

11661 2ij



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**DESARROLLO DE UNA VACUNA ORAL EN CONTRA  
DE Actinobacillus pleuropneumoniae SEROTIPO 1**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
(AREA MICROBIOLOGIA)  
P R E S E N T A  
EDGAR AGUILERA CERON**

**DIRECTOR DE TESIS  
Ph. D. ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**1997**

**TESIS CON  
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 esta 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  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLAN  
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
FES - Cuautitlán  
Presente.

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "DESARROLLO DE UNA VACUNA ORAL EN CONTRA DE Actinobacillus pleuropneumoniae SEROTIPO 1"

que presenta el (la) alumno (a) EDGAR AGUILERA CERON

con Núm. de cuenta 8255675-0 N° Exp. 77818

para obtener el grado de MAESTRO EN MICROBIOLOGIA

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

\_\_\_\_\_ a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 19 \_\_\_\_\_

NOMBRE DE LOS SINODALES

PRESIDENTE: DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

VOCAL: DR. JORGE TORTORA PEREZ

SECRETARIO DR. ROBERTO CERVANTES OLIVARES

1er. SUPL. DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

2do. SUPL. M.C. ANDRES ROMERO ROJAS

**A EDGAR ALAN, OMAR E IRMA**

**A TI  
AUNQUE YA NO ESTES PRESENTE**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Este trabajo fue realizado en los laboratorios de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y en la Unidad de Aislamiento del Departamento de Epizootiología del CENID-Microbiología, unidad Palo Alto de la SARH, por lo que se agradece en general al personal que labora en ellos.**

**Al Dr. Eliseo Hernández Baumgarten, al Técnico Rodolfo Robles Gómez y en general a la sección de Microscopía Electrónica por su asesoría y apoyo técnico en la realización de este trabajo.**

**A los profesores del posgrado.**

**Al Dr. Roberto A. Cervantes Olivares por su asesoría, ayuda y amistad.**

**Al Dr. Abel Ciprian Carrasco por permitirme utilizar las instalaciones a su cargo y las asesorías brindadas.**

**A la Dra. Susana E. Mendoza Elvira por su apoyo y amistad incondicionales.**

**A la Dra. Sara E. Valdés Martínez por su apoyo.**

**A Oscar y Carolina por estar siempre presentes.**

**A Ana por mostrarme otro camino.**

## INDICE

<b>Indice de gráficas</b>	<b>I</b>
<b>Indice de figuras</b>	<b>II</b>
<b>Indice de tablas</b>	<b>III</b>
<b>Resumen</b>	<b>IV</b>
<b>Justificación</b>	<b>V</b>
<b>1.0 Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes	1
1.2 Transmisión, patogenia y cuadro clínico	2
1.3 Prevención de la enfermedad	5
1.4 Sistemas de liberación controlada y vacunación oral	8
<b>2.0 Objetivos</b>	<b>11</b>
2.1 Objetivo general	11
2.2 Objetivos particulares	11
<b>3.0 Materiales y métodos</b>	<b>12</b>
3.1 Cultivo del microorganismo	12
3.2 Separación de la biomasa y purificación de sólidos suspendidos	12
3.3 Purificación de lipopolisacárido y polisacárido capsular de Apl	13
3.4 Análisis de las fracciones	14
3.4.1 Determinación de proteínas (Bradford, 1976)	14
3.4.2 Determinación de carbohidratos	14
3.4.2.2 Aminoazúcares (Strominger y col., 1959)	14
3.4.2.2 Azúcares neutros (Dische y col., 1949)	15
3.4.2.3 Determinación de 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO) (Cynkin y ashwell, 1960)	15
3.4.3 Ensayo para endotoxina con lisado de amebocito de limulus	16
3.4.4 Electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS (SDS-PAGE) e Inmunotransferencia	16
3.5 Determinación del tamaño óptimo de partícula para la micronización de carbopol	17

<b>3.6 Determinación del tiempo de humectación óptimo y comportamiento ultramicroscópico de la matriz micronizada</b>	<b>18</b>
<b>3.7 Preparación de la matriz carbopol-antígeno</b>	<b>18</b>
<b>3.8 Inmunización de cerdos y desafío con Apl completo</b>	<b>18</b>
<b>3.9 Estudio histopatológico</b>	<b>19</b>
<b>3.9.1 Lesiones macroscópicas</b>	<b>19</b>
<b>3.9.2 Lesiones microscópicas</b>	<b>20</b>
<b>3.9.3 Recuperación del agente</b>	<b>20</b>
<b>3.9.4 Ensayos serológicos</b>	<b>20</b>
<b>4.0 Descripción analítica de resultados</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Cultivo del microorganismo</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Métodos analíticos</b>	<b>22</b>
<b>4.3 Análisis de las fracciones</b>	<b>32</b>
<b>4.4 Determinación del tamaño óptimo de partícula para la micronización del carbopol</b>	<b>37</b>
<b>4.5 Determinación del tiempo de humectación óptimo y comportamiento ultramicroscópico de la matriz micronizada</b>	<b>37</b>
<b>4.6 Ensayos serológicos</b>	<b>42</b>
<b>4.6.1 Aglutinación lenta en tubo</b>	<b>42</b>
<b>4.6.2 Inmunotransferencia</b>	<b>44</b>
<b>4.7 Patología</b>	<b>46</b>
<b>4.7.1 Lesiones pulmonares macroscópicas</b>	<b>46</b>
Grupo de inmunización O	46
Grupo de inmunización OI	49
Grupo de inmunización IM	50
<b>4.7.2 Aislamiento microbiológico</b>	<b>54</b>
<b>4.7.3 Histopatología</b>	<b>54</b>
Grupo O	57
Grupo OI	58
Grupo IM	58
Grupo C	59
Respuesta en placas de Peyer	59
<b>5.0 Discusión</b>	<b>60</b>
<b>6.0 Conclusiones</b>	<b>67</b>
<b>Referencias</b>	<b>68</b>

## INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1	Curva de crecimiento de <u>Actinobacillus pleuropneumoniae</u> serotipo 1	23
Gráfica 2	Cinética de crecimiento de <u>Actinobacillus pleuropneumoniae</u> ser 1 en condiciones de fermentación	24
Gráfica 3	Curva de calibración para proteínas (macrotécnica)	25
Gráfica 4	Curva de calibración para proteínas (microtécnica)	26
Gráfica 5	Espectro de Dische galactosa 0.001M	27
Gráfica 6	Espectro de Dische ramnosa 0.001M	28
Gráfica 7	Espectro de Dische galactosa-ramnosa	29
Gráfica 8	Curva de calibración ramnosa	30
Gráfica 9	Curva de calibración galactosa	31
Gráfica 10	Curva de calibración glucosamina	33
Gráfica 11	Curva de marcadores de peso molecular	35
Gráfica 12	Tiempo de humectación óptimo	39

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<b>Electroforesis en gel de poliacrilamida-Dodecil sulfato de sodio (12.5%) de los extractos de material capsular de <u>Actinobacillus pleuropneumoniae</u> ser. 1</b>	<b>34</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Corte longitudinal de una seccion de intestino tratada con microparticulas de carbopol</b>	<b>38</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Microscopia electronica de barrido de microparticulas de carbopol: comportamiento de solubilizacion</b>	<b>41</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Respuesta serica de los cerdos experimentales hacia los antigenos purificados de Ap1</b>	<b>45</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Distribucion de las lesiones en los grupos experimentales</b>	<b>47</b>
<b>Figura 6</b>	<b>Apariencia de las lesiones pulmonares (cerdos 5, 6 y 7)</b>	<b>51</b>
<b>Figura 7</b>	<b>Apariencia de las lesiones pulmonares (cerdos 11 y 12)</b>	<b>53</b>
<b>Figura 8</b>	<b>Apariencia de las lesiones pulmonares (cerdos 13, 14 y control)</b>	<b>55</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	<b>Análisis de las fracciones</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 2</b>	<b>Títulos séricos de los animales pre y posdesafío por aglutinación lenta en tubo</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 3</b>	<b>Análisis de varianza por el método de rango múltiple de Tuckey (95%) para las lesiones observadas en los grupos de inmunización</b>	<b>48</b>
<b>Tabla 4</b>	<b>histopatología de las lesiones</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 5</b>	<b>Características generales de la respuesta de los cerdos experimentales posterior al desafío</b>	<b>61</b>

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el de diseñar y evaluar una forma farmacéutica de liberación prolongada susceptible de ser utilizada para la liberación de antígenos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* que por administración oral funcionara como vacuna en contra de la pleuroneumonía contagiosa porcina. Para tal efecto, una mezcla de lipopolisacárido de tipo semi-rugoso, polisacárido capsular y las proteínas integrales de membrana externa de 76, 69, 61, 56, 50, 39-44, 29 y 16 Kd purificadas de una cepa de *A. pleuropneumoniae* del serotipo 1 se incluyeron en una matriz micronizada de Carbopol 934P. Los estudios de microscopía electrónica de barrido realizados *ex vivo* en una sección de intestino delgado de cerdo revelaron que la matriz micronizada fué capaz de fijarse a este nivel permitiendo la liberación de los antígenos incluidos en ella. Se trabajó con 14 cerdos libres de patógeno específico divididos en tres grupos de inmunización de cuatro animales cada uno y un grupo control no inmunizado de dos animales. El primer grupo fue inmunizado con dos dosis de bacterina por vía intramuscular, el segundo con dos dosis de matriz micronizada por vía oral y el tercero con una dosis de bacterina por vía intramuscular y una segunda dosis de matriz micronizada por vía oral. Cada dosis se aplicó con 7 días de diferencia, el grupo control no fue inmunizado. A los 7 días de la segunda inmunización todos los animales fueron desafiados en una cámara de aerosolización con una cepa de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 aislada de campo. El análisis estadístico de las lesiones encontradas en los grupos al sacrificio sugiere que existió una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) en el porcentaje de lesiones encontradas en los grupos de inmunización oral e intramuscular contra los grupos control y combinación intramuscular-oral ante el desafío homólogo, no existiendo diferencia significativa entre los grupos oral e intramuscular.

## JUSTIFICACION

Se propone el uso de vacunación oral contra la pleuroneumonía contagiosa porcina debido a que el uso de las bacterinas disponibles comercialmente no ha tenido éxito en el control de la enfermedad posiblemente debido a que la vacunación por vía parenteral no induce convenientemente una inmunidad de tipo local en la mucosa respiratoria del cerdo. La introducción de antígenos purificados de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1 en un sistema de liberación controlada para aplicación por vía oral permitiría obtener las siguientes ventajas:

1. Inducción de inmunidad local en la mucosa respiratoria del cerdo que proteja convenientemente a el animal evitando la colonización del microorganismo en el sitio primario de daño.
2. Aumentar el tiempo de exposición del antígeno bacteriano en el organismo a fin de aumentar la respuesta inmune en contra del agente infeccioso.
3. Evitar el estrés debido al manejo en los animales y a que la vacunación se haría por vía natural al introducirse en el alimento normal, y
4. Controlar las dosis inoculadas.

Desde el punto de vista económico tienen los siguientes puntos:

1. La industria farmacéutica nacional maneja rutinariamente los sistemas de liberación controlada para un cierto número de principios activos, por lo que la infraestructura para la producción de la vacuna ya existe.
2. El polímero propuesto para el diseño de la forma farmacéutica (Carbopol) se encuentra disponible a bajo costo en México.
3. Un control efectivo de la pleuroneumonía contagiosa porcina mediante la vacunación oral provocaría consecuentemente un aumento en la productividad de la industria porcina al reducir el número de animales muertos antes de salir a la venta y las pérdidas económicas debido al elevado costo de animales afectados crónicamente, y
4. Desde el punto de vista del trabajo de campo también se reduciría el costo de la vacunación siendo que podría inmunizarse un gran número de animales a la vez disminuyendo el número de personal requerido para tal efecto, el tiempo utilizado y los insumos necesarios para la vacunación.

## 1.0 INTRODUCCION

### 1.1 ANTECEDENTES

La pleuroneumonía contagiosa porcina es una enfermedad respiratoria severa caracterizada por neumonía necrotizante con pleuritis, su distribución es cosmopolita y tiene una gran importancia para la industria porcina (Leman, 1981; Taylor; 1981). Los rangos de morbilidad y mortalidad pueden exceder al 50% durante los brotes agudos y pérdidas posteriores son ocasionadas debido a la pobre conversión alimenticia en los cerdos afectados crónicamente y a el alto costo de su tratamiento, además la prevalencia y severidad de esta infección parecen relacionarse con el grado de intensidad de la producción porcina (Sanford y Josephson, 1981). El agente causal Actinobacillus pleuropneumoniae (Ap), se clasifica según sus antígenos capsulares en serotipos de los cuales se reconocen en el presente doce (Gunnarson y col., 1977; Rosendal y Boyd, 1982; Nielsen y O'Connor, 1984; Nielsen, 1985; Nielsen, 1986). El serotipo 1 se ha encontrado en Argentina, Australia, Canadá, Chile, Hungría, Polonia y Estados Unidos. El serotipo 2 en Checoslovaquia, Dinamarca, Alemania, Hungría, Japón, Corea, Holanda, Noruega, España y Suiza. El serotipo 3 en Estados Unidos, Bélgica, Irlanda e Inglaterra. El serotipo 4 en España. El serotipo 5 en Canadá, Chile, Italia, Corea y Estados Unidos. El serotipo 6 en Bélgica, Canadá, Dinamarca, Alemania y España. El serotipo 7 en Alemania. El serotipo 8 en Estados Unidos, España, Holanda y Japón. El serotipo 9 en Francia, Alemania y Holanda. El serotipo 10 en Canadá, Dinamarca, Alemania, Hungría, España e Inglaterra. El serotipo 11 en Holanda y, el serotipo 12 en Canadá, Hungría y Japón (Leman, 1981; Medina, 1986; Mittal y col., 1992). En México, se han encontrado los serotipos 1 al 9, siendo dominante el serotipo 1 (Ciprian y col., 1988; Diaz y col., 1988).

La diferenciación en serotipos es importante en estudios epizootológicos de la pleuroneumonía contagiosa porcina y los antígenos involucrados en dicha diferenciación corresponden en parte al material capsular y presumiblemente a una mezcla de polisacárido y lipopolisacárido, encontrándose en el lipopolisacárido determinantes antigénicos comunes y específicos entre los diferentes serotipos, e inmunodeterminantes específicos de cepa dentro del polisacárido capsular (Fenwick y Osburn, 1986; Mittal y col., 1987). Los polisacáridos capsulares de Ap son polímeros lineales de alto peso molecular tipo ácido teicoico que se diferencian por los monosacáridos presentes en ellos, en tanto que los lipopolisacáridos se

diferencian por la presencia de cadenas laterales de polisacáridos ramificados de alto peso molecular conocidas como cadenas O. En el caso de Ap serotipo 1, el polisacárido capsular es un disacárido repetitivo compuesto de 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa y D-galactosa, y la cadena O del mismo está conformada por una unidad repetitiva de tetrasacárido -[(1-6)-D-Glucosa-(1-2)-L-Rammosa{(3-1)-D-NAcGlucosamina}-(1-2)-L-Rammosa-(1-2)]- (Perry y col., 1990).

Se han desarrollado varios ensayos serológicos con antígenos termoestables, termolábiles y el cuerpo bacteriano completo (Nicolet y col., 1981; Lombin y col., 1982; Mittal y col., 1984), puesto que la identificación serológica y la eliminación de los cerdos reactivos positivos ha demostrado ser en algunos casos un procedimiento de control efectivo (Nielsen y col., 1976), sin embargo, existen frecuentemente problemas en la evaluación e interpretación de las pruebas y algunos portadores pasan inadvertidos (Schultz y col., 1982; Mittal y col., 1984).

## 1.2 TRANSMISION, PATOGENIA Y CUADRO CLINICO

Entre los factores que predisponen a los problemas respiratorios se encuentran los cambios bruscos de temperatura, malas condiciones de higiene, estrés debido al manejo y adquisición de nuevos animales. Algunos autores consideran que el factor más importante es la densidad de la población animal y otros estudios muestran que el manejo y el ambiente juegan un papel importante en la incidencia y gravedad de las neumonías (Bjorlund y Bervinsco, 1965; Landquist, 1974; Tielsen, 1978; Henry, 1982). La transmisión de la neumonía por Ap se lleva a cabo fundamentalmente por contacto directo de cerdo a cerdo a través de aerosoles, de este modo la frecuencia de la enfermedad se intensifica cuando los animales pasan a jaulas o corrales que permiten el contacto entre un gran número de animales y se mezclan animales de diferentes grupos, con diferente capacidad de respuesta inmune y estresados por su nueva condición social (Taylor, 1981; Schultz, 1985). El período de incubación en condiciones de campo varía entre 12 y 24 horas para infecciones naturales y experimentales, los brotes se presentan súbitamente y se detectan por la muerte de algunos cerdos en la granja. 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 pulmonar con intensos cambios vasculares. En la forma aguda puede observarse anorexia, disnea con respiración diafragmática rápida, cianosis en orejas y extremidades, vómito ocasional y muerte con hemorragia nasal en uno a cuatro días o bien recuperación

espontánea. En la forma sobreaguda se detecta hipertermia (41° a 42° C), cianosis en piel, abdomen y oreja, hemorragia y espuma nasal, chillidos agudos, opistótonos y muerte. Las lesiones observadas a la necropsia son pericarditis, hidropericardio, hidrotórax de líquido sanguinolento, hemorragias en miocardio, adherencias pleurales (viscerales y parietales), infartos rojos principalmente en lóbulos diafragmáticos y friabilidad de la zona infartada. Las lesiones microscópicas comprenden: Zonas de infarto, edema alveolar, infiltración peribronquial y perivascular de células mononucleares, y hemorragia en alvéolos (Ramirez, 1970).

La patogenicidad de la enfermedad aún no ha sido esclarecida, los datos disponibles sugieren que la enfermedad se produce cuando **Ap** llega a nivel alveolar y su virulencia esta asociada a uno o varios factores que parecen ser endotoxinas y/o exotoxinas, las cuales resultan ser citotóxicas para macrófagos alveolares, células mononucleares de sangre periférica y neumocitos de tipo I y II en el cerdo y ratón (Bendixen y col., 1981; Chung y col., 1993; Idris y col., 1993).

En general, aquel agente infeccioso que es capaz de evadir los mecanismos inmunes inespecíficos durante su paso a través del árbol respiratorio, se encuentra a nivel de los bronquiolos con una segunda barrera inmune, la cual está representada por las **IgA** secretorias producidas por el tejido linfoide asociado a bronquiolo. En este punto la respuesta depende de la concentración de dichos anticuerpos y de la calidad de los mismos, es decir, de su especificidad hacia el agente infeccioso, y en caso de que las condiciones no sean suficientemente favorables, esta barrera también puede ser ignorada por el microorganismo. La siguiente fase corresponde entonces a la activación de células plasmáticas de la mucosa y linfa hacia la producción de **IgE** que sensibiliza a mastocitos con la consecuente liberación de histamina y factores quimiotácticos, con cambio en la permeabilidad vascular y trasudación de **IgG** y complemento, además de infiltración de polimorfonucleares y eosinófilos a la zona. La formación de complejos antígeno-anticuerpo en presencia de complemento permiten la sensibilización de macrófagos los cuales eliminan con mayor eficiencia al agente infeccioso (Roitt, 1985).

En el caso particular de la infección con **Ap**, se encuentran algunos detalles que no corresponden a una infección aerógena clásica, como lo es la presencia en casi todo el pulmón de una reacción de hipersensibilidad de tipo III, en vez de la localización solo a nivel de lóbulos apical y cardíaco. Esto se explica en parte porque **Ap** es capaz de diseminarse a través del tejido pulmonar hacia la pleura vía sistema linfático (Sebunya y Saunders, 1983).

Los cambios microscópicos observados en la histopatología pueden ser explicados a través de las toxinas caracterizadas para éste microorganismo. En primer lugar, puede citarse al lipopolisacárido (LPS), el cual por infusión intrabronquial induce lesiones típicas a las encontradas en cerdos moribundos en estados agudos de pleuroneumonía (Fenwick y col., 1986b) y se ha demostrado que puede producir lesión del endotelio alveolar con edema y trombosis vascular en el cerdo y cambios degenerativos de pneumocitos de tipo I y II en ratón, además de ser citotóxico para macrófagos alveolares, polimorfonucleares, monocitos y linfocitos porcinos (Worthen y col., 1986; Idris y col., 1993). En segundo lugar, se han reportado una serie de toxinas como la hemolisina termoestable (Nakai y col., 1984) y una toxina termolábil (Kadis y col., 1986) las cuales durante algún tiempo no fueron debidamente clasificadas. Frey y col. (1994), revisaron dichas toxinas y las caracterizaron de la siguiente manera:

**ApxI.** Es la toxina hemolítica y citotóxica más potente, es conocida como hemolisina I o citolisina I con un peso molecular aparente de 105 Kd. Presenta similitud con la hemolisina de E. coli y en menor grado con la leucotoxina de **P. multocida**. Fija ávidamente  $Ca^{2+}$ .

**ApxII.** Es débilmente hemolítica y citotóxica, conocida como hemolisina II o citotoxina II y producida por todos los serotipos exceptuando al 10, presenta un peso molecular aparente de 105 Kd, siendo difícil de separar de **Apx I**. Parece estar más relacionada con la leucotoxina de **P. haemolytica**.

**Apx III.** No es hemolítica, pero sí fuertemente citotóxica para macrófagos alveolares y neutrófilos, presenta un peso molecular aparente de 120 Kd y similitud con **Apx I**, **Apx II**, la hemolisina de E. coli y la leucotoxina de **P. haemolytica**.

En tercer lugar, se han descrito metalo-proteasas de IgA, gelatina y hemoglobina, que aún faltan por caracterizar completamente (Negrete-Abascal y col., 1994).

La lisis bacteriana en la zona de daño y la diseminación hematogena de las toxinas referidas a través de la circulación menor podrían explicar la presencia de hemorragias en miocardio. Es importante señalar que los macrófagos que se encuentran en la zona de daño que no tienen origen en el alvéolo se derivan de monocitos de la médula ósea y pasan ya maduros a los sacos alveolares en un tiempo aproximado de tres días, el cual es necesario para su maduración (Vanforth, 1975), y posiblemente esta maduración no sea alcanzada debido al daño que estos sufren a partir de las toxinas liberadas por **Ap**, con lo cual la eficiencia de la respuesta inmune se ve disminuida notablemente, aún cuando en la histopatología

se encuentren grandes cúmulos de macrófagos transformados que serían incapaces de eliminar a la bacteria.

### **1.3 PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD**

La prevención de la enfermedad debe realizarse desde tres puntos de partida fundamentales:

#### **I. Mejoramiento de las condiciones de la granja.**

a) Es de vital importancia evitar el hacinamiento de los animales, mejorar la ventilación de las instalaciones sin que esto produzca corrientes de aire que provoquen cambios bruscos de temperatura (un sistema de extractores, p. ej.), reducir la mezcla de animales de diferentes grupos y utilizar sistemas de cuarentena para animales de reciente importación a la granja (Alexander y Harris, 1992).

b) Limpiar y desinfectar la granja para reducir la contaminación ambiental.

c) Utilizar modelos de producción en dos o tres sitios y practicar el destete temprano medicado (Alexander y col., 1980).

#### **II. Control serológico.**

a) Emplear frecuentemente técnicas serológicas para detectar portadores y eliminarlos de la granja.

b) Cuando la granja sea pequeña y produzca animales de elevado valor genético, en caso de encontrarse animales infectados será necesario eliminarlos y repoblar la granja con animales seronegativos de una granja libre (Kawanagh, 1989).

#### **III. Vacunación de la piara.**

Se han tenido diversos problemas para encontrar una vacuna que proteja realmente contra la enfermedad y lo más usual ha sido la aplicación constante de autobacterinas en la granja. La prevención de la infección por inmunización con bacterinas ha sido poco exitosa. Las bacterinas producidas con cultivos jóvenes (6 a 12 horas) son tóxicas, aunque inducen cierta resistencia serotipo-específica a la enfermedad y posiblemente a la infección (Nielsen, 1976; Henry y Marsteller, 1982). Las bacterinas provenientes de cultivos de 18 horas o más no son tóxicas pero proveen poca inmunidad protectora. Los adyuvantes son necesarios para desarrollar la respuesta inmune a las bacterinas de cultivos viejos, pero son innecesarios en bacterinas de cultivos jóvenes (Pijoan y col., 1982). En este sentido, el uso de dihidroheptaprenol como adyuvante en bacterinas ha sido útil, al parecer porque promueve un aumento de la fagocitosis y actividad bactericida de polimorfonucleares y macrófagos (Kimura y col., 1993), así mismo, las bacterinas

preparadas con base del 5% de lecitina-aceite mineral estimulan títulos altos de anticuerpos (Straw y col., 1990).

Se han utilizado también múltiples sistemas de vacunas con fracciones semi-purificadas de Ap, como el sobrenadante de cultivo libre de células a mitad de la fase logarítmica conteniendo carbohidratos, LPS, proteínas, la hemolisina de 110 Kd y la toxina de 120 Kd que confieren protección contra el desafío pero sin eliminar la posibilidad de generar portadores sanos (Fedorka-Cray y col., 1993), o extractos celulares obtenidos a partir de cloruro de litio en conjunto con hemolisina cruda adsorbidos en hidróxido de aluminio que protegen de la muerte y del daño pulmonar ante el desafío con serotipo homólogo (Beaudet y col., 1994). También se ha intentado la inmunización con la lipoproteína de 40 Kd de Ap1 expresada en E. coli que confiere protección cruzada hacia los serotipos 2, 8, 9, 11 y 12 eliminando la posibilidad de muerte pero no de daño crónico (Gerlach y col., 1993), así mismo, el uso de proteínas de fusión formadas por la porción carboxi-terminal de la citolisina de 103 Kd y la proteína fijadora de transferrina expresadas en E. coli a partir del genoma de Ap7 ha tenido resultados semejantes en cuanto a evitar la muerte pero no el daño crónico (Rossi-Campos y col., 1992). El antígeno proteico asociado al polisacárido capsular extraído con cetavión de Ap1 protege a ratones de la muerte ante el desafío intraperitoneal y al parecer existe un fenómeno de acarreador-hapteno (Lenser y col., 1988). En este sentido, el uso de vacunas a partir de conjugados de hemolisina-polisacárido y hemolisina-LPS por vía intramuscular reduce significativamente el rango de mortalidad y la frecuencia de lesiones pulmonares (Byrd y col., 1992). Otros intentos de prevención no relacionados a vacunación se han llevado a cabo con el uso de el factor de estimulación de colonias de granulocitos que puede introducirse como profiláctico en cerdos que se ingresan a granjas libres o como coadyuvante de antibióticos para el tratamiento y rápida resolución del daño generado por la infección (Pijoan y col., 1990).

Los estudios serológicos indican una pobre correlación de los títulos de anticuerpos séricos con la resistencia a la infección o a la enfermedad (Nielsen, 1979; Pijoan y col., 1982). Se puede suponer entonces, que si bien las bacterinas elevan los títulos de anticuerpos séricos no inducen eficientemente la formación de anticuerpos protectivos como IgA secretoria en la luz de los bronquios, posiblemente porque estas son introducidas por vía diferente a la respiratoria.

En contraste a la protección inducida por las bacterinas, los cerdos que sobreviven a la infección desarrollan una fuerte inmunidad especie-específica y son resistentes a la reinfección indiferentemente al serotipo (Nielsen, 1976; Nielsen, 1979).

Se han ensayado inmunizaciones por aerosolización con Ap inactivado obteniendo solamente protección serotipo-específica, siendo necesario el uso de adyuvantes (Nielsen, 1984; Loftager y col., 1993). La inmunización por aerosoles con Ap atenuado ha tenido resultados alentadores, demostrando que la aplicación local en mucosa respiratoria genera la producción de anticuerpos protectivos en secreciones de la clase IgG e IgA aparte de la respuesta sérica (Bosse y col., 1992), sin embargo, los sistemas utilizados para la inmunización tienden a ser impropios para vacunar a todo un hato desde el punto de vista de tiempo y costo.

Hasta el momento, es claro que la enfermedad debe ser bloqueada antes de que se de la adhesión del microorganismo, o al menos se debe bloquear la actividad de toxinas como lipopolisacáridos o Apx a nivel de la mucosa a partir de IgA secretoria e IgG producidas por células del sistema de tejido linfoide asociado a mucosas. Como la aplicación de los inmunógenos purificados referidos con anterioridad a nivel respiratorio desencadena una respuesta similar a la enfermedad, es deseable introducirlos vía otras mucosas en donde el daño producido sea relativamente inócuo, a saber, mucosa oral, mucosa enterica o serosa peritoneal. Debido a las características de comportamiento y de manejo del cerdo es recomendable la introducción de vacunas por vía oral lo cual permite por un lado la inmunización vía placas de Peyer en la mucosa enterica y por otro disminuye el estrés debido al manejo el cual es reconocido como agente predisponente de algunas enfermedades porcinas (Tielsen, 1978). Por otra parte, se ha encontrado que es precisamente en el material capsular, lipopolisacárido y polisacárido capsular, en donde residen los determinantes antigénicos que provocan gran parte de la respuesta humoral y celular del cerdo a la infección, como lo son antígenos específicos de cepa y serotipo en el polisacárido capsular, determinantes de serotipo y antígenos que producen los cruces serológicos entre serotipos y antígenos específicos e inespecíficos de especie en el LPS (Fenwick y Osburn, 1986; Radacovici y col., 1994), y que en el LPS reside la capacidad de adherencia del microorganismo a los anillos traqueales y células pulmonares (Bélanger y col., 1990; Jacques y col., 1991) por lo que inicialmente serían los antígenos de elección para la producción de inmunidad protectora a partir de una vacuna. El problema principal es introducir dichos antígenos de tal manera que sean capaces de inducir la producción de anticuerpos secretorios que eviten la fase de adhesión de Ap a la mucosa respiratoria del cerdo inhibiendo su mecanismo de daño. Se sabe que existe un mecanismo de transporte de anticuerpos a través de las células que producen anticuerpos en la lámina propia de la mucosa epitelial a la circulación general y luego hacia la luz de otras mucosas

por las células epiteliales de éstas (Benacerraf, 1979). Por ejemplo, se ha comprobado en ovejas que al introducir antígenos proteicos en la cavidad peritoneal aparecen anticuerpos de tipo IgA en la mucosa bronquial (Scichitano y col., 1984), la presencia de células productoras de anticuerpos en el tracto respiratorio del cerdo posteriores a la inmunización con proteínas vía intraperitoneal e intratraqueal (Sheldrake y col., 1988) también ha sido comprobada, así como la protección cruzada conferida contra el desafío con virus de la gastroenteritis transmisible porcina posterior a la infección con coronavirus respiratorio (Cox y col., 1993). Es importante considerar que los antígenos de tipo polisacárido y lipopolisacárido son en general por sí mismos débiles inmunógenos, por lo que es deseable obtener un sistema que permita prolongar la disponibilidad de estos antígenos en el organismo en forma constante por un tiempo razonable a fin de elevar la respuesta inmune en contra de ellos, una alternativa para resolver este problema son los sistemas de liberación controlada.

#### 1.4 SISTEMAS DE LIBERACION CONTROLADA Y VACUNACION ORAL

Con el desarrollo de la ingeniería genética han aparecido nuevos productos con propiedades farmacológicas útiles, para los cuales la selección de un sistema apropiado de liberación ha sido complicada por el hecho de que la mayoría de estos productos son polímeros de alto peso molecular, en general polipéptidos, que debido a sus grandes dimensiones son incapaces de atravesar la mayoría de las cadenas poliméricas de los materiales utilizados comúnmente en los sistemas de liberación controlada. Algunos medios, sin embargo, están disponibles para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de macromoléculas a partir de materiales poliméricos biocompatibles o biomateriales. En general, puede considerarse que existen tres tipos de biomateriales, los polímeros biodegradables, los polímeros no biodegradables y los polímeros bioadhesivos, los primeros dos son útiles principalmente para administración parenteral en tanto que los últimos son preferidos para administración oral debido a su capacidad de adhesión sobre la superficie epitelial del tracto gastrointestinal (Langer, 1984; Hung y col., 1985). En animales, la liberación sostenida de antígenos a partir de implantes subcutáneos de copolímeros no biodegradables compuestos de etileno-acetato de vinilo (EVAc) ha demostrado promover la respuesta de anticuerpos por más de seis meses (Preis y Langer, 1979). Sin embargo, el polímero EVAc ha sido reemplazado por poliésteres

láctico-co-glicólicos biodegradables debido a que son los únicos permitidos por la Administración Federal de Drogas (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica (Morris y col., 1994). La administración subcutánea del enterotoxóide B de S. aureus (SEB) microencapsulado en dichos polímeros provoca altos títulos séricos de IgG en contraste al antígeno soluble (Eldridge y col., 1991), observándose el mismo resultado con la microencapsulación de toxóide tetánico en láctico-co-glicólico (Esparza y Kissel, 1992).

La observación de que las micropartículas son adsorbidas por la placas de Peyer en el tracto gastrointestinal ha sugerido que la administración oral de vacunas microencapsuladas es posible y puede resolver los problemas de pH bajo y enzimas líticas en el medio gástrico así como las altas dosis requeridas para la inmunización de mucosas, por lo que existen varios desarrollos en este sentido para la administración oral de inmunógenos tales como SEB, fimbrias de E. coli y virus de influenza A inactivado (Morris y col., 1994), sin embargo, algunos de estos antígenos como las fimbrias de E. coli no son debidamente protegidos por la microencapsulación en láctico-co-glicólico y son destruidos por la acidez estomacal (Edelman y col., 1993).

El problema de la degradación de los antígenos a su paso por el estómago cuando se utilizan polímeros biodegradables como los poliésteres de láctico-co-glicólido podría ser resuelto con el uso de materiales bioadhesivos, algunos de los cuales tienen la propiedad de protección a la mucosa gástrica, es decir, que a su paso por el tracto gástrico forman películas que inhiben la actividad del jugo gástrico sobre las células. Idealmente, un bioadhesivo debe cumplir con las siguientes propiedades: No ser tóxico, no ser absorbido por el tracto gastrointestinal, formar preferentemente enlaces no covalentes con las superficies epiteliales mucosas, rápida adhesión a los tejidos, permitir fácil incorporación del principio activo, poseer sitios específicos de anclaje y ser económico (Hung y col., 1985). A la fecha, se conocen varios productos bioadhesivos que exhiben las características antes citadas como lo son el carbopol (carboxipolimetileno), policarbophil, carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y alginato de sodio entre los más importantes, siendo el carbopol uno de los materiales con mayor capacidad adhesiva y baja toxicidad (Smart, 1984; Hung y col. 1985), que además se encuentra disponible a bajo costo en México y es permitido por la FDA para la preparación de formas farmacéuticas. El desarrollo de este trabajo esta encaminado hacia el diseño de un sistema de liberación controlada a base de carbopol que contenga polisacárido y lipopolisacárido de Ap, que introducido por vía oral en cerdos funcione como

**vacuna, estimulando la producción de anticuerpos secretorios a nivel de la mucosa bronquial inhibiendo la capacidad de daño del microorganismo, como una alternativa de prevención para la pleuroneumonía contagiosa porcina.**

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

**Diseñar y probar un sistema de liberación controlada para inmunización oral contra la pleuroneumonía contagiosa porcina.**

### **2.2 Objetivos particulares**

**2.2.1. Extraer y purificar el polisacárido capsular y el lipopolisacárido de A. pleuropneumoniae serotipo 1.**

**2.2.2 Incluir los antígenos en una matriz de carbopol y determinar el tamaño de partícula óptimo para su adhesión en la mucosa intestinal del cerdo.**

**2.2.3. Inmunización de cerdos con el sistema de liberación controlada y desafío con A. pleuropneumoniae serotipo 1 para evaluar la efectividad de la vacuna propuesta.**

### 3.0 MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 CULTIVO DEL MICROORGANISMO.

La cepa de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1 (Ap1) que se obtuvo del cepario de la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la FES-Cuautitlán U.N.A.M., se cultivó en un fermentador de 10 litros (New Brunswick, Co.) en caldo soya tripticaseína suplementado con 10% de FESUNAD como fuente de NAD, en agitación a 200 r.p.m. y con un flujo de aire de 3 litros por minuto, utilizando como antiespumante una mezcla de 100 ml de aceite mineral y 20 ml de silicón FG-10 (Dow Corning). Como inóculo se utilizó un cultivo en fase exponencial del microorganismo en una cantidad equivalente al 10 % del volumen total de fermentación. El pH se ajustó constantemente a 7.0 con NaOH 5M y la temperatura se mantuvo a 37°C durante 5 horas. Se obtuvieron alícuotas de 10 ml a los 0, 30, 60, 120, 180, 240 y 300 minutos, con la finalidad de seguir la cinética de crecimiento mediante la lectura de absorbancias en un espectrofotómetro (Beckman DU-64) a 580 nm y el cálculo de peso seco por gravimetría sobre membrana Millipore de 0.22  $\mu$ m. Para este fin, la biomasa contenida en los 10 ml de alícuota de cultivo se retuvo en membranas de 25 mm de diámetro previamente pesadas, que posteriormente se secaron a 40°C durante 24 horas y se pesaron para obtener el peso seco por diferencia, las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 3.2 SEPARACION DE BIOMASA Y PURIFICACION DE SOLIDOS SUSPENDIDOS.

La biomasa contenida en el cultivo se separó por centrifugación a 3500g/30 min., y a partir del sobrenadante se obtuvo la fase oleosa la cual se lavó con agua destilada por centrifugación bajo las mismas condiciones y se resuspendió en 200 ml de agua destilada para ser extraída en dos ocasiones con 50 ml de cloroformo. La fase acuosa se dializó contra amortiguador salino de fosfatos 0.05M, pH 7.0 (PBS) con membrana de corte de 5000d, estas fracciones se congelaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

### 3.3 PURIFICACION DE LIPOPOLISACARIDO Y POLISACARIDO CAPSULAR DE Apl.

La biomasa se resuspendió en un quinto del volumen original de cultivo con isopropanol al 50% en agua y se mantuvo a 37°C durante 30 minutos con agitación ocasional. Posteriormente, la biomasa se lavó dos veces por centrifugación a 3500g/20 min. con agua destilada y se deshidrató por tratamiento sucesivo con etanol, acetona y éter.

Para la extracción del lipopolisacárido de tipo rugoso (LPSr) se utilizó la técnica de Galanos y col. (1969). La bacteria deshidratada se extrajo con una mezcla de fenol 90%-cloroformo-éter de petróleo (2:5:8) en proporción de 4 ml/g de bacteria, homogeneizando en vortex por 2 minutos, manteniendo la temperatura entre 0 y 20°C. La mezcla se centrifugó a 5000g/15 min., re-extrayendo el paquete en dos ocasiones mas y juntando los sobrenadantes obtenidos, los cuales se filtraron sobre papel Wathman y se llevaron a 30-40°C en un evaporador rotatorio para eliminar el éter-cloroformo hasta la cristalización del fenol. El fenol cristalizado se redisolvió con agua destilada gota a gota hasta la precipitación del LPS y se dejó reposar la mezcla por uno a dos minutos para centrifugarse posteriormente a 3000 g/10 min. El sobrenadante se decantó a sequedad y el precipitado se lavó por centrifugación dos veces con fenol al 80%, e igual numero de veces con éter secando a vacío, de esta manera se obtuvo LPSr crudo. Para la extracción del lipopolisacárido de tipo liso (LPSl) y el polisacárido capsular (PC), las bacterias deshidratadas se trataron con una solución de EDTA 0.25M en NaCl 0.85% en proporción de 15 ml/g de bacteria durante 3 horas a 25°C y agitación a 100 r.p.m., posteriormente la mezcla se centrifugó a 3700g/30 min., separando el paquete y el sobrenadante. El sobrenadante se filtró por membrana Millipore de 0.22 µm y se dializó contra agua destilada, esta preparación fue llamada LPSl crudo. Por otra parte, el paquete se resuspendió en HCl 0.05M en NaCl 0.85% en proporción de 25 ml/g de bacteria y se agitó a 50 r.p.m. durante 3 horas a 25°C, posteriormente la mezcla se centrifugó a 3500g/30 min. y el sobrenadante se neutralizó con NaOH 0.1N, esta solución se filtró por membrana Millipore de 0.22 µm y se mezcló con 5 volúmenes de etanol al 95% durante 12 horas a 4°C, separando el precipitado por centrifugación a 5000g/30 min., dializando éste contra agua destilada, la preparación fue llamada PC crudo.

### 3.4 ANALISIS DE LAS FRACCIONES.

#### 3.4.1 Determinación de proteínas (Bradford, 1976).

**Reactivo.** Se disolvieron 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%, se agregaron 100 ml de  $H_3PO_4$  al 85% (p/v) y se diluyó a un litro con agua destilada.

**Método estándar.** A 100  $\mu$ l de solución que contenía entre 10 y 100  $\mu$ g de proteína, se agregaron 5 ml del reactivo de azul de Coomassie mezclando con vortex, midiéndose la absorbancia contra blanco de amortiguador a 595 nm después de dos minutos y antes de una hora. La concentración del problema se calculó por interpolación en una curva patrón.

**Método micro.** A 100  $\mu$ l de solución que contenía entre 1 y 10  $\mu$ g de proteína, se agregó 1 ml de reactivo de Coomassie mezclando con vortex, midiéndose la absorbancia contra blanco de amortiguador a 595 nm después de dos minutos y antes de una hora. La concentración del problema se calculó por interpolación en una curva patrón.

#### 3.4.2 Determinación de carbohidratos.

Previo a la determinación de carbohidratos los extractos se hidrolizaron con  $H_2SO_4$  2M (para la determinación de azúcares neutros) y HCl 2M (para aminoazúcares), a 100°C durante 16 horas.

##### 3.4.2.1 Aminoazúcares (Strominger y col., 1959).

A 40  $\mu$ l de una solución que contenía de 0.01 a 0.1  $\mu$ moles de glucosamina mantenida en baño de hielo se agregaron 20  $\mu$ l de una mezcla 1:1 recién preparada de  $NaHCO_3$  saturado y anhídrido acético en agua, incubando a 25°C por 10 minutos, colocándola en baño maría por 3 minutos. Después de dejarlo enfriar a temperatura ambiente se le adicionaron 50  $\mu$ l de  $K_2B_4O_7$  al 5% o de glicina 0.1 M a pH 9.0 y se colocó en baño maría por 7 minutos. Se agregaron 500  $\mu$ l de ácido

acético glacial y 200  $\mu$ l de p-dimetilaminobenzaldehído al 16% en ácido acético glacial al 95% y 5% de HCl concentrado, se incubó la mezcla a 38°C por 20 minutos y se leyó la absorbancia a 585 nm. La concentración de los problemas se calculó por interpolación en una curva patrón.

#### 3.4.2.2 Azúcares neutros (Dische y col., 1949).

A 200  $\mu$ l de muestra conservados en baño de hielo se le agregaron 900  $\mu$ l de  $H_2SO_4$  diluido en agua (12:2) agitando la mezcla y dejándola reposar a temperatura ambiente por 10 minutos. La mezcla se mantuvo posteriormente por 3 minutos en baño de agua en ebullición, dejándola enfriar a temperatura ambiente. A esta solución se le determinó el espectro de absorción desde 230 nm hasta 700 nm. Una vez determinado el espectro se agregaron 20  $\mu$ l de una solución recién preparada de clorhidrato de cisteína al 3% en agua, agitando y dejando reposar en obscuridad. Se determinó nuevamente el espectro desde 230 nm hasta 700 nm a los 90 minutos y 22 horas. A partir de los espectros se obtuvo la longitud de onda a la que debían determinarse galactosa (600 nm) y Ramnosa (400 nm). La concentración de las muestras se calculó a partir de curvas patrón. La concentración de glucosa fue obtenida a partir de los hidrolizados con ac. sulfúrico (previa neutralización con  $NaHCO_3$ ) en un autoanализador de química clínica Express 550 (CIBA-Corning), mediante el uso de reactivos comerciales basados en el método de Trinder (Glucosa-Trinder, CIBA-Corning).

#### 3.4.2.3 Determinación de 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO) (Cynkin y Ashwell, 1960).

Se pipetearon 100  $\mu$ l de muestra en un tubo de tapón de rosca y se añadieron 50  $\mu$ l de  $H_2SO_4$  0.5M, calentando en baño maría en ebullición por 8 minutos con los tapones flojos. La mezcla se enfrió en baño de agua y se añadieron 250  $\mu$ l de Ac. Peryódico 0.005M en  $H_2SO_4$  0.0625M dejándola reposar por 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción de oxidación se detuvo por la adición de 500  $\mu$ l de arsenito de sodio al 2% en HCl 0.5N agitando y dejando reposar por 2 minutos. Se añadieron entonces 2 ml de Ac. 2-tiobarbitúrico al 0.3% aq. y la mezcla se calentó en baño maría en ebullición por 10 minutos, enfriando al baño de agua. Se

leyó la absorbancia a 549 y 532 nm contra blanco de reactivos. La concentración de KDO se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g KDO/ml} = (0.087A^{549} - 0.024A^{532}) \times 2550.$$

### 3.4.3 Ensayo para endotoxina con lisado de amebocito de limulus.

Siguiendo las instrucciones del fabricante se prepararon diluciones decimales de LPS estándar, extracto crudo de LPS y polisacárido capsular, colocando 10  $\mu\text{l}$  de cada dilución en los pozos de una microplaca y adicionando 10  $\mu\text{l}$  de la solución de lisado de amebocito (Sigma Chem. Co., St. Lo.) a cada pozo, las placas se sellaron con parafilm y se colocaron a 37°C por 30 minutos. El título se tomó como la última dilución en la que se encontró formación de gel.

### 3.4.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) e Inmunotransferencia.

El corrimiento electroforético de las fracciones se realizó con el sistema de Laemli (1970), utilizando el gel concentrador al 4% en amortiguador Tris-HCl 0.125M, 0.1% SDS, pH 6.8 y el gel de corrida al 12.5% en amortiguador Tris-HCl 0.375M, 0.1% SDS, pH 8.8. El amortiguador de corrida fue Tris 0.025 M-glicina 0.192M, 0.1% SDS, pH 8.3. La corrida se realizó a 35 mA de corriente constante durante 35 minutos, con preelectroforesis de 30 minutos y cambio de amortiguador previo a la iniciación de la corrida. Las bandas fueron reveladas por tinción con nitrato de plata y contrateñidas con azul de Coomassie (Hitchcock y Brown, 1983). Se utilizaron como marcadores de peso molecular miosina (205 Kd),  $\beta$ -galactosidasa (116 Kd), albúmina bovina (60 Kd), ovoalbúmina (45 Kd) y anhidrasa carbónica (29 Kd), y como estándares de referencia lipopolisacárido de tipo liso obtenido de *E. coli* serotipo O26:B6 y de tipo rugoso obtenido de *S. minnesota* R5 (mutante Rc). Todos los marcadores fueron comprados a Sigma Chem. Co. El material separado por SDS-PAGE se transfirió del gel a papel de nitrocelulosa (Immobilon, Millipore) utilizando el sistema de metanol-Tris-glicina de Towbin y col. (1979). La electrotransferencia se desarrolló en un equipo de transferencia (Hoefer Scientific

Instruments, San Francisco, CA) por 2 horas a 30 V. Los sitios no ocupados en el papel de nitrocelulosa se bloquearon con solución bloqueadora amortiguada de albúmina sérica bovina (ELISAmate, Kirkegaard & Perry, Lab. Inc.) por 5 minutos a temperatura ambiente y las tiras se dejaron reaccionar con el suero de prueba diluido 1:20 en la misma solución durante 1.5 horas retirándose el suero con solución de lavado (ELISAmate, Kirkegaard & Perry, Lab. Inc.) repitiendo el procedimiento en 5 ocasiones. Entonces se agregó anticuerpo peroxidado de afinidad por IgG o IgM porcina desarrollado en cabra (Kirkegaard & Perry, Lab. Inc.) diluido 1:500 en leche descremada al 1% en amortiguador de trietanolamina, pH 7.2 durante 1.5 horas y después del proceso de lavado las tiras se revelaron con una solución de 30 mg de alfa-Cloronaftol en 50 ml de amortiguador de trietanolamina pH 7.2, 10 ml de metanol y 50  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno, durante 20 a 60 minutos.

### 3.5 DETERMINACION DEL TAMAÑO OPTIMO DE PARTICULA PARA LA MICRONIZACION DE CARBOPOL.

Una solución al 10% de carbopol se colocó en altura controlada sobre una charola porcelanizada y se secó en estufa a 60°C durante 12 horas, la placa obtenida se molió y micronizó con un molino de cuchillas, el polvo así obtenido se tamizó en diferentes tamaños de partícula, tomándose para las experiencias los cortes 80/100, 100/200 y 200/325. Con estos polvos se realizaron pruebas de adhesión sobre secciones longitudinales de 20 X 1 cm de yeyuno de cerdo convencional acorde con el ensayo *ex vivo* propuesto por Ranga y Buri (1989). Las secciones se lavaron con solución amortiguadora de Soerensen y se fijaron mediante grapas a una sección longitudinal de tubo de cloruro de polivinilo. Una vez fijos, los cortes se espolvorearon homogéneamente con 100 mg de los micronizados, dejándose interactuar con la mucosa durante 10 minutos. Posteriormente, se refluyó solución intestinal simulada a una velocidad de 25 ml/min. durante 60 minutos, permitiendo que la solución cubriera íntegramente la mucosa. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y se determinó la cantidad de carbopol eluido por un análisis gravimétrico contra un blanco de mucosa sin polímero. La prueba se realizó por triplicado. Se tomaron secciones de tejido para microscopía electrónica de barrido antes y después del reflujo y en secciones no tratadas.

### 3.6 DETERMINACION DEL TIEMPO DE HUMECTACION OPTIMO Y COMPORTAMIENTO ULTRAMICROSCOPICO DE LA MATRIZ MICRONIZADA.

Una vez determinado el tamaño óptimo de partícula se procedió a determinar el efecto del tiempo de humectación (tiempo necesario para provocar la relajación de las cadenas del polímero por efecto del ingreso de agua), sobre la fuerza mucoadhesiva del polímero y su comportamiento a nivel ultramicroscópico. Se utilizaron tabletas de carbopol 934 con área constante de 0.79 cm<sup>2</sup>, las cuales se dejaron interactuar con fluido intestinal simulado desde 0 hasta 15 minutos ( 1, 3, 5, 5.5, 10, 12.5 y 15 ) y la fuerza de adhesión se midió por medio de una balanza de torsión modificada (Villalobos y col., 1992). Paralelamente, muestras de polímero micronizado fueron expuestas a fluido intestinal simulado en los mismos periodos de tiempo, liofilizándose y tratándose para su observación por microscopía electrónica de barrido.

### 3.7 PREPARACION DE LA MATRIZ CARBOPOL-ANTIGENO.

Se preparó una mezcla de los extractos crudos de LPSr, LPSI y PC en igual proporción (v/v) y se adicionó al 1% a la solución saturada de carbopol secando y micronizando de la manera que fue descrita con anterioridad. Siendo este polvo micronizado el que se utilizó para la inmunización oral.

### 3.8 INMUNIZACION DE CERDOS Y DESAFIO CON ApI COMPLETO.

Se utilizaron cerdos libres de patógeno específico (spf) recién destetados, obtenidos del bioterio del CENID-Microbiología de la SARH, asignados de manera aleatoria a cuatro grupos. El primer grupo (n= 4), se inmunizó por vía oral con 200 mg de matriz micronizada en el día 0, con la misma dosis oral de refuerzo en el día 7 (grupo O). El segundo grupo (n=4), se inmunizó por vía oral con 200 mg de matriz micronizada en el día 0, con dosis intramuscular de refuerzo en el día 7, con 2 ml de una bacteria preparada con la misma cepa de ApI en Al(OH)<sub>3</sub> (grupo OI). El tercer grupo (n=4), se inmunizó por vía intramuscular con 2 ml de bacterina en el día 0, con dosis intramuscular de refuerzo en el día 7, con 2 ml de bacterina (grupo IM).

El cuarto grupo (n=2), se tomó como control sin tratamiento (grupo C). En el día 14 todos los animales fueron desafiados en una cámara de aerosolización construida y normalizada en FES-Cuautitlán (Caballero, 1985) con 12.5 ml de un cultivo de **Apl** completo con  $5.2 \times 10^7$  UFC/ml durante 15 minutos y refluendo aire solamente durante 5 minutos mas. A partir de este momento se evaluaron los signos en los animales (temperatura rectal, cianosis, postración), sin embargo, debido a que no se encontró cambio alguno en los animales cuatro días después del primer desafío, se realizó un segundo desafío bajo las mismas condiciones pero esta vez con una cepa de **A. pleuropneumoniae** aislada de campo del serotipo 1.

Los animales que no murieron en un lapso de 7 días se sacrificaron previa insensibilización por electrocución, tanto ellos como los que murieron en etapas previas fueron procesados para estudio de patología. Las lesiones macroscópicas fueron observadas y registradas en el momento del sacrificio, tomándose muestras de las lesiones presentes en pulmón para cultivo microbiológico y estudio histopatológico. Durante el curso del experimento se tomaron muestras de sangre a todos los animales a fin de obtener suero y poder realizar los ensayos de serología, los tiempos designados para tal fin correspondieron a los días 0, 7 (refuerzo), 14 (primer desafío), 18 (segundo desafío) y 25 (sacrificio).

### 3.7 ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.

#### 3.7.1 Lesiones macroscópicas.

Los pulmones obtenidos a la necropsia se evaluaron para conocer el grado de daño generado por el desafío y la protección ofrecida por las inmunizaciones. A partir del registro del área superficial de las lesiones presentadas en la región dorsal y ventral de los pulmones en los cuatro lóbulos sobre modelos en papel Wathman No. 1 acorde con Ciprián (1987), se calculó el porcentaje de daño pulmonar tomando como base el area total de las lesiones. La medición del porcentaje de lesión se modificó ligeramente a la técnica propuesta originalmente, en la que el área se medía sobre papel milimétrico, en este caso el porcentaje se obtuvo por diferencia de pesos entre el modelo sobre papel completo (pulmón normal ) y el peso del modelo una vez que las áreas marcadas de lesión fueron eliminadas por corte. Los resultados se trataron estadísticamente por análisis de varianza con el método de rangos múltiples de Tukey al 95% de confianza mediante el paquete Statgraphics ver. 3.0.

### 3.7.2 Lesiones microscópicas.

Se removieron secciones de las zonas dañadas en pulmón y se fijaron en formalina amortiguada al 10%, para luego ser embebidas en parafina y cortadas a un espesor de 5-6  $\mu\text{m}$ . Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina y eosina para su observación y evaluación de daño. Así mismo, se tomaron muestras de duodeno, yeyuno e ileon a fin de evaluar una probable respuesta a nivel de placas de Peyer.

### 3.7.3 Recuperación del agente.

Se tomaron muestras de las zonas de daño a fin de recuperar al microorganismo mediante cultivo en placas de agar sangre sembrando en estria por dilución de colonias utilizando una cepa de Staphylococcus aureus como nodriza.

## 3.8 ENSAYOS SEROLOGICOS.

### Agglutinación lenta en tubo.

Se empleó la técnica descrita por Morilla (1986), el antígeno para la prueba se preparó a partir de un cultivo de 18 horas a 37°C en placa de agar de soya-tripticaseína suplementado con NAD, con la misma cepa de *Ap1* que se utilizó para la preparación de los antígenos crudos. El crecimiento de lavó por centrifugación a 3500g/20 min. en dos ocasiones y posteriormente se diluyó a una concentración del 4.5% en solución 0.15M de NaCl, medida como el volumen porcentual de células empacadas en un tubo capilar después de centrifugación a 5000 r.p.m./3 min. en una centrifuga clínica para microhematocrito (Becton-Dickinson). El antígeno concentrado se normalizó previo a la determinación a una concentración celular equivalente al 0.045% en solución 0.15M NaCl estéril adicionada en el momento de su uso con fenol a una concentración final del 0.5% (el antígeno se diluyó 1:100 con solución salina fenolada en el momento de su uso). Para la determinación se realizaron diluciones decimales de 1:25, 1:50, 1:100 1:200 y 1:400. Mediante el uso de una pipeta de Bang se colocaron en cinco tubos 80, 40, 20, 10 y 5  $\mu\text{l}$  de suero problema a los cuales se les adicionaron 2.0 ml

de antígeno normalizado 1:100, resultando las diluciones de 1:25 a 1:400 especificadas con anterioridad. Los tubos se agitaron durante 30 segundos en la misma gradilla y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Para la lectura de la prueba se utilizó luz fluorescente indirecta con fondo negro, el grado de aglutinación se midió observando el grado de transparencia sin agitar el tubo de la siguiente manera:

- (++++) = Aglutinación y sedimentación completas con clarificación total del sobrenadante.
- (+++ ) = Aglutinación y sedimentación casi completas y clarificación del 75%.
- (++ ) = Aglutinación y sedimentación pronunciadas y clarificación del 50%.
- ( + ) = Sedimentación parcial y clarificación del 25%.
- ( - ) = Clarificación nula.

## 4.0 DESCRIPCION ANALITICA DE RESULTADOS

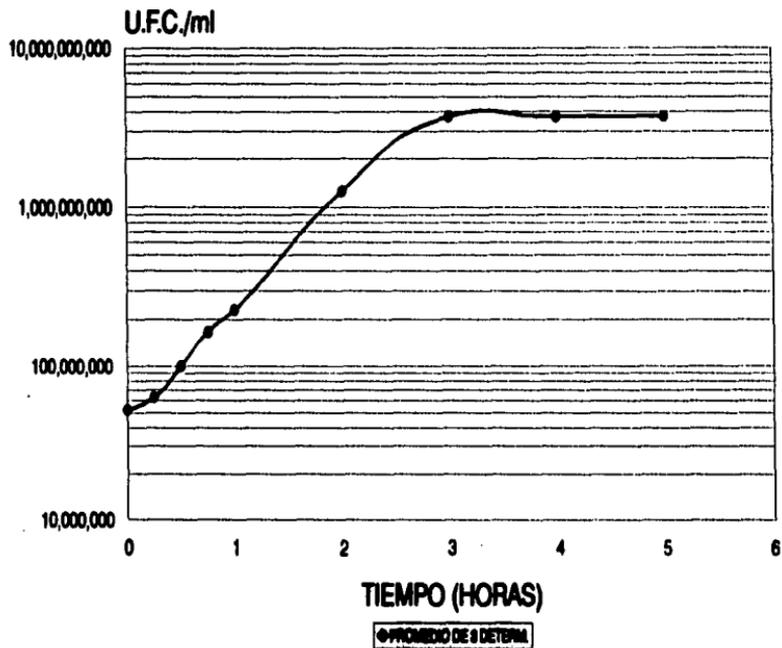
### 4.1 CULTIVO DEL MICROORGANISMO.

La curva de crecimiento para *Ap1* se presenta en la gráfica 1, en donde puede observarse un comportamiento monofásico con un tiempo de 3.5 horas a la fase estacionaria. El comportamiento cinético de la cepa en cultivo con fermentador se presenta en la grafica 2, bajo las condiciones de fermentación utilizadas el rendimiento de biomasa fue de 1.68 g/l. En este caso, las lecturas de absorbancia indicaron que la fase estacionaria se alcanzó a las 5 horas, sin embargo, al realizarse el seguimiento con cuentas viables se observó la disminución progresiva de las UFC/ml, paralela a la formación de sólidos suspendidos no relacionados a la biomasa viable alrededor de las 3 horas de iniciado el cultivo. Como lo más probable era que se tratara de productos de lisis bacteriana estos sólidos fueron separados y purificados para su estudio, las características de estos se describirán más adelante.

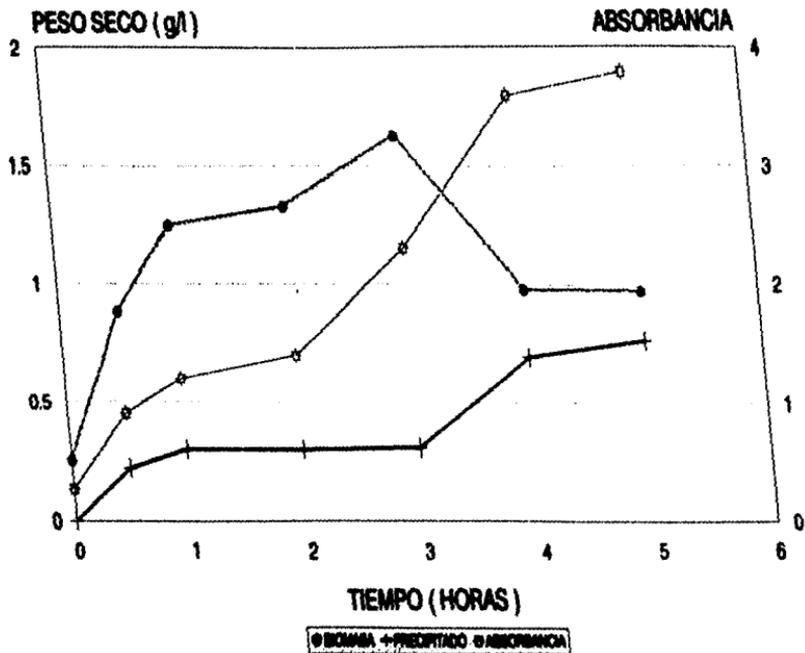
### 4.2 METODOS ANALITICOS

Las gráficas 3 y 4 presentan las curvas estándar utilizadas para la determinación de proteínas con ecuaciones de regresión  $Y=0.0051X - 0.0229$ , con  $r=0.9988$  e  $Y=0.0171X + 0.0456$  con  $r=0.9961$  para las técnicas macro y micro, respectivamente. En las gráficas 5 y 6 se presentan los espectros obtenidos por la técnica de Dische para galactosa y ramnosa, respectivamente. A partir de éstas se decidió utilizar solo la parte correspondiente a la última fase de la determinación, es decir, los espectros de 24 horas. En la gráfica 7 se presenta la superposición de los espectros a partir de la cual se decidió utilizar la longitud de onda de 400 nm para la determinación de ramnosa y de 600 nm para galactosa debido a que a estas longitudes pudo diferenciarse una de la otra. Como se observa en esta gráfica ramnosa fue incapáz de absorber a 600 nm y aún cuando galactosa también absorbía a 400 nm la concentración de ramnosa pudo ser corregida a partir de las ecuaciones de regresión obtenidas para las curvas de calibrado (gráficas 8 y 9) que fueron  $Y=0.0182X + 0.1268$ ,  $r=0.9968$  para ramnosa e  $Y=0.0085X - 0.051$ ,  $r=0.9989$  para galactosa, de tal manera que la corrección para ramnosa fue el resultado de restar el

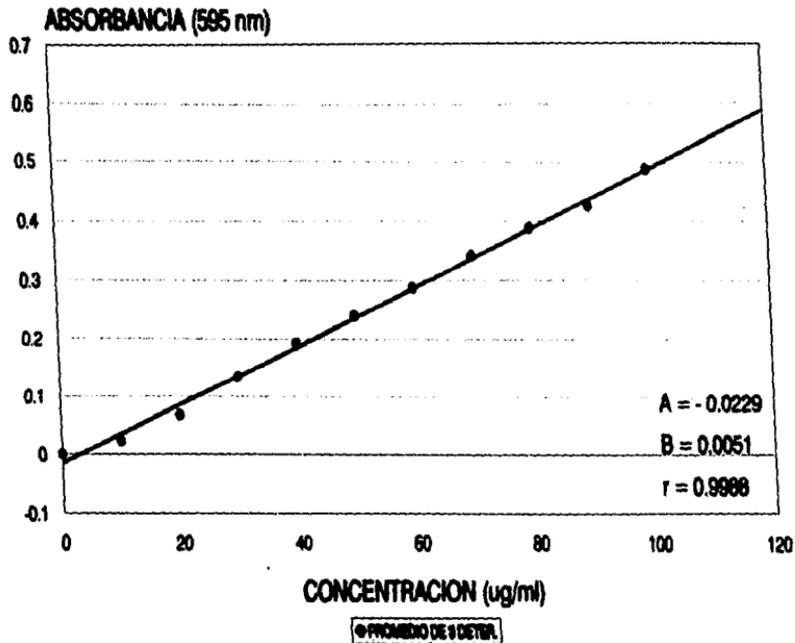
GRAFICA 1. CURVA DE CRECIMIENTO *Actinobacillus pleuropneumoniae*  
SEROTIPO 1



GRAFICA 2. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SER. 1  
EN CONDICIONES DE FERMENTACION

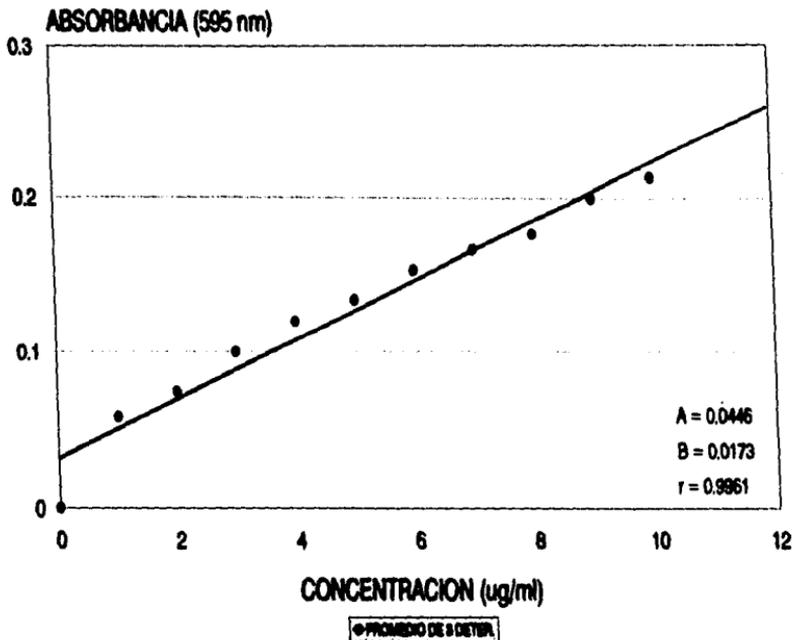


# GRAFICA 3. CURVA DE CALIBRACION PARA PROTEINAS (MACROTECNICA)

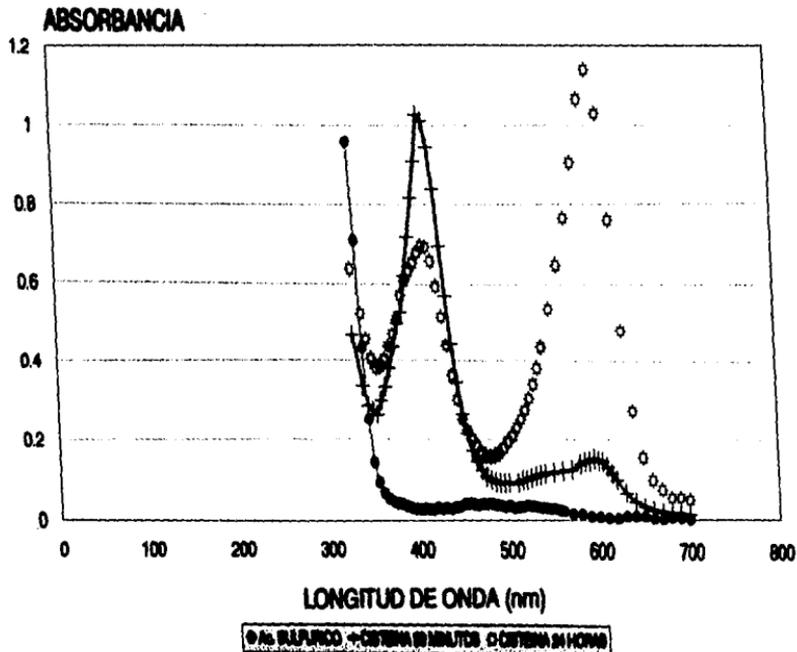


# GRAFICA 4. CURVA DE CALIBRACION PROTEINAS

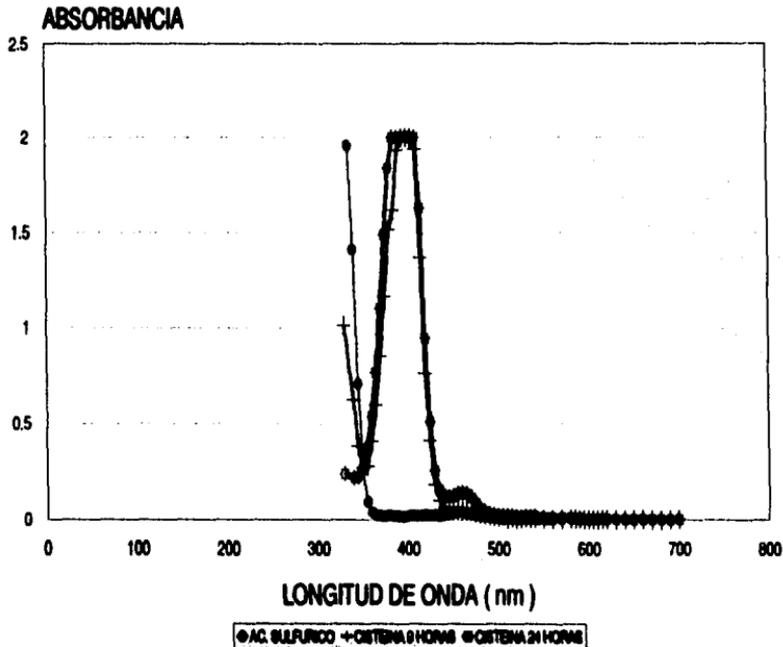
(MICROTECNICA)



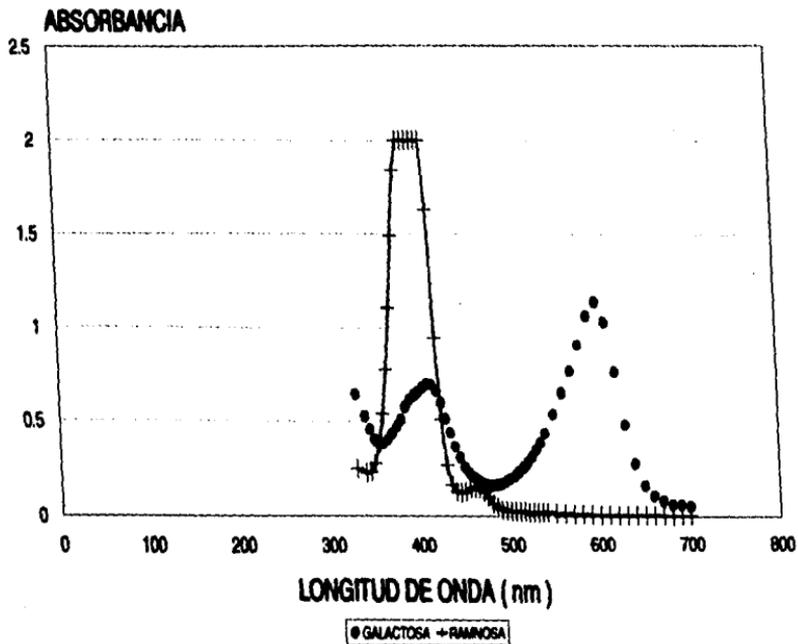
# GRAFICA 5. ESPECTRO DE DISCHE GALACTOSA 0.001 M



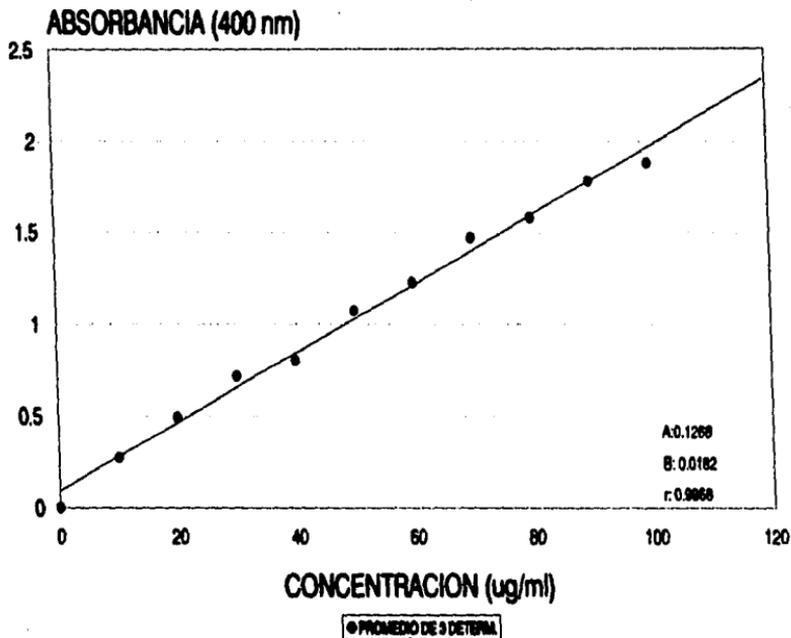
# GRAFICA 6. ESPECTRO DE DISCHE RAMNOSA 0.001M



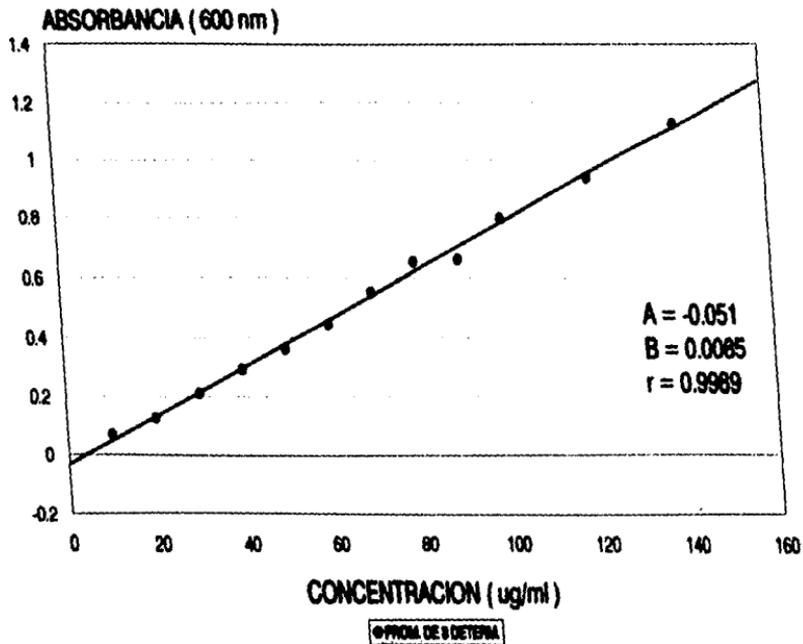
# GRAFICA 7. ESPECTRO DE DISCHE GALACTOSA-RAMNOSA



## GRAFICA 8. CURVA DE CALIBRACION RAMNOSA



# GRAFICA 9. CURVA DE CALIBRACION GALACTOSA



valor interpolado para absorbancia a 600 nm al interpolado a 400 nm según la fórmula:

$$\mu\text{g de Ramnosa} = (0.0182A^{400} - 0.1268) - (0.0085A^{600} - 0.051).$$

En la gráfica 10 se presenta la curva estandar para glucosamina, con la ecuación de regresión  $Y=0.0027X + 0.056$ ,  $r=0.9971$ . En la gráfica 11 se presenta la curva estándar para los marcadores de peso molecular en SDS-PAGE con una ecuación de regresión:  $\log Y=5.5667Rf - 1.346$ ,  $r=0.9924$ .

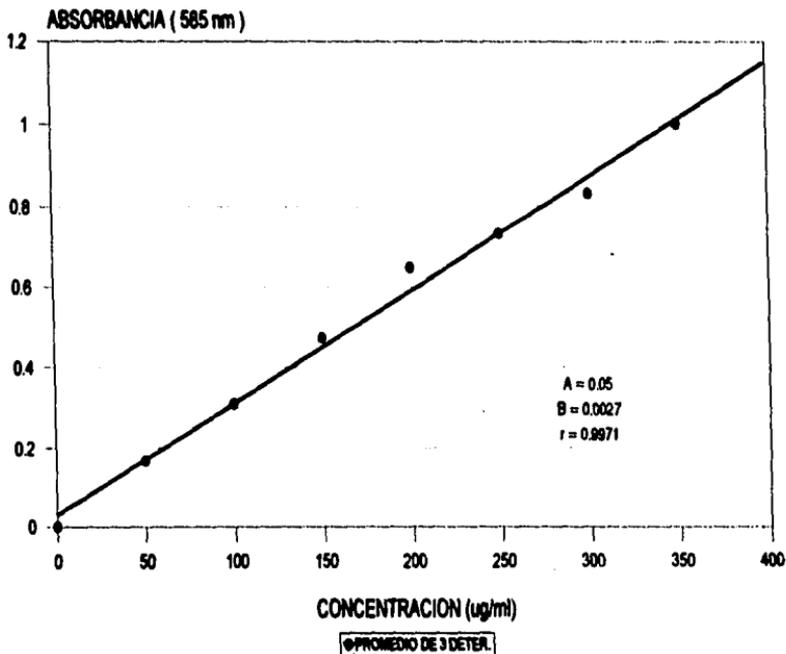
#### 4.3 ANALISIS DE LAS FRACCIONES

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en el análisis químico de las fracciones. Puede observarse que todas las fracciones presentaron contaminación con proteínas y que a juzgar por el contenido de carbohidratos el LPS y el PC aunque se encontraban enriquecidos en las fracciones correspondientes, no pudieron separarse convenientemente. Las fracciones fueron analizadas en geles de poliacrilamida-SDS (la curva estándar de marcadores de peso molecular se presenta en la gráfica 11), teniendo con nitrato de plata a fin de revelar la presencia de LPS y PC, contratiendo con azul de Coomassie para revelar proteínas (figura 1). Las fracciones protéicas contaminantes fueron las mismas para los extractos LPSr y LPSI, correspondiendo todas a perfiles reportados con anterioridad para la proteínas integrales de membrana externa, destacando las de 76 Kd, 50 Kd, la región mayor de 39 a 44 Kd, la proteína modificable por calor de 29 Kd y la proteína de 16-16.5 Kd (Rapp y col., 1986; Thwaits y Kadis, 1990; Thwaits y Kadis, 1993). En cuanto al PC, éste presentó una menor contaminación protéica encontrándose solamente bandeos definidos de 76, 69, 61 y 56 Kd también correspondientes a proteínas integrales de membrana externa.

El extracto de sólidos suspendidos presentó una amplia gama de proteínas contaminantes, sin embargo, éste extracto según se infiere por el análisis químico presentó la mayor proporción de LPS y PC.

Al realizar el análisis de las bandas teñidas con nitrato de plata se observó que tanto el extracto de LPSr como el de LPSI presentaron un patrón similar de bandeos con 15 a 20 dobletes de coloración grisásea y roja, sin patrón de repetición homogéneo que corresponden a las cadenas de polisacárido O, los cuales no se encuentran en

# GRAFICA 10. CURVA DE CALIBRACION GLUCOSAMINA



**TABLA 1. ANALISIS DE LAS FRACCIONES**

<b>DETERMINACION (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>LIPOPOLISACARIDO RUGOSO</b>	<b>LIPOPOLISACARIDO LISO</b>	<b>POLISACARIDO CAPSULAR</b>	<b>SOLIDOS SUSPENDIDOS</b>
<b>PROTEINAS</b>	13	55	85	113
<b>KDO</b>	15	83	9	86
<b>RAMNOSA</b>	309	380	132	396
<b>GALACTOSA</b>	179	244	96	416
<b>GLUCOSA</b>	3852	880	2214	18090
<b>GLUCOSAMINA</b>	1200	1860	15	2100

GRAFICA 11. CURVA DE MARCADORES DE PESO MOLECULAR

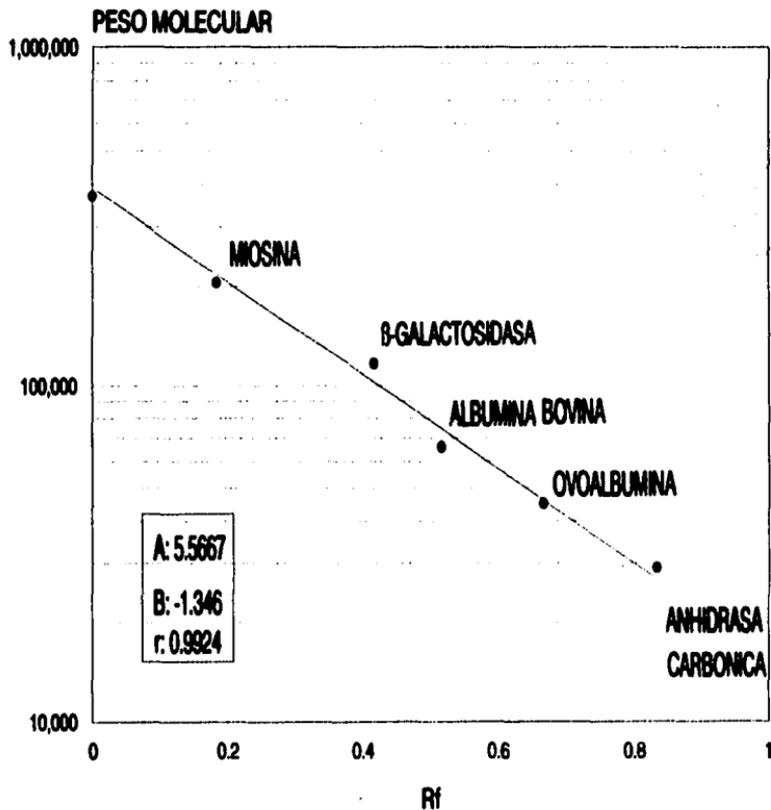




Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (12.5%) de los extractos de material capsular de *Actinobacillus pleuropneumoniae* ser. 1.  
 1. Marcadores de peso molecular; 2. Lipopolisacárido liso (*E. coli* ser. 026:B26);  
 3. Lipopolisacárido rugoso (*S. minnesota* R5, mutante Rc); 4. Sólidos suspendidos;  
 5. Polisacárido capsular; 6. "Lipopolisacárido liso"; 7. "Lipopolisacárido rugoso".

los LPS de tipo rugoso o liso por lo que se puede inferir que el polímero obtenido por los dos métodos correspondió a LPS de tipo semi-rugoso (Hitchcock y Brown, 1983), el peso molecular aparente de la mancha principal correspondiente al núcleo de LPS resultó de 18 a 20 Kd.

La prueba de lisado de amebocito de *Limulus*, indicó la presencia de endotoxina mayor a 10,000 unidades en el caso del extracto de LPS y de 100 unidades de endotoxina en el caso del extracto de PC.

#### 4.4 DETERMINACION DEL TAMAÑO OPTIMO DE PARTICULA PARA LA MICRONIZACION DEL CARBOPOL.

El método utilizado mostró claras diferencias entre los tamaños de partícula evaluados, el corte de malla 200/325 presentó la mayor proporción de estancia al cabo de 60 minutos, seguido por los cortes 100/200 y 80/100 eluyendose aproximadamente el 35%, 40% y 55% del polímero respectivamente. No hubo diferencias significativas entre los ensayos realizados para cada micronizado, indicando que la bioadhesión fue reproducible en pruebas *ex vivo*. Las micrografías electrónicas indicaron una estrecha relación entre el polímero y la mucosa, observándose zonas de intestino con las vellosidades totalmente recubiertas por carbopol (Figura 2a), y zonas en donde se apreciaron claramente las micropartículas del polímero incluidas entre las vellosidades íntimamente ligadas a la mucosa (Figura 2b,c).

#### 4.5 DETERMINACION DEL TIEMPO DE HUMECTACION OPTIMO Y COMPORTAMIENTO ULTRAMICROSCOPICO DE LA MATRIZ MICRONIZADA.

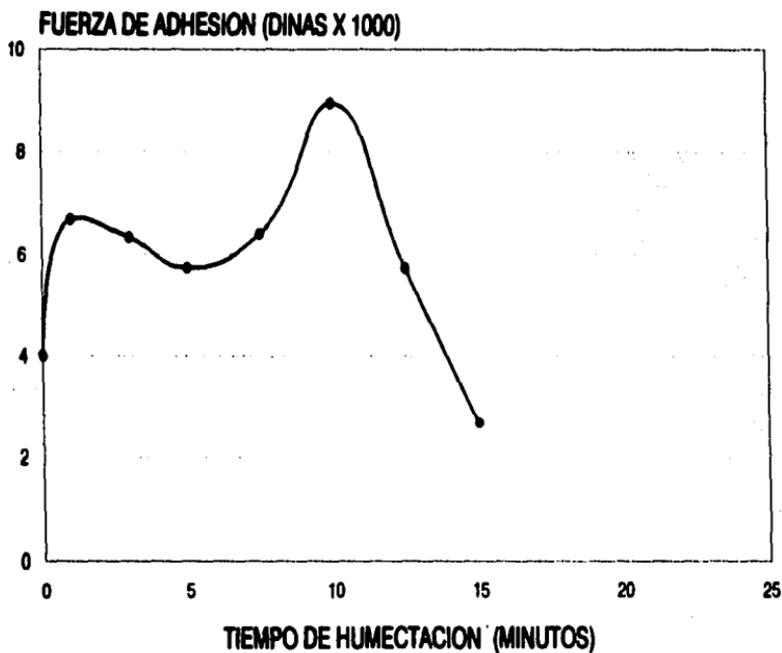
En la gráfica 12 se puede apreciar que a partir de la relación tiempo de humectación contra fuerza de adhesión manteniendo el área de exposición constante se obtuvo un comportamiento que puede ser explicado de la siguiente forma:

A tiempo de humectación 0 se observó una lectura que técnicamente se ha denominado punto de fatiga y depende de la penetración de la mucosa y/o probablemente de las fuerzas electrostáticas de los grupos carboxilo del carbopol y oligosacáridos de la mucosa (Longer y Robinson, 1986).



**Figura 2. Corte longitudinal de una sección de intestino tratada con microparticulas de carbopol. A 200X, B 700X, C 1500 X.**

## GRAFICA 12. TIEMPO DE HUMECTACION OPTIMO



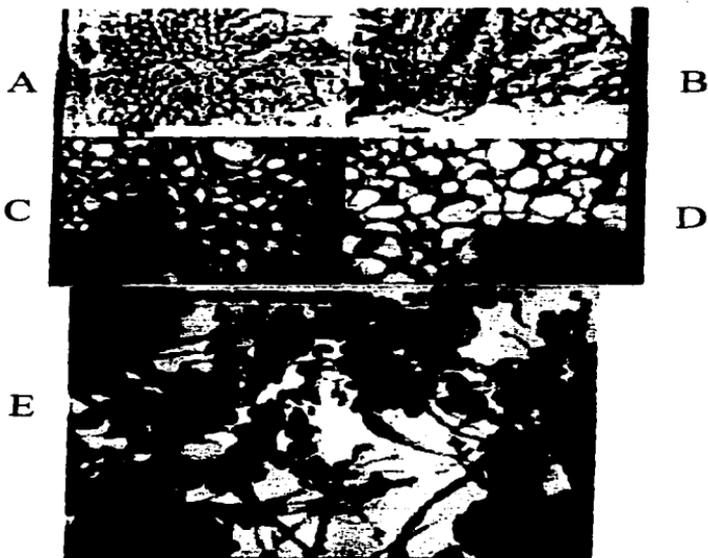
El incremento observado entre 0 y 1 minutos sobre la fuerza de adhesión pudo indicar una interpenetración (mucosa-polímero/ polímero-mucosa), ya que la humectación del polímero no había sido suficiente como para anular la acción de la mucosa sobre el mismo. La sumatoria de las fuerzas del polímero poco humectado, así como las mencionadas en el punto anterior, provocaron un aumento en la fuerza de adhesión.

La disminución de la fuerza de adhesión presentada del minuto 1 al 5 pudo deberse a la eliminación de las interacciones electrostáticas interfaciales, producto del agua presente, aunque esta última no haya sido la suficiente hasta el momento como para elevar por sí misma la fuerza de adhesión.

A partir de los 5 minutos, la cantidad de polímero relajado permitió una máxima interpenetración con un probable cambio de la viscosidad de las regiones en contacto, lo cual dificultó la separación (Longer y Robinson, 1986).

Hacia los 10 minutos se presentó la mayor fuerza de adhesión, la cual disminuyó en tiempos posteriores debido a la solubilización de las primeras capas relajadas de polímero.

Adicionalmente, se tomaron micrografías electrónicas de las micropartículas de carboxipol a tiempos establecidos de humectación, el comportamiento de solubilización del polímero presentó un patrón definido que se caracterizó por la formación de poros de erosión que gradualmente aumentaron de diámetro (Figura 3a,b,c,d), hasta generar microfíamentos que finalmente se solubilizaron en el medio (Figura 3e). Este comportamiento de solubilización fue similar al encontrado en las secciones de intestino tratadas con carboxipol y sometidas a reflujo, en donde el polímero se observó hacia el tiempo mayor de reflujo en forma de microfíamentos (comparar Fig. 2c y Fig. 3e). Esto indicó que conforme el polímero era solubilizado el activo contenido en la matriz podía ser liberado en forma simultánea y dado que el tiempo en el que se estudió la fuerza de adhesión con pastillas directamente expuestas al amortiguador fue de 15 minutos, a diferencia del ensayo de reflujo *ex vivo* que fue de 60 minutos, el tiempo necesario para dicha liberación dependió claramente del medio al que las partículas fueron sometidas, es decir, que en un medio en el que el polímero se encontraba directamente expuesto al



•Figura 3. Microscopía electrónica de barrido de micropartículas de carbopol: Comportamiento de solubilización . A. B. C y D , 0. 3. 5 y 10 minutos respectivamente ( 2000 X). E 10 minutos (10,000X )

amortiguador la solubilización fue acelerada, en tanto que en el intestino el polímero situado hacia las criptas de las vellosidades al encontrar una menor cantidad de solución circundante presentó un tiempo mayor de solubilización. Este comportamiento sugirió que los microgránulos no eluidos durante la prueba de adhesión *ex vivo* podían permanecer durante un tiempo prolongado en asociación a la mucosa aumentando por tanto el tiempo de exposición del activo a este nivel, determinando una doble función: La localización espacial y la liberación controlada de los antígenos a utilizar para la elaboración de la vacuna.

#### 4.6 ENSAYOS SEROLOGICOS.

##### 4.6.1 Aglutinación lenta en tubo.

En la tabla 2 se presentan los títulos obtenidos por aglutinación lenta en tubo para los sueros de los animales en el día 0, después de la primera inmunización (día 7), posterior al primer desafío (día 18) y al momento del sacrificio (día 25). Puede observarse que todos los animales fueron seronegativos al inicio del experimento y que posteriormente a la primera inmunización, solo los animales que recibieron dosis de bacterina (cerdos 9-12) y uno que recibió dosis oral (cerdo 8) habían desarrollado respuesta sérica en contra del cuerpo bacteriano completo.

Después del primer desafío, los títulos de anticuerpos permanecieron constantes y solo se observó cambio significativo para el título encontrado en el cerdo 8 y uno de los controles (cerdo 13), en este punto, cabe hacer notar que los animales que recibieron dosis inicial oral y refuerzo con bacterina, así como los que se inmunizaron solo con dosis orales, no presentaron respuesta sérica detectable por el método utilizado.

Hacia el final del experimento, los títulos para los grupos de inmunización O, OI y C, observaron una franca elevación, en tanto que los títulos obtenidos para el grupo de inmunización IM (solo bacterinizados) permaneció constante y en un animal (cerdo 9) pareció disminuir.

**TABLA 2. TITULOS SERICOS DE LOS CERDOS EXPERIMENTALES PRE  
Y POSDESAFIO POR AGLUTINACION LENTA EN TUBO**

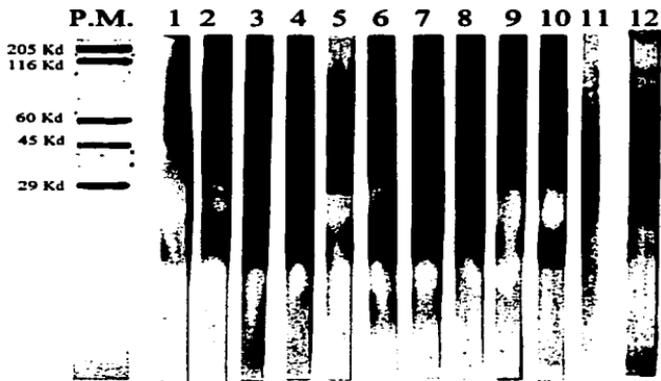
CERDOGRUPO	DIAS 0	DIAS 7	PRIMER DESAFIO	SEGUNDO DESAFIO
1)ORAL	0	0	0	1:320
2)ORAL	0	0	0	1:80
3)ORAL	0	0	N.D.	N.D.
4)ORAL	0	0	0	1:40
5)ORAL-INTRAMUSCULAR	0	N.D.	0	1:40
6)ORAL-INTRAMUSCULAR	0	0	0	N.D.
7)ORAL-INTRAMUSCULAR	0	0	0	1:40
8)ORAL-INTRAMUSCULAR	0	1:40	1:80	1:320
9)INTRAMUSCULAR	0	1:320	1:320	1:180
10)INTRAMUSCULAR	0	1:80	1:80	1:80
11)INTRAMUSCULAR	0	1:40	1:40	1:80
12)INTRAMUSCULAR	0	1:320	1:320	1:320
13)CONTROL	0	0	1:80	1:320
14)CONTROL	0	0	0	1:80

**N.D. NO DETERMINADO**

#### 4.6.2 Inmunotransferencia.

En la figura 4 se presenta la respuesta sérica específica al final del experimento de los animales contra el antígeno purificado que se utilizó para la preparación de la vacuna oral. Cabe señalar que sólo se obtuvo respuesta de anticuerpos de la clase IgG, puesto que el análisis también se realizó para la clase IgM sin encontrar reacción por parte de los sueros con anticuerpos de esta clase. Los carriles 1 al 10 corresponden a los sueros de los cerdos 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13 y 14. Los carriles 11 y 12 corresponden, respectivamente, a la reacción con Concanavalina A y a las proteínas presentes en el extracto. Los bandeos evidenciados por la reacción de Concanavalina A corresponden a las cadenas laterales de polisacáridos O, debido a su contenido de glucosa, no encontrándose reacción hacia el polisacárido capsular porque éste no contiene carbohidratos capaces de fijarse a la lectina. Puesto que los cerdos 5 al 8 pertenecían al mismo grupo experimental (OI), se observó una respuesta homogénea a las fracciones antigénicas utilizadas para la inmunización que fue dirigida principalmente en contra de las cadenas laterales O y el núcleo del LPS y las proteínas externas de membrana (76, 69, 61, 56, 50, 39-44, 29 Y 16 Kd), con una débil respuesta en contra del PC, en el cerdo 4 (grupo O) se observó una respuesta semejante a las del grupo OI, en tanto que en el cerdo 1, perteneciente al grupo O, se observó principalmente respuesta en contra de las proteínas de membrana externa excepto a las de 39-44, 29 y 16 Kd. En el caso de los cerdos 11 y 12 (grupo IM), el perfil observado correspondió a una respuesta elevada en contra de las proteínas de membrana externa, principalmente a las de 76, 69, 61, 56 y 50 Kd. Para los cerdos 13 y 14 la respuesta de anticuerpos se dirigió primordialmente hacia cadenas laterales O de alto peso molecular (COA) y la fracción de proteínas de membrana externa, sin reacción aparente contra de las cadenas laterales O de bajo peso molecular (COB).

A fin de determinar las fracciones contra las cuales la respuesta de anticuerpos fue mayor, los sueros se diluyeron 1:200 y se probaron nuevamente contra los antígenos transferidos a papel de nitrocelulosa. En el cerdo 4 (grupo O) se observó todavía una respuesta franca en contra de COB y el núcleo del LPS, así como a proteínas de bajo peso molecular (39-44, 29 y 16 Kd), disminuyendo la cantidad de anticuerpos en contra de COA, perdiéndose la respuesta hacia las demás proteínas de membrana externa. Los sueros de los cerdos 5, 6 y 7 se comportaron de igual manera, en el caso del suero del cerdo 8 éste conservó una gran cantidad de anticuerpos en contra de las proteínas de membrana externa y COA del LPS con una



**Figura 4. Respuesta sérica de los cerdos experimentales hacia los antígenos purificados de Ap1. Los carriles 1 al 10 corresponden a los sueros de los animales 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13 y 14. Carril 11, reacción con Concanavalina A. Carril 12, proteínas presentes en el extracto.**

marcada disminución de los anticuerpos dirigidos en contra del núcleo. Los sueros de los cerdos 11 y 12 sólo conservaron la respuesta correspondiente a las fracciones de bajo peso molecular de proteínas (39, 29 y 16 Kd), COB y núcleo del LPS, conservándose en el cerdo 12 una ligera respuesta al PC.

## **4.7 PATOLOGIA**

### **4.7.1 Lesiones pulmonares macroscópicas**

La distribución de las lesiones en los grupos experimentales se presenta en la figura 5, cabe señalar que ninguno de los animales murió posdesafío. A partir de el estudio de planimetría se determinaron los porcentajes de lesión aparente producidos por el desafío experimental, los resultados se muestran en la tabla 3, en donde puede observarse que tanto el grupo C como el grupo OI son estadísticamente semejantes con un rango de daño pulmonar aparente mayor al 50%, en tanto que los grupos O e IM fueron semejantes entre ellos confiriendo protección a los animales con reducción de las lesiones aparentes en alrededor de un 50% con respecto a la respuesta media del grupo C. A continuación se presenta la descripción de las lesiones (el porcentaje de lesión aparente para cada cerdo se presenta entre parentesis):

#### **Grupo de inmunización O.**

En este grupo se presentó en promedio un 21.75% de lesión neumónica con un intervalo de confianza para la media de 5.79% a 37.7%. En general las lesiones fueron en el 75% de los casos (tres animales) de tipo agudo y en el 25% (un animal) de tipo crónico. Las lesiones agudas correspondieron a zonas hemorrágicas difusas y focos de arresto purulentos con localización preponderante en lóbulos diafragmáticos, en tanto que las crónicas correspondieron a zonas hemorrágicas con cicatrización y adherencias pleurales distribuidas en los lóbulos diafragmáticos, cardíacos y apicales. Uno de los animales con proceso agudo presentó lesión tipo micoplasma.

**Cerdo I (15%):** Presentó una sola lesión de tipo hemorrágico, de coloración rojo-púrpura, sólida, en el lóbulo diafragmático izquierdo.



A



B



C



D

Figura 5. Distribución de las lesiones en los grupos experimentales. A Administración oral; B Administración oral-intramuscular; C Administración intramuscular; D Control no inmunizado.

TABLA 3. ANALISIS DE VARIANZA POR EL METODO DE RANGO MULTIPLE DE TUKEY (95%) PARA LAS LESIONES OBSERVADAS EN LOS GRUPOS DE INMUNIZACION.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
ENTRE LOS GRUPOS	3392.261	3	1130.76	5.213	0.0201
DENTRO DE LOS GRUPOS	2169.313	10	216.9313		
TOTAL (CORREGIDO)	5561.594	13			

NIVEL	N	PROMEDIO	ERROR ST INTERNO	ERROR ESTANDAR	INTERVALO DE CONFIANZA
CONTROL	2	62.4643	4.9304	10.41469	39.899-85.031
INTRAMUSCULAR	4	21.74445	4.771726	7.364294	5.789-37.701
ORAL	4	21.75088	5.482275	7.364294	5.794-37.708
ORAL-IM	4	45.98153	11.13103	7.364294	30.025-61.938
TOTAL	14	34.48829	3.936381	3.936381	25.859-43.018

NIVEL	N	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
INTRAMUSCULAR	4	21.7445	*
ORAL	4	21.75088	*
ORAL-IM	4	45.98153	**
CONTROL	2	62.4643	*

**Cerdo 2 (21%):** En la vista ventral se presentaron tres lesiones en los lóbulos diafragmáticos, un foco purulento en el lóbulo derecho de apariencia esférica, blanco-grisácea, sólido, de bordes bien definidos y dos en el lóbulo izquierdo, una semejante a la anterior y otra hemorrágica semejante a la descrita para el cerdo 1, en tanto que en el lóbulo apical derecho se encontró una lesión de hepatización sugestiva de micoplasma. En la vista dorsal, se encontraron tres pequeñas lesiones de tipo hemorrágico en el lóbulo cardíaco izquierdo, dos focos purulentos esféricos blanco-grisáceos semejantes a los ya descritos en el lóbulo diafragmático izquierdo y una lesión de tipo hemorrágico en el lóbulo diafragmático derecho.

**Cerdo 3 (37%):** Se presentó un mayor grado de lesión que para los otros animales de este grupo, en la vista ventral se observaron lesiones hemorrágicas, sólidas, de bordes definidos, al parecer rodeadas de cicatrización, circunscribiendo los lóbulos apical y cardíaco derechos, una lesión hemorrágica del mismo tipo en el lóbulo cardíaco izquierdo y dos más en el lóbulo diafragmático izquierdo. En la vista dorsal se presentó una lesión hemorrágica en la base del lóbulo apical izquierdo, dos en el lóbulo cardíaco izquierdo, tres en el lóbulo diafragmático izquierdo, una de mayor extensión y con adherencia pleural, una en el lóbulo apical derecho, una en el lóbulo cardíaco derecho y una en el lóbulo diafragmático derecho.

**Cerdo 4 (13%):** Presentó una lesión hemorrágica en la vista ventral situada en el lóbulo diafragmático izquierdo, así como un foco purulento en el lóbulo diafragmático izquierdo de la vista dorsal.

### **Grupo de inmunización OI.**

En este grupo se observó una lesión media del 45.98%, con un intervalo de confianza de 30.02% a 61.94%. En el 75% de los animales se encontró lesión aguda y en el 25% lesión crónica. Las lesiones agudas correspondieron a lesiones hemorrágicas con focos purulentos y adherencias pleurales e interlobulares, distribuidas en lóbulos diafragmáticos, cardíacos y apicales. Las lesiones crónicas comprendieron zonas de apariencia hemorrágico-congestiva y focos purulentos, distribuidas en los lóbulos diafragmáticos y cardíacos.

**Cerdo 5 (32%):** En la vista ventral presentó una extensa zona de apariencia hemorrágico-congestiva que interesó la mayor parte del lóbulo diafragmático

izquierdo, dentro de la cual se encontró un foco purulento de alrededor de 5 cm de diámetro, y una zona de lesión de tipo hepatizante en la mayoría del lóbulo cardiaco izquierdo con cinco pequeños focos purulentos, así como dos pequeñas lesiones hemorrágicas en el lóbulo accesorio. En la vista dorsal, se observó una zona hemorrágica que interesó alrededor del 50% de la superficie del lóbulo diafragmático izquierdo y una lesión hemorrágica irregular en el lóbulo cardiaco izquierdo. La apariencia de las lesiones se presenta en la figura 6a.

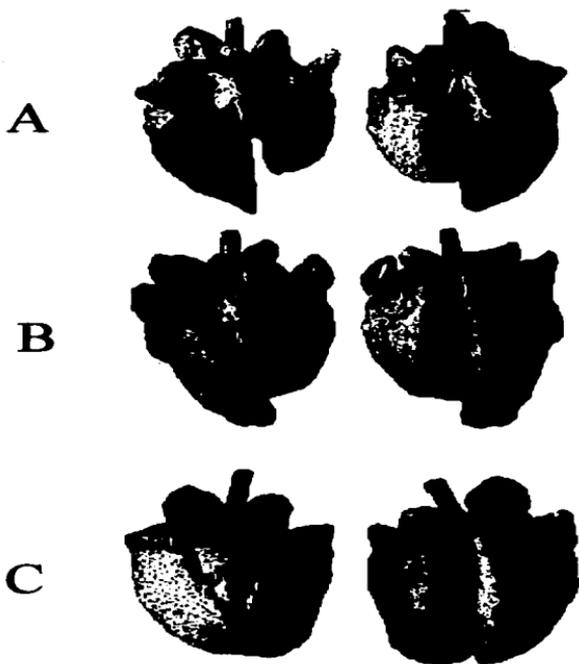
**Cerdo 6 (47%):** Presentó tres lesiones en el lóbulo diafragmático izquierdo en la región ventral dos de ellas fueron focos purulentos y una -la de mayor tamaño- de tipo hemorrágico, y una lesión de tipo hepatizante sugestiva de micoplasma que afectó una gran zona del lóbulo cardiaco izquierdo, en tanto que, en la vista dorsal se observaron dos lesiones en el lóbulo diafragmático izquierdo una de tipo hemorrágico y un foco purulento, además de una lesión de apariencia hepatizante con bordes hemorrágicos en el lóbulo cardiaco izquierdo. Se encontraron adherencias interlobulares. La apariencia de las lesiones se muestra en la figura 6b.

**Cerdo 7 (28%):** En la región ventral se observaron dos lesiones de tipo hemorrágico en el lóbulo diafragmático derecho, con adherencias interlobulares y en la vista dorsal se presentó un foco purulento en el lóbulo apical izquierdo así como dos lesiones de tipo hemorrágico en el lóbulo diafragmático derecho, una de ellas con adherencia pleural (figura 6c).

**Cerdo 8 (77%):** Se presentaron extensas zonas de daño en todos los lóbulos exceptuando el lóbulo accesorio, el tipo de lesión fue hemorrágica, encontrándose solo dos focos purulentos uno en cada lóbulo diafragmático de la región ventral, se encontraron abundantes adherencias pleurales e hidrotórax de líquido sanguinolento.

### **Grupo de inmunización IM.**

En este grupo se encontró un 21.74% de lesión media, con un intervalo de confianza de 5.79% al 37.7%. En el 50% de los casos se encontró lesión crónica y en el otro 50% lesión aguda. Las lesiones agudas correspondieron al tipo hemorrágico, con mayor frecuencia de focos purulentos y adherencias pleurales. En la presentación crónica las lesiones fueron de tipo hemorrágico con cicatrización y focos purulentos.



**Figura 6. Apariencia de las lesiones pulmonares: A. Cerdo 5; B. cerdo 6; C. Cerdo 7.**

**Cerdo 9 (21%):** Presentó en la región ventral dos lesiones en el lóbulo diafragmático izquierdo, una lesión hemorrágica bien definida y otra también hemorrágica pero de apariencia filamentososa a lo largo del lóbulo, en la vista dorsal se observaron tres lesiones en el lóbulo diafragmático izquierdo, la mayor una lesión hemorrágica y dos focos purulentos con adherencia pleural.

**Cerdo 10 (34%):** Presentó en la región ventral dos lesiones de tipo hemorrágico, sólidas, rodeadas al parecer por cicatrización en el lóbulo diafragmático derecho. En la región dorsal, se observó una lesión hemorrágica en el ápice del lóbulo cardiaco izquierdo y otra semejante en el derecho, y dos lesiones hemorrágicas en el lóbulo diafragmático derecho de igual apariencia a las de la vista ventral.

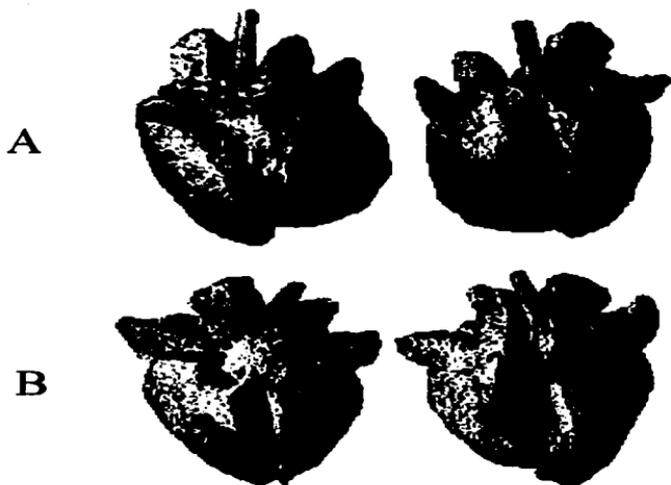
**Cerdo 11 (21%):** Presentó en la región ventral una lesión hemorrágica en el lóbulo diafragmático derecho y un foco purulento en el lóbulo diafragmático izquierdo. En la región dorsal se observaron dos focos purulentos en el lóbulo diafragmático izquierdo y dos focos purulentos en el lóbulo diafragmático derecho uno de ellos de mayor extensión (figura 7a).

**Cerdo 12 (11%):** Presentó un foco purulento en el lóbulo diafragmático izquierdo de la región ventral. En la región dorsal se observó un foco purulento en el lóbulo diafragmático izquierdo, un foco purulento en el lóbulo cardiaco izquierdo y un foco purulento de mayor tamaño en el lóbulo diafragmático derecho (figura 7b).

### **Grupo C.**

Este grupo presentó el 62.46% de lesión pulmonar aparente, con un intervalo de confianza de 39.9% a 85.05%, siendo el 100% de los casos de tipo crónico. Las lesiones fueron de tipo hemorrágico con cicatrización y múltiples focos de arresto, lesiones hepatizantes y adherencias pleurales.

**Cerdo 13 (64%):** Presentó en la región ventral una lesión hemorrágica, sólida, con múltiples focos de arresto de alrededor del 50% del lóbulo diafragmático derecho y una lesión de tipo hepatizante en el mismo lóbulo, una lesión difusa de color rosa-purpúreo en el lóbulo cardiaco derecho, en el lóbulo diafragmático izquierdo se observó una lesión hemorrágica. La región dorsal mostró una lesión hemorrágica en



**Figura 7. Apariencia de las lesiones pulmonares: A. Cerdo 11; B. Cerdo 12.**

el lóbulo diafragmático izquierdo, un foco purulento y una lesión difusa de color rosa púrpuro en el mismo lóbulo. En el lóbulo diafragmático derecho se presentó una lesión hemorrágica extensa con múltiples focos de arresto y adherencias pleurales, en el lóbulo cardíaco derecho se observó una lesión de color rosa-púrpuro (figura 8a).

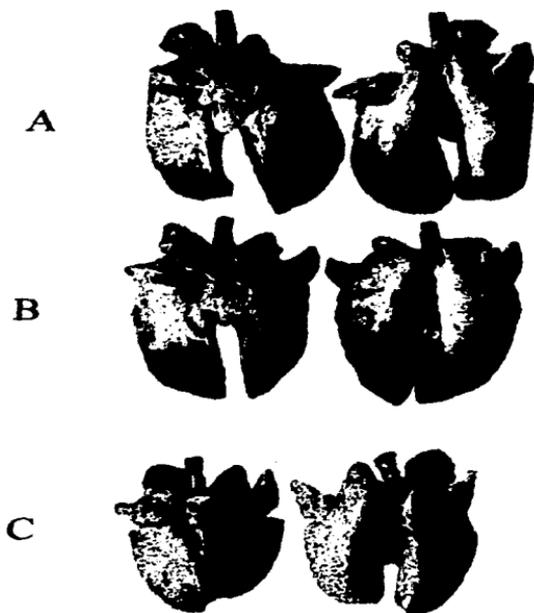
Cerdo 14 (57%): En la región ventral se presentó una zona de hemorragia difusa, con una zona de múltiples focos de arresto en el lóbulo diafragmático derecho, una lesión hemorrágica difusa en el lóbulo accesorio, un foco purulento en el lóbulo apical derecho y una zona hemorrágica con múltiples focos purulentos en el lóbulo diafragmático izquierdo. En la zona dorsal se observó una zona hemorrágica con focos de arresto y una pequeña lesión hemorrágica en el lóbulo diafragmático izquierdo, una lesión extensa de arresto en el lóbulo diafragmático derecho y un foco purulento en el lóbulo apical derecho (figura 8b).

#### 4.7.2 Aislamiento microbiológico.

En todos los animales se logró recuperar **Ap1** a partir de las lesiones observadas en pulmón, adicionalmente, se aisló **Mycoplasma spp** en una de las lesiones presentadas en los pulmones de los cerdos 2 (grupo O) y 6 (grupo OI). No se encontró ningún otro agente en las lesiones pulmonares.

#### 4.7.3 Histopatología.

Se realizó la lectura de laminillas de los cerdos experimentales, en juegos de cortes de pulmón, duodeno, yeyuno e ileon, en un estudio en ciego. En los cortes de intestino se prestó especial atención a la condición de las placas de Peyer, cuando estaban presentes, considerando la presencia de figuras de mitosis, linfoblastos e infiltración de linfocitos en los trayectos posvenulares como posibles indicadores de activación de la placa. Considerando que se realizaron dos intentos de desafío, en pulmón se definió la presencia de neumonía en su forma aguda o crónica. Los resultados se presentan en la tabla 4, en esta se indicó la presencia de neumonía tipo **Actinobacillus pleuropneumoniae** y/o **Pasteurella multocida**, con base en las siguientes características:



**Figura 8. Apariencia de las lesiones pulmonares: A. Cerdo 13; B. cerdo 14; C. Control normal.**

# TABLA 4. HISTOPATOLOGIA DE LAS LESIONES

CG	PULMON			DUODENO				YEYUNO				ILEON										
	Apf	Ph	LC	A	B	C	D	OTROS				A	B	C	D	OTROS						
1/D	X	X		+	++	++	-	EOSINOFILOS				+	++	++		EOSINOFILOS		-	-	-	INFILTRACION EN EPITELIO	
2/D	X	X		-	-	-	-	POCAS CELS. EN PP				SPP	SPP	SPP		EOSINOFILOS		-	-	-	X	
3/D	X	X	X	-	-	-	-	ROTAVIRUS LIBE				-	-	-	X	MUCOSA ROTA		-	-	-	X	POCAS CELS. EN PP
4/D	X			STL	STL	STL	-	EOSINOFILOS				+	+	-				+	+	-		
5/D	X		X	SCP A	SCP A	SCP A	-					-	-	-		PP SIN ACTIVIDAD			+	++	X	INFILTRACION EN EPITELIO
6/D	X			++	++	-	-					SPP	SPP	SPP	SPP			SA	SA	SA	++	
7/D	X			STL	STL	STL	-	SCPA				RL	RL	RL	RL	ROTAV. LIBE		SA	SA	SA	X	DEPLECCION CELULAR EN PP
8/D	X			STL	STL	STL	-	SCPA				SCP A	SCP A	SCP A	SCP A	SCPA		SA	SA	SA		
9/D	X			STL	STL	STL	-	SCPA				-	+	-				-	+	-		
10/D	X	X	X	TUJ	TUJ	TUJ	-					SPP	SPP	SPP	SPP			+	+	++	X	INFILTRACION EN EPITELIO
11/D	X	X		TUJ	+	TUJ	-							+	X	DEPLECCION CELULAR EN PP		M.R.	M.R.	M.R.	M.R.	ROTAVIRUS LIBE
12/D	X	X	X	STL	STL	STL	-	SCPA								EOSINOFILOS		SA	SA	SA	X	
13/C	X		X	TUJ	TUJ	+	-											SA	SA	SA		
14/C	X	X	X	STL	STL	STL	-					SPP	SPP	SPP				SA	SA	SA	X	

CG: CERDOGRUPO; Apf: ACTINOBACILLUS; Ph: PASTEURELLA; LC: LESION CRONICA; A: MITOSIS; B: LINFOBLASTOS; C: POSVENUARES; D: CELULAS GIGANTES; STL: NO SE ENCONTRO TEJIDO LINFOIDE; TUJ: TEJIDO LINFOIDE INACTIVO; SA: PLACA DE PEYER INACTIVA; SPP: NO SE ENCONTRO PLACA DE PEYER; SCPA: SIN CAMBIO PATOLOGICO APARENTE; RL: ROTAVIRUS LIBE; M.R.: MUCOSA ROTA

**A. pleuropneumoniae (Ap):** En los casos más severos presencia de exudado fibrino-celular en alveolos, necrosis del epitelio bronquial con oclusión o exudado fibrino-celular, lesiones multifocales a difusas en parénquima, inflamación septal con necrosis y/o trombosis, y necrosis fibrinoide en tejido vascular. Se presentan también zonas de infarto, edema y/o hemorragia alveolar e infiltración peribronquial y perivascular de células mononucleares, quizá el rasgo más característico de las lesiones microscópicas es la presencia de macrófagos transformados.

**P. multocida (Pm):** Microscópicamente se aprecia una bronconeumonía exudativa con distribución lobular. Inicialmente se encuentra una infiltración leucocitaria perivascular y peribronquiolar, engrosamiento del septo alveolar e invasión de neutrófilos, células mononucleares y exudado mucopurulento en alveolos y bronquiolos, acompañados generalmente de una reacción pleural fibrinopurulenta.

#### **Grupo O.**

En 3:1 (75%) de los casos se encontraron elementos de bronconeumonía tipo Ap y/o Pm, y solo en uno de los casos elementos francos de bronconeumonía por Ap. Solo uno de los animales presentó rasgos sugestivos de proceso crónico, con elementos de Ap y/o Pm.

**Cerdo 1:** Bronconeumonía fibrino-purulenta aguda severa, con edema y hemorragias difusas severas. Proliferación nodular de macrófagos transformados.

**Cerdo 2:** Bronconeumonía fibrino-purulenta aguda severa, con edema y hemorragias difusas severas. Infiltración alveolar difusa de macrófagos.

**Cerdo 3:** Bronconeumonía fibrinosa crónica severa, con hemorragia y proliferación severas de macrófagos transformados.

**Cerdo 4:** Bronconeumonía fibrino-purulenta aguda severa, con edema y hemorragias muy severas. Proliferación severa de macrófagos transformados.

## **Grupo OI**

En 4:4 (100%) de los casos se encontró lesión tipo **Ap**, en 2:4 (50%) como bronconeumonía fibrinosa severa y el restante como neumonía fibrinosa severa. Solo uno con elementos sugestivos de proceso crónico.

**Cerdo 5:** Bronconeumonía fibrinosa crónica severa con proliferación masiva de macrófagos transformados.

**Cerdo 6:** Neumonía fibrinosa aguda severa, con edema, congestión y hemorragias severas. Proliferación severa de macrófagos transformados e infarto rojo.

**Cerdo 7:** Neumonía aguda severa, con abundante presencia de macrófagos transformados y fibrosis pulmonar. Infartos cicatrizados.

**Cerdo 8:** Bronconeumonía fibrinosa severa, con proliferación de macrófagos transformados y congestión severas.

## **Grupo IM.**

En 3:4 (75%) de los casos se encontró bronconeumonía o neumonía tipo **Ap** y/o **Pm**, y solo en uno bronconeumonía tipo **Ap**. En 2:2 (50%) de los casos se encontró lesión aguda y el restante fue de tipo crónico.

**Cerdo 9:** Bronconeumonía aguda severa con proliferación de macrófagos transformados e infartos cicatrizados.

**Cerdo 10:** Bronconeumonía crónica severa con proliferación de macrófagos transformados e infartos cicatrizados.

**Cerdo 11:** Bronconeumonía fibrino-purulenta aguda severa, con edema y hemorragias severas. Proliferación de macrófagos transformados.

**Cerdo 12:** Neumonía crónica severa con proliferación de macrófagos transformados y fibrosis severa.

### **Grupo C.**

En 2:2 (100%) de los casos se encontró lesión crónica, en uno neumonía tipo Ap y en el otro neumonía tipo Ap y/o Pm.

Cerdo 13: Neumonía crónica severa con proliferación severa de macrófagos transformados, edema moderado y fibrosis de pleura severa.

Cerdo 14: Neumonía crónica severa con fibrosis pulmonar e infartos cicatrizados.

### **Respuesta en placas de Peyer.**

Solo se encontraron placas de Peyer activas en 1:4 de los animales del grupo O (25%) que presentó proceso de tipo agudo. En el grupo OI 2:4 (50%) presentaron placas activas, de los cuales uno cursó con proceso agudo y otro con proceso crónico. En el grupo IM 1:4 (25%) que presentó lesión crónica tuvo activas las placas de Peyer. El grupo C no presentó actividad en este sentido. Cabe señalar que en duodeno no se evaluó la presencia de placas de Peyer, sino tejido linfoide asociado a intestino.

En todos los casos se observaron eosinófilos abundantes en la mucosa intestinal. En ocho animales, dos por lote, se observaron en placas de Peyer células gigantes, con núcleos agrandados, frecuentemente lobulados y ocasionalmente con estructuras sugestivas de cuerpos de inclusión. La presencia de estas células gigantes, se asoció en la mitad de los casos a depleción de linfocitos en las placas afectadas, pudiendo corresponder estas células a una infección por adenovirus. En los grupos O, OI e IM se encontró un animal, respectivamente, con la mucosa dañada, con desprendimiento del epitelio y cambios de aspecto degenerativo en las criptas glandulares.

## 5.0 DISCUSION

En la tabla 5 se resumen las características principales del comportamiento de los cerdos al final del experimento. El análisis estadístico sugiere que existió una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) en el porcentaje de lesiones encontradas en los grupos de inmunización O e IM contra los grupos OI y control ante el desafío homólogo, no pudiendo definir si la protección conferida hubiera prevenido de la muerte puesto que ninguno de los animales murió posesafio.

Aunque el grado de lesión en los grupos O e IM fue homogéneo y hasta este punto podría indicarse que la vacuna oral propuesta funcionó confiriendo protección de manera análoga a la de una bacterina administrada por vía intramuscular, debe tomarse en cuenta: Primero, que solo un 25% de los animales del grupo O presentó lesión crónica, en tanto que el 50% de los animales del grupo IM presentaron dichas lesiones y segundo, que aún cuando el aislamiento microbiológico demostró en todos los casos la presencia de Actinobacillus pleuropneumoniae a partir de las lesiones pulmonares, en dos de los casos se aisló adicionalmente Mycoplasma spp correspondiendo estos a un cerdo del grupo O y uno del grupo OI. Se ha demostrado que la preexistencia de Mycoplasma hyopneumoniae puede exacerbar el cuadro clínico de la infección por Apl en el cerdo (Yagihashi y col., 1984) por lo que este hallazgo influye sobre los resultados obtenidos para el porcentaje de lesión aparente en los grupos experimentales O y OI suponiendo -al menos en teoría- que pudo existir un menor porcentaje de lesión promedio de no haberse presentado la probable interacción entre los dos agentes durante la infección experimental. Por lo tanto se indicaría una mayor eficiencia de la vacuna oral, sin embargo, debe señalarse que los resultados obtenidos corresponden al comportamiento de los grupos experimentales ante dos intentos de desafío y existe la posibilidad de que el primer desafío provocara un cierto grado de protección.

En un principio, durante el desarrollo de la fase experimental, se pensó que el primer desafío no había tenido ningún efecto sobre las unidades experimentales - puesto que estas no mostraron signología alguna- y se optó por realizar un segundo desafío sin tomar en cuenta la respuesta serológica de los animales. A la luz de los resultados obtenidos en la serología e histopatología, se puede inferir que contrario a lo que se concluyó en el momento dado, el primer desafío sí tuvo efecto, tomando en cuenta dos factores: Primero, que los títulos de anticuerpos séricos de cuando menos dos cerdos, uno perteneciente al grupo OI y otro al grupo C, se elevaron

**TABLA 5. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA RESPUESTA DE LOS CERDOS EXPERIMENTALES  
POSTERIOR AL DESAFIO**

CERDO	INMUNIZACION	% DE LESION	TIPO DE LESION	PLACAS DE PEYER ACTIVAS	TITULO POR AGLUTINACION LENTA EN TUBO (1)	INMUNOTRANSFERENCIA (2)	AGENTE RECUPERADO DE LAS LESIONES
1	ORAL/ORAL	15	AGUDA	SI	0/1:320	COA, CORE, 78, 89, 81, 58, 50 Kd	Ap1
2	ORAL/ORAL	21	AGUDA	NO	0/1:80	N.D.	Ap1, MICROPLASMA
3	ORAL/ORAL	37	CRONICA	NO	N.D.	N.D.	Ap1
4	ORAL/ORAL	13	AGUDA	NO	0/1:40	COA, COB, CORE, 38-44, 29, 18 Kd	Ap1
5	ORAL-INTRAMUSCULAR	52	CRONICA	SI	0/1:40	COB, CORE, 38-44, 29, 18 Kd	Ap1
6	ORAL-INTRAMUSCULAR	47	AGUDA	SI	N.D.	COB, CORE, 38-44, 29, 18 Kd	Ap1, MICROPLASMA
7	ORAL-INTRAMUSCULAR	28	AGUDA	NO	0/1:40	COB, CORE, 38-44, 29, 18 Kd	Ap1
8	ORAL-INTRAMUSCULAR	77	AGUDA	NO	1:80/1:320	COA, CORE, 78, 89, 81, 58, 50, 38-44, 29, 18 Kd	Ap1
9	INTRAMUSCULAR	21	AGUDA	NO	1:320/1:180	N.D.	Ap1
10	INTRAMUSCULAR	34	CRONICA	SI	1:80/1:80	N.D.	Ap1
11	INTRAMUSCULAR	21	AGUDA	NO	1:40/1:80	COB, CORE, 38, 29, 18 Kd	Ap1
12	INTRAMUSCULAR	11	CRONICA	NO	1:320/1:320	PC, COB, CORE, 38, 29, 18 Kd	Ap1
13	NO INMUNIZADO	84	CRONICA	NO	1:80/1:320	COA, 38-44 Kd	Ap1
14	NO INMUNIZADO	57	CRONICA	NO	0/1:80	COA, 38-44 Kd	Ap1

(1). PRIMER ASEGUNDO DESAFIO; (2) N.D. NO DETERMINADO; COA CADENAS LATERALES DE ALTO PESO MOLECULAR, COB CADENAS LATERALES DE BAJO PESO MOLECULAR

significativamente y, segundo, que seis de los catorce cerdos (46%) presentaron lesión de tipo crónico, haciendo resaltar en este punto que el tiempo transcurrido desde el segundo desafío hasta el sacrificio no fue suficiente para generar lesiones de tipo crónico, las cuales se esperan cuando menos 14 días posteriores a este, en tanto que el tiempo transcurrido desde el primer desafío hasta el sacrificio si pudo dar lugar a dichas lesiones. La baja respuesta debida al primer desafío puede ser atribuida en todo caso a dos razones: Primera, que la dosis administrada durante la aerosolización no fue letal ya sea porque el tiempo que los animales permanecieron en la cámara fue corto o porque la viabilidad del inóculo se vió afectada debido a un mal manejo, y/o segundo, a que por tratarse de una cepa de laboratorio la patogenicidad se vió disminuida debido al gran número de pases a la que fue sometida, de hecho se han producido con anterioridad cepas atenuadas de A. pleuropneumoniae serotipo 1 (Ap1) obtenidas de campo por medio de hasta 70 pasajes in vitro (Rosendal y McInnes, 1990). El hecho, es que esta aerosolización pudo conferir cierta inmunidad protectora a los animales independientemente de la inmunización a la que fueron previamente sometidos. En experiencias anteriores, Loftager y col. (1993) lograron obtener inmunidad protectora mediante inmunización por aerosolización con A. pleuropneumoniae serotipo 2 (Ap2) utilizando bacteria inactivada y Quil A como adyuvante, en este caso se inmunizó a seis animales con una suspensión de bacterias cuya concentración era de  $10^{10}$  U.F.C./ml durante una hora hasta que se completó un litro, repitiendo el protocolo en seis ocasiones en los días 1, 3, 5, 8, 10 y 12 del experimento obteniendo una baja respuesta sérica de IgG con discreta elevación de IgA posteriores al protocolo de inmunización. El número de inmunizaciones así como la carga bacteriana utilizadas en esta experiencia puede indicar que la bacteria inactivada administrada por esta vía es pobremente antigénica. Por otra parte, Bossé y col. (1992) obtuvieron inmunidad protectora mediante aerosolización con una cepa atenuada de Ap1 utilizando 75 ml de una suspensión de bacterias que contenía  $2 \times 10^6$  U.F.C./ml, no encontrando signos clínicos posteriores a la inmunización de los animales, en este caso los títulos de anticuerpos séricos de tipo IgG contra el polisacárido capsular, LPS y la hemolisina probados por ELISA no se elevaron significativamente sino hasta el séptimo día postinmunización, así mismo, los títulos contra estos antígenos en lavados bronquiales probados por ELISA se elevaron significativamente hasta el día 21 postinmunización. En nuestro caso, siendo que la dosis utilizada para el segundo desafío se encontraba dentro del rango de letalidad según ensayos previos desarrollados en la misma cámara de aerosolización que para

esta experiencia por Falcon y col. (1987) y que éste se realizó cuatro días posteriores al primero, sea que la cepa utilizada para el primer desafío se encontrara parcialmente viable (en cuyo caso el poder antigénico y patógeno se vió disminuído) o fuera una cepa atenuada, el tiempo transcurrido al momento del segundo desafío pudo no ser suficiente como para conferir inmunidad protectora, en todo caso, a la luz de los hallazgos referidos arriba, es probable que los cerdos del grupo control no murieran por efecto de la cepa patógena de campo utilizada para el segundo desafío, al establecerse un cierto equilibrio entre la respuesta inmune debida al primer desafío y el efecto patógeno de la cepa utilizada para el segundo desafío.

En cuanto a la producción de anticuerpos, la respuesta específica en contra de los antígenos vacunales al final del experimento fue en cierta medida homogénea, sin embargo, a partir de los datos presentados en la tabla 5 puede observarse que los animales con mayor índice de daño pulmonar (cerdos 5, 6, 8, 13 y 14; 32%, 47%, 77%, 64% y 57%, respectivamente) pertenecientes a los grupos OI y C presentaron una respuesta mayor en contra de las cadenas laterales O de alto peso molecular (COA) del LPS y respuesta baja o inexistente en contra del núcleo y las cadenas laterales O de bajo peso molecular (COB) del LPS. Se sabe que una de las principales adhesinas de Ap a los anillos traqueales del cerdo mantenidos en cultivo es el LPS (Bélangier y col., 1990), aunque también se ha encontrado la presencia de fimbrias en el 45% de los aislamientos de campo de Ap1 (Utrera y Pijoan, 1991), y que en la fracción COA reside la capacidad de adherencia de Ap1 y Ap2 a células del mesénquima pulmonar, endotelio vascular y epitelio traqueal (Paradis y col., 1994), probablemente por interacción con dos proteínas de bajo peso molecular (10 y 11 Kd) presentes en la secreción de éstas (Bélangier y col., 1994). Además el evento inicial en la colonización bacteriana es la adherencia de los microorganismos a las células epiteliales y/o a la capa mucosa de las superficies epiteliales y el bloqueo de las adhesinas presentes en el microorganismo disminuye los efectos patógenos en cierta medida (Beachey, 1981; Ofek y Beachey, 1980). Debió esperarse entonces, que la presencia de anticuerpos en contra de la fracción COA en los sueros de los cerdos de los grupos OI y C del experimento hubiese generado un mayor grado de inhibición de daño comparado con los sueros de los animales que no presentaron dichos anticuerpos en alta concentración, sin embargo, esto no sucedió así. Se sabe que el LPS aislado de Ap1 inoculado por vía intrabronquial en cerdos, provoca lesiones típicas de animales muertos durante estadíos agudos de la enfermedad (Fenwick y col., 1986b), induciendo alto grado de lesión endotelial con edema y trombosis vascular (Worthen y col., 1986). En este punto, es probable que

los anticuerpos de clase IgG y complemento trasudados a pulmón por efecto de la liberación de histamina y quimiotácticos a partir de mastocitos activados por IgE proveniente de las células plasmáticas de mucosa y linfa posteriores al evento inicial de colonización (Roitt, 1985), que pudieran haber reaccionado con la fracción COA del LPS -la cual se encuentra bien expuesta sobre la superficie capsular (Paradis y col., 1994)- generaran una extensa lisis bacteriana con la consecuente liberación de cantidades apreciables de LPS induciendo un mayor grado de lesión.

Cabe señalar que el suero del cerdo 4 (grupo O), también presentó una cantidad apreciable de anticuerpos contra la fracción COA, pero presentó un grado de lesión bajo (13%), en este caso, la cantidad de anticuerpos en contra de las fracciones COB y núcleo fue cualitativamente mayor que la respuesta en contra de COA, de tal suerte que éstos pudieran haber bloqueado la actividad tóxica del LPS que es mediada principalmente por el lípido A del núcleo, al unirse a un receptor específico en células de origen mononuclear o vía una proteína fijadora de LPS plasmática con el receptor CD14 de las mismas para inducir una serie de respuestas secundarias que incluyen la liberación de citocinas pro-inflamatorias entre las que se incluyen IL-1, IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral que actúan de manera sinérgica para inducir inflamación, choque y en ocasiones la muerte (Halliday y col., 1994; Rietschel, 1994; Rietschel y Brade, 1992). Dicho bloqueo de la toxicidad del LPS se ha observado en la actividad protectora cruzada ante el desafío experimental intranasal en cerdos con **Ap**, que presentan los anticuerpos generados por inmunización en contra del núcleo del LPS de *E. coli* (Fenwick y col., 1986a), así mismo se ha observado que la inmunización pasiva con sueros de animales convalecientes confiere protección específica (Bossé y col., 1992; Oishi y col., 1993) y que los animales que sobreviven al desafío desarrollan una respuesta protectora sobre serotipo heterogéneo (Nielsen, 1984), encontrándose las reacciones cruzadas entre serotipos de **Ap** en la fracción COB del LPS (Radacovici y col., 1994), lo cual podría explicar que los cerdos de este experimento que presentaron respuesta primordialmente en contra del núcleo y la fracción COB del LPS (grupos O e IM) tuvieran un mayor grado de protección.

En este punto, surge una discordancia: si los animales inmunizados por vía oral y los inmunizados por vía intramuscular tuvieron un grado aceptable de protección, ¿Porqué los inmunizados por la combinación oral-intramuscular presentaron mayor daño? Se sabe que la inmunización con **Ap** completo inactivado solamente induce protección serotipo-específica (Nielsen, 1984) y que las bacterinas de **Ap** preparadas con  $Al(OH)_3$  generan títulos de anticuerpos menores que las que tienen

como base aceite mineral o lecitina (Straw y col., 1990), esto último fue cierto para el 50% de los animales que se inmunizaron por vía intramuscular en este experimento, podría indicarse entonces que en el caso de la inmunización intramuscular la respuesta de anticuerpos, en un principio, se dirigió primordialmente en contra de los antígenos con mayor exposición en la superficie bacteriana, es decir, proteínas de membrana externa, PC (en un animal) y la fracción COA del LPS, produciendo resistencia serotipo-específica, con cierta producción de anticuerpos en contra del núcleo y COB que pudieron aumentar con la dosis de refuerzo y aún más con el primer desafío, pero que no fueron detectados a partir de la prueba de aglutinación lenta en tubo posiblemente porque el antígeno utilizado para la prueba fue el cuerpo bacteriano completo y los antígenos del núcleo y COB del LPS no están expuestos en la superficie, así mismo, el no encontrar títulos aparentes en contra de la bacteria en la inmunización oral pudo deberse a que la respuesta sérica se dirigió en contra de dichos antígenos en títulos bajos o solo existió respuesta a nivel mucosal.

La respuesta sérica a las proteínas integrales de membrana que se encontraban presentes en el extracto antigénico utilizado para la preparación de la vacuna oral y por supuesto en la bacteria fue homogénea para los grupos inmunizados con actividad preponderante en contra de las fracciones de 39-44 Kd, 29 Kd y 16 Kd presentando sólo uno de los cerdos del grupo OI (cerdo 8) respuesta adicional en contra de las fracciones 76 Kd, 69 Kd, 61 Kd, 56 Kd y 50 Kd. En tanto que en el grupo C sólo se presentó respuesta importante en contra de las fracciones de 39-44 Kd. Las proteínas integrales de membrana de 76 Kd, 50 Kd y 39 Kd generan la producción de anticuerpos que tienen un papel importante como opsoninas para la fagocitosis de Ap por leucocitos porcinos (Thwaites y Kadis, 1993) y es probable que una respuesta exagerada en contra de éstas acentuara la lisis bacteriana durante el curso de la infección experimental aumentando la liberación de LPS y otros productos tóxicos de tal suerte que esto podría explicar de alguna manera el alto índice de daño encontrado en el cerdo 8. En el caso de la inmunización combinada oral-intramuscular, a juzgar por el comportamiento de uno de los animales la inmunización oral primaria pudo generar una cierta respuesta mucosal que al combinarse con la respuesta ante el refuerzo intramuscular promovió una mayor respuesta en contra de los antígenos de superficie probablemente a nivel pulmonar, desarrollándose una respuesta exahacerbada que generó un aumento en el daño agudo al desafío, haciendo notar que en este grupo solo un animal presentó daño crónico y que, al parecer, el 50% de los cerdos presentaron actividad aumentada en

las placas de Peyer. Aunque esto último debe ser tomado con reserva, ya que sólo uno (25%) de los animales en el grupo de inmunización oral presentó dicha actividad y aún, uno de los animales del grupo intramuscular también la presentó, por lo que es probable que esta actividad estuviera asociada a la respuesta ante el primer desafío.

Por lo anteriormente expuesto, es probable que la inmunización oral a la que fueron sometidos los animales si tuvo un cierto efecto protector. Aunque en otros intentos de inmunización oral con bacteria completa no se haya encontrado efecto protector y solo se haya desarrollado una respuesta pobre a nivel local (Nielsen y col., 1990), es probable que la inactividad encontrada fuera debida a que las bacterias fueron administradas sin un vehículo que protegiera el mosaico antigénico de la bacteria del efecto deletéreo del jugo gástrico a su paso por el tracto digestivo y a que el tiempo que dichos antígenos permanecieron en este sitio fué muy corto, a diferencia del tiempo que los antígenos administrados en esta experiencia -al menos por el comportamiento encontrado en la determinación *ex vivo*- pudieron haber permanecido, además de que el Carbopol utilizado como vehículo tiene actividad reconocida como protector de la mucosa gástrica y esto pudo inhibir el efecto que la digestión estomacal generara sobre los antígenos purificados, los cuales son susceptibles de hidrólisis parcial por ácidos.

## **6.0 CONCLUSIONES**

- 1. La vacuna propuesta tuvo efecto protectorio ante el desafío, no pudiendo definir el efecto ante la muerte.**
- 2. La combinación de inmunizaciones por vía oral e intramuscular puede exacerbar el cuadro clínico, probablemente por aumento en la reacción de hipersensibilidad.**
- 3. Se propone reformular la preparación de la vacuna utilizando solamente las fracciones purificadas de los polisacáridos correspondientes a las cadenas laterales O y las proteínas de membrana externa de 39-44, 29 y 16 Kd, aumentando además el número de inmunizaciones por vía oral.**

## REFERENCIAS

- Alexander, T.J.L. & Harris D.L. (1992). Methods of disease control. En Disease of Swine. A.D. Lemand (De.) Iowa State University Press, Anes, Iowa, USA, 7th ed. pp: 808-836.
- Alexander, T.J.L. , Thornton, K., Boon, G., Lysons, R.J. & Gush, A.F. (1980). Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. *Vet. Rec.* **106**: 114-119.
- Beachey, E.H. (1981). Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* **143**: 325-345.
- Beaudet, R., McSween, G., Boulay, G., Rosseau, P., Bisailon, J.G., Descoteaux, J.P. & Ruppen, R. (1994). Protection of mice and swine against infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* by vaccination. *Vet. Microbiol.* **39**: 71-81.
- Bélanger, M., Dubreuil, D., Harel, J., Girard, Ch. & Jacques, M. (1990). Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect. Immun.* **58** (11): 3523-3530.
- Bélanger, M., Dubreuil, D. & Jacques, M. (1994). Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **62** (3): 868-873.
- Benacerraf, B. & Unanue, E.R. (1980). Textbook of Immunology, The Williams & Wilkins Co., Baltimore U.S.A.
- Bendixen, P.H., Shewen, P.E. & Rosendal, S. (1981). Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for porcine lung macrophages, peripheral blood monocytes, and testicular cells. *Infect. Immun.* **33**: 673-676.
- Bjorlund, W.E. & Bernvisco, B. (1965). Studies on pneumonia and atrophic rhinitis in pigs. On variation caused by environment, breed and sex. *Nord. Vet. Med.* **17**: 137-146.

- Bossé, J.J., Johnson, R.P., Nemeč, M. & Rosendal, S. (1992). Protective local and systemic antibody responses os swine exposed to an aerosol of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1. *Infect. Immun.* 60 (2): 479-484.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Byrd, W., Harmon, B.G. & Kadis, S. (1992). Protective efficacy of conjugate vaccines against experimental challenge with porcine Actinobacillus pleuropneumoniae. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 34: 307-324.
- Caballero, C.S. (1985). Efecto del virus de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de Pasteurella multocida en cerdos de engorda. Tesis Maestría en Ciencias (Microbiología), FES-Cuautitlán, U.N.A.M.
- Chung, W.B., Baestrom, L., McDonald, J. & Collins, M.T. (1993). Actinobacillus pleuropneumoniae culture supernatants interfere with killing of Pasteurella multocida by swine pulmonary alveolar macrophages. *Can. J. Vet. Res.* 57: 190-197.
- Ciprian, C.A. (1987). Interacción entre Mycoplasma hyopneumoniae y Pasteurella multocida en las neumonías de los cerdos. Tesis Doctorado en Ciencias (Microbiología), FES-Cuautitlán, U.N.A.M.
- Ciprian, C.A., Medina, A.G., Fuentes, R.M., Pijoan, A.C., Torres, A.O., Colmenares, V.G. & Camacho, M.J. (1988). Serotyping of Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae isolates from pigs in México. *Vet. México* 19: 205-210.
- Cox, E., Pensaert, M.B. & Callebaut, P. (1993). Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs immune after infection with the porcine respiratory coronavirus. *Vaccine* 11 (Issue 2): 267-272.
- Cynkin, M.A. & Ashwell, G. (1960). Estimation of 3-deoxy sugars by means of the malonaldehyde-thiobarbituric acid reaction. *Nature* 186: 155-156.

- Dziabi, C., Gonzalez, M., Zimenez, E. & Stephano, A. (1988). Serotyping of **Haemophilus pleuropneumoniae** isolated from pigs in México. Proc. 10th Int. Pig Vet. Soc. Cong Rio de Janeiro, Brazil, p. 75.
- Dische, Z., Shettler, L.B. & Osnos, M. (1949). Arch. Biochem. Biophys. **22**: 169.
- Edelman, R., Russell, R.G., Lososky, G., Tall, B.D., Tacket, C.O., Levine, M.M. & Lewis, D.H. (1993). Immunisation of rabbits with enterotoxigenic **E. coli** colonization factor antigen (CFA/I) encapsulated in biodegradable microspheres of poly(lactide-co-glycolide). Vaccine **11**:155-158.
- Eldridge, J.H., Staas, J.K., Meulbroek, J.A., Tice, T.R. & Gilley, R.M. (1991). Biodegradable and biocompatible poly(DL-lactide-co-glicolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. Infect. Immun. **59** (9): 2978-2986.
- Esparza, I. & Kissel, T. (1992). Parameters affecting the immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid. Vaccine **10**: 714-720.
- Falcon, N.A., De Paz, V.O., Morales, J., Batalla, C.D., Alvarado, A., Sierra, N., Tórtora, P.J., Mendoza, E.S., Hernández, B.E., Camacho, M.J. & Ciprian, C.A. (1987). Sinergia entre el virus de la Pseudorabia (PVR) y **Haemophilus pleuropneumoniae** en la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP). Memorias, 2a. Reunión de Investigación FES-Cuautitlán.
- Fedorka-Cray, P.J., Stine, D.L., Greenwald, J.M., Gray, J.T., Huether, M.J. & Anderson, G.A. (1993). The importance of secreted virulence factors in **Actinobacillus pleuropneumoniae** bacterin preparation: a comparison. Vet. Microbiol. **37**: 85-100.
- Fenwick, B.W. & Osburn, B.I. (1986). Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of **Haemophilus pleuropneumoniae** in convalescent and immunized pigs. Infect. Immun. **54**(2): 575-582.

- Fenwick, B.W., Osburn, B.I., Cullor, J.S., Henry, S.C. & Olander, H.J. (1986a). Mortality in swine herds endemically infected with **Haemophilus pleuropneumoniae**: Effect of immunization with cross reacting lipopolysaccharide core antigens of *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.* 47(8): 1888-1896.
- Fenwick, B.W., Osburn, B.I. & Olander, H.J. (1986b). Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from **Haemophilus pleuropneumoniae**. *Am. J. Vet. Res.* 47(7): 1433-1441.
- Frey, J., Beck, M. & Nicolet, J. (1994). RTX-toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, in *Bacterial protein toxins*, Zbl. Bakt. Suppl. 24, Freer et. al. (eds.), pp. 322-332.
- Galanos, C., Luderitz, O. & Westphal, O. (1969). A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9: 245-249.
- Gerlach, G.F., Anderson, C., Klashinsky, S., Rossi-Campos, A., Potter, A.A. & Wilson, P.J. (1993). Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (Oml A) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* 61: 565.
- Gunnarson, A., Biberstein, E.L. & Hurvell, B. (1977). Serologic studies on porcine strains of **Haemophilus parahemolyticus (pleuropneumoniae)**: Agglutination reaction. *Am. J. Vet. Res.* 38: 1111-1114.
- Halliday, M.I., McCrory, D.C., Weir, C.D., Gardiner, K.R., Soong, C.V. & Rowlands, B.J. (1993). LPS & Citokines. *Proc. Pathol. Soc. Great Britain & Ireland, J. Med. Microbiol.* 39 Suppl. 1. Abst. 326.
- Henry, S. (1982). **Haemophilus pleuropneumoniae** bacterins. *Proc. Minnesota Pork Conf.* pp 106-110.
- Henry, S.C. & Marsteller, T.A. (1982). *Haemophilus pleuropneumoniae* bacterin field trials in an endemically affected herd. In *Proceedings, Int. Pig Vet. Soc. Cong.* pp 72.

- Hitchcock, P.J. & Brown, T.M. (1983). Morphological heterogeneity among **Salmonella** lipopolysaccharide chemotype in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**: 269-277.
- Hung, S. Ch., Haesung, P., Kelly, P. & Robinson, J.R. (1985). Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery II: Synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers. *J. Pharm. Sci.* **74** (4): 399-405.
- Idris, U.E.A., Harmon, B.G., Udeze, F.A. & Kadis, S. (1993). Pulmonary lesions in mice inoculated with **Actinobacillus pleuropneumoniae** hemolysin and lipopolysaccharide. *Vet. Pathol.* **30**: 234-241.
- Jacques, M., Bélanger, M., Roy, G. & Foiry, B. (1991). Adherence of **Actinobacillus pleuropneumoniae** to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. *Vet. Microbiol.* **27**: 133-143.
- Kadis, S., Udeze, F.A. & Latimer, K.S. (1986). Lung lesions and cytotoxicity of porcine alveolar macrophages induced by **Haemophilus pleuropneumoniae** lipopolysaccharide. In Proceedings, Int. Pig Vet. Soc., Barcelona, pp 625.
- Kawanagh, N.T. (1989). Improving herd health by the population and restocking with M.D. stock: planing the program. Minnesota Swine Herd Health Programming Conference, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, U.S.A., pp: 19-40.
- Kimura, M., Araki, S., Nakai, T. & Kume, K. (1993). Protective effect of dihydroheptaprenol in combination with vaccine to experimental **Actinobacillus pleuropneumoniae** infection in guinea pigs and pigs. *J. Vet. Med. Sci.* **55** (4): 627-630.
- Laemli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.
- Landquist, J.O. (1974). Animal and environment in the production pattering pigs. *Acta Vet. Scand. Suppl.* **51**: 26

- Langer, R. (1984), in *Controlled Drug Bioavailability* Vol. 3, V.F. Smolen & L.A. Ball, eds., New York, U.S.A., pp 307.
- Leman, A.D., Glock, R.D., Mengelin, W.R., Penny, R.H.C., Scholl, E. & Straw, B. (1981). *Diseases of Swine*, 5th ed., The Iowa State University Press, Ames (Iowa), U.S.A.
- Lenser, D.K., McDonald, T.L. & Miller, N.G. (1988). Protection of mice against the lethal effect of an intraperitoneal infection with **Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae** after vaccination with capsular proteins. *Vet. Microbiol.* 18 (3-4): 335-348.
- Loftager, M.K., Eriksen, L., Aasted, B. & Nielsen, R. (1993). Protective immunity following immunisation of pigs with aerosol of **Actinobacillus pleuropneumoniae** serotype 2. *Res. Vet. Sci.* 55: 281-286.
- Lombin, L.H., Rosendal, S. & Mitchell, W.R. (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.
- Longer, M.A. & Robinson, J.R. (1986). Fundamental aspects of bioadhesion. *Pharm. Int.* May: 114-117.
- Medina, A.G. (1986). Serotificación de **Haemophilus pleuropneumoniae**, aislados a partir de pulmones con pleuroneumonía contagiosa obtenidos en el rastro de ferretería, D.F., Tesis profesional, Q.F.B., FES-Cuautitlán, U.N.A.M., México.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. & Leblanc, D. (1984). A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of **Haemophilus pleuropneumoniae** infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 45(4):715-9.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. & Martineau, G.P. (1987). Effect of heat treatment on the surface antigens of **Haemophilus pleuropneumoniae**. *Vet. Rec.* 120: 62-65.

- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. & Nadeau, M. (1992). Serological characterization of Actinobacillus pleuropneumoniae strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.* **32**: 135-148.
- Morilla, G.A. & Bautista, G.C.R. (1986). *Manual de inmunología*, Ed. Diana, México.
- Morris, W., Steinhoff, M.C. & Russell, P.K. (1994). Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation. *Vaccine* **12** (1): 5-11.
- Nakai, T., Swata, A. & 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.
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V., García, C., Godinez, D., Serrano, J.J., Alvarez de la Cuadra, J. & De la Garza, M. (1994). Actinobacillus pleuropneumoniae: Virulence and gene cloning. *Arch. Med. Res. Méx.*, **25** (2): 229-233.
- Nicolet, J., Paroz, P. & Krawinkler, M. (1981). An enzyme-linked immunosorbent assay, using an EDTA-extracted antigen for the serology of **Haemophilus pleuropneumoniae**. *Am. J. Vet. Res.* **42**: 2139-2142.
- Nielsen, R. (1976). Pleuropneumonia in swine caused by **Haemophilus parahemolyticus**. Studies on the protection obtained by vaccination. *Nord. Veterinaarmed* **28**: 337-348.
- Nielsen, R. (1979). **Haemophilus parahemolyticus** serotypes pathogenicity and cross immunity. *Nord. Vet. Med.* **31**: 407-413.
- Nielsen, R. (1984). **Haemophilus pleuropneumoniae** serotype-cross protection experiments. *Nord. Vet. Med.* **36**: 221-234.
- Nielsen, R. (1985). Serological characterization of **Haemophilus pleuropneumoniae** (**Actinobacillus pleuropneumoniae**) strains and proposal of a new serotype: serotype 10. *Acta Vet. Scand.* **2**: 581-585.

- Nielsen, R. (1986). Serological characterization of Actinobacillus pleuropneumoniae strains and proposal of a new serotype: serotype 12. Acta Vet. Scand. 27: 453-455.
- Nielsen, R., Loflager, M. & Eriksen, L. (1990). Mucosal vaccination againsts Actinobacillus pleuropneumoniae infection. In Proceedings, 11th Congress, International Pig Veterinary Society, July 1-5, Laussane, Switzerland.
- Nielsen, R. & 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.
- Nielsen, R, Thomsen, A.D., & Vesterlund, S.D. (1976). Pleuropneumonia caused by **Haemophilus parahemolyticus**: an attempt to control the disease at two progeny testing stations by serological blood testing followed by removal of the seropositive animals and their littermates. Nord. Vet. Med. 28: 349-352.
- Ofek, I. & Beachey, E. H. (1980). Bacterial adherence. Adv. Intern. Med. 25: 503-532.
- Oishi, E., Ito, H., Okabe, T. & Terakado, N. (1993). Passive protection of mice against Actinobacillus pleuropneumoniae infection by monoclonal antibodies. J. Vet. Med. Sci. 55 (5): 711-715.
- Paradis, S.E., Duvrebil, D., Rioux, S., Gottschalk, M. & Jacques, M. (1994). High-molecular mass lipopolysaccharides are involved in Actinobacillus pleuropneumoniae adherence to porcine respiratory tract cells. Infect. Immun. 62 (8): 3111-3119.
- Perry, M.B., Altman, E., Brisson, J.-R., Beynon, L.M. & Richards, J.C. (1990). Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of **Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae** strains. Serdiag. Immunother. Infect. Dis. 4: 299-308.

- Pijoan, C. Cruz, G. & Martinez, H. (1982). Protection and immunity obtained with a gel-adyuvant bacterin of **Haemophilus pleuropneumoniae**. In Proceedings, Int. Pig Vet. Soc. Cong. pp 73.
- Pijoan, C., Utrera, V. & Miller, A. (1990). Effect of granulocyte colony-stimulating factor on prevention or reduction of severity of lesions associated with **Actinobacillus pleuropneumoniae** infection. In Proceedings, 11th Congress, International Pig Veterinary Society, Laussane, Switzerland, July 1-5.
- Preis, I. & Langer, R.S. (1979). A single-step immunisation by sustained antigen release. *J. Immunol. Methods* **28**: 193-197.
- Radacovicci, S., Gottschalk, M. & Dubreuil, J.D. (1994). Lipopolysaccharides of **Actinobacillus pleuropneumoniae** (serotype 1): a readily obtainable antigen for ELISA serodiagnosis of pig pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.* **39**: 219-230.
- Ramirez, N.R. (1970). Neumonia hemorrágica en cerdos: Neumonía por **Haemophilus parahemolyticus**. Tesis, M.V.Z., U.A.M., México.
- Ranga, R.K.V. & Buri, P. (1989). *Int. J. Pharm.* **52**: 265.
- Rapp, V.J., Munson, R.S.Jr., & Ross, R.F. (1986). Outer membrane protein profiles of **Haemophilus pleuropneumoniae**. *Infect. Immun.* **52** (2): 414-420.
- Rietschel, E. Th. (1993). Structure-Activity-Relationships of endotoxins. *Proc. Pathol. Soc. Great Britain & Ireland, J. Med. Microbiol.* **39** Suppl. 1. Abst. 324.
- Rietschel, E. Th. & Brade, H. (1992). Bacterial endotoxins. *Scientific American* **267** (2): 54-61.
- Roitt, I. (1985). *Essential Immunology*, 5th ed., Blackwell Sci. Pub., London, p. 190-191.
- Rosendal, S. & Boyd, D.A. (1982). **Haemophilus pleuropneumoniae** serotyping. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 840-843.

- Rosendal, S. & McInnes, J.I. (1990). Characterization of an attenuated strain of **Actinobacillus pleuropneumoniae**, serotype 1. *Am. J. Vet. Res.* **51**: 711-717.
- Rossi-Campos, A., Anderson, C., Gerlach, G.F., Klashinsky, S., Potter, A.A. & Wilson, P.J. (1992). Immunization of pigs against **Actinobacillus pleuropneumoniae** with two recombinant protein preparations. *Vaccine* **10**: 512.
- Sanford, S.E. & Josephson, G.K.A. (1981). Porcine **Haemophilus pleuropneumoniae** epizootic in southwestern Ontario: Clinical, microbiological, pathological and some epidemiological findings. *Can. J. Comp. Med.* **46**: 109-114.
- Sebunya, T.N.K. & Saunders, J.R. (1983). **Haemophilus pleuropneumoniae** infection in swine: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **182**: 1331-1337.
- Scicchitano, R., Husband, A.J. & Clancy, R.L. (1984). Contribution of intraperitoneal immunisation to the local immune response in the respiratory tract of sheep. *Immunology* **53**: 375-384.
- Schultz, R.A. ed., (1985). Compendium on swine **Haemophilus pleuropneumoniae**. SDS Biotech. Corp., Ames, Iowa, U.S.A.
- Schultz, R.A., Ross, R.F. & Young, T. (1982). Prevalence of antibodies to **Haemophilus pleuropneumoniae** in Iowa swine. *Am. J. Vet. Res.* **43**: 1848-1851.
- Sheldrake, R.F., Romalis, L.F. & Saunders, F. (1988). Specific antibody containing cells in the porcine respiratory tract following intraperitoneal and intratracheal immunisation. *Res. Vet. Sci.* **45**: 369-373.
- Smart (1984). An in vitro investigation of mucosa adhesive materials for use in controlled drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* **36**: 295-299.
- Straw, B.E., Shin, S., Calliham, D. & Petersen, M. (1990). Antibody production and tissue irritation in swine vaccinated with **Actinobacillus** bacterins containing various adjuvants. *J.A.V.M.A.* **196** (4): 600-604.

- Strominger, J.L., Park, J.T. & Thompson, R.E. (1959). Composition of the cell wall of *Staphylococcus aureus*: It's relation to the mechanism of action of *Penicillium*. *J. Biol. Chem.* **234**: 3263.
- Taylor, D.J. (1981). *Pig Diseases*, 2nd ed., The Burlintong Press (Cambridge) LTD, Great Britain.
- Thwaits, R.N. & Kadis, S. (1991). Immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane proteins and enhancement of phagocytosis by antibodies to the proteins. *Infect. Immun.* **59** (2): 544-549.
- Thwaits, R.N. & Kadis, S. (1993). Purification of surface-exposed integral outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their role in opsonophagocytosis. *Am. J. Vet. Res.* **54** (9): 1462-1470.
- Tielsen, M.J.M. (1978). Buildings, enviromental conditions and diseases. *Proc. A.U.E.A. & Prod.* pp. 7-17.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **74**: 4350-4354.
- Utrera, V. & Pijoan, C. (1991). Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet. Record* **128**: 357.
- Vanforth, R. ed. (1975). Mononuclear Phagocytes, In *Immunity Infection and Pathology*, Blackwell Sci. Pub., Great Britain, pp 951.
- Villalobos, G.R., López, A.J., Aguilera, C.E., Quintanar, G.D. & Cervantes, O.R.A. (1992). Desarrollo de un nuevo método para medir bioadhesión de polímeros. *Tópicos de Investigación y Posgrado* **2** (3): 41-48.
- Worthen, G.S., Haslett, C., Smedly, L.A., Rees, A.J., Gumbay, R.S., Henson, J.F. & Henson, P.M. (1986). Lung vascular injury induced by chemotactic factors: enhancement by bacterial endotoxins. *Fed. Proc.* **45**: 7-12.

- Yagihashi, T., Nunoya, T., Mitui, T. & Tajima, M. (1984). Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on the development of *Haemophilus pleuropneumoniae* pneumonia in pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.* 46 (5): 705-713.