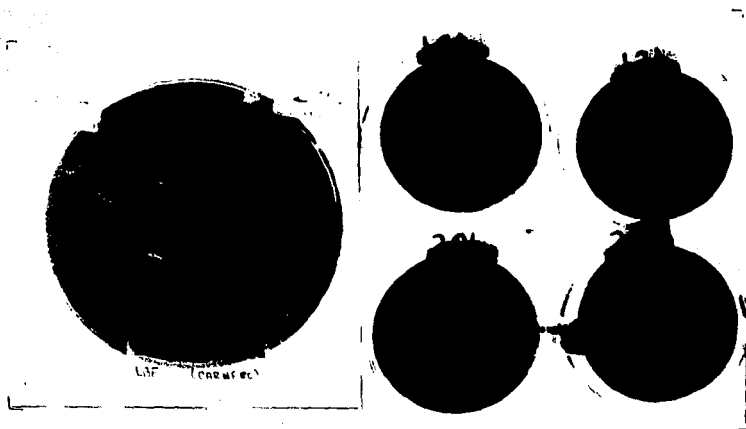
**FIGURA 2**



***Resultados de la prueba de hemolisis en Agar Sangre-Cloranfenicol***

En la figura se muestra la actividad hemolítica del sobrenadante bacteriano (no hay crecimiento bacteriano); por lo cual la hemolisina es un producto de expresión.

FIGURA 3



Comparación de la actividad hemolítica del sobrenadante del cultivo de *Bordetella bronchiseptica* en A.S. con eritrocitos de carnero y A.S. con eritrocitos de bovino.

Se observa mejor la zona de hemólisis en agar sangre de carnero que en el agar sangre de bovino, debido a este trabajo con eritrocitos de carnero.

En la Tabla 4 se reportan los resultados obtenidos de la actividad hemolítica del sobrenadante del cultivo de *B. bronchiseptica* a las diferentes horas de incubación de la cinética de crecimiento. Donde la mayor producción de hemólisis se presentó a las 20 h (Para cada hora se empleo una caja diferente).

#### **4.5. OBTENCION DEL EXTRACTO DEL SOBRENADANTE DE *B. bronchiseptica*.**

El precipitado obtenido del sobrenadante de un cultivo de 24 h de *B. bronchiseptica* presentó un color amarillento.

**TABLA 4**

**Identificación de la actividad hemolítica del sobrenante del cultivo de *Bordetella bronchiseptica* cepa LBF.**

HORAS	HEMOLISIS
0	-
2	-
4	-
6	-
12	-
16	+
20	+++
24	++
26	+
30	+
48	+

(+) Grado de hemólisis

(-) No se observó hemólisis.

#### 4.6. ANALISIS DEL EXTRACTO DEL SOBRENADANTE BACTERIANO.

Se elaboró una curva patrón, los valores de ésta se reportan en la Tabla 5 y en la Figura 4 la curva correspondiente. La concentración de proteínas obtenida del extracto del sobrenadante bacteriano fue de: 6.04 mg/ml. Para comprobar la actividad hemolítica del extracto bacteriano se realizó la prueba de hemólisis en agar sangre, la cual resulto positiva; con lo que se confirma la presencia de la hemolisina en el sobrenadante.

#### 4.7. ELECTROFORESIS DEL EXTRACTO DEL SOBRENADANTE BACTERIANO

Los valores de movilidad relativa (Rf) de las proteínas de peso molecular conocido se reportan en la Tabla 6, con los cuales se elaboró la curva patrón presentada en la Figura 5.

El patrón electroforético en gel de poliacrilamida se muestra en la Figura 6 y en la Tabla 7 se reportan los valores de los pesos moleculares de las proteínas presentes. En la Figura 7 se muestra el patrón electroforético en gel de poliacrilamida de los extractos bacterianos de *B. bronchiseptica* cepa LBF y *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 (este último fue preparado para un trabajo anterior).

**TABLA 5**

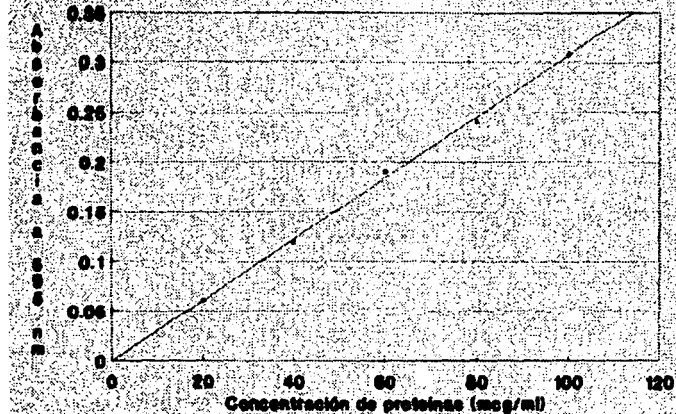
Valores para la curva patrón de proteínas (595 nm) por el método Bradford (empleando albúmina sérica bovina como proteína patrón)

CONC. DE PROTEINA	ABSORBANCIA(µg/ml)
20	0.061
40	0.119
60	0.190
80	0.240
100	0.308
<b>PROBLEMA</b>	<b>0.185</b>

Corr. 0.99, Constante = -0.0009, Coeficiente de regresión= 0.0031



**FIGURA 4**  
**Curva patrón de proteínas**



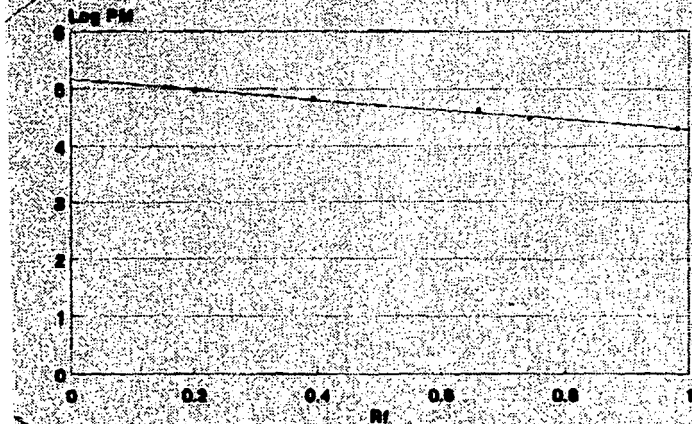
CORR. 0.99, constante = 0.0006  
coef. de regresión = 0.0021

**TABLA 6**

Valor del coeficiente de movilidad relativa (RF) y logaritmo del peso molecular (Log PM) de las proteínas patrón.

<b>PROTEINA PATRON</b>	<b>PM (Kd)</b>	<b>LOG PM</b>	<b>RF</b>
Fosforilasa b	94	4.9731	0.2018
Albumina sérica bovina	67	4.8261	0.3945
Ovoalbumina	43	4.6335	0.6606
Anhidrasa carbónica	30	4.4771	0.7431
Inhibidor de tripsina	20	4.3010	0.9817

**FIGURA 5**  
**Curva patrón de pesos moleculares**



Curv. 0.0022, coef. de reg. -0.8742  
Intercepto 6.1006

**FIGURA 6**



Patrón electroferético del extracto del sobrenadante de *Bordetella bronchiseptica* cepa LBF  
y *A. pleuropneumoniae* serotipo 1

A= Albúmina sérica bovina

C= Sobrenadante de *B. bronchiseptica* cepa LBF

B= Pesos moleculares (KD)

D= Sobrenadante de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1

**TABLA 7**

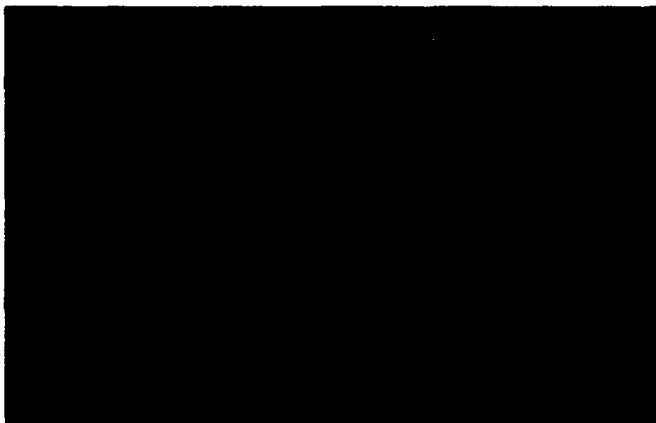
**Pesos moleculares de las proteínas del extracto del sobrenadante de la cepa LBF de *Bordetella bronchiseptica* en gel SDS-poliacrilamida.**

<b>BANDA</b>	<b>PM (Kd)</b>
1	103
2	86
3	80
4	76
5	68
6	49
7	38

#### **4.8. REACCION DEL SUERO DE CONEJO CON LOS EXTRACTOS BACTERIANOS EN LA PRUEBA DE IET**

Una vez realizada la transferencia a papel de nitrocelulosa (NC) de los patrones electroforéticos de los dos extractos bacterianos se pusieron a reaccionar con el suero de conejo inmunizado con el extracto del sobrenadante de *B. bronchiseptica*. En la Figura 8 se muestra el patrón antigénico de *B. bronchiseptica* cepa LBF y *A. pleuropneumoniae* serotipo 1. En donde se observa que para *B. bronchiseptica* se reconocieron 4 bandas de: 66, 62, 52, y 38 Kd de peso molecular y para *A. pleuropneumoniae* no se observa ningún tipo de reconocimiento (no se detectó la presencia de bandas).

FIGURA 8



Patrón antigénico de los extractos bacterianos *B. bronchiseptica* cepa LBF<sup>(A)</sup> y de *A. pleuropneumoniae*<sup>(B)</sup> serotipo 1.

El suero hiperinmune empleado para el revelado fue de un conejo inmunizado con el extracto de *B. bronchiseptica*.

## 5. DISCUSION

La porcicultura se encuentra afectada regularmente por las enfermedades infecciosas, siendo las respiratorias las principales causas de morbilidad y mortalidad; aun cuando existen dudas acerca de su etiología, estas son atribuidas principalmente a las bacterias del género *Pasteurella*, *Bordetella* y *Actinobacillus* (Leman, 1986; Taylor, 1981).

Aunque la patogenia de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP) no esta totalmente definida, en los últimos años la atención se ha centrado en varios factores de virulencia entre los cuales se encuentran las exotoxinas y endotoxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Se han descrito toxinas con actividad hemolítica y/o citotóxica en todos los serotipos estudiados de esta bacteria (Deveniah y Rosendal, 1990).

También se sabe que en la diseminación de la PCP juegan un importante papel los cerdos subclínicamente infectados, por lo que la identificación serológica de este tipo de animales no es sencilla debido a que en muchas explotaciones porcinas se inmuniza a la pira (Fenwick, 1986; Udeze and Kadis, 1992). Esto supondría teóricamente que la diferenciación entre un animal inmunizado y uno infectado podría realizarse empleando la hemolisina como antígeno, asumiendo que el animal infectado tendría anticuerpos contra la toxina y el cerdo inmunizado no.



Devenish (1990), determinó la respuesta humoral y la inmunoprotección en cerdos inmunizados con la hemolisina purificada de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 y desafiados posteriormente con la bacteria virulenta. La asociación entre los anticuerpos neutralizantes y la inmunoprotección indican que la hemolisina es un importante factor de virulencia.

Bathia y col. (1991), observaron en un modelo de ratón que la hemolisina purificada (105 Kd) confirió protección parcial al desafiar a los ratones intranasalmente con una dosis letal de *A. pleuropneumoniae* serotipos homólogos y heterólogos, sin embargo también observaron que el serotipo puede diferir en su habilidad para producir la hemolisina.

La hemolisina de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 fue purificada y caracterizada como una proteína de 105 Kd mediante la técnica de hibridación del DNA; demostrando también que contiene fragmentos de DNA que son particularmente homólogos a los genes de *E. coli* (hly A y hly B), (Gygi, 1990). Por lo que las hemolisinas de *A. pleuropneumoniae* pertenecen a una familia de citotoxinas denominadas RTx (toxinas estructuralmente similares) (Strathdee y Lo, 1989) e incluyen estructuras relacionadas citotoxinas/hemolisinas de un amplio rango de bacterias gram negativas, incluyendo *E. coli*, *P. hemolítica*, *Proteus mirabilis*, *Proteus*, spp, *Morganella morganii*, *A. pleuropneumoniae* y *A. actinomycetemcomitans* (Lo et al., 1989; Koranakis et al., 1988; Lally et al., 1989; Change et al. 1989). Ocasionalmente con esto mayor problema para la identificación serológica ya que puede dar resultados falsos positivos.

Nakase (1957b y 1957c) y Roop II y col. (1987) describieron las diferencias en la morfología de las colonias de *B. bronchiseptica* observadas entre las 4 fases que presenta este microorganismo, dentro de las cuales se encuentra la actividad hemolítica del mismo. La fase I corresponde al primo aislamiento y el cultivo de 24 h de incubación presenta colonias pequeñas, redondas, transparentes, convexas, superficie lisa brillante con bordes definidos y con la característica de producir hemolisis (en agarsangre). La cepa LBF de *B. bronchiseptica* utilizada para la realización de este trabajo se clasificó dentro de la fase I, trabajo realizado por Barcnas (1993), sin embargo es poco lo que se conoce acerca de las hemolisinas que presenta esta bacteria. En el presente estudio se encontró que la hemolisina es un producto de excreción de la bacteria.

El diagnóstico de la infección ocasionada por *B. bronchiseptica* en las granjas esta actualmente basado en el aislamiento del microorganismo. No obstante, con la aceptación de *B. bronchiseptica* como una de las causas primarias de la RAP, varios estudios para determinar los niveles de anticuerpos han indicado que las pruebas serológicas pueden ser útiles en el diagnóstico de la enfermedad (Kang y col., 1974; Kemeny, 1973; Kemeny y Amtomer, 1973; Ogata y col., 1973). Pascale y Nicole (1993) observaron que después de la infección con *B. bronchiseptica* virulenta se presenta una primera síntesis y la persistencia de anticuerpos anti-adenilciclasa-hemolisina y anti-hemaglutininas filamentosas en el suero de ratones infectados, lo que sugirió persistencia de la bacteria o de sus antígenos; sus resultados indicaron que el complejo adenilato ciclasa-hemolisina juega un papel importante en la virulencia de esta bacteria y es un antígeno protector contra la infección.

Montaraz y col. (1985), identificaron un antígeno proteico de membrana externa de 68 Kd, el cual poseía actividad de adenilato ciclasa, empleando los anticuerpos monoclonales BBO5 y BBO7; observaron que la inyección pasiva del anticuerpo BBO5 protegía al ratón de la infección cuando era aerosolizado con la *B. bronchiseptica*.

Posteriormente se purificó el antígeno de 68 Kd por cromatografía de afinidad basada en BBO5, se evaluó su potencia para inmunizar activamente a ratones contra el desafío intraperitoneal o por aerosol, observando una disminución de los niveles de mortalidad y/o los conteos bacterianos en pulmón (Montaraz et al., 1985). Novotny y col. (1985b) en otro estudio observaron la ausencia de la proteína de 68 Kd en cepas no patógenas de *B. bronchiseptica* mientras que cepas virulentas sí la presentaban.

En este trabajo se observaron 7 proteínas del extracto de sobrenadante de la cepa LBF de *B. bronchiseptica*, mientras que en el enfrentamiento con el suero hiperinmune de conejo contra esta cepa se observaron 4. La proteína de 66 Kd fue reconocida por el suero hiperinmune de conejo por lo que se podría inferir que se trata del mismo antígeno reportado por Montaraz y col. (1985) y Barceñas (1993). Aún cuando los animales de laboratorio (conejo) no son los hospederos naturales de *Bordetella bronchiseptica*, resulta indispensable emplearlos como modelos experimentales; ya que al ser sensibles a la infección, nos proporcionan una serie de resultados los cuales podrían ser tratados de reproducir en el hospedero natural (cerdo) extrapolando éste mismo protocolo. Todo esto

con el fin de determinar si las proteínas reconocidas por el suero de conejo también son inmunogénicas para el cerdo.

En cuanto a los resultados del enfrentamiento del suero hiperinmune de conejo de *B. bronchiseptica* contra el extracto del sobrenadante de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 (hemolisina) se puede establecer que no existe relación serológica entre ambas hemolisinas. Por lo que la hemolisina de *B. bronchiseptica* no pertenece al grupo de la citotóxicas Rtx.

## 6. CONCLUSIONES

En las condiciones a las cuales se llevo a cabo la cinética de crecimiento se observó que la máxima producción de hemólisis se presentó a las 20 h.

La hemolisina de *Bordetella bronchiseptica* es un producto de expresión.

En el patrón electroforético del extracto de la cepa hemolítica de *Bordetella bronchiseptica* se observaron 9 bandas de: 205Kd, 116Kd, 97Kd, 84Kd, 66Kd, 55Kd, 45Kd, 36Kd, 29Kd.

Las proteínas inmunogénicas para el conejo del extracto del sobrenadante de la cepa LBF de *Bordetella bronchiseptica* fueron de: 66Kd, 62Kd, 52Kd, 38Kd.

Con respecto al modelo experimental tomado (Suero hiperinmune de conejo) se establece que no existe identidad serológica entre los antígenos detectados de *Bordetella bronchiseptica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

## 7. APENDICE

### 1. BUFFER DE FOSFATOS, pH 7.2.

Solución A: ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2 M): se disolvieron 27.6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en agua destilada, completando a un litro.

Solución B: ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M): 53.65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  se disolvieron en agua destilada, llevando a volumen final de un litro.

Solución A .....140 ml.

Solución B .....360 ml.

Agua destilada .....500 ml.

### 2. GELES DISCONTINUOS DE POLIACRILAMIDA DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE).

#### A) Solución de monómeros, acrilamida-bis acrilamida.

Acrilamida.....30 g.

Bis acrilamida .....0.8 g.

Agua destilada .....100 ml.

B) Regulador del gel de separación Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8.

Trizma base ..... 18.15 g.

Agua destilada ..... 90 ml.

C) Regulador del gel concentrador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.

Trizma base ..... 3.0 g.

Agua destilada ..... 40 ml.

D) Lauril sulfato de sodio, (SDS) al 10%.

E) Persulfato de amonio al 10%.

F) Gel de separación.

Solución de monómeros ..... 12 ml.

Tris 1.5 M, pH 8.8. .... 7.5 ml.

SDS 10% ..... 0.6 ml.

Agua destilada ..... 10.05 ml.

Se hizo vacío durante 15 minutos.

Persulfato de amonio 10% ..... 0.075 ml.

N<sup>o</sup>N<sup>o</sup>N<sup>o</sup>N<sup>o</sup>tetrametiletilendiamina (TEMED) ..... 0.005 ml.

**G) Gel de concentración.**

Solución de monómeros .....1.33 ml.

Tris 0.5 M, pH 6.8 .....2.5 ml.

SDS al 10% .....0.2 ml.

Agua destilada .....6.1 ml.

Se hizo vacío durante 10 minutos.

Persulfato de amonio al 10% .....0.05 ml.

TEMED .....0.005 ml.

**3. SOLUCION AMORTIGUADORA DE CORRIDA (TRIS 0.025 M, GLICINA 0.192**

**M, SDS AL 0.1%, pH 8.3.**

Trizma base .....3.0 g.

Glicina .....14.4 g.

SDS al 10% .....10 ml.

Agua destilada hasta .....11

**4. SOLUCION DIGESTORA.**

Tris 0.5 M, pH 6.8 .....4.375 ml.

SDS .....0.1 g.

Glicerol .....0.5 ml.

2-mercaptoetanol .....0.25 ml.

Azul de bromofenol .....0.05 g.



**5. SOLUCION MADRE PARA TINCION DE PROTEINAS.**

Azul de coomasie R-250 .....2 g.  
Agua destilada .....200 ml.

**6. COLORANTE DE TRABAJO PARA TINCION DE PROTEINAS COOMASIE R-250**

AL 0.125%.

Solución madre de Azul de Coomasie ....62.5 ml.  
Metanol absoluto .....250 ml.  
Acido acético glacial .....50 ml.  
Agua destilada .....137.5 ml.

**7. SOLUCION DESTENIDORA I PARA EL GEL.**

Metanol absoluto .....500 ml.  
Acido acético glacial .....100 ml.  
Agua destilada .....400 ml.

**8. SOLUCION DESTENIDORA II PARA EL GEL.**

Metanol absoluto .....25 ml.  
Acido acético glacial .....35 ml.  
Agua destilada .....440 ml.

**9. AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA (TRIS 0.025 M, GLICINA 0.192 M, pH**

**8.3, METANOL 20% V/V).**

Trizma base .....	3.023 g.
Glicina .....	14.4 g.
Metanol .....	200 ml.
Agua destilada .....	800 ml.

**10. SOLUCION DE NEGRO DE AMIDO AL 0.1 %**

Negro de amido .....	0.1 g.
Metanol .....	45 ml.
Acido acético glacial .....	10 ml.
Agua destilada .....	45 ml.

**11. SOLUCION AMORTIGUADORA DE TRIETANOLAMINA pH 7.2 (TBS).**

Cloruro de sodio .....	7.5 g.
Trietanolamina .....	2.8 ml.
Acido clorhídrico 1 N .....	17.0 ml.
Cloruro de magnesio .....	0.1 g.
Cloruro de calcio .....	0.02 g.
Agua destilada .....	980.2 ml.

## 12. SOLUCION REVELADORA.

Alfa-cloronaftol .....0.03 g.

Metanol absoluto .....10.0 ml.

TBS, pH 7.2 .....50.0 ml.

Peróxido de hidrógeno .....0.05 ml.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Akkermans, J.P., Ouwerkerk, M.H. and Terpstra, J.I., 1969. *Bordetella bronchiseptica* and infection of the nasal cavity of swine. Neth. J. Vet. Sci. 2: 76-83.

Azechi, H., Koyoma, N. and Terakado, N., 1973. Sensitivity *in vitro* to bacterial drugs of *Bordetella bronchiseptica* isolated from swinw. J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 26: 75-79.

Backstrom, L., Hoefling, D., Morkoc, A., Vinson, R. and Smith, A. R., 1982a. Atrophic rhinitis in swine I: Clinical signs, slaughter lesions, daily weight gain, disease transmission. Proceed. Int. Pig. Vet. Soc. Congress, México City. 116.

Backstrom, L., Hoefling, D., Morkoc, A., Vinson, R., and Smith, A. R., 1962b. Atrophic rhinitis in swine II: Bacteriology, *Pasteurella multocida* serotypes and pathogenicity in mouse virulence tests, preventive medication and vaccinations. Proceed. Int. Pig. Vet. Soc. Congress, Mexico City. 122.

Barceñas, G., Rodríguez, M., 1990. Diagnóstico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en cerdos utilizando el método DOT-ELISA. Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. (UNAM).

Barceñas, G., 1993. Comparación de la respuesta inmune humoral de cerdos inmunizados con *Bordetella bronchiseptica* y la des arrollada en casos clínicos de Rinitis Atrofica Porcina. Tesis profesional de maestría. Facultad de Estudios Superiores. Cuautitlán. (UNAM).

Bhatia, B., Mittal, K.R. and Frey, J., 1991. Factors involved in immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Veterinary Microbiology*. 29: 147-158.

Bemis, D.A. and Appel, M.J.G., 1977. Aerosol, parenteral, and oral antibiotic treatment of *Bordetella bronchiseptica* infections in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170: 1082-1086.

Bergey's., 1925. *Manual of determinative bacteriology*. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore, London. p. 388-392.

Brock, T.D., Smith, D.W. and Madigan, M.T., 1987. *Microbiology*. p. 535-536.

Chang, Ch. y et al., 1978. Isolation and antigen characterization of *H. pleuropneumoniae* from porcine pneumonia. *Jap. J. Vet. Sci.* 40: 103-107.

Chang, Y.F., et al., 1989. Cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *DNA*. 8: 635-647.

Collings, L.A. and Rutter, J. M., 1985. Virulence of *Bordetella bronchiseptica* in the porcine respiratory tract. J. Med. Microbiol. 19: 247-258.

Cowan, S.T., 1974. Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria. 2nd Edit. Cambridge University Press. Cambridge.

Cross, R.F. and Claflin, R. M., 1962. *Bordetella bronchiseptica* induced porcine atrophic rhinitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 141: 1467-1468.

Devenish, J., Rosedal, S., 1990. Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104 kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infection and immunity. J. Clin. Microbiol. 58: 3829-3832.

Duncan, J.R., Ross, R.F., Switzer, W.P. and Ramsey, F.K., 1966. Pathology of experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in swine: atrophic rhinitis. Am. J. Vet. Res. 27: 457-466.

Evans, G. and Maitland, H.B., 1939. The toxin of *B. bronchiseptica* and the relationship of this organism to *H. pertussis*. J. Pathol. 48: 67- 78.

Farrington, D.O. and Switzer, W.P., 1977. Evaluation of nasal culturing procedures for the control atrophic rhinitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 170: 34-35.

Fenwick, B.W., 1986. Vaccine potential of *H. pleuropneumoniae* oligosaccharide-tetanus toxoid conjugates. *Infect. Immun.* p. 583-586.

Fenwick, B.W. and Osburn, I.B., 1986. Immune response to the lipopolisaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* inconvalescent and immunized pigs. *Infect. Immun.* 54(2): 575-582.

Frank, A., 1992. Effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin on porcine neutrophil function. *Infection and Immunity.* 60: 1558-1567.

Frey, J., 1988. Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by calcio. *Infection and immunity.* 56: 2570-2575.

Frost, B.M., Valiant, M.E., Weissberger B. and Dulaney, E.L., 1976. Antibacterial activity of efrotomycin. *Jpn. J. Antibiot.* 29: 1083-1091.

Füzi, M., 1973. Selective isolation of *Bordetella bronchiseptica*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.* 22: 270-272.

Füzi, M., 1975. Nitrofuration - test for the differentiation of *Bordetella bronchiseptica*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.* 231: 466-470.

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

Giles, C.J., Smith, I.M., Baskerville, A. J. and Brothwell, E., 1980a. Clinical, bacteriological and epidemiological observations on infectious atrophic rhinitis of pigs in southern England. Vet. Rec. 106: 25-28.

Goodnow, R.A., 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol. Rev. 44: 738-772.

Gygi, D., et al., 1990. Isolation of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* haemolysin gene and the activation and secretion of the prohaemolysin of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology. 4: 123-128.

Hanada, M., Shimoda, M., Tomita, S., Nakase, Y. and Nishiyama, Y. 1979. Production of lesions similar to naturally occurring swine atrophic rhinitis by cell-free sonicated extract of *Bordetella bronchiseptica*. Jpn. J. Vet. Sci. 41: 1-8.

Harris, D.L. and Switzer, W.P., 1968. Turbinate atrophy in young pigs exposed to *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, and combined inoculum. Am. J. Vet. Res. 29:777-785.



Harris, D.L., Switzer, W.P. and Harris, R.A., 1971. A suggested mechanism for the pathogenesis of infectious atrophic rhinitis. *Can. J. Comp. Med.* 35: 318-323.

Haupt, H., 1935. Zur Systematik der Bacterieu. Die für Mensch und Tier pathogenen gram-negativen alkali - bildenden stabchenbak-terien (Aerobactereae Pribram 1929 em). *Ergeb Hyg Bakteriolog.* 17: 199-230.

Hodges, R.W., Jacob, A.E. and Smith, J.T., 1974. Properties of an R factor from *Bordetella bronchiseptica*. *J. Gen. Microbiol.* 84: 199-204.

Jericho, K.W.F., 1968. Pathogenesis of pneumonia in pigs. *Vet. Rec.* 82: 509-516.

Kang, B.K., et al., 1974. Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. II. Agglutination on *B. bronchiseptica* infection. *Jap. J. Vet. Sci.* 32: 195-304.

Kemeny, L.J., 1973. Agglutination response of pigs to intranasal of *Bordetella bronchiseptica*. *Cornell. Vet.* 63: 130-137.

Kemeny, L.J. and Amtower, W.C., 1973. *Bordetella* agglutinating antibody in swine a herd survey. *Can. J. Comp. Med.* 37: 409-412.

Koronakis, V., et al., 1988. Comparison of the haemolysin secretion protein HlyB from *proteus vulgaris* and *Escherichia coli*; site-directed mutagenesis causing impairment of export function. Mol. Gen. Genet. 213:551-555.

Korenfiel-Kleiman, L., 1977. Observaciones sobre la frecuencia de la rinitis atrófica porcina en diversos rastros del Distrito Federal y el Estado de México. Tesis profesional, Facultad de Medicina y Zootecnia (UNAM).

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

Kume, K.T., 1986. Interaction between heat-stable hemolytic substance from *Haemophilus pleuropneumoniae* and porcine pulmonary macrophages *in vitro*. Infection and immunity. 51: 563-570.

Labaw, L.W. and Mosley, V.M., 1955. Periodic structure in the flagella of *Brucella bronchiseptica*. Biochem. Biophys. Acta. 17: 322-324.

Laemmli, V.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature, London. 227: 680-685.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Lally, E.R., et al., 1989. Analysis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. J. Biol. Chem. 264: 15451-15456.

Landquist, J.O., 1974. Animal and environment in the production patterning pigs. Acta. Vet. Scand. Suppl. 51.

Leman, A.D., 1986. Disease of swine 6th Ed. The Iowa State University Press. Ames. (Iowa), U.S.A. p. 426-436.

Leslie, P.H. and Gardner, A.D., 1931. The phases of *Haemophilus pertussis*. J. Hyg. 31: 423-434.

Little, T.W.A., 1975. Respiratory disease in pigs a study. Vet. Rec. 96: 540-544.

Lo, R.Y.C., et al., 1987. Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica*. A 1. Infect. Immun. 55: 1987-1996.

Lombin, L.H., 1982. Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. Can. J. Comp. Med. 46: 109-114.

Macc Faddin, F.J., 1980. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana, Buenos Aires, Argentina, S.A. p. 274.

Maeda, M., Tokuhisa, S., and Shimizu, T., 1971. Nasal lesions and *Alcaligenes bronchisepticus* infection in swine atrophic rhinitis. Natl. Inst. Anim. Health Q. 11: 151-158.

Maqueda, A.J., 1977. Incidencia de neumonia enzoótica en varios Estados productores de cerdos de la República Mexicana. AMVEC. UAM. México. p. 1.

Martineau, G.P., Broes, A., Jong de, M.F. Martineau-Roize, B., 1982. Experimental reproduction of atrophic rhinitis with *Pasteurella multocida* on gnotobiotic and convectional piglets. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Congress. México, City. 88.

Matsumaya, T. and Takino, T., 1980. Scanning electron microscopic studies of *Bordetella bronchiseptica* on the rabbit tracheal mucosa. J. Med. Microbiol. 13: 159-161.

Montaraz, J.A., Novotny, P. and Yvanyi, J., 1985. Identification of 68 kilodalton protective antigen from *Bordetella bronchiseptica*. Infect. Immun. 47: 744-751.

Morrison, R.B., 1989. An etiological investigation in to pneumo nia in slauhgtter weight swine. Can. J. Comp. Med. 49: 5-12.

Muirhead M.R., 1979. Respiratory disease of pigs. Br. Vet. J. 135: 497.

Myirea, P., et al., 1974. Pleuropneumonia in pigs caused by *H. parahemolyticus*. Aust. Vet. J. 70: 255-259.

Nakase, Y., 1957a. Studies on *Haemophilus bronchisepticus*. I. The antigenic structures of *H. bronchisepticus* from guinea pig. Kitasato Arch. Exp. Med. 30: 57-72.

Nakase, Y., 1957b. Studies on *Haemophilus bronchisepticus*. II. Phase variation of *H. bronchisepticus*. Kitasato Arch. Exp. Med. 30: 73-77.

Nakase, Y., 1957c. Studies on *Haemophilus bronchisepticus*. III. Differences of biological properties between phase I and phase III of *Haemophilus bronchisepticus*. Kitasato Arch. Exp. Med. XXX: 79-84.

Necochea, R., 1980. Haemofiosis en México. UAM. p. 1-7.

Nielsen R. and Olander, H.J., 1963. Experimental reproduction of atrophic rhinitis in pigs reared to slaughter weight. Proceed. Int. Pig. Vet. Soc. Congress. Ames Iowa E.U., P 1.

Nielsen, N.C., Riising, H.J. and Bille, N., 1976. Pleuropneumonia of swine caused by *H. parahemolyticus*. Studies on the protection obtained by vaccination. Acta. Vet. Med. 23: 337-348.

Novoty, P., Kobisch, M., Cownley, K., Chubb, A.P. and Montaraz, J.A., 1985. Adenylate cyclase of a 68, 000 -molecular- weight protein isolated from the outer membrane of *Bordetella bronchiseptica*. Infect. Immun. 50: 199-206.

Ogata, M., et al., 1973. Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine.IV: Agglutination test with forma lized antigen for *B. bronchiseptica* infection in pigs. Jap. Vet. Sci. 35: 1949-1955.

Ohmae and cols., 1973. Antimicrobial effect of combinations of colistin and other chemoterapeutic agents.*In vitro* effect. Annual Report of the National Veterinary Assay Laboratory, Japan. 10: 39-45.

Pascale, G. and Nicole, G., 1993. Virulence of *B. bronchiseptica*: Role of Adenylate Cyclase- Hemolysin. Infect. and Imm. 61: 4072-4078.

Pedersen, K.B. and Barford, K., 1981b. The ethiological significance of *Bordetella bronchiseptica* and *P. multocida* in atrophic rhinitis of swine. Nord. Vet. Med. 33: 513-522.

Pedersen, K.B. and Elling, F., 1984. Persistent atrophic rhinitis induced by demonecrotic *Pasteurella multocida*. Proceed. Int Fig. Vet. Soc. Congress, Ghent. p 158.

Phillips, C.E., 1943. *Alcaligenes (Brucella) bronchiseptica* as a factor in porcine pneumonias. *can J.Comp. Med.* 7: 59-59.

Pijoan, C., Ochoa G. and Mendez, D., 1979. Aislamiento de *Haemophilus parahaemolyticus* en cerdo con neumonia. *Tec. Mec. México.* 34: 85-87.

Pijoan, C., 1986. Effects of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus pleuropneumoniae* toxins on swine alveolar macrophages. *Vet. Immunol.* 13: 141-149.

Pittman, M., 1974. Genus *Bordetella* Moreno-López 1952, p 282-283 In R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Richter, G.W. and Kress, Y., 1967. Electron microscopy of a strain of *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* 94: 1216-1224.

Roop II, M.R., Veit, H.P., Sinsky, R.J. Veit, S., Hewlett, E.L. and Komegay, E., 1987. Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine. *Infect. Immun.* 55: 217-222.

Ross, R.F., Duncan, J.R. and Switzer W.P., 1963. Turbinate atrophy in swine produced by pure cultures of *Bordetella bronchiseptica*. Vet. Med. 58: 566-570.

Ross, R.F., Switzer, W.P. and Duncan, J.R., 1967. Comparison of pathogenicity of various isolates of *Bordetella bronchiseptica* in young pigs. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 31: 53-57.

Rutter, J.M. and Rojas, X., 1982. Atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets: differences in the pathogenicity of *Pasteurella multocida* in combined infections with *Bordetella bronchiseptica*. Vet. Rec. 110: 531-535.

Sawata, A. and Kume, K., 1982. Nasal turbinate atrophy in young mice inoculated with *Bordetella bronchiseptica* of pig origin. Res. Vet. Sci. 34: 287-295.

Schultz, R.A., 1985. Compendium on swine *Haemophilus pleuropneumoniae*. SDS. Biotech. Corporation. Ames. Iowa. USA.

Semjén, G. and Magyar, T., 1985. A bovine haemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* responsible for adherence. Acta. Vet. Hungarica. 33: 129-136.

Shiefer, B. and Greenfield, J., 1974. *H. parahemolyticus* saskat chewan I. Bacteriological and experimental studies. Can. J. Comp. Med. 38: 105-110.



Shirk, R.J. and Kemp, G.A., 1968. Experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in embryonated eggs. p. 178-182. Antimicrob. Agents Chemother. 1967.

Simpson, W. and Simmons, D.J.C., 1976. Problems associated with the identification of *Bordetella bronchiseptica*. Lab. Anim. 10: 47-48.

Smith, I.M., Giles, C.J. and Baskerville, A.J., 1982. Immunization of pigs against experimental infection with *Bordetella bronchiseptica*. Vet. Rec. 110: 488-494.

Straw, B.E. et al., 1983. Pneumonia and atrophic rhinitis in pigs from a test station. J. A. V. M. A. 182: 607-611.

Strathdee, C.A. and Lo, R.Y.C., 1989. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. J. Bacteriol. 171: 916-928.

Switzer, W.P., 1956. Studies infectious atrophic rhinitis. V. Concept that several agents may cause turbinate atrophy. Am. J. Vet. Res. 17: 478-484.

Switzer, W.P., 1963. Elimination of *Bordetella bronchiseptica* from the nasal cavity of swine by sulfonamide therapy. Vet. Med. 58: 571-574.

Switzer, W.P. and Farrington, D.O., 1972. Progress in the control of atrophic rhinitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in swine. J. Am. Vet. Med. Assn. 161: 1325-1331.

Switzer, W.P. and Farrington, D.O., 1973. Infectious atrophic rhinitis. p.687-711. In H.W. Dunne and A.D. Leman (ed.), Diseases of swine, 4th ed. Iowa State University Press, Ames.

Taylor, D.J., 1981. Pig Diseases. 2 Edition. The Burlintong Press (Cambridge) LTV. Foxton, Cambridge, Great Britain.

Terakado N., Azechi, H., Ninomiya, K. and Shimizu, T., 1973. Demonstration of R factors in *Bordetella bronchiseptica* isolated from pigs. Antimicrob. Agents Chemother. 3: 555-558.

Thorp, F.Jr. and Tanner, F.W., 1940. Bacteriological study of the aerobic flora occurring in pneumonic lungs of swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 96:149-160.

Thorp, F.Jr. and Tanner, F.W., 1940. Bacteriological study of the aerobic flora occurring in pneumonic lungs of swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 96:149-160. Topley, W.W.C. and Wilson, G.S., 1929. The principles of Bacteriology and Immunity 1st Ed. Edward Arnold and col., London.

Tornøe, N.M., Nielsen, N.C., and Svendsen, J., 1976. *Bordetella bronchiseptica* isolations from the nasal cavity of pigs in relation to atrophic rhinitis. Nord. Vet. Med. 28: 1-18.

Uedeze, F.A., 1987. Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolisaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 18: 768-773.

Udeze, F.A. and Kadis, S., 1992. Inhibition of bactericidal activity of anticapsular antibody by non-specific antibodies reactive with surface-exposed antigenic determinants on *A. pleuropneumoniae*. Infect. Immun. 60:3852-3860. Welch, R.A., 1991. Mol. Microbiol. 5: 521-528.

Wilkins, R.J. and Helland, 1973. Antibacterial sensitivities of bacteria isolated from dogs with tracheobronchitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 162: 47-50.

Wilson, M.P. and Miles, G., 1946. *Bordetella bronchiseptica* a reassessment of its role in canine respiratory disease. Vet. Rec. 93: 486-487.

Yokomizo, Y. and Shimizu, T., 1979. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* to swine nasal epithelial cells and its possible role in virulence. Res. Vet. Sci. 27: 15-21.