

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

OBTENCIÓN DE UN CONJUGADO DE *Haemophilus*  
*parasuis* PARA EL DIAGNOSTICO POR  
INMUNOFLUORESCENCIA DE LA ENFERMEDAD DE  
GLÄSER

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

MARIA DEL ROCIO LOPEZ PEREZ

ASESORES:

Dra. SUSANA MENDOZA ELVIRA

Dr. ABEL CIPRIAN CARRASCO

Dr. ANDRES ROMERO ROJAS

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

2006



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MIS PADRES:**

**ANDRÉS LÓPEZ GUTIÉRREZ Y FRANCISCA PÉREZ LÓPEZ ,  
PORQUE GRACIAS A SU APOYO, SU AMOR Y SU COMPRENSIÓN  
LOGRÉ CUMPLIR UNA DE MIS METAS , LO CUAL CONSTITUYE UNA  
HERENCIA INVALUABLE.**

### **A MIS HERMANOS:**

**ISIDORA, MARGARITA , BENITO, FELICITAS, RICARDO, POR SU  
APOYO INCONDICIONAL Y POR SER TODOS ELLOS UN EJEMPLO A  
SEGUIR.**

### **A FEDE:**

**POR COMPARTIR CONMIGO SU CARIÑO, SU CONFIANZA, SU  
APOYO Y POR ESTAR CERCA DE MI EN EL INICIO DE ESTE NUEVO  
CAMINO.**

### **A MIS AMIGOS:**

**MIREYA, MARTHA, LIZBETH, LORENA, GABY, ANGELES, OMAR,  
GUSTAVO, MARCOS, JAIR, DAVID C., SILVERIO , CESAR, DAVID,  
AMMIN, ARGEL, ALMA, IZTHEL, TANIA, ROGELIO, SANDRA, CESI  
Y POR SUPUESTO A MI COMPAÑERA DE TESIS MARIA ELENA ,  
GRACIAS A TODOS POR SU APOYO, SU COMPRENSIÓN Y POR  
HACER MI ESTANCIA EN LA FACULTAD UNA ETAPA  
INOLVIDABLE.**

**A LA DRA. SUSANA MENDOZA:**

**POR IMPULSAR EN MI LA SUPERACIÓN, LA DEDICACIÓN AL TRABAJO, PERO SOBRE TODO, SU GRAN CALIDAD HUMANA.**

**AL DR. ABEL CIPRIAN:**

**POR COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS Y POR SU ESTÍMULO A SEGUIR ADELANTE**

**AL DR. ANDRES ROMERO:**

**POR SU CONSTANTE ASESORÍA PARA LA OBTENCIÓN DEL CONJUGADO**

**A MIS SINODALES:**

**POR SU ORIENTACIÓN EN LA CULMINACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.**

**AL DR. ELISEO HERNÁNDEZ:**

**POR FACILITAR EL USO DEL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA Y POR SU ASESORÍA EN LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.**

**AL DR. FRANCISCO ROSALES:**

**POR LA DONACIÓN DEL CERDO SPF PARA LA PREPARACIÓN DEL CONJUGADO Y SU AYUDA TÉCNICA EN CADA MOMENTO.**

**AL MVZ DAVID TRUJILLO:**

**POR SU ASISTENCIA TÉCNICA Y POR SU AMISTAD.**

**AL SR. GABINO SÁNCHEZ:**

**POR SU ASISTENCIA CON MATERIAL DE LABORATORIO Y DE IGUAL MANERA POR BRINDARME SU AMISTAD.**

**Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS CON LAS QUE ME VI INVOLUCRADA A TRAVÉS DE MI CARRERA, QUIENES CREYERON EN MI Y ME DIERON LAS HERRAMIENTAS NECESARIAS PARA MI FORMACIÓN PROFESIONAL.**

## INDICE GENERAL

Índice de cuadros

Índice de figuras

Abreviaturas

Resumen

### **1.0** Introducción

Agente etiológico

Distribución en la naturaleza

Mecanismos de virulencia

Epidemiología

Cuadro clínico y patológico

Diagnóstico microbiológico

Métodos de diagnóstico

Fijación del complemento

ELISA

IHA

Pruebas inmunohistoquímicas

Inmunoglobulinas

Métodos desarrollados para el aislamiento de las inmunoglobulinas

Justificación

Hipótesis

### **2.0** Objetivo general

Objetivo particular

### **3.0** Material y métodos

Cepa de referencia: *Haemophilus parasuis* (Suvaxyn RespiFend HPS)

Esquema de vacunación

Prueba de ELISA

Preparación del conjugado FITC-Ab

Modificación de la técnica

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Electroforésis

Cromatografía de afinidad

Cortes histológicos en congelación

Tinción de muestras

#### **4.0 Resultados**

Obtención y purificación del suero

Cuantificación de proteínas

Detección de anticuerpos contra *Haemophilus parasuis*

Purificación de las inmunoglobulinas en cromatografía de Afinidad

Cromatografía de afinidad

#### **5.0 Discusión**

#### **6.0 Conclusiones**

#### **7.0 Bibliografía.**

Palabras clave: *Haemophilus parasuis*, cromatografía, isotiocianato de fluoresceína, cuantificación, inmunofluorescencia, diagnóstico de *Haemophilus parasuis*, Enfermedad de Glässer, Anticuerpos anti *H. parasuis*

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.1</b>	A) Morfología microscópica de <i>Haemophilus parasuis</i> B) aspecto pulmonar c) Colonias de <i>Haemophilus parasuis</i>	
<b>Cuadro 3.1</b>	Técnica de ELISA	
<b>Cuadro 3.2</b>	Curva patrón para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford	
<b>Cuadro 3.3</b>	Volumen requerido de cada una de las soluciones para la elaboración del gel en poliacrilamida (SDS-PAGE)	
<b>Cuadro 4.1</b>	Valores de absorbancias para la realización de la curva patrón y cuantificación de proteínas	
<b>Cuadro 4.2</b>	Resultado de niveles de anticuerpo por medio de la técnica de ELISA	
<b>Cuadro 4.3</b>	Volumen requerido en la cromatografía de columna para la separación de las inmunoglobulinas	
<b>Cuadro 4.4</b>	Valores de absorbancias correspondientes a la cromatografía de columna	

<b>Cuadro 4.5</b>	Valores de absorbancias correspondientes a la cromatografía de columna	
<b>Cuadro 4.6</b>	Modificación realizada a la cromatografía de columna	
<b>Cuadro 4.7</b>	Valores de absorbancia correspondiente al tubo mas concentrado al menos concentrado en la cromatografía de columna.	
<b>Cuadro 4.8</b>	Valores de absorbancia en la segunda etapa de la cromatografía de columna	
<b>Cuadro 4.9</b>	Valores de absorbancia en la segunda etapa de la cromatografía de columna	
<b>Cuadro 4.10</b>	Volumen total al juntar las muestras con buffer de fosfatos y citratos al término de la cromatografía de columna	
<b>Cuadro 4.11</b>	Cantidad de fluoresceína y buffer de carbonato-bicarbonato requerido para la elaboración del conjugado.	

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b>	Inmunofluorescencia Directa	
<b>Figura 2</b>	Cuantificación de proteínas	
<b>Figura 3</b>	Determinación de la Inmunoglobulina G, a partir de una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE con tinción de Azul de Comassie	
<b>Figura 4</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción de nitrato de plata	
<b>Figura 5</b>	Reacción positiva de Inmunofluorescencia Directa	
<b>Figura 6</b>	Reacción positiva de Inmunofluorescencia Directa	
<b>Figura 7</b>	Reacción negativa de Inmunofluorescencia Directa	
<b>Figura 8</b>	Reacción positiva de Inmunofluorescencia Directa vista en diferentes sitios del pulmón.	

## Abreviaturas

<b>AGPT</b>	Técnica de precipitación en agar gel
<b>ELISA</b>	Ensayo ligado a una enzima
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FITC-Ab</b>	Isotiocianato de fluoresceína antisuero porcino.
<b>IFD</b>	Inmunofluorescencia porcina
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IHA</b>	Hemoaglutinación indirecta
<b>OPD</b>	Orto-fenilendiamina
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBS</b>	Amortiguador de fosfatos
<b>SDS</b>	Duodecil fosfato de Sodio
<b>SPF</b>	Libres de patógenos específicos
<b>SSF</b>	Solución salina fisiológica
<b>U.V.</b>	Ultravioleta
<b>Xg</b>	Gravedades

## Resumen

Para obtener el suero contra *Haemophilus parasuis* se inmunizó, con un calendario de vacunación establecido durante dos meses a un cerdo de 21 días de edad, utilizando una cepa de *Haemophilus parasuis*. La obtención del suero se realizó sacrificando y sangrando en blanco al cerdo. Se determinaron los niveles de anticuerpos contra *Haemophilus parasuis* por medio de la técnica de ELISA. Para la obtención del conjugado se efectuó una precipitación de Ig. con sulfato de amonio y se colocó la solución de globulinas en diálisis hasta observar la ausencia de iones sulfato. A partir de una cuantificación de proteínas por el método de Bradford se determinó la cantidad de proteínas presentes en el suero. En la identificación de la Ig. se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata, y posteriormente se llevó a cabo una cromatografía de columna por afinidad para la separación de las IgG's. Al término de esto, se realizó la prueba confirmativa en la cual se determinó el título de los anticuerpos por medio de una inmunofluorescencia Directa (IFD). Se hicieron cortes de tejidos de pulmones positivos a *Haemophilus parasuis*, fueron fijados, expuestos al conjugado y observados en el microscopio de fluorescencia.

La electroforesis con nitrato de plata determinó la eficiencia de la técnica de precipitación de Ig. con sulfato de amonio. Se cuantificaron los niveles de anticuerpos por medio de la prueba de ELISA, desde el inicio de la inmunización hasta el sacrificio, mostrando un aumento considerable de la relación positivo/muestra hacia *Haemophilus parasuis*.

En la prueba de IFD en pulmones sanos, se observó la ausencia de fluorescencia, mientras de un bronquio de pulmón de cerdo infectado con *Haemophilus parasuis* se observó fluorescencia en la luz del bronquio a un título de 1:90. Aún no se conoce de manera específica el lugar donde se establece *Haemophilus parasuis* ya que se observó fluorescencia en diversas zonas como son los epitelios del bronquio, alvéolos y otras zonas. Dado que los resultados de IFD para detectar *Haemophilus parasuis* en los tejidos infectados fueron satisfactorios, podemos establecer que la IFD puede ser útil como técnica de diagnóstico para la enfermedad de Glässer y esto es debido a las ventajas que representa. Cabe señalar que es necesario realizar una estandarización de este método para poder detectar el tejido donde principalmente se muestra la fluorescencia y así poder dar un diagnóstico más eficaz.

## 1.0 Introducción

La enfermedad de Glässer fue descrita en 1910 por K. Glässer, en Alemania como una inflamación fibrinosa de las articulaciones de cerdos jóvenes, en los tres primeros meses de vida, asociada a situaciones de estrés (traslados y cambios en el manejo).<sup>19,27,40,52</sup>

La enfermedad descrita, cuyo agente etiológico es *Haemophilus parasuis*, ha sido diagnosticada prácticamente en todo el mundo. La enfermedad esta diseminada ampliamente en las explotaciones porcinas y se complica cuando se asocia a otras enfermedades como El síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y otros.<sup>1, 5, 6, 19, 34, 38,</sup>

<sup>40, 52</sup>Se considera, en la actualidad, uno de los problemas emergentes porcinos de mayor interés económico y científico, asociado a explotaciones calificadas como "excelentes o de alta salud" desde el punto de vista sanitario, incluyendo explotaciones SPF (libres de patógenos específicos) o, simplemente, de alto estatus sanitario<sup>14</sup>. En este tipo de granjas la enfermedad aparece de forma fulminante, con muertes súbitas que, en ocasiones, adquieren niveles preocupantes. Algunos investigadores han sugerido que el cambio de presentación epidemiológica de la Enfermedad de Glässer, podría explicarse por el patrón de colonización de *Haemophilus parasuis* en cerdos jóvenes,

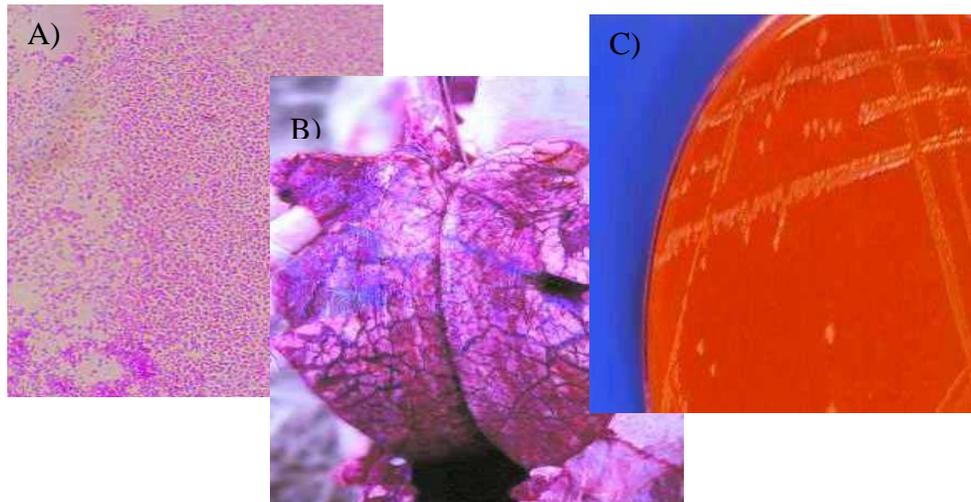
siendo este patrón modificado por las prácticas de manejo de segregación y el destete precoz <sup>18, 45</sup>

### **1.1 Agente etiológico**

*Haemophilus parasuis* es el agente causal de la enfermedad de Glässer o poliserositis infecciosa porcina, el cual es aislado frecuentemente de las secreciones nasales de cerdos aparentemente sanos,<sup>8,14,15</sup> una de las bacterias que colonizan tempranamente la mucosa respiratoria, en donde la mayoría de los cerdos se infectan por el microorganismo alrededor del día 10-14 de edad<sup>13</sup>. Posiblemente uno de los microorganismos que colonizan mas tempranamente la mucosa respiratoria de los cerdos es el *Streptococcus suis* <sup>16</sup>. En la actualidad se realizan estudios de hibridación de DNA para determinar si efectivamente este microorganismo pertenece a éste género o tiene que ser reubicado<sup>15</sup>, así mismo se sabe que hay 15 serotipos diferentes del microorganismo en donde un porcentaje importante de aislamientos que corresponden bioquímicamente a *Haemophilus parasuis* son no tipificables <sup>15</sup> indicando esto que posiblemente el número de serotipos sea mayor.<sup>7,19</sup>

## 1.2 Distribución en la naturaleza

Debido a que a lo largo de la historia se ha conceptualizado a *Haemophilus parasuis* como un microorganismo que actúa en forma secundaria, a su naturaleza heterogénea y a la dificultad para manejar las muestras clínicas y lograr el primo aislamiento, no se sabe a ciencia cierta si es un microorganismo ubicuo o no. Debido a los estudios realizados para diferenciar los serotipos existentes se sabe que está distribuido en E.U.A., Alemania, Brasil, Canadá y Australia, en donde los serotipos más comunes son el 5, 4, 13, 14, 2, 12,<sup>12, 16, 35, 52, 54</sup> tomando una importancia debido al porcentaje de aislamientos el serotipo 5 y 4. Los serotipos 1, 5, 10, 12, 13, 14 son asociados por lo general a casos agudos, capaces de producir la muerte del animal, mientras los serotipos 2, 4 y 15 desencadenan la forma crónica de la enfermedad.<sup>5, 6,15,27,40,47,48</sup> En México se han realizado estudios y aislamientos en donde desafortunadamente sólo se ha podido comprobar la presencia de *Haemophilus parasuis* en casos clínicos, mediante el aislamiento e identificación bioquímica, sin poder llegar a la serotipificación, motivo por el cual se conoce que los serotipos 2, 1, 4, 12 y 13 están presentes en la piara nacional.<sup>41,22,25,38,54,19</sup>



Cuadro. 1.1 A) Morfología microscópica de *Haemophilus parasuis* (tinción de gram). B) Enfermedad de Glässer forma respiratoria. Aspecto pulmonar C) Colonia de *Haemophilus parasuis* sobre agar PPLO.<sup>15</sup>

### 1.3 Mecanismos de virulencia

En el caso de los mecanismos de virulencia de la familia *Pasteurellaceae* se han realizado estudios muy profundos en algunos de sus miembros como el *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* y *P. haemolytica*, desafortunadamente y debido a que la enfermedad de Glässer era considerada como esporádica y asociada a problemas de stress, no se han realizado estudios para determinar los mecanismos de

virulencia del *Haemophilus parasuis*, aunado a esto la gran diversidad fenotípica, genotípica y la dificultad para realizar el aislamiento de dicha bacteria han complicado su estudio. <sup>26,48</sup>

#### **1.4 Epidemiología**

Como en el caso de algunos otros patógenos porcinos, el cerdo es el hospedador exclusivo de *Haemophilus parasuis*, de cuyas fosas nasales se recupera, en ocasiones sin relación con cuadro clínico alguno, hasta el punto de representar una de las especies bacterianas más prevalentes en el caso de lechones de una semana de edad, a los que, además, colonizan precozmente <sup>28,40</sup>

La enfermedad de Glässer ha sido considerada, una enfermedad esporádica asociada al estrés, característica de los animales jóvenes. El problema surge, sin embargo, en explotaciones de animales SPF o con altos estándares sanitarios, en donde la introducción de *Haemophilus parasuis* puede ser causa de un proceso generalizado, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, capaz de afectar a animales de cualquier edad y en cualquier fase de producción. <sup>5,6,15,11,19,52</sup>

El problema de la infección por *Haemophilus parasuis* es particularmente problemático sobre el aparato respiratorio, por la presencia de microorganismos en las fosas nasales, a las que coloniza, por lo general,

tiene lugar en animales protegidos inmunitariamente. En el caso del pulmón se comporta, habitualmente, como un invasor secundario, oportunista, que produce enfermedad asociado con otros agentes bacterianos, virales o coincidiendo con una falta de inmunidad protectora específica, lo que da lugar a lesiones pulmonares. Ocasionalmente se ha podido demostrar su condición de agente etiológico respiratorio primario, especialmente en casos de bronconeumonía fibrinosupurativa. En cualquier caso, parece claro que el tracto respiratorio actúa como puerta de entrada del microorganismo, desde el que en ocasiones se produce la infección sistemática generalizada y, por tanto, la enfermedad clínica. El potencial patógeno de *Haemophilus parasuis* constituye también un factor importante que condiciona la gravedad y progresión de la enfermedad sistémica<sup>28,40</sup>

### **1.5 Cuadro clínico y patológico**

Suele presentarse con un aumento súbito de fiebre, anorexia, inflamación articular, las lesiones son muy abundantes, con pleuritis, pericarditis, peritonitis fibrosa, broncopneumonía variable, líquido sinovial turbio y meningitis purulenta. En casos crónicos hay hipertrofia cardíaca, edema pulmonar, adherencias, la muerte se presenta de 2 a 3 días.<sup>15,40</sup> El cuadro clínico depende de la localización de las lesiones inflamatorias. Las lesiones macroscópicas primarias consisten en la

presencia de un exudado serofibrinoso o fibrinopurulento en las superficies mucosales <sup>1,21,37,41</sup>

### **1.6 Diagnóstico microbiológico.**

*Haemophilus parasuis* ha recibido a lo largo de los años diversas denominaciones. Las investigaciones de Biberstein, White (1969) y de Kilian (1976) justificaron el cambio de denominación a *Haemophilus parasuis*, al observar su independencia del factor X de coagulación de la sangre (hemina u otras porfirinas). La posición taxonómica dentro de la familia *Pasteurellaceae* es aún incierta, debido a la falta de homología a nivel del ADN con otras bacterias del género *Haemophilus*. <sup>40</sup>

Es una bacteria Gram negativa, son móviles, se comportan como aerobios, anaerobios facultativos que pueden ser encontrados en diferentes procesos inflamatorios. Microscópicamente, son pequeños bacilos o cocobacilos pleomórficos (incluso cadenas filamentosas), de longitud variable, desde 1 a 7  $\mu\text{m}$  de largo y 0.2 a 2  $\mu\text{m}$  de ancho, ubicada en la parte superior del tracto respiratorio de los cerdos, pueden diseminarse rápidamente rompiendo las barreras de la mucosa nasal causando una infección sistémica <sup>7,8,16,40,42</sup>. *Haemophilus parasuis* ataca las superficies lisas de los empalmes de las cubiertas del intestino, de los pulmones, del corazón y del cerebro, adhiriéndose a los epitelios

mediante adhesinas para evitar su eliminación y protegiéndose de la fagocitosis mediante la elaboración de exopolisacáridos.<sup>16,19, 40,41</sup>

## 1.7 Métodos diagnósticos

### Pruebas inmunes

Una de las dificultades para el correcto diagnóstico de *Haemophilus parasuis* es la carencia de métodos diagnósticos rápidos y sencillos, así como capaces de diferenciar los serotipos presentes, cuestión que es sumamente importante ya que se ha demostrado que pueden existir diferentes serotipos de la bacteria en una misma explotación y que como sabemos la protección de la mayoría de las bacterinas comerciales es serotipo específica y que algunos serotipos de las cepas de campo no producen una inmunidad adecuada para ofrecer una protección real, razón por la cual algunas bacterinas pueden no dar resultados satisfactorios.<sup>21,34</sup>

El diagnóstico generalmente, se basa en la historia clínica, síntomas, lesiones y otros datos epidemiológicos, la recuperación del microorganismo a partir de las lesiones macroscópicas o de distintos órganos (si la enfermedad adquiere carácter septicémico) proporciona cierta seguridad de que el aislamiento obtenido se relaciona con la enfermedad.<sup>1,15,19,34,35,45,48</sup>

### **1.7.1 Fijación del complemento**

Por otro lado conviene tener en cuenta que pocos laboratorios disponen de técnicas serológicas para la enfermedad de Glässer.

Se sabe que existe la prueba de fijación del complemento la cual se usa para identificar algunos de los serotipos de *Haemophilus parasuis*, desafortunadamente es una prueba compleja, que no diferencia a todos los serotipos existentes.

### **1.7.2 ELISA <sup>34</sup>**

La técnica de ELISA es el procedimiento mas usado en la actualidad, por su capacidad rutinaria de procesar grandes volúmenes de muestras, teniendo un alto grado de sensibilidad y especificidad, donde es posible determinar si los cerdos que van a ser introducidos a una granja presentan anticuerpos contra el *Haemophilus parasuis*, pero esta prueba solo esta disponible en muy pocos laboratorios de diagnóstico privados en E.U.A.

### **1.7.3 IHA <sup>1,40,42,31</sup>**

Recientemente se ha desarrollado una técnica nueva , más sensible y específica , para serotipar las cepas de *Haemophilus parasuis*. Se trata de la hemoaglutinación indirecta (IHA), que reduce significativamente el porcentaje de cepas que no pueden ser serotipadas por el método

tradicional de serotipaje: el test de precipitación en gel de agar (AGPT) utilizada para diferenciar los 15 serotipos

#### **1.7.4 Pruebas inmunohistoquímicas.** <sup>51</sup>

Aunque estas técnicas se pueden usar para identificar tanto antígenos como anticuerpos en suspensiones celulares o en cortes de tejidos, su aplicación más común está orientada a la detección de antígenos. Las técnicas inmunohistoquímicas se utilizan también para demostrar y localizar el depósito de complejos antígeno-anticuerpo en las lesiones de varios órganos que aparecen en muchas enfermedades.

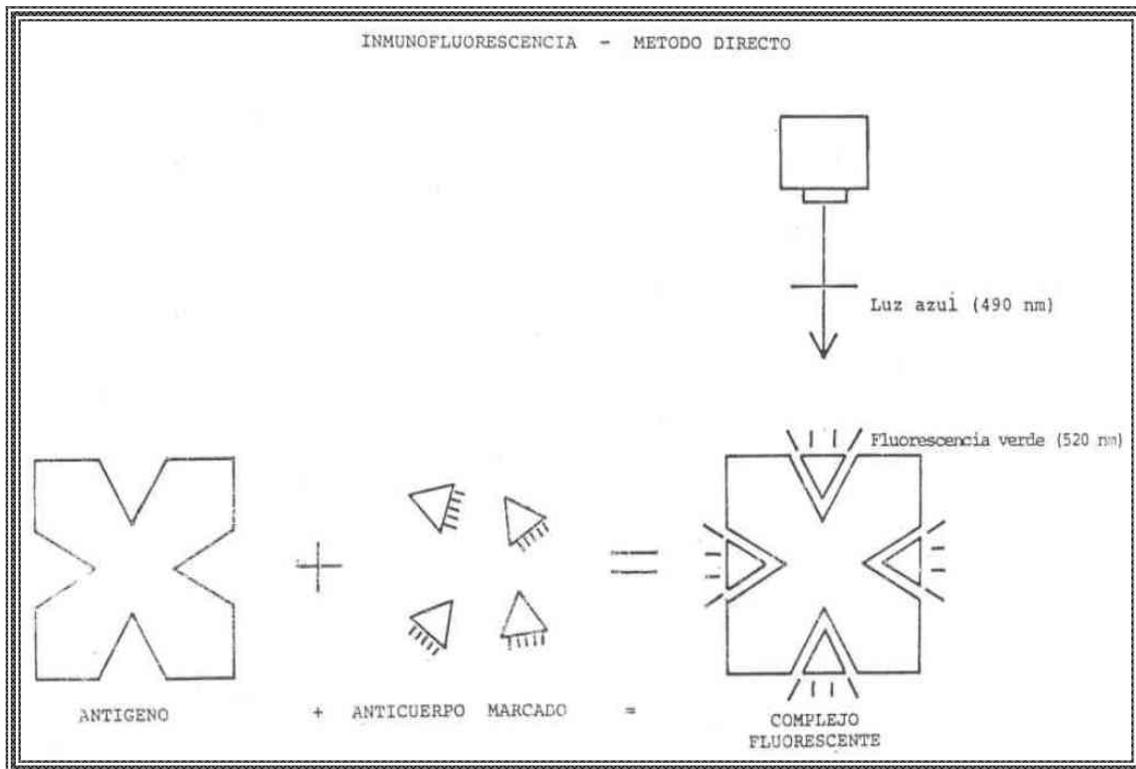
Reportes recientes indican la existencia de una prueba de inmunofluorescencia para detectar anticuerpos contra *Haemophilus parasuis*.

#### **1.7.5 Inmunofluorescencia** <sup>39,49,50,51,53</sup>

La técnica de inmunofluorescencia utiliza anticuerpos monoclonales para identificar células y/o tejidos según su capacidad de expresar determinadas moléculas o antígenos de superficie. Para ello, los anticuerpos específicos están marcados con una molécula fluorescente (fluoresceína) para revelar la presencia del correspondiente antígeno en una célula o en un corte de tejido a estudiar. La inmunofluorescencia puede ser directa, cuando la fluoresceína se une directamente al anticuerpo específico, mientras que la indirecta utiliza un anticuerpo

anti-inmunoglobulina marcado con la fluoresceína para detectar el anticuerpo específico (no marcado) unido a la célula o tejido.

Figura. 1 Inmunofluorescencia Método directo <sup>13</sup>



### 1.7.6 Inmunoglobulinas <sup>9,56,58</sup>

Las inmunoglobulinas (Ig's) son elementos básicos de la respuesta inmunitaria humoral de los organismos vertebrados. Estas glicoproteínas se encuentran en el suero y tejidos tisulares, son producidas por linfocitos B estimulados (células plasmáticas) como respuesta a la presencia de un agente extraño específico, pueden subdividirse en

clases debido a las diferencias en su estructura. Inmunoglobulina G IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. <sup>56</sup> Por lo tanto las inmunoglobulinas son un componente importante dentro de los mecanismos de defensa contra las enfermedades de origen infeccioso que presentan los animales. En los cerdos, las etapas de mayor susceptibilidad a las infecciones son las inmediatas posteriores al nacimiento y el periodo de destete. <sup>9,58</sup>

### **1.7.7 Métodos desarrollados para el aislamiento de las inmunoglobulinas.**

Para efectuar estudios químicos y fisicoquímicos en inmunoglobulinas y anticuerpos, deben de aislarse y purificarse adecuadas cantidades de estos materiales. Las inmunoglobulinas son proteínas plasmáticas altamente heterogéneas en lo que se refiere a estructura, tamaño, carga y actividad biológica. Los métodos desarrollados para el aislamiento de las inmunoglobulinas de las proteínas plasmáticas y de entre ellas mismas, se basan en el uso de su naturaleza básica, en sus diferentes solubilidades en varios solventes y en sus relativamente altos puntos isoeléctricos (IgG: pI=5.8-7.3)

El uso de solamente una de cualquiera de estas técnicas no da una preparación pura de la Inmunoglobulina y en general se utilizan una combinación de técnicas.

## **Precipitación de inmunoglobulinas**

Las técnicas de precipitación fraccionada usando sulfato sódico o amónico se utilizan comúnmente para efectuar concentraciones de inmunoglobulinas crudas en el suero. Una posterior purificación de las inmunoglobulinas puede realizarse utilizando otras técnicas tales como cromatografía, filtración en gel, electroforésis o ultracentrifugación en gradiente. <sup>1,9,32,56</sup>

## **Electroforesis**

El método conocido como electroforésis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS o SDS- PAGE, permite, por comparación con sustancias de peso molecular conocido que han sido recorridas simultáneamente, determinar el peso molecular relativo de los productos en análisis. Se utiliza en forma rutinaria con tal finalidad y para ello son necesarias ínfimas cantidades de muestra. <sup>17,32,39</sup>

## **Cromatografía de afinidad**

Los métodos cromatográficos tienen la ventaja de ser altamente específicos y las condiciones de operación se pueden ajustar para evitar la disminución de la actividad biológica y para lograr el aislamiento en el menor número de pasos posible. Uno de los métodos cromatográficos

utilizados para la purificación de inmunoglobulinas es la cromatografía de afinidad.<sup>58</sup>

La cromatografía de afinidad permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando. Se utiliza para purificar anticuerpos a partir de sobrenadantes de cultivos o líquidos naturales, como el suero, fijando primero el antígeno o alguna proteína con afinidad específica por la Fc de la Ig, y posteriormente pasar el sobrenadante o el suero por la columna.<sup>1</sup>

### **Cuantificación de proteínas**

En la purificación de proteínas a menudo se requieren métodos rápidos y sensibles para la cuantificación de proteínas, el método de Bradford es uno de los métodos con mayor sensibilidad para la determinación de proteínas. Es un método de determinación de proteínas que implica la unión de Azul Brillante de Comassie G-250 con las proteínas, esta unión provoca un cambio en su máximo de absorbancia que es el que se mide en el espectrofotómetro y que es proporcional a la cantidad de proteína.<sup>36</sup>

## **Diálisis.**

La diálisis es un procedimiento que separa las proteínas del solvente valiéndose del gran tamaño que presentan estas proteínas frente a las moléculas de sales y del solvente .

De esta forma la diálisis retiene las proteínas de gran tamaño en el interior de membrana, mientras que permite que la concentración de otros solutos que se encuentran en la preparación proteica se modifique hasta alcanzar una situación de equilibrio con la solución que se encuentra fuera de la membrana. <sup>2,58,46</sup>

## 1.8 Justificación

La industria porcícola se enfrenta hoy en día a enfermedades respiratorias en granjas de alta salud, el desarrollo de estrategias para reducir el impacto económico es y ha sido una prioridad para la industria porcina durante largo tiempo.<sup>34</sup>

El diagnóstico definitivo de las enfermedades respiratorias del cerdo permiten utilizar y/o elaborar los biológicos / reactivos adecuados para el diagnóstico, así como los biológicos para la inmunización de los animales susceptibles.<sup>34</sup>

Una de las dificultades para el correcto diagnóstico de *Haemophilus parasuis*, es la carencia de métodos rápidos y sencillos, capaces de diferenciar los serotipos presentes en una misma explotación porcina.

Reportes recientes indican la existencia de una prueba de inmunofluorescencia para detectar anticuerpos contra *Haemophilus parasuis*. Desafortunadamente estas técnicas aún no están disponibles en el país, por lo que es necesario realizar proyectos que lleven al desarrollo de pruebas de diagnóstico accesibles y poder diferenciar los serotipos existentes en el país.<sup>53</sup>

## **1.9 Hipótesis**

Si se obtiene un conjugado específico de anticuerpos anti *Haemophilus parasuis* unido a FITC, en muestras positivas conocidas y se detecta fluorescencia , entonces la técnica de inmunofluorescencia puede ser utilizada como prueba de diagnóstico rápido para la enfermedad de Glässer.

## **OBJETIVOS**

### **2.0 Objetivo general :**

Preparar un conjugado de Anticuerpos anti *Haemophilus parasuis* con un fluorocromo (FITC) para el diagnóstico por inmunofluorescencia de la enfermedad de Glässer.

### **2.1 Objetivos particulares:**

1. Inmunizar a un cerdo con base en un calendario de inmunización.<sup>4,10</sup>
2. Obtener la fracción gammaglobulina del suero por medio de precipitación con sulfato de amonio saturado.

3. Llevar a cabo una cuantificación de proteínas por el método de Bradford.<sup>36</sup>
4. Realizar una electroforesis con SDS-PAGE para identificar las inmunoglobulinas presentes en el suero.
5. Determinar el nivel anticuerpos a partir de la técnica de ELISA.
6. Realizar una cromatografía de afinidad para la separación y purificación de globulinas conjugadas.
7. Determinar por medio de la prueba de inmunofluorescencia directa el título del mismo.

### **3.0 Material y Métodos**

#### **3.1 Cepa de referencia: *Haemophilus parasuis* ( Suvaxyn RespiFend HPS)**

#### **3.2 Esquema de vacunación:** <sup>10,36,12</sup>

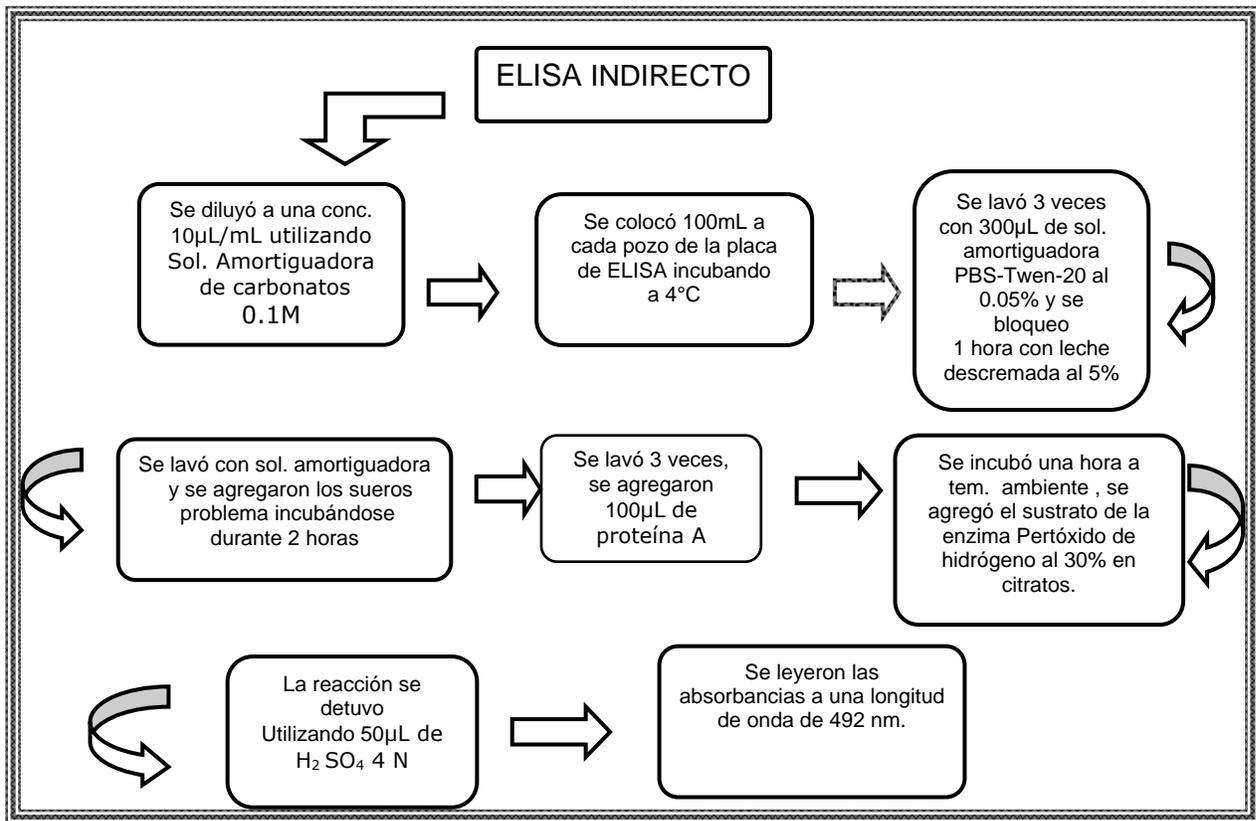
Se utilizó un cerdo de 21 días de edad que fue inoculado intratraquealmente con 2 mL de una bacterina comercial una vez a la semana, el tratamiento se llevó a cabo durante dos meses, aumentando la dosis conforme iba transcurriendo el tiempo. A partir de la primera inoculación se realizó la toma del suero para determinar el título de anticuerpos presentes en el cerdo, las tomas se fueron realizando una vez por semana para determinar el comportamiento del título de anticuerpos.

#### **3.3 Prueba de ELISA** <sup>52,53,57</sup>

La técnica de ELISA es una prueba inmunoenzimática que forma parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados para poder visualizar una reacción antígeno-anticuerpo. La técnica utilizada en este estudio fue un ELISA indirecto, básicamente consiste en la

inmovilización a un soporte sólido del antígeno contra el cual queremos detectar anticuerpos específicos.

Cuadro 3.1.- Diagrama de Flujo. Técnica de ELISA



### 3.4 Preparación del conjugado FITC-Ab. <sup>5,17,18</sup>

1. Se adicionaron 100 mL de antisuero en un vaso de precipitado en baño de hielo con agitación constante. Se vertió gota a gota 50 mL ( ½ del volumen del suero) de una solución de sulfato de amonio saturado agitándolo lentamente.

2. Las globulinas precipitadas se guardaron a 4°C por un mínimo de 30 min. Posteriormente se sedimentaron las globulinas por centrifugación a 6 000 xg por 30 min. en una centrífuga refrigerada. Se decantó y se descartó el sobrenadante.
3. Se disolvió el precipitado de globulina con agua destilada ajustándolo a un pH de 7.5 por adición de 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> usando un volumen igual al volumen original del suero, el precipitado se disolvió con ayuda de una barra de cristal, se agitó lentamente con un agitador magnético.
4. Por segunda vez se precipitaron las globulinas agregando gota a gota 50 mL (1/2 de volumen original del suero) de solución del sulfato de amonio .
5. Se sedimentó la globulina precipitada por centrifugación a 6000 Xg. y nuevamente se decantó y descarto el sobrenadante.
6. Se disolvió la globulina precipitada por adición de un volumen de agua destilada a un pH de 7.5 igual al volumen original (100 mL)

7. Por tercera vez se precipitó la globulina agregando gota a gota 50 mL (1/2 del volumen original del suero) de sulfato de amonio saturado .
8. Se sedimentó la globulina precipitada por centrifugación a 6000 Xg se decantó y se descartó el sobrenadante .
9. Se disolvió la globulina precipitada por adición de 50 mL (1/2 del volumen original) del suero de agua destilada ajustando a un pH de 7.5
10. Se colocó la solución de globulinas en una membrana semipermeable de celulosa y se dializó a 4°C, contra solución salina fisiológica a un ratio de una parte de globulina por 800 partes de SSF.
11. Se dializó contra cambios repetidos de SSF hasta una prueba negativa para el ion sulfato que fue obtenido después de toda la noche en diálisis. Se le agregó unos cuantos mL de una solución saturada de  $\text{BaCl}_2$  en un volumen igual al dializado. La formación de un precipitado indicaba la presencia de iones sulfato.

12. Se removió la globulina del tubo de diálisis y se clarificó por centrifugación por 30 min. a 2000 xg en una centrífuga refrigerada.
13. Se determinó el contenido de proteínas usando el método de Bradford.<sup>36</sup>
14. Se determinó la cantidad de Isotiocianato de fluoresceína (FITC) requerida para marcar la globulina. Se uso 0.05 mg de FITC/mg de globulina.<sup>19, 32, 39</sup>
15. Se pesó la cantidad requerida de FITC, se disolvió en un volumen de Buffer de carbono - bicarbonato preparado recientemente , pH 9.5, igual 10% del volumen total del % de solución de globulina .
16. Se adicionó la solución de Buffer carbonato- bicarbonato de FITC gota a gota a la solución de globulina fría. Se agitó lentamente en un agitador magnético a 4°C toda la noche.
17. Se decantó el conjugado, se colocó en un tubo de diálisis y se dializó contra PBS pH 7.2 en una relación de una parte de

conjugado por 800 partes de PBS. Se cambió el dializado y se reemplazó el frasco con PBS diariamente .

18. Se continuó la diálisis hasta que no hubo evidencia de fluorescencia en el dializado, por medio de una lámpara de Wood´s de luz U.V.

### **3.5 Modificación a la técnica.**

Se trabajó con el Sulfato de amonio saturado al 60% al adicionarla a la globulina reconstituida, del mismo modo, se adicionó en una proporción igual a la muestra de suero.

Se reconstituyó con PBS pH 7.2 en un volumen igual al del suero original. <sup>3,32</sup>

### **3.6 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford <sup>36</sup>**

El ensayo es muy reproducible y rápido, con la tinción el proceso es completado en aproximadamente dos minutos con una estabilidad por una hora manteniendo un buen color.

#### **1. Preparación de Proteínas**

Una vez obtenida la precipitación con sulfato de amonio. Se realizó una dilución 1:10 para su cuantificación.

#### **2. Preparación de reactivo de proteína**

Azul Brillante Comassie (100 mg) se disolvió en 50 mL de Etanol al 95%. Una vez disuelto se adicionó 100 mL al 85% (w/v) de ácido fosfórico. La solución obtenida fue diluida a un volumen total de 1000 mL.

La concentración final en el reactivo fue de 0.01 % (w/v) de Azul Brillante de Comassie, 4.7 % (w/v) de etanol y 8.5 % (w/v ) de ácido fosfórico.

Se preparó la Albúmina Sérica Bovina 100mL al 0.1 % que se utilizó como solución stok para preparar la curva patrón.

### **3. Determinación de la concentración de proteína.**

Se adicionó a los diferentes tubos 1 mL de buffer, se agregó 5 mL del reactivo de proteínas en los tubos y cada tubo se fue mezclando por inversión. Se midió la absorbancia a 595 nm después de dos minutos y antes de una hora, en cubetas de 3mL .

El peso de la proteína fue trazado contra la absorbancia correspondiente en una curva estándar. <sup>44</sup> En el siguiente cuadro se muestra el volumen necesario de las diferentes soluciones a preparar y el número de tubos necesario que se requieren para realizar la cuantificación de proteínas .

Cuadro 3.2 Curva patrón requerida para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Tubos		1	2	3	4	5	6 mta.
Solución stok	--	0.2 mL 200 µL	0.4 mL 400 µL	0.6 mL 600 µL	0.8 mL 800 µL	1 mL 1000 µL	
H <sub>2</sub> O Destilada	1 mL 1000 µL	0.8 mL 800 µL	0.6 mL 600 µL	0.4 mL 400 µL	0.2 mL 200 µL	---	1 mL 1000 µL
Reactivo de Bradford	5mL	5mL	5mL	5mL	5mL	5mL	5 mL

### 3.7 Electroforesis <sup>11,17,29,33,43</sup>

La electroforesis es una técnica muy valiosa para exhibir la diversidad de tipos de proteínas presentes en una mezcla. La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), es uno de los mejores procedimientos de fraccionamiento desarrollados.

Cuadro 3.3 En este cuadro se muestra el orden en el que se adicionó cada una de las soluciones para hacer un gel siguiendo los pasos que se mencionan a continuación:

	Gel tapon	Gel separador ( 7.5% ) adicionar alcohol isopropílico	Gel concentrador
Agua destilada	-----	4.85 mL	6.1 mL
Tris HCl Ph 8.8	1 mL	2.5 mL	-----
Tris HCl Ph 6.8	-----	-----	2.5 ml
SDS 10 % p / v	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Bis / acrilamida 30 %	2 mL	2.5 $\mu$ L	1.3 mL
Persulfato de amonio 10 %	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L ( 0.05 %)	50 $\mu$ L ( 0. 05 %)
Temed	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L ( 0.05%)	5 $\mu$ L (0.1 %)

- 1) Una vez preparada la mezcla del gel tapón se vertió rápidamente a la cámara de electroforesis , se colocó y se esperó a que gelificara.
- 2) Posteriormente se colocó el gel separador, se adicionó 1 mL de isopropanol sobre la superficie, cuando la gelificación se llevó acabo se observó una interfase muy definida entre el isopropanol y el gel, se enjuagó con agua destilada y se secó .
- 3) Se adicionó la mezcla del gel concentrador, se colocó el peine, el cual se retiró cuando el gel polimerizó, quedando de esta forma los pozos bien definidos.

### Preparación y corrimiento de las muestras.

- 1) Se colocó el volumen suficiente que contenía un mínimo de 20 ug de proteína en tubos Ependorff bien etiquetados.
- 2) Se adicionó un buffer de muestra ( Glicerol, SDS, Azul de bromofenol) realizando una dilución 1:4 , se mezcló y se hirvió durante 5 min.
- 3) Posteriormente con ayuda de puntas de 20  $\mu$ L, se colocó la muestra en los carriles del gel concentrador.
- 4) Junto con las muestras problema, se colocó en un carril una muestra (gamma globulinas), con el fin de tomarla como referencia.
- 5) Se corrió con una fuente de poder a 100 volts, hasta que el colorante quedara al final del gel separador.

### Tinción del gel con azul de comassie<sup>17</sup>

- 1) Se colocó el gel en un recipiente con la solución colorante (Azul de Comassie-Agua) durante un periodo de 2-3 horas, con agitación lenta, a temperatura ambiente.
- 2) Transcurrido el tiempo se sacó el gel y se colocó en una solución desteñidora I (MeOH, HOAc )durante dos horas.
- 3) Posteriormente se transfirió a la solución decolorante II (MeOH, HOAc)hasta que las bandas se observaron.

## Tinción de geles con nitrato de plata . <sup>17</sup>

- 1) Después de la electroforésis se colocaron los geles en sol. fijadora con leve agitación 20 min.
- 2) Se enjuagaron los geles en 400 mL de H<sub>2</sub>O desionizada 10 min. con leve agitación.
- 3) Se decantó el agua y se reemplazó con H<sub>2</sub>O desionizada para enjuagar con 800 mL por 40 min.
- 4) La tinción y revelación se realizó en 20 min.

Se preparó la sol. teñidora 5 min. antes de usarse de la siguiente manera:

- 17.5 mL de agua desionizada
  - 25 mL de sol. de plata (silver complex sol. )
  - 2.5 mL de sol. moderador de reducción
  - 2.5 mL de reactivo desarrollador de imagen (image development reagent)
- 5) Antes de usar el preparado se añadió rápidamente 25mL de sol. aceleradora (development acelerador solución ) se adicionó al recipiente de tinción y se tiño con leve agitación durante 20 min.
  - 6) Después de haber obtenido la tinción deseada se colocaron los geles en Ac. Acético al 5% para así detener la reacción en

aproximadamente 15 min. Una vez transcurrido este tiempo, se lavó con agua desionizada por 5 min.

### **3.8 Cromatografía de afinidad**

#### **(Hi Trap rProtein A FF) <sup>20</sup>**

El aislamiento de Inmunoglobulinas específicas de un antígeno determinado se lleva a cabo mediante cromatografía de afinidad; La cromatografía de afinidad es la técnica de elección cuando se pretende aislar un anticuerpo o un antígeno en estado puro. <sup>30</sup>

#### *Purificación*

- 1) Se adicionaron 60  $\mu$ L 1M de Tris- HCl pH 9.0 por cada mL de fracción recolectada.
- 2) Se llenó la jeringa con el buffer de inicio, se removi6 y se conect6 la columna con la jeringa, se adicion6 gota a gota evitando introducir aire a la columna.
- 3) Se lav6 con un m6nimo de 5 vol6menes la columna con agua destilada o con buffer de un6n
- 4) Se regener6 la columna con 5 vol6menes de buffer de elusi6n
- 5) Se equilibr6 la columna con 5 vol6menes con buffer de un6n.
- 6) Posteriormente se aplic6 la muestra usando la jeringa.
- 7) Se lav6 con 5 vol6menes de buffer de un6n.
- 8) Se eluy6 con 5 vol6menes de buffer de elusi6n .

### **3.9 Cortes histológicos en congelación** <sup>13</sup>

- 1) Los cortes de tejido que se realizaron, se colocaron en una base y se adicionó Gel Tissue -Tek, se colocó en una mesa, llevándose a congelación aproximadamente 10 -15 min.
- 2) Los cortes se depositaron en el criostato durante 5-10 min. para que se ambientara la muestra, se realizaron los cortes y se tomaron en un portaobjetos, se fijaron con acetona a -20° C durante 10 min. y se dejaron secar al aire libre.

#### **3.9.1 Tinción de muestras** <sup>13</sup>

- 1) Se colocó una gota del conjugado sobre el tejido preparado cuidando que cubriera todo el preparado, se incubó a 37°C, 45 min. en una cámara húmeda (algodón con agua desionizada)
- 2) Se lavó tres veces con PBS, cambiando el PBS en forma continua y un lavado con agua destilada, se esperó a que se secaran y se montaron las muestras con glicerina amortiguada 50% 1:1 en PBS y se colocó un cubre objetos cuidando no hacer burbujas.
- 3) Se observó al microscopio de fluorescencia, se adicionaron unas gotas de sol. de glicerina amortiguada por debajo del portaobjetos.

4) Una vez que se determinó el título del conjugado en las muestras de tejidos, se continuo trabajando con las muestras. Esta vez el objetivo era observar las diversas características que se manifestaron en los tejidos de pulmón al llevarse acabo la reacción positiva contra *Haemophilus parasuis*.

## **4.0 Resultados**

### **4.1 Obtención y purificación del suero**

Los animales fueron sacrificados para obtener toda la sangre, se obtuvo un volumen aproximado de 750 mL de suero, al término de esto se realizó la purificación con sulfato de amonio al 60 % y se concentró por diálisis obteniéndose un volumen aproximado de 12.7 mL.

### **4.2 Cuantificación de proteínas**

En el cuadro 4.1 observamos la cuantificación de proteínas, esta medición se realizó a 595 nm después de dos minutos y antes de una hora, como lo determina la técnica por el método de Bradford, se realizaron las pruebas por triplicado obteniéndose un promedio de las absorbancias para la realización de la curva. El peso de la proteína fue trazado contra la absorbancia correspondiente en una curva patrón, fig.2<sup>36</sup>

Cuadro 4.1 Cuantificación de proteínas

Tubos	1	2	3	4	5	<i>H. parasuis</i> dilución 1:10
Lecturas (Abs.) $\lambda$ 595 nm	0.1681	0.4173	0.5815	0.6486	0.8703	0.7714
	0.2248	0.4154	0.5042	0.6783	0.9397	0.7387
	0.2333	0.3954	0.5476	0.6599	0.8139	0.7775
Promedio de las lecturas	0.2087	0.4093	0.5444	0.6622	0.8746	0.7625
mg de proteínas						0.088 mg
Dilución 1: 10 ml						0.88 mg/mL

Al realizar nuestra curva patrón , se pudo determinar la concentración de proteínas, dentro de esta cuantificación de proteínas, se realizó una dilución a la muestra debido a que los valores que se obtenían en las lecturas eran mayores a las establecidas en la curva patrón, motivo por el cual, se realizaron una serie de diluciones, encontrándose que la dilución ideal correspondía a la dilución 1/10. (fig. 2)

## Quantificación de proteínas

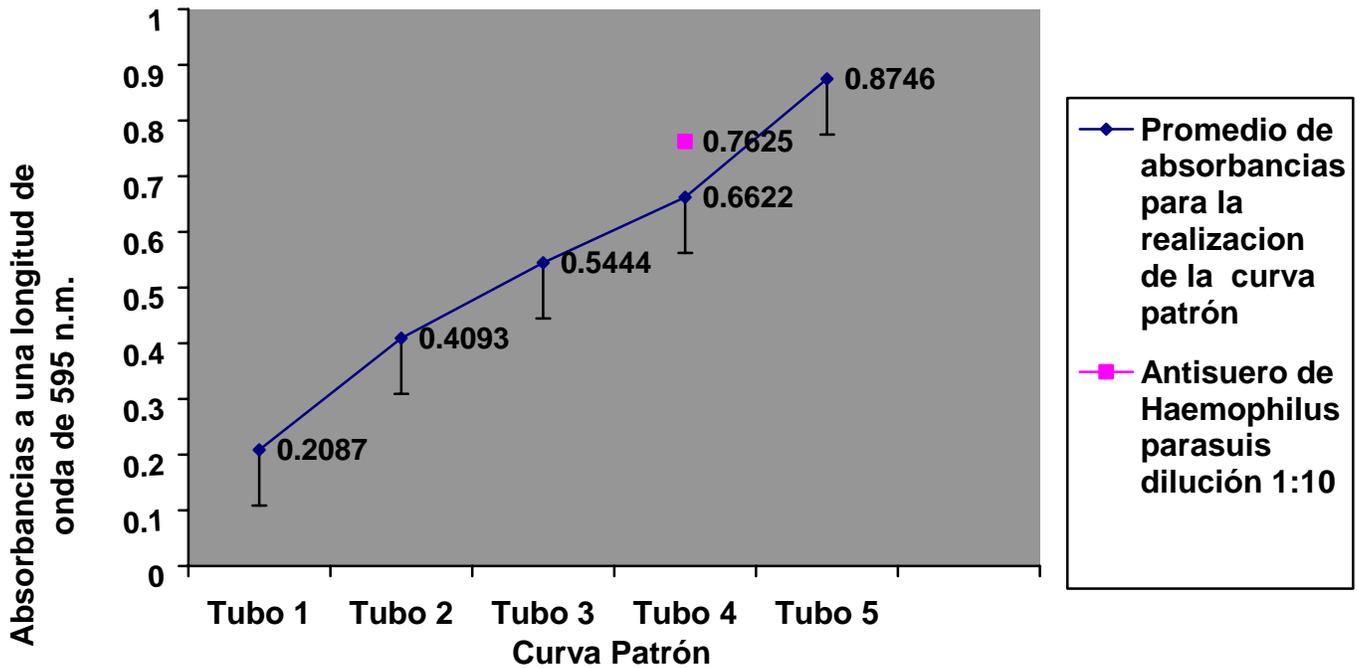


Fig.2 Muestra la concentración de las proteínas obtenidas en la curva patrón, determinándose una concentración de 0.88 mg/mL de proteínas, con un nivel de correlación ( $r = 0.99$ )

En la siguiente figura se visualizan las inmunoglobulinas en suero a partir de una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, observándose en la primera columna el marcador que se utilizó como referencia (gammaglobulina). Del el carril numero 2 al 6 corresponden a las muestras que se tomaron al realizar la precipitación en sus diferentes ciclos, el carril numero 2 y 3 pertenecen al sobrenadante y reconstituido del primer ciclo, el carril 4 y 5 corresponden al segundo

ciclo y el carril numero seis corresponde a la muestra original de *Haemophilus parasuis*.

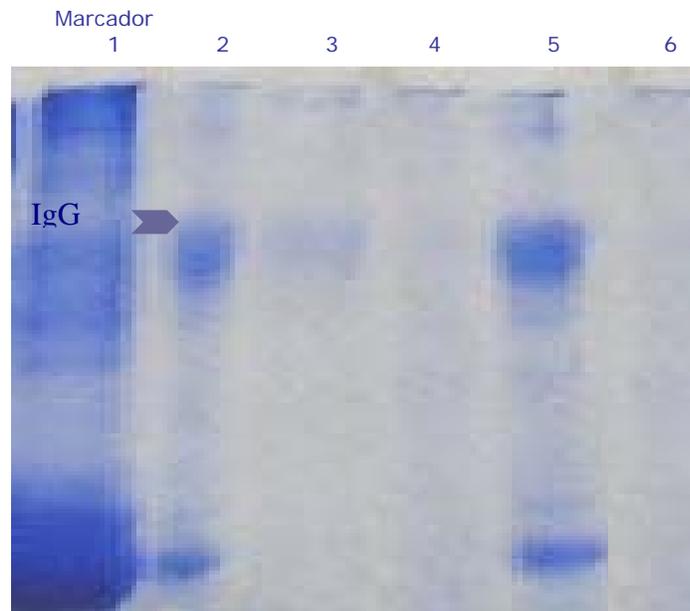


Fig. 3 Determinación de la Inmunoglobulina IgG, acompañada de otras inmunoglobulinas de acuerdo al marcador que se utilizó de referencia.

#### 4.3 Detección de anticuerpos contra *Haemophilus parasuis*

Para la determinación de los anticuerpos contra *Haemophilus parasuis*, se realizaron las tomas de suero una vez a la semana, esperando observarse un aumento en los títulos conforme al calendario de vacunación .

Desde el inicio de la inmunización hasta el sacrificio se determinaron los niveles de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA indirecta,

mostrando un aumento considerable, dando positivo para *Haemophilus parasuis* (cuadro 4.2).

Cuadro 4.2 Resultados de niveles de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA

	IDENTIFICACION	VALOR en % de los anticuerpos	RESULTADO
Basal	<i>Haemophilus parasuis</i>	21.29	Basal
1 <sup>a</sup> . Semana	<i>Haemophilus parasuis</i>	22.90	Sospechoso
2 <sup>a</sup> . Semana	<i>Haemophilus parasuis</i>	36.67	Positivo
3 <sup>a</sup> . Semana	<i>Haemophilus parasuis</i>	39.71	Positivo

INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA		
< 20 %	20 – 30 %	> 30 %
Negativo	Sospechoso	Positivo

#### **4.4 Purificación de las inmunoglobulinas en cromatografía de afinidad**

Al analizar los resultados se determinó pasar una fracción de la muestra por una columna de afinidad y la otra fracción quedaría intacta, para su posterior conjugación con la fluoresceína.

#### **4.5 Cromatografía de afinidad**

**(Hi Trap rProtein A FF) <sup>20</sup>**

Una vez determinada la cantidad de suero que se haría pasar por la columna se llevó a cabo el procedimiento establecido en la técnica de cromatografía por columna. El volumen que se determinó para trabajar fue de 3 mL de suero, es decir, trabajar con una cantidad considerable de acuerdo a las dimensiones de la columna. Al hacer pasar la muestra en la columna con una serie de soluciones permitiría separar de manera más específica las inmunoglobulinas como se observa en el cuadro 4.3

Cuadro 4.3 Volumen requerido para cada una de las soluciones necesarias para separar las inmunoglobulinas.

Volumen de la muestra	Buffer de unión (fosfatos de sodio pH 7 )	Buffer de elusión (citrato de sodio pH 3-6)	Volumen total
3 mL	6 mL	9 mL (a partir de los 3 mL, se toma en cada tubo 10 gotas de solución)	12 mL

Al separarse las inmunoglobulinas se tomaron una serie de muestras que se fueron leyendo en un espectrofotómetro.

Las lecturas mostraron diferentes valores, es decir, no mostraban un comportamiento definido (cuadro 4.4), por lo cual se decide juntar las muestras y pasarlas de nuevo en la columna. (cuadro 4.5)

Cuadro 4.4 A partir de la separación de la inmunoglobulinas, se obtuvieron resultados sin ningún orden, como se muestra a continuación.

Muestras	volumen	Lecturas (absorbancia ) Longitud de onda 280 nm luz U.V
1	10 gotas	0.2350
2	10 gotas	0.0459
3	10 gotas	0.1679
4	10 gotas	0.0343
5	10 gotas	0.0562
6	10 gotas	0.0392
7	10 gotas	0.0579
8	10 gotas	0.0407
9	10 gotas	0.0598

Las lecturas que se obtuvieron en el cuadro 4.5 muestran el mismo comportamiento que las lecturas anteriores. Es importante hacer notar, que el volumen que se recolectó en este siguiente ciclo fue mayor. <sup>32</sup>

Cuadro 4.5 Lecturas obtenidas después de haber pasado la muestra por la columna.

Muestras	volumen	Lecturas (absorbancia ) Longitud de onda 280 nm luz U.V
1	3mL	0.236
2	1mL	0.133
3	1mL	0.148
4	1mL	0.058
5	1mL	0.613
6	1mL	0.238

Una vez obtenido los resultados de las tablas anteriores, se buscaron alternativas que permitieran obtener mejores resultados, como aumentar el volumen del buffer de elusión <sup>9</sup>

(Cuadro 4.6). Nuevamente se toman las lecturas, pero a diferencia de las lecturas anteriores, estas lecturas se realizaron del tubo más concentrado al menos concentrado y así disminuir algún error que se pudiera estar cometiendo al pasar las muestra en las cubetas para la medición en el espectrofotómetro. Los ciclos consistían en pasar la muestras varias veces , con el fin de obtener inmunoglobulinas más específicas. (cuadro 4.7)

Cuadro 4.6 Se muestran los diferentes volúmenes con los que se modificó la técnica. <sup>9</sup>

Volumen de la muestra de <i>Haemophilus parasuis</i>	Buffer de unión (fosfatos)	Buffer de elusión (citratos)	Volumen total
3 mL	6 mL	12 mL	15 mL

Cuadro 4.7 Valores de absorbancias que corresponden al tubo mas concentrado al menos concentrado.

1er. ciclo		Lecturas (absorbancia ) Longitud de onda 280 nm Luz U.V
Tubos	Volumen	
6	2 mL	0.0339
5	2 mL	0.0284
4	2 mL	0.0056
3	2 mL	0.0234
2	2 mL	0.0967
1	2 mL	0.1867
muestra	3 mL	0.6475

Los resultados que se observaron en este ciclo volvieron a desalinearse, mostrando un desorden con respecto al cuadro anterior .

En los diferentes ciclos observamos una variación de las lecturas, se determinó realizar otra serie de ciclos que permitieran observar los posibles factores que estuvieran interviniendo en las lecturas.

Una vez efectuado el ciclo de esta segunda etapa, volvemos a encontrar diferentes valores en las lecturas (cuadro 4.8), una de las posibles razones de este comportamiento, fue, a la cantidad de inmunoglobulinas que al parecer iban disminuyendo y esto pudo deberse a que estas inmunoglobulinas se estuvieran desnaturalizando debido a el tiempo de manipulación. <sup>39</sup>

Cuadro 4.8 Valores correspondientes a la segunda etapa.

2° Ciclo		Lecturas (absorbancia ) Longitud de onda 280 nm Luz U.V.
Tubos	Volumen	
6	2 mL	0.1754
5	2 mL	-0.0012
4	2 mL	0.0462

3	2 mL	-0.0026
2	2 mL	0.0681
1	2 mL	0.0282
muestra	3 mL	0.6925

Al llevar acabo esta serie de ciclos y al analizar las lecturas, parecería que los tubos que debían de tener una lectura cercana a cero (tubo 1,2)son las que presentaron una mayor concentración. Motivo por el cual se decidió correr las muestras que tuvieran las lecturas mas altas por cada ciclo tratando de encontrar congruencia entre ellas, quedando de la siguiente manera.

En el cuadro 4.9 se muestran los diferentes resultados que se obtuvieron al realizarse las lecturas a aquellas muestras que habían obtenido valores altos en los ciclos anteriores, junto con la muestra correspondiente de cada ciclo.

Cuadro 4.9

Ciclo	Tubo	Lectura (Absorbancia) 280 nm. Luz U.V
1er ciclo	Tubo 1	0.1867
1er ciclo	muestra	0.6475
2° ciclo	Tubo 6	0.1745

2° ciclo	muestra	0.3740
3er ciclo	Tubo 1	0.2040
3er ciclo	muestra	0.4145
4° ciclo	Tubo 2	0.1724
4° ciclo	muestra	0.6132
5° ciclo	Tubo 6	0.1754
5° ciclo	muestra	0.6925
6° ciclo	Tubo 2	0.1524
6° ciclo	muestra	0.7518
7° ciclo	Tubo 5	0.2585
7° ciclo	muestra	1.1364

Los resultados de las absorbancias, mostraron diferencias por cada ciclo y solo se encontró similitud en el 1er ciclo, 4° ciclo y 5° ciclo . Por tal motivo se realizó una prueba confirmativa para determinar la presencia de las inmunoglobulinas en estudio, esta prueba confirmativa consistió en realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida con Nitrato de plata.

En la electroforesis con nitrato de plata se observa la presencia del marcador gammaglobulina (carril 1) que se utilizó como referencia para la determinación de la presencia de la Ig G, en los siguientes carriles se observa una serie de muestras que fueron recolectadas en los diferentes ciclos que se llevaron a cabo en la cromatografía de columna . Es importante destacar la presencia de las inmunoglobulinas en estudio de manera muy tenue en los diferentes carriles a excepción del carril

numero 4 y carril numero 8 donde se observa con mayor visibilidad. De igual manera se observa la presencia en los diferentes carriles de otras bandas que no pertenece a la inmunoglobulina G.<sup>32</sup>

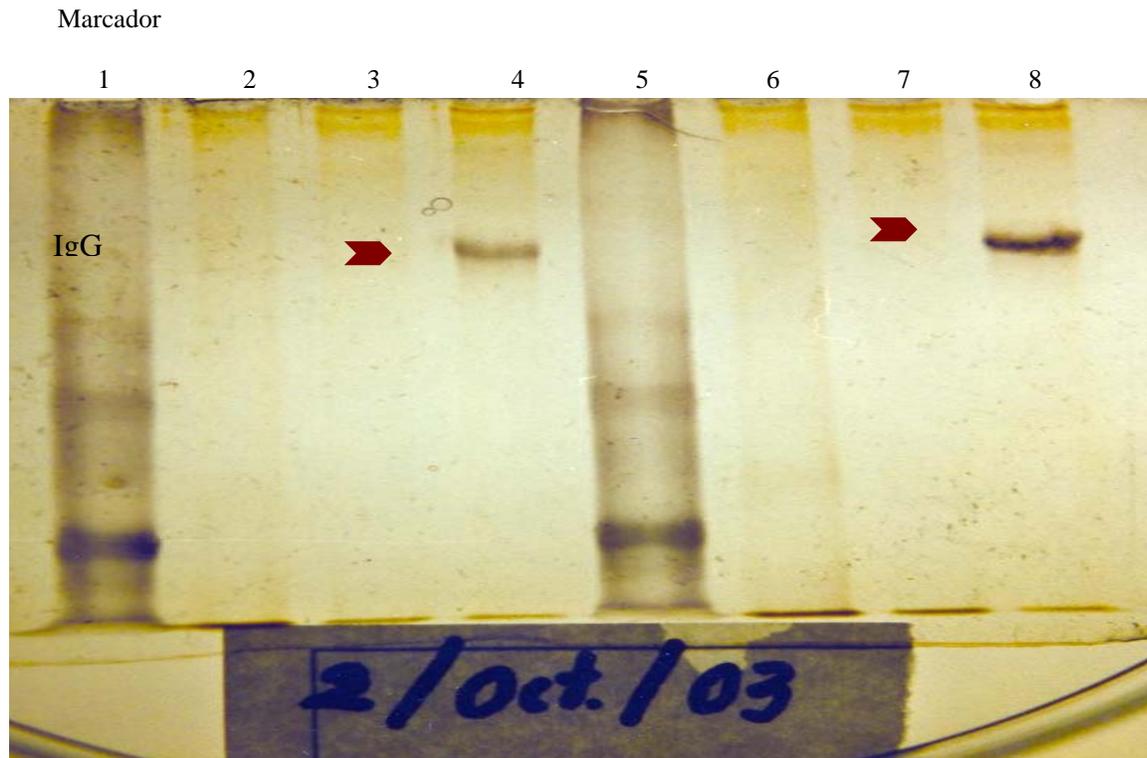


Fig.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción de Nitrato de Plata. Se observa la presencia de algunas bandas que no pertenecen a las inmunoglobulinas G en el suero. Determinándose que la separación de las inmunoglobulinas no era la adecuada.

La concentración de las proteínas disminuyeron, el procedimiento que se realizó en la columna no era la indicada, es por ello que se decide juntar las muestras .

Cuadro 4.10 Se observa el volumen total que se obtuvo al juntar las muestras con buffer de fosfatos y citratos.

Se juntan las muestras	Volumen total obtenido
* Muestras con buffer de fosfatos.	de las muestras
* Muestras con buffer de citratos	172 mL

Al juntarse las muestras con un volumen aproximado de 172 mL , se sometieron a diálisis por un tiempo determinado en buffer de fosfatos pH 7.2. Después de haber sido sometida a diálisis la muestra, nuevamente se volvió a medir el volumen para iniciar los cálculos para llevar a cabo el título del conjugado.

Al término de la diálisis se comenzó el título del conjugado , tomando en cuenta que no existió ninguna modificación en la concentración de las proteínas. Las muestras se continuaron trabajando por separado esperando encontrar alguna diferencia. Se determinaron los mg de fluoresceína por mg de proteína y el volumen de buffer de carbonato-bicarbonato pH 9.5 (Cuadro 4.11)

Cuadro 4.11. En este recuadro se observa la cantidad de fluoresceína y buffer de carbonato-bicarbonato requerido para cada una de las muestras.

Muestra de <i>Haemophilus parasuis</i> Original ( 3.2 mL )	Muestra de <i>Haemophilus parasuis</i> (columna 135 mL )
Se adiciona 0.044 mg de fluoresceína y 0.32 mL de buffer de carbonato al 10%	Se adiciona 0.044mg de fluoresceína y 13.5 mL de buffer de carbonato-bicarbonato al 10 %

Una vez que se realizó el conjugado por separado, se llevó a cabo la prueba confirmativa, es decir, la presencia de fluorescencia en los tejidos de pulmón, donde se trabajó con 5 pulmones positivos a *Haemophilus parasuis* previamente caracterizados por otras técnicas de diagnóstico. En la determinación del título de la bacteria, se trabajó con uno de los pulmones, detectándose un título de 1/90 como se observa en la figura que se muestra a continuación.

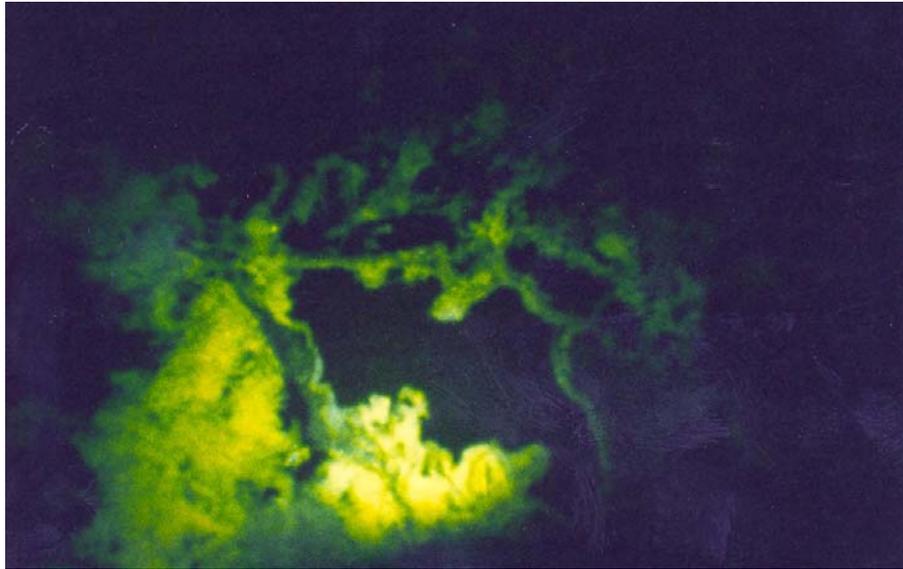


Figura 5. Reacción positiva de Inmunofluorescencia Directa sobre un corte histológico de un bronquio de pulmón de cerdo infectado con *Haemophilus parasuis* donde se observa fluorescencia en la luz del bronquio con un título 1:90 (Fotos 40X)

Una vez establecido el título en las muestras de tejido, se observaron las diversas características que manifestaron los tejidos de pulmón a llevar a cabo la reacción positiva contra *Haemophilus parasuis*, como se muestra en las figuras 6 .

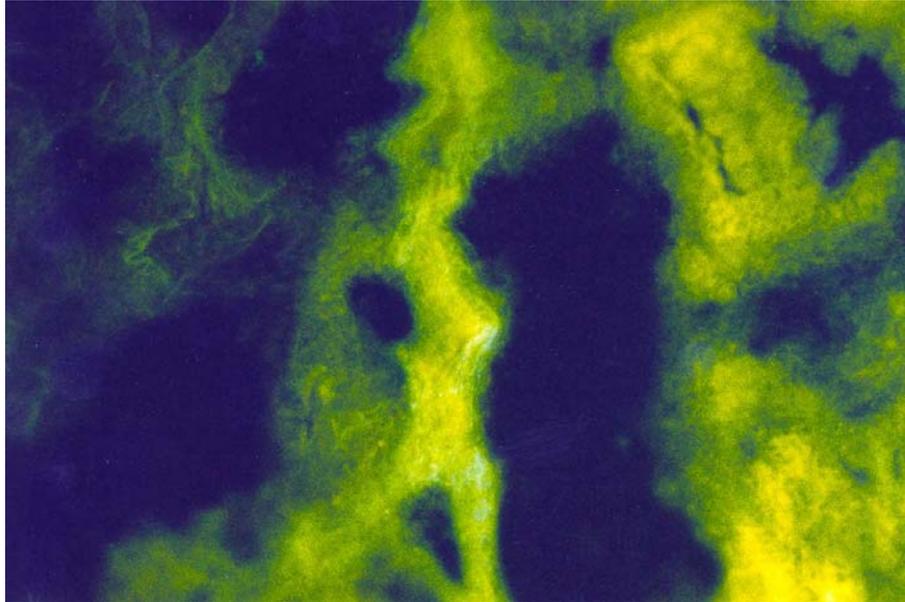


Figura 6. Reacción positiva mostrando fluorescencia en el tejido, observándose un engrosamiento de los tabiques interalveolares y la presencia de exudado en los alveolos (40X)

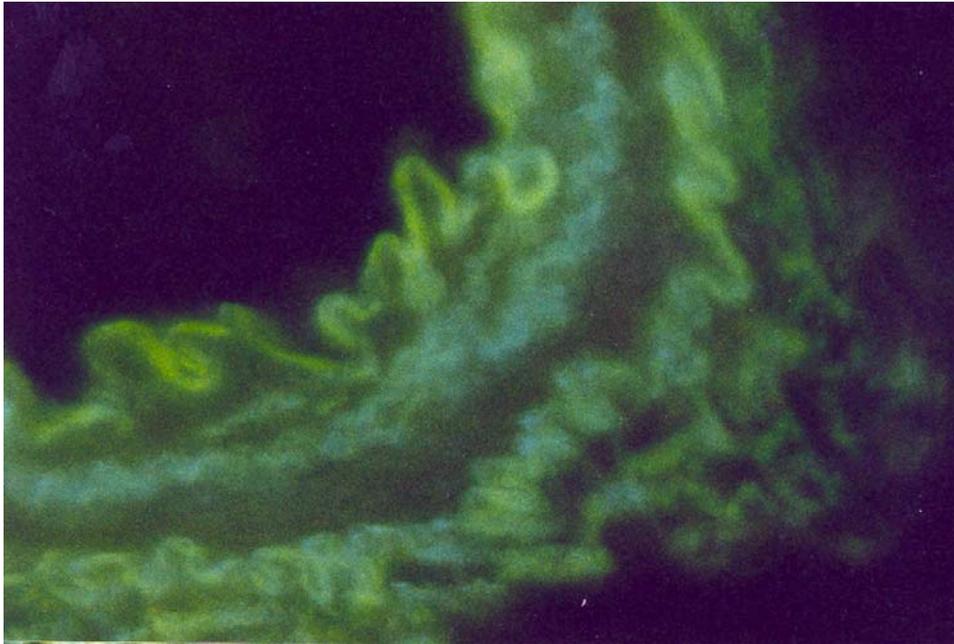


Figura 7. Prueba de Inmunofluorescencia Directa . El corte fue obtenido de un pulmón negativo a *Haemophilus parasuis* observándose ausencia de fluorescencia en el tejido. (40x)

Dentro de la prueba de inmunofluorescencia directa se realizaron una serie de cortes que nos permitieron observar la fluorescencia en diversos sitios del pulmón.

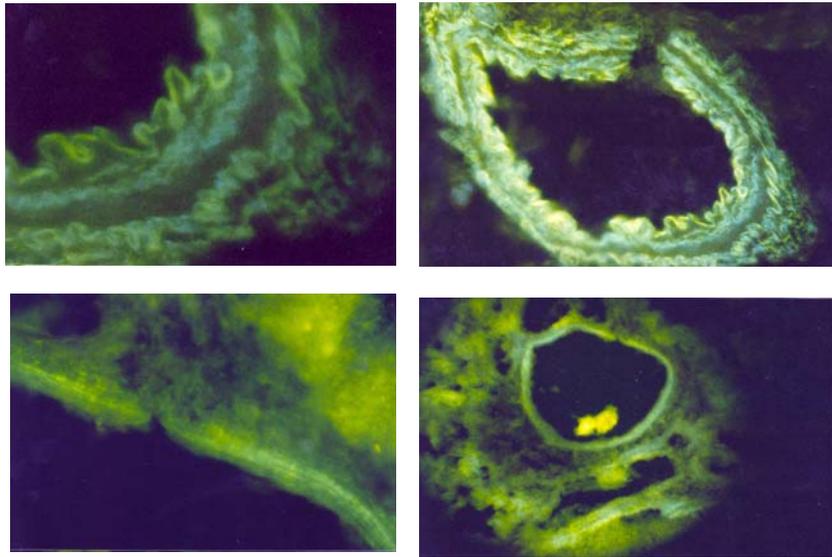


Figura 8. Prueba de inmunofluorescencia directa vista en diferentes sitios del pulmón, evidenciando la presencia de *Haemophilus parasuis*.

(40x)

## 5.0 Discusión

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de virología de posgrado, bajo las condiciones de trabajo estandarizados. El cerdo que se adquirió era un cerdo convencional , pero libre de enfermedad que causa *Haemophilus parasuis* del cual se preparó el suero hiperinmune.

Para poder establecer un calendario de vacunación en un programa de inmunización se tomó en cuenta lo siguiente:

Cualquier animal que sea vacunado por primera vez, ya sea adulto o joven, debe de ser revacunado a los 14-21 días, con el fin de estimular una buena respuesta inmune, de lo contrario será deficiente, no importa lo que las marcas comerciales declaren, ya que es un principio básico de la inmunología. <sup>4,10,</sup>

En este sentido nuestro calendario de vacunación se estableció en un periodo aproximado de 2 meses una vez a la semana, con el fin de obtener una buena respuesta inmune. La bacterina comercial (Fort Dogde Suvaxyn RespiFend HPS), esta indicada para prevenir la presentación de signos clínicos asociados a las serovariedades 4 y 5 .

Al inicio del proyecto se modificó el calendario de vacunación, debido a que el cerdo inmunizado comenzó a presentar reacciones que

posiblemente fueron debidos a la administración de la bacterina comercial, por lo cual se suspendió la administración por una semana y media evitando que se realizaran las tomas de muestras correspondientes a ese periodo. Es importante recordar que la administración de la bacterina se realizó por vía (intratraqueal).<sup>4</sup>

Una vez que se determinó que el cerdo se encontraba en buen estado se continuó con la administración y la toma de muestra, siguiendo el procedimiento hasta el día del sacrificio, concluido el sacrificio se llevó a cabo la prueba de ELISA para obtener los títulos de las diferentes tomas.

El ELISA indirecto es el procedimiento más utilizado en la actualidad. Se basa en el uso de un antígeno obtenido a partir de un serotipo virulento, con el que se consiguen niveles aceptables de sensibilidad y especificidad, aunque existan reacciones cruzadas entre serotipos y no discrimine el serotipo implicado.<sup>53</sup>

Los títulos de anticuerpos para *Haemophilus parasuis* se encontraron en un porcentaje satisfactorio a pesar de haberse realizado las modificaciones antes mencionadas. Los valores de interpretación de la prueba fueron estandarizados para la prueba de ELISA por los

laboratorios de diagnóstico especializado, donde se llevo acabo la prueba de ELISA indirecta.

En la preparación del conjugado se continuaron realizando cambios, una de las modificaciones que se realizaron a la técnica fue la precipitación de las inmunoglobulinas, generalmente se emplea entre un 30 a 50 % de saturación.<sup>17,3</sup> En este trabajo la precipitación de inmunoglobulina G resulto más eficiente al usar un porcentaje de sulfato de amonio saturado al 60% al adicionarla a la globulina reconstituida, agregándose en una proporción igual a la muestra de suero. Sin embargo es importante mencionar que este procedimiento no es suficiente para obtener una proteína totalmente purificada.<sup>3,32</sup>

En la cuantificación de proteínas se obtuvieron niveles elevados de proteínas, determinándose que la modificación realizada en la técnica de precipitación si permitió obtener mejores resultados. Por tal motivo se llevaron acabo las pruebas confirmativas, como la realización de la electroforesis por SDS-PAGE, pero hubo dificultades para poder apreciar con claridad las inmunoglobulinas a estudio, el motivo principal era la cantidad de proteínas que se utilizó al correr la electroforesis, por lo cual se determino realizar una electroforesis con tinción con nitrato de plata, ya que esta técnica era más sensible y permitiría apreciar con claridad

las inmunoglobulinas; la cantidad de muestra con la que se trabajaría sería la mínima. Desde este momento se determinó que se realizaría esta técnica para realizar pruebas confirmativas para cuando se pasaran las muestras por la columna.<sup>32</sup>

Al hacer pasar la muestra en la columna con una serie de soluciones permitiría separar de manera más específica las inmunoglobulinas, de esta forma se obtendrían lecturas en el espectrofotómetro que darían a conocer de manera más precisa la presencia de la inmunoglobulina en estudio. Por tal motivo se llevaron a cabo una serie de ciclos que podrían dar conocimiento al respecto.

Cada de uno de los ciclos que se fueron realizando mostraron un comportamiento diferente, debido a esto se fueron realizando una serie de modificaciones que permitirían purificar a la inmunoglobulina de manera adecuada.

Se realizaron cambios en los volúmenes al momento de coleccionar las muestras que se hacían pasar por la columna, como un cambio de volumen en el buffer de elusión, la cantidad que se coleccionaba no evidenciaba la presencia de la inmunoglobulina al tomar las lecturas en el espectrofotómetro, así también el cambio de volumen de buffer de

elusión permitiría obtener la mayor cantidad de inmunoglobulinas que se habían quedado fijados previamente en la columna. <sup>9,32</sup>

Se tomaron las lecturas del tubo más concentrado al menos concentrado para disminuir el error que se pudiera estar cometiendo al hacer pasar la muestra en las cubetas para la medición en el espectrofotómetro.

Los resultados obtenidos vuelven a mostrar diferencias en las lecturas, todo pareciera que ahora la cantidad de inmunoglobulinas iban disminuyendo y esto pudo deberse a que estas inmunoglobulinas se estuvieran desnaturalizándose debido a el tiempo de manipulación. Los anticuerpos tienden a durar menos cuando se mantienen diluidos con soluciones salinas, no se deben de congelar y descongelar varias veces ni mantenerlas por mucho tiempo en el refrigerador , ya que el título de los anticuerpos tenderían a disminuir.<sup>39</sup>

Por tal motivo se hizo correr un último ciclo donde se tomarían en cuenta los valores que tuvieran mayor absorbancia en cada uno de los ciclos, como sus muestras respectivas, encontrándose un comportamiento similar en el 1er ciclo, 4° y 5° ciclo. Debido a ello se decidió correr las muestras en una electroforesis con tinción de nitrato de plata como prueba confirmativa para determinar la presencia de

inmunoglobulina G. Dando como resultado la presencia de bandas que no corresponden a las inmunoglobulinas G , determinándose que la cantidad que se hacía pasar por la columna era mayor. Esto causo problemas debido a que solo se esperaba observar IgG´s.

La capacidad de unión de la inmunoglobulina G y la proteína A depende de el origen de la especie y su capacidad total depende de otros factores como la fluidez de la muestra durante su aplicación y de la concentración de la muestra. <sup>20,58</sup>

Se decidió trabajar de dos maneras, es decir, trabajar con muestras que pasarían en la columna para la purificación de inmunoglobulinas y muestras que se trabajarían sin pasar por la misma, para después realizar una análisis de los resultados obtenidos y determinar que tan viable sería trabajar las muestras en las columnas de afinidad.

Al observar si existían diferencias entre las dos maneras de trabajar la muestra, se determinó que no había diferencia en las dos, nuevamente se planteó volver a trabajar con las muestras sin distinción alguna.

El conjugado de *Haemophilus parasuis*, se evaluó por la presencia de fluorescencia en los tejidos, cuidando que no se obtuviera un falso positivo por la presencia de otros microorganismos a fines a ciertos tejidos.

La población de individuos enfermos o infectados con *Haemophilus parasuis* se tomó de aquellos animales que presentaron lesiones pulmonares características de la enfermedad que a su vez fueron determinadas por otras técnicas como aislamiento y así garantizar la presencia de *Haemophilus parasuis*. Para la obtención de controles negativos, se consideraron los mismos individuos en experimentación.

Se tomaron 5 muestras de pulmón, de las cuales se eligió una para determinar el título del conjugado, las 5 muestras mostraron reacción positiva con el reactivo, determinándose la eficiencia del mismo.<sup>4</sup>

Debido a las características de *Haemophilus parasuis* para su crecimiento, se decidió utilizar la técnica de inmunofluorescencia como una alternativa mas para el diagnóstico en los cerdos, por lo tanto, se llevó acabo la inmunización del cerdo cumpliéndose las características necesarias para ello, posterior a esto se obtuvo un suero hiperinmune con un título elevado del 39.71 % positivo a *Haemophilus parasuis* que permitió se conjugara con el isotiocianato de fluoresceína, una vez obtenido el conjugado se probó con tejidos de pulmón. Al llevar acabo la prueba de inmunofluorescencia directa en los tejidos de pulmón se

determinó un título elevado para *Haemophilus parasuis* de 1:90, a partir de este resultado, encontramos que esta técnica fue fácil de realizar, pero que presenta un inconveniente, la necesidad de tener un microscopio de fluorescencia, aun con este inconveniente se consideró esta técnica como una alternativa rápida para el diagnóstico de *Haemophilus parasuis* para la enfermedad de Glässer.

Haciendo un análisis de todo el procedimiento que se siguió; encontramos que la purificación y la concentración de la muestra aumenta la probabilidad para que se lleve a cabo una reacción más específica y esto permitió que nosotros pudiéramos realizar una serie de diluciones para llevar a cabo la inmunofluorescencia directa

Existen una serie de aspectos que se proponen trabajar para obtener mejores resultados como son:

Proponer para posteriores proyectos extender el calendario de inmunización, debido a que es posible obtener mayor cantidad de anticuerpos <sup>39</sup>, recordando que en este proyecto se acortó el tiempo, pero creemos que es posible conocer el nivel máximo de producción de anticuerpos.

Los resultados obtenidos en este proyecto denotan la necesidad de realizar una serie de pruebas que permitan conocer el lugar específico donde se aloja *Haemophilus parasuis*, debido a que solo se determinó la presencia del antígeno, y no el lugar en específico donde se encontraban.

Es importante dar a conocer que los mejores resultados se obtienen de muestras de tejidos de corazón inflamado o de una articulación inflamada, Dice Brad Bosworth, veterinario de servicios técnicos de Novartis. "Las cepas de *Haemophilus parasuis* encontradas en estos lugares son casi dañinas y causan la enfermedad problema. Las muestras de otros tejidos de otros lugares puede incluir cepas no patógenas de la bacteria, las cuales no están involucradas en la enfermedad problema y pueden alterar el diagnóstico, por ello la necesidad de determinar que la presencia de fluorescencia en los tejidos de pulmón corresponden a los serotipos involucrados en la enfermedad".

Se deberá de trabajar posteriormente con muestras para la validación del conjugado y así evitar falsos positivos o falsos negativos.

Trabajar con cerdos permitió utilizar a la especie y obtener mayor cantidad de antisuero que en un conejo<sup>9</sup>. La prueba permitirá ayudar a

los porcicultores a conocer el status sanitario de su granja y tomar medidas como la vacunación o tratamiento con antibióticos

Cabe mencionar que existe la posibilidad de proponer técnicas que se puedan emplear de igual manera, disminuyendo costos y garantizando la eficiencia de la misma técnica.

## 6.0 Conclusiones

Al dar seguimiento a los niveles de anticuerpos, se determinó que si es posible extender más el calendario de vacunación para obtener mayor cantidad de anticuerpos.

La concentración con la que se puede trabajar el conjugado es elevado, como consecuencia, el elevado título del conjugado puede ser empleado en distintas muestras esperando encontrar los mismos resultados .

Una ventaja de esta prueba es el empleo de un reactivo de tinción. Una vez que el conjugado ha sido titulado y evaluado, las reacciones requieren de un mínimo de controles para establecer la especificidad.

Para mejorar la eficiencia de la prueba es recomendable realizar una estandarización de la técnica que permita conocer los sitios específicos donde se encuentra alojado *Haemophilus parasuis*

Por ello la inmunofluorescencia directa se propone como una prueba de diagnóstico rápida <sup>9,55</sup> para detectar la presencia de *Haemophilus parasuis*, sin esperar síntomas o lesiones característicos de la enfermedad, siendo una de las ventajas de la prueba.

## 7.0 Bibliografía

1. Amano H. Shibata M, Kajio M.Morozumi T. 1994. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1,4, and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. J. Vet.Med.,Sci., 56:639644.
2. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Inmunología molecular, 5a ed, ELSEVIER, 2004, España, pp.222-225,522,524,531
3. Akita, E. M. And Nakai S. Inmunoglobulins from egg yolk: isolation and purification J. Food Sci. 57: 629-634.
4. Brad Bosworth, DVM, PhD Novartis animal Health, Los Diagnósticos son críticos en la prevención de las enfermedades de *Haemophilus parasuis*.
5. Broma,G, M. Ranger,C,R, Fluorescent isothiocyanate conjugated antiserum, porcine origin. USDA;APHIS; Veterinary Services Laboratorios Scientific Services Laboratory, Reagents Section, P.O. Box 844 Arnes, Towa 50050, 1988.

6. Birberstein EI, White DC, 1969, Aproposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. J.Med. Microbiol., 2: 7578.
7. Blackall PJ, Pahoff JL, 1995, Characterization of porcine haemophill, isolated from Australian pigs between 1988 and 1992, Aust. Vet. J. 72: 1, 1821.
8. Carol A. Lichtensteiger and Eric R. R. Vimr, Purification and renaturation of membrane neuraminidase from *Haemophilus parasuis*, Veterinary Microbiology 93; 70-87, 2003
9. Carpenter Philip L. Inmunología y Serología, 2 ed, La Prensa Médica Mexicana, México. 1982. p.94
10. Cruz Sanchez Tonatiuh, Tórtota Pérez Jorge L., Vega Marco A. et al, Cinética de la infección experimental en cerdos con *Mycoplasma hyopneumoniae* usando inmunofluorescencia.
11. Chrambach, A. and Joven, T. M., Electrophoresis, 4, 190-204 (1984) Instruction Manual BIO-RAD

12. Diaz, R.C., Mercadillo, S.A., Haro, T.M., Ramírez, H.G., Galván, P.E. Memorias del XXXV Congreso Nacional AMVEC, Acapulco Guerrero, 2000, 105.
13. FAO, Inmunofluorescencia Directa, Manual de Técnicas de Diagnostico Viroológico. Ed. FAO, 1997.
14. Fidler, D.P. Emerging trends in international law concerning global infectious disease control, *Emerging Infectious Diseases*, 9 (3): 285-290.
15. Fernández A, E. García E. Villa A., Métodos Rápidos de diagnóstico diferencial de enfermedades infecciosas en porcino, Laboratorios Exopol.
16. Gayan Joseph. DVM Path, Marie A. Haemophilus, vol 5 Issue 3, University Guelpp Newsletter.
17. Gordan, A. H., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol 1, Part. 1, (Work T.S. and Work E., eds). North Holland Publishing C., Amsterdam- London, 1975.

18. Harris ,D.L. Alexander, T.J. (1999) Methods of disease control. In Diseases of Swinw, 8 th, Edition. Iowa State University Press, Ames, IA,USA, pp. 1077-1110.
19. Hill C.E., D.S: Metcalf and J.J. MacJannes, A search for virulence genes of *Haemophilus parasuis* using differential display RT-PCR, Veterinary Microbiology, 96: 189-202 , 2003
20. HipTrap affinity columns, Instruction Manual, Amersham pharmacia biotech, Piscataway, NJ, USA. pp. 11.
21. Hoefling DC. 1994. The various forms of *Haemophilus parasuis*. Swine Health Prod, 2:1
22. Herrera M.JD; Huerta AOF, Hernández R. Serotipificación de aislamientos de *Haemophilus parasuis* en varios estados de la República Mexicana, . ,AMVEC,Veracruz.
23. J.H. Lara , M. E. Torres, A. Santos, Desarrollo de un modelo experimental para demostrar la interacción de *Mycoplasma hyopneumoniae e Haemophilus parasuis*. FESC, UNAM, PADEP 100001

24. JR Reguero González, C. López Larrea, S. González Rodríguez E. Martínez Naves , "Inmunología , Biología y Patología del Sistema Inmune" 3<sup>a</sup>. Ed, Panamericana , España 2003, p. 195-198.
25. Kielstein P, Rosner H, Müller W. 1991. Typing of heat stable soluble *Haemophilus parasuis* antigen by means of agar gel precipitation and the dot blot procedure. J. Vet. Med., B 38:315320
26. Kielstein P, Rapp-Gabrielson VJ. 1992. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* based on immunodiffusion using heatstable antigen extracts. J. Clin. Microbiol., 30:862865
27. Kilian M. 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. J. Gen. Microbiol., 93: 962.
28. Kott BE. 1983. Chronological studies of respiratory disease in baby pigs. M. S. Thesis. Iowa State University. Ames. Iowa.

29. Laemmli, U.K., Nature, 1970, 227,680, Instruction Manual  
BIO.RAD
30. Leslie Hudson, Practical Immunology, 3<sup>a</sup> ed, Black Well  
Scientific, Gran Britain, Oxford, 1989
31. López V. Jesús Enfermedad de Glässer: Aspectos prácticos,  
Laboratorios Intervet.
32. Margni, Inmunología e Inmunoquímica, Panamericana ,  
Argentina 1989, p. 571,578,644,645,674
33. McLellan,T., Analytical Biochemistry, 126,94-99 (1982)  
Instruction Manual, BIO-RAD
34. Mendoza E. Ciprian A. Tercer Ciclo Nacional de  
Enfermedades Respiratorias del Cerdo, UNAM, Academia  
Veterinaria Mexicana Fesc, 2001, p.85, 11, 115, 117.

35. Méndez Trigo AV, Trigo E. 1996. Viability of *Haemophilus parasuis* in tissues, exudates and pure culture swabs. Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc., 14:314.
36. Miriam M. Bradford Jonathan, A Rapid And Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein- Dye Binding. Analytical Biochemistry, 1976; 72, 248-254.
37. Moller, K, Andersen LV, Christensen G, Kilian M. 1993. Optimization of the detection of NAD dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. Vet. Microbiol., 36:261-271
38. Morikoshi T, Kobayashi K, Kamino T, Owaki S, Hayashi S, Hirano S. 1990. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated in Japan. Jpn. J. Vet. Sci., 52:3
39. Morilla Antonio, Bautista Campos , Manual de Inmunología , Diana , México 1986, p.64,97-99.

40. Morozumi T, Nicolet J. 1986. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. J. Clin. Microbiol., 23:138142
41. Morris, R.S., Davies, P.R., Lawton, D.E. (2002) Evolution of diseases in the world's pig industry. Proc. 16 th IPVS Congress, Ames, IA, USA, pp.1-10.
42. Oliveira S, L Galina, I Blanco, A Canals, C Pijoan, Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. J. Vet Diagn. Invest 2001 Nov 13 (6): 495-501, 2001
43. Ornstein, L. And Davis, B. J., Anal. Sci., 121, 321 (1964).  
Instruction Manual, BIO-RAD
44. Ortega G. R. Chapa BJ, Rodríguez GE, González, Comparación de PCR y aislamiento para el diagnóstico de *Haemophilus parasuis* Investigaciones aplicadas S.A. de C. V.
45. Pijoan, C., Torremorell, M., Solano, G. (1997) Colonization patterns by the bacterial flora of young pigs. Proc. 28th Annual Meeting AASP, Quebec City, Canada, pp.463-464.

46. Pound, J. Inmunochemical protocols. Ed. Humana press. United Status, p. 337 – 345
47. Rafiee M, Blackall PJ. 2000. Establishment, validation and use of the KielsteinRapp-Gabrielson serotyping scheme form *Haemophilus parasuis*. Aust. Vet J., 78:3, 172 174.
48. Rapp-Gabrielson VJ, Gabrielson DA. 1992. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. Am. J. Vet. Res., 53:659664.
49. Reguero González, Inmunología: Biología y Patología del Sistema Inmune, 3 ed. Panamericana, España , 2003, p. 195-198.
50. Roitt Ivan, Brostoff Jonathan, Male David, Inmunología, 5a ed., Harcourt, España, 2000, p. 385-387.
51. Rojas Espinosa, Inmunologia, 2a ed, Panamericana, México D.F. 2001, pp.147, 168, 169.

52. Rubies X, Kielstein P, Costa LI. , Riera P, Artigas C, España E. 1999. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. Vet. Microbiol., 66:245248.
53. Segales, J . (1996). Enfermedad de Glässer: conceptos generales de la infección por *Haemophilus parasuis*. Medicina Veterinaria, 13: 595-605.
54. Schimmel D, Kielstein P, Hass R. 1985. Zur serologische typisierung von *Haemophilus parasuis*. Arch. Exp. Vet. Med. Leipzig, 39:944947.
55. Sorensen V, Barford K, Ahrens P, Friis NF, Feenstra AA, Pedersen MW, et al. Comparison of four different methods for demonstration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of experimentally inoculated pigs. Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Pigs Veterinary Society Congress;1994 June 26-30; Bangkok, Thailand. Chulalongkorn University Faculty of Veterinary Science, 1994:188.
56. Steward M.W. Inmunoquímica, Omega, Barcelona , 1979, p. 20,21,26.

57. Thrusfield, M. Veterinary Epidemiology. 2nd Edition.  
Blackwell Science Ltd, Cambridge, United Kingdom
58. Vega Fernández, M.R, Vázquez Moreno, L y Ramos-Clamont,  
G. Aislamiento de Inmunoglobulinas de Suero Porcino, Mediante  
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica : Comparación de dos  
Matrices Cromatográficas, p.1,2,95.97.