



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLAN"

**AISLAMIENTO Y ENSAYO DE LA ANTIGENICIDAD DEL  
POLISACARIDO CAPSULAR DEL SOBRENADANTE DE UN  
CULTIVO DE *Haemophilus pleuropneumoniae*  
SEROTIPO 5**

## T E S I S

QUE, PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
PRESENTAN:

**María Patricia Graciela Calzada Flores**  
**Andrés Romero Rojas**

DIRECTOR DE TESIS:  
M. en C. JOSE CAMACHO MACHIN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1 9 8 5



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

	<i>Página</i>
Abreviaturas	<i>i</i>
Reactivos	<i>ii</i>
Resumen	<i>iii</i>
CAPITULO I. GENERALIDADES	1
A. HISTORIA.	3
B. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.	4
C. ORIGEN Y EFECTOS DE LA NEUMONIA.	5
D. TRANSMISION.	6
E. PATOGENIA.	7
F. SIGNOS CLINICOS.	8
G. LESIONES.	9
H. CONTROL DE LA ENFERMEDAD.	10
I. INMUNIDAD Y PROFILAXIS.	11
J. CAPSULA BACTERIANA.	12
J.1 Estructura capsular.	15
J.2 Síntesis y liberación del polisacárido capsular.	16
J.3 Aislamiento del 'polisacárido capsular.	18
CAPITULO II. OBJETIVOS	21

CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS	22
A. CURVA DE CRECIMIENTO,	22
B. EXTRACCION DEL COMPLEJO POLISACARIDO.	22
C. ANALISIS DE LAS FRACCIONES.	26
C.1 Determinación de proteínas.	26
C.2 Determinación de pentosas.	27
C.3 Determinación de endotoxina.	28
C.4 Electroforesis.	30
D. ANALISIS DE LA ANTIGENICIDAD DE LAS FRACCIONES.	35
E. ENSAYO DE LA PROTECCION INDUCIDA POR LAS FRACCIONES.	41
CAPITULO IV. RESULTADOS	43
A. CURVA DE CRECIMIENTO.	43
B. EXTRACCION DEL COMPLEJO POLISACARIDO.	45
C. ANALISIS DE LAS FRACCIONES.	46
D. ANTIGENICIDAD DE LAS FRACCIONES.	60
CAPITULO V. DISCUSION	63
CAPITULO VI. CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFIA.	68

ABREVIATURAS

ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
AMP	Adenosin monofosfato
A <sub>230</sub>	Absorbancia a 230 nm
A <sub>260</sub>	Absorbancia a 260 nm
CY	Casaminácidos-extracto de levadura
HB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
NAD	Nicotin adenin dinucleótido
ng	Nanogramos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PC-A	Polisacárido capsular fracción A
PC-B	Polisacárido capsular fracción B
pg	Picogramos
PM	Peso molecular
PRP	Polirribofosfato
ppt	Precipitado
R <sub>f</sub>	Desplazamiento relativo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
snd.	Sobrenadante
TEMED	N N N' N' tetrametilendiamino
Tris	Hidroximetilamino metano

REACTIVOS

Casamino Acids. Difco laboratories. Detroit, Michigan (USA).

Hexadecyltrimetil-amonium bromide. Fisher Scientific Co. New Jersey (USA).

Limulus amebocyte lysate lote 7191. Mallinckrodt, Inc. St. Louis (USA).

Reactivos de electroforesis. Bio-Rad laboratories. Richmond, California (USA).

Endotoxina de *Escherichia coli*. Mallinckrodt, Inc. St. Louis (USA).

Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

## RESUMEN

La neumonía causada por *Haemophilus pleuropneumoniae* representa en la actualidad grandes pérdidas económicas para la porcicultura nacional; por lo que es necesario incrementar los estudios tendientes a dilucidar la patogenia y el control de la enfermedad. Han surgido una amplia variedad de bacterinas, sin embargo actualmente no existe una eficaz que permita controlar o erradicar la pleuropneumonía en granjas porcinas. Los hallazgos de que el polisacárido capsular y la endotoxina del *Haemophilus pleuropneumoniae* son los principales agentes inmunogénicos hacen pensar en la posibilidad de una vacuna.

En el trabajo se aplicó con buenos resultados la precipitación con detergente catiónico del polisacárido capsular, con el fin, de eliminar la mayor cantidad de endotoxina y proteínas y así encontrar un inmunógeno de menos toxicidad posible. Como el extracto obtenido no produjo un grado de inmunogenicidad considerable al ser inoculado en conejos, consideramos conveniente probarlo en su hospedero natural para observar el grado de protección que confiere, realizar un estudio más profundo sobre la síntesis y liberación del polisacárido capsular y hacer un balance de costos de producción y viabilidad de este inmunógeno para poder ser aplicado como vacuna.

CAPITULO UNO

GENERALIDADES

El crecimiento de la población mundial, en las últimas décadas, no ha venido respaldado por un crecimiento similar en la producción de alimentos, especialmente en la producción de carne y leche. Las limitaciones en la producción animal están en parte, asociadas a las enfermedades infecciosas (11).

Dentro de los obstáculos infecciosos en la producción de carne de cerdo encontramos principalmente dos tipos de afecciones: entéricas y respiratorias. En los países de América y Europa entre las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en el ganado porcino se encuentran las afecciones respiratorias, las que se han reconocido como un factor importante en la producción porcina intensiva (31, 42, 51).

Las afecciones respiratorias se caracterizan por alta morbilidad, altos índices de mortalidad, múltiples agentes etiológicos y disminución de la tasa de crecimiento (12, 42). Las pérdidas económicas por estas afecciones están asociadas a muerte de animales y elevados gastos de medicamentos, por lo que están consideradas como la principal causa de disminución de la productividad, especialmente en cerdos de engorda (35, 72) y es difícil evaluar las pérdidas si tenemos en cuenta que el mayor número de cerdos afectados por la enfermedad varía según la explotación.

La incidencia de los problemas respiratorios en cer-



dos parece elevada. En Inglaterra se observó que al menos un 10% de los cerdos sacrificados presentan lesiones de tal severidad como para justificar la extracción del pulmón, y comentan que del 20% al 30% de muestras en el postdestete y fase de engorda son por neumonía (37). En Checoslovaquia Gois y col. (23) encontraron hasta un 50% de los pulmones con lesiones neumónicas en rastros, en -- en Brasil algunos investigadores encontraron 17% de pulmones neumónicos (48). En un estudio de rastros mexicanos en distintos estados se halló que el 50% de los cerdos -- sacrificados tenían lesiones pulmonares (39) y Ochoa reportó de un 10% a 12% en el rastro de Ferrería, México -- D.F. (49).

La atención con respecto a los problemas respiratorios ha sido enfocada en los últimos años hacia *Haemophilus pleuropneumoniae*, aunque la revisión en la literatura nos indica que también otros agentes bacterianos, virales, micoplasmas y parásitos son importantes en las enfermedades respiratorias (29, 31, 35, 76).

## A. HISTORIA.

En 1892 Pfeiffer aisló y describió por primera vez - las características de un organismo íntimamente asociado - con la influenza humana. Sus rasgos más sobresalientes --- fueron que el organismo no creció en el laboratorio excepto en presencia de dos factores, ambos presentes en sangre completa, por lo que se le dió el nombre de *Haemophilus*, - nombre genérico de ese organismo.

Algunas bacterias del género *Haemophilus* están asociadas con afecciones del tracto respiratorio como el *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus parainfluenzae* en el hombre; *Haemophilus parasuis* y *Haemophilus pleuropneumoniae* - en el cerdo, además están el *Haemophilus aegyptus* que causa conjuntivitis y el *Haemophilus ducreyi* que causa lesiones dérmicas chancroides, ambos en el hombre.

En 1963, Olander aisló una bacteria de una neumonía - en cerdo, la cual requería para su crecimiento el factor V (NAD) y que producía una marcada hemólisis en agar sangre por lo que se le denominó *Haemophilus parahaemolyticus*, -- primer reporte realizado en California, USA. (50). Ese --- mismo año en Argentina se investigó un brote de pleuroneumonía de tipo agudo en cerdos y se denominó *Haemophilus pleuropneumoniae* (54). Se llegó a la conclusión de los estudios de Olander y Shope que el *Haemophilus parahaemolyticus* y el *Haemophilus pleuropneumoniae* son la misma bacteria.

Recientemente (1983) se ha propuesto que *Haemophilus pleuropneumoniae* y *Pasteurella haemolytica* están fuera de lugar en sus respectivos géneros, y que deben transferirse al género *Actinobacillus* al que se asemejan mucho (55a).

B. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.

Las cepas de *Haemophilus pleuropneumoniae* son microorganismos pleomórficos que se observan generalmente como --pequeños bastones gram negativos, capsulados, de aproximadamente 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  de largo y 0.3 $\mu\text{m}$  de diámetro, son inmóviles, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos, además crecen bien en medios enriquecidos que contienen --factor V (NAD) pero no requiere el factor X (Hemina) (17, 40).

Por su necesidad del factor V crecen en la proximidad de las colonias de *Staphylococcus aureus*, fenómeno que se conoce como satelitismo.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE <i>Haemophilus pleuropneumoniae</i> (14)			
Factor V	+	Lactosa	-
Factor X	-	Ribosa	-
Catalasa	d	Xilosa	+
Nitratos	+	Arabinosa	-
Oxidasa	d	Dulcitol	-
Urea	+	Inositol	-
Indol	-	Dextrosa	+
Citrato	-	Fructuosa	+
Voges-Proskauer	-	Maltosa	L
Rojo de metilo	-	Manitol	L
Hemólisis beta	+	Fosfatasa alcalina	+

Factor V = NAD

Factor X = Hemina

+ = positivo

- = negativo

L = ligero

d = dudoso

### C. ORIGEN Y EFECTOS DE LA NEUMONIA.

Entre los factores que predisponen a los problemas respiratorios se encuentran los cambios bruscos de temperatura, malas condiciones de higiene, stress debido al manejo y adquisición de nuevos animales. Algunos autores consideran que el factor mas importante es la densidad de la población animal (26) y otros estudios muestran que el manejo y el ambiente juegan un papel importante en la incidencia y gravedad de neumonías (10, 33, 74).

La neumonía causada por *Haemophilus pleuropneumoniae* es una enfermedad seria, la cual tiene un impacto económico - significativo, teniendo como características en su forma crónica, la disminución de peso y del crecimiento y una baja conversión de alimentos, provocando mayor costo para el porcicultor los animales que se mantienen vivos que los que mueren por la forma aguda (26).

Esta enfermedad está ampliamente distribuida y ha sido reportada en Suiza, Estados Unidos (50), Holanda (44), Dinamarca (44), India y Japón (16), Canadá (66), Australia (43), Alemania, Suecia, Bélgica y Francia (25). En México el primer aislamiento reportado fué un brote en Tlaxcala (51), posteriormente en otros principales estados porcicultores de la zona del Bajío en donde los problemas respiratorios tienen una gran importancia.

El periodo de incubación de la bacteria es corto, experimentalmente de menos de 6 horas, aunque en condiciones de campo varia entre 12 y 24 horas (43,44,69).

En un análisis de 15 brotes en Dinamarca (44) se obtuvieron los siguientes datos:

Morbilidad de 8.5% a 40%

Mortalidad de 0.4% a 24%

### C.1 Morbilidad y Mortalidad.

La dificultad para la evaluación de la morbilidad ha sido manifiesta en los brotes mexicanos, que se han caracterizado por los siguientes hechos:

1. La morbilidad varía según la edad de los animales.
2. La mayoría de los brotes detectados han sido en animales de 30 a 50 Kg. de peso.
3. Ocasionalmente difunde a animales adultos.
4. La morbilidad puede alcanzar en el lote afectado -- hasta el 80%, en tanto que la mortalidad, aún en -- presencia de tratamiento puede ser hasta del 35% -- (39).

### D. TRANSMISION.

La transmisión de *Haemophilus pleuropneumoniae* se lleva a cabo fundamentalmente por contacto directo, este modo de transmisión se intensifica cuando:

1. Se utilizan corrales o jaulas que permiten el contacto.
2. Se mezclan constantemente animales de diferentes grupos.

## E. PATOGENIA.

Los datos disponibles sugieren que la enfermedad se produce cuando el microorganismo llega a nivel alveolar y su virulencia está muy asociada a uno o varios factores que parecen ser endotoxinas y/o exotoxinas. Se ha probado experimentalmente que el sobrenadante del medio de cultivo libre de bacterias puede inducir neumonía localizada microscópicamente, similar a la causada en cerdos infectados (9).

El *Haemophilus pleuropneumoniae* resulta citotóxico para los macrófagos alveolares del cerdo y células mononucleares de sangre periférica. La toxina de esta bacteria es estable a altas temperaturas (15 min./100° C) y puede ser neutralizada con sueros de cerdos con infección crónica (9); se encuentra en la pared celular bacteriana y puede producir trombosis vascular y exudación del flujo edematoso y hemorrágico, sin embargo el hecho de que las bacterias que confieren mayor protección son las que tienen cápsula y no toxoide demuestra que la toxina no es el único factor de patogenia involucrado (64).

La bacteria penetra por vía aérea y se transmite de cerdo a cerdo debido a la proximidad entre animales dentro de una granja. El brote se presenta súbitamente y se detecta por la muerte de algunos cerdos en la granja.

## F. SIGNOS CLINICOS,

La neumonía es un proceso inflamatorio del parénquima pulmonar, casi siempre causado por infección. La neumonía causada por *Haemophilus pleuropneumoniae* puede tomar dos formas (56):

### 1. Neumonía hemorrágica aguda.

Los signos encontrados son los siguientes:

- a) Anorexia.
- b) Dificultad respiratoria caracterizada por respiración diafragmática rápida.
- c) Cianosis en orejas y extremidades.
- d) Inmovilidad.
- e) Vómito ocasional.
- f) Muerte con hemorragia nasal en uno o cuatro días o bien recuperación espontánea.

### 2. Neumonía hemorrágica sobreaguda.

La manifestación más marcada de esta enfermedad es la muerte súbita de los animales y la presencia de hemorragia nasal, poco antes de esto se logran detectar los siguiente signos:

- a) Temperatura elevada (41°C-42°C).
- b) Cianosis en piel, abdomen y oreja.
- c) Hemorragia y espuma en nariz.
- d) Chillidos agudos, opistótonos y muerte.

G. LESIONES.

Las lesiones observadas con mayor frecuencia son:

1. Lesiones macroscópicas.

- a) Pericarditis.
- b) Hidropericardio.
- c) Hidrotórax de líquido sanguinolento.
- d) Hemorragias en el miocardio
- e) Adherencias pleurales.
- f) Infartos en lóbulos diafragmáticos.
- g) Friabilidad en la zona infartada.

2. Lesiones microscópicas.

- a) Zona de infarto.
- b) Edema vascular.
- c) Infiltración peribronquial y perivascular de ---  
células mononucleares (linfocitos y macrófagos).
- d) Hemorragias en alveólos.



#### H. CONTROL DE LA ENFERMEDAD,

La enfermedad se convierte en un problema de difícil control aunque las combinaciones de ampicilina y penicilina han sido eficaces en la mayoría de los brotes tratados, esto es sólo al inicio ya que posteriormente su efectividad decrece.

La gravedad actual del problema obliga a sugerir un sistema de control basado en los siguientes puntos:

1. Control zootécnico que incluye control de ventilación, espacio y temperatura para granjas de engorda y no introducción de animales de otras granjas en explotaciones de cría.
2. Reducir la densidad de la población animal.
3. Vacunación con bacterinas hechas a base exclusivamente de *Haemophilus pleuropneumoniae* de la región, con revacunaciones frecuentes (probablemente cada 60 días por su poca efectividad).
4. En granjas donde ya existe el problema un tratamiento masivo de antibióticos.
5. Disminuir al mínimo el mezclado de animales.

## I. INMUNIDAD Y PROFILAXIS,

Nielsen (46) observó que al provocar la neumonía experimentalmente por vía intranasal en cerdos y retar después con la misma cepa, había protección de madres a hijos. Esto sugirió que la vacunación contra la infección por *Haemophilus pleuropneumoniae* podría ayudar en el control de la enfermedad. Debido a esto surgieron una variedad de bacterinas, de las cuales la que mejores resultados dió es la que emplea un cultivo de *Haemophilus pleuropneumoniae* de 6 horas, inactivado con formalina unido al adyuvante completo de Freud; sin embargo debido a la formación de abscesos en el sitio de la inoculación esta bacterina no ha sido permitida.

Ninguna bacterina previene la infección por *Haemophilus pleuropneumoniae* sin embargo algunas reducen las pérdidas por muerte disminuyendo muy poco la mortalidad y daño al tejido. Se ha demostrado que la cantidad de anticuerpos producidos por la vacunación con bacterina es similar a la obtenida por la infección experimental, esto sugiere que los títulos de vacunación no son suficientemente fuertes para prevenir la infección (52). Una mejor protección se adquiere con bacterinas añadidas con adyuvantes oleosos y no con adyuvantes de gel (26, 47), sugiriendo los resultados que la inmunidad celular tiene un papel importante en las defensas del huésped contra la infección de *Haemophilus pleuropneumoniae*; tampoco es efectiva la vacuna con bacteria muerta.

En resumen la mayoría de las bacterinas preparadas contra patógenos pulmonares han dado pobres resultados. Debido a estos se ha sugerido que la cápsula bacteriana y la endotoxina constituyen el antígeno protector ya que los cultivos de bacterias atenuadas con formalina dan mejor protección (45, 53, 77).

## J. CAPSULA BACTERIANA.

Las bacterias patógenas deben su virulencia a los componentes antifagocitarios de superficie que se evidencian en ocasiones como cápsulas bien definidas. Estas estructuras superficiales consisten en geles hidrófilos que protegen a los organismos de la ingestión por fagocitos y se ponen de manifiesto mediante tinción negativa, en una suspensión de tinta china en la cual forma una banda entre el medio (opaco) y el cuerpo bacteriano, que aparece más teñido o más refractil.

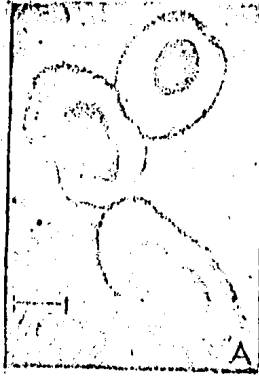
También pueden teñirse con colorantes especiales y además, al ser expuestas a anticuerpos anticapsulares específicos, aumentan su tamaño y refractividad (21).

Se han podido identificar las estructuras químicas de los geles capsulares de varias especies bacterianas, la cápsula del *Pneumococcus* tipo 3 por ejemplo, está compuesto por un polímero de glucosa y ácido glucurónico de alto peso molecular. Tales estructuras capsulares pueden interferir el proceso de fagocitosis y contribuir así a incrementar la virulencia, esto resulta evidente en el caso del *Diplococcus pneumoniae*. Se el comportamiento de las cepas capsuladas L (lisas) se comparan con el de las cepas no capsuladas R (rugosas), las primeras resultan resistentes a la fagocitosis en ausencia de anticuerpos y son altamente virulentas para el ratón, mientras que las últimas son fagocitadas rápidamente y por lo tanto avirulentas; la supresión enzimática del gel capsular puede realizarse fácilmente en el caso del *Pneumococcus* tipo 3 transforma al organismo en no patógeno y lo hace susceptible a la fagocitosis; de modo parecido los anticuerpos frente al polisacárido capsular se combinan específicamente con él destruyendo sus propiedades antifagocitarias.

Durante la fase de crecimiento exponencial, cuando la proporción del polisacárido sintetizado es máxima las cápsulas son grandes y el organismo muy virulento. En la última fase de crecimiento estacionario disminuye la síntesis del polisacárido, las cápsulas se hacen pequeñas y los organismos son menos virulentos (20).

Al microscopio electrónico la cubierta capsular no muestra ningún detalle estructural; las verdaderas cápsulas muestran límites bien definidos y para separarlas del cuerpo bacteriano puede ser necesario utilizar un tratamiento enzimático, si bien es frecuente que las sustancias capsulares solubles pueden ser detectadas inmunológicamente en los filtrados de cultivo. Ciertas cápsulas sin embargo no presentan límites precisos y su superficie externa se confunde con el medio circundante.

Estas propiedades impiden establecer la distinción precisa entre productos de excreción de elevada viscosidad y la propia estructura celular, además ciertas mutantes carecen de cápsula visible, aunque presenten una microcápsula detectable mediante procedimientos inmunológicos tan específicos como la misma cápsula (21).



CAPSULA BACTERIANA



## J.2 Síntesis y liberación del polisacárido capsular.

Pittman (55) observó que la encapsulación de células en medio sólido determinadas por iridiscencia fué más notoria en colonias juvenes, en las que el antígeno apareció en el medio; Alexander (1) encontró que la encapsulación - así como la morfología de los mismos bacilos empieza a deteriorarse después de alcanzar cierta densidad bacteriana en la superficie del medio sólido, el deterioro en medio líquido es más graduada, él infirió que las responsables eran enzimas autolíticas, pero no reportó si el antígeno era degradado o solamente liberado de la bacteria en desintegración.

Dingle y Fothergill (20) encontraron que la adición de glucosa, la neutralización de la acidez y el aereamiento aumentaban al máximo el crecimiento bacteriano en medio líquido pero no reportaron la relación de estos con la producción del polisacárido capsular. Otros investigadores -- posteriormente, prepararon polirribitol fosfato empleando el procedimiento de Alexander (79) para permitir la liberación espontánea del antígeno hasta la desaparición de la cápsula como lo revela la reacción de Quellung.

Anderson y col. (4) encontraron que el contenido de pentosas en el sobrenadante parece ser una base sólida para la cuantificación del antígeno capsular en las preparaciones, haciendo las debidas correcciones por las alteraciones que puedan causar los ácidos nucleicos de células rotas en el medio. La liberación de estos ácidos logró disminuirse con la utilización de un medio preparado con cas aminoácidos y extracto de levadura, junto con glucosa y un amortiguador de fosfatos, el cual se ideó por varios hallazgos en sus experimentos:

1. Demostró que un cultivo de *Haemophilus influenzae* tipo b libera 23mg de polirribitol fosfato por mg - de células en el curso de cuatro a cinco días, cantidad que en dos días era la mitad, y al menos una cantidad de PRP permanecía asociada a la célula después de que determinaba la liberación.
2. Observó que la liberación de polirribitol fosfato (PRP) es muy lenta a 4°C y es más rápida a 37°C que a 25°C, esto solo varió en presencia de formaldehído.
3. La concentración de PRP alcanza un máximo que permanece constante varios días.
4. La adición de glucosa mayor del 1% estimula la producción de cápsula y el crecimiento bacteriano, la ribosa posee un efecto similar, y el ribitol no incrementa ni la síntesis, ni el crecimiento.
5. La adición de amortiguador de fosfato de sodio incrementa el rendimiento y la producción de la cápsula.
6. La liberación completa se realiza sin citólisis aparente.
7. El rendimiento de PRP por célula es un poco mayor - en medio líquido que en sólidos y semisólidos.
8. El material capsular aislado puede ser reducido de tamaño por incubación con suspensiones celulares - involucrando enzimas periplasmáticas. Dicha ruptura no es necesaria para el proceso de secreción. - Cantidades pequeñas de otros antígenos son liberados en el medio y ayudan al estímulo inmunológico.
9. La meta de estos experimentos es aplicar los resultados a otros polisacáridos capsulares bacterianos.



### J.3 Aislamiento del polisacárido capsular.

El polisacárido capsular parece ser el principal determinante de virulencia en infecciones sistémicas (1) y el reciente interés de usarlo como potencial inmunoprotector ha inducido esfuerzos para mejorar los métodos de purificación (57, 71).

En las primeras investigaciones para el aislamiento del polisacárido capsular del *Haemophilus influenzae* tipo b se utilizó la precipitación fraccionada de filtrados de líquidos de cultivo con solventes orgánicos, posteriormente se han usado precipitaciones múltiples (20) o electroforesis (78) para separar el antígeno de otros materiales precipitables en los cultivos.

Zamenhoff y Leidy (79) extrajeron el polisacárido capsular de bacterias suspendidas en medio líquido a partir de un medio sólido de la misma especie, reduciendo el volumen de trabajo y eliminando la mayoría de los contaminantes potenciales, utilizaron el dodecilsulfato de sodio para reducir las proteínas y el carbón para adsorber los ácidos nucleicos. Rodríguez y col. (59) aislaron el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b a partir de células preparadas de forma similar, por intercambio de iones o extracción con cloroformo.

Estos estudios han demostrado que el polisacárido capsular es sintetizado durante el crecimiento y en los primeros estadios de la fase estacionaria; para este tiempo la mayoría de los antígenos han sido liberados al medio (4). Por lo tanto el rendimiento óptimo se obtiene mediante el aislamiento del polisacárido capsular de los sobrenadantes de cultivo, el cual contiene otros materiales de la bacteria así como componentes del medio, necesarios para el crecimiento de *Haemophilus influenzae* tipo b.

El uso de la precipitación con detergentes de nitrógeno cuaternario para el aislamiento del polisacárido capsular fué introducido por Jaques y col. (30) y desarrollada ampliamente por Scott (65) principalmente con polímeros de tejidos animales y plantas; desde entonces este principio ha sido usado para el aislamiento de varios polisacáridos capsulares bacterianos, incluyendo cultivos totales de *Neisseria meningitidis* serotipos A, B y C (24) dando buenos resultados en las preparaciones de soluciones inmunológicamente activas de gran valor en el estudio de las respuestas del hospedero a la vacunación contra especies pirogénicas gram negativas.

Esta metodología se ha aplicado al aislamiento del polisacárido capsular del *Haemophilus influenzae* tipo b (5) encontrando que:

1. La adición de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HB) al cultivo en concentración suficiente para precipitar el polisacárido capsular causa la liberación de una cantidad abundante de material macromolecular que precipita también, por lo tanto es ventajoso adicionar el detergente al sobrenadante de cultivo celular y así evitar pasos posteriores de purificación.
2. Con este método se precipita al menos el 80% del polisacárido capsular junto con una cantidad proporcional de ácidos nucleicos.
3. Se precipitan casi el 10% de las proteínas sin evidente selectividad.
4. La concentración de proteína fácilmente se redujo por extracción con fenol frío sin pérdida del polisacárido capsular.

5. La extracción con fenol disminuye el porcentaje de lipopolisacáridos presentes.
6. Extracciones con sales de sodio y calcio eliminaron cierta cantidad de estas sustancias también.

La inmunogenicidad de un extracto con polisacárido -- bacteriano puede variar debido a su peso molecular (27) -- y/o por el contenido residual de agentes inmunoprecipitantes diferentes a los polisacáridos (68).

Todos los datos descritos anteriormente llevaron a -- Anderson e Insel (6) a proponer una técnica para la extracción del polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* - tipo b con la menor cantidad posible de proteínas y endotoxina, este extracto indujo anticuerpos contra PRP en conejos recién destetados y anticuerpos contra los componentes somáticos de *Haemophilus influenzae* tipo b principalmente contra lipopolisacáridos, además excedió en gran medida al PRP puro en la estimulación *in vitro* de la incorporación de timidina tritiada ( $H^3$ ) por leucocitos mononucleares de sangre humana.

En estudios posteriores estos autores determinaron -- los anticuerpos contra componentes somáticos bacterianos y ensayaron el extracto en adultos humanos voluntarios, inoculando por vía intramuscular, resultando que el extracto en adultos es aceptable si bien no se demostró un incremento notable en la inmunogenicidad de PRP, debido tal vez a que los experimentos se hicieron en adultos y la actividad de *Haemophilus influenzae* tipo b se manifiesta en niños -- cuya memoria inmunológica para los determinantes de PRP -- está poco desarrollada (6).

CAPITULO DOS

OBJETIVOS

El presente trabajo intenta obtener un extracto donde se encuentre la mayor cantidad de polirribitol fosfato --- (PRP) y pequeñas cantidades de protefna y endotoxina de -- *Haemophilus pleuropneumoniae* serotipo 5, a partir de los sobrenadantes de cultivo por medio de la precipitación con detergente catiónico (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y fraccionamiento por tamaño molecular del polisacárido -- capsular, extrayendo el precipitado con soluciones de cloruro de sodio progresivamente más concentradas siguiendo -- una técnica ya establecida, que ha servido para obtener el mismo extracto del *Haemophilus influenzae* tipo b.

Se probará la inmunogenicidad de la preparación resul-- tante mediante la inoculación en conejos adultos; inten-- tando con esto iniciar el estudio del antígeno capsular -- como una posible vacuna que proteja contra las infecciones causadas por *Haemophilus pleuropneumoniae*.

CAPITULO TRES

MATERIALES Y METODOS

A. CURVA DE CRECIMIENTO.

En un volumen de 50ml de casaminoácidos más extracto de levadura fresca se sembraron inoculos de *Haemophilus pleuropneumoniae* durante 8 horas a 37°C, de este crecimiento se hizo una dilución 1: 10 y se inoculo em matraces nefelométricos que contenian 250ml de medio fresco y estéril; los matraces se incubaron a 37°C con agitación a 100 rpm. Las lecturas de absorbancia se tomaron a diferenste intervalos de tiempo (41) a una longitud de onda de 550 nm.

B. EXTRACCION DEL COMPLEJO POLISACARIDO.

Reactivos.

- Medio de cultivo:

Casamyno Acyd Yeast (C Y / litro)  
Casaminoácidos ..... 10.0g  
Extracto de levadura' ..... 5.0%  
Glucosa ..... 5.0g  
Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2

- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HB)

- NaCl 0.2M, 0.4M y 1.0M

- Etanol al 65%.

### Procedimiento.

Para efectuar la extracción del complejo polisacárido se utilizó un cultivo de *Haemophilus pleuropneumoniae* serotipo 5 aislado de campo por el Dr. Gilberto Ochoa en la Unidad de Investigación y Estudios de Posgrado de la FES-Cuautitlán) en agar con casaminoácidos y extracto de levadura fresca al 5% (CY) que posteriormente se paso a medio líquido (seis litros), incubado durante 8 horas en agitación (fase estacionaria del cultivo), aplicando la técnica de Anderson (6) que se muestra en el diagrama de la figura 1 para recuperar la forma inmunogénica de PRP.

La técnica consiste en separar el paquete celular del sobrenadante y este último se precipita con el detergente catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio, el precipitado se extrae secuencialmente con NaCl a concentraciones crecientes de 0.2M a 1.0M, y los extractos se precipitan con etanol al 65% y se resuspenden en solución salina libre de pirógenos, los precipitados de los extractos se fraccionaron por centrifugación a 21000 x g durante 20 min. a 4°C y sus sobrenadantes ultracentrifugados a 200000 x g durante 3 horas 30 minutos para obtener las fracciones "PC-A" y "PC-B", que son las más ricas en PRP.

Figura 1. Diagrama de fraccionamiento de la fase estacionaria de un cultivo de *Haemophilus pleuropneumonicus* serotipo 5.

ppt. = precipitado

snd. = sobrenadante

HB = bromuro de hexadeciltrimetilamonio

PC = complejo polisacárido

Todo el procedimiento fue realizado a 4°C.

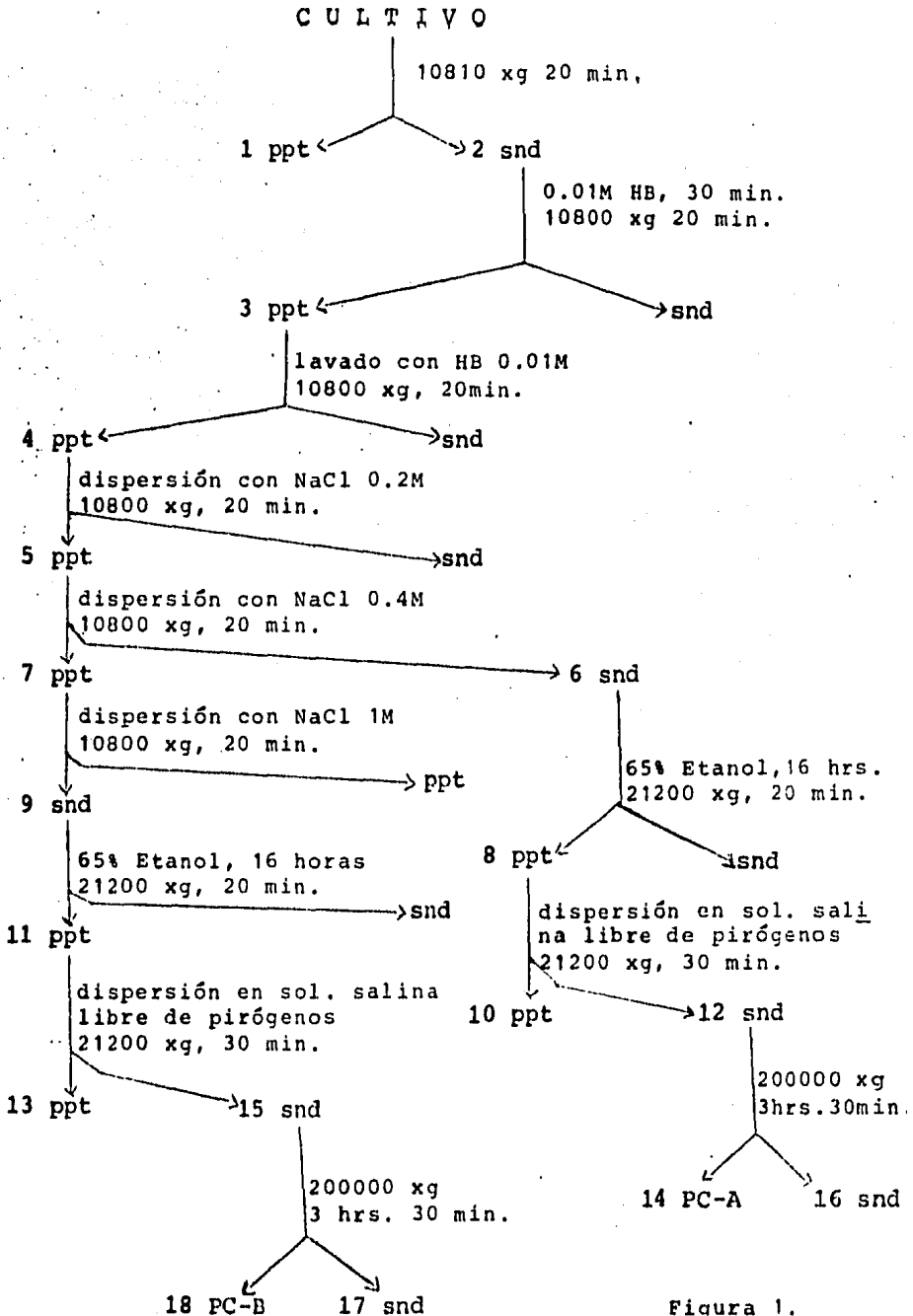


Figura 1.



### C. ANALISIS DE LAS FRACCIONES.

En las seis últimas fracciones incluyendo "PC-A" y -- "PC-B" se analizaron y se cuantificaron:

1. Proteínas por el Método de Kalb y Bernlohr (32).
2. Pentosas por el Método de Orcinol (8).
3. Endotoxina por el Micrométodo de gelación de lisado de amebocito de limulus (22, 60).
4. Electroforesis con gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) (37), revelando con nitrato de plata (2)

#### C.1 Determinación de Proteínas.

Método de Kalb y Bernlohr.- Una manera de determinar las concentraciones de proteínas en extractos libres de - células en forma rápida y precisa es usando la medición - de la absorbancia a 230 y 260nm., estas dos longitudes de onda disminuyen la interferencia por ácidos nucleicos y - dan una sencibilidad equivalente a la del método de Lowry (36), y es menos dependiente a los cambios de concentración de los aminoácidos de las proteínas que están cuantificándose.

Kalb y Bernlohr llegaron mediante la relación de las absorbancias de 230 y 260nm a una ecuación para obtener - la cantidad de proteínas en la muestra en microgramos por mililitro.

Procedimiento.

- a) Medir la absorbancia de las fracciones a 230nm.
- b) Medir la absorbancia de las fracciones a 260nm
- c) Realizar el siguiente cálculo:

$$183 A_{230} - 75.8 A_{260} = \text{microgramos/mililitro}$$

## C.2 Determinación de Pentosas.

Método de Orcinol.- La determinación de pentosas libres o fosforiladas en presencia de adenosina, AMP, ADP o ATP consiste en una hidrólisis alcalina preliminar de la muestra, que se realiza con una solución 0.1N de NaOH calentada a 100°C durante 5 minutos, donde las pentosas libres y fosforiladas se descomponen completamente, pero los azúcares unidos a purinas no son afectados; determinando el valor de orcinol antes y después del tratamiento con álcali.

### Reactivos.

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 10% en agua.

HCl concentrado.

Orcinol (5 metil- 1,3 dihidroxibenceno).

Etanol al 95%

NaOH 0.1N

### Procedimiento.

- a) A 1.5ml de la muestra se le adicionan 3 ml de un reactivo ácido preparado por la mezcla de 0.5ml de una solución al 10% de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 100ml de HCl.
- b) Se adiciona a la mezcla 0.2ml de una solución de orcinol al 6% en etanol al 95% preparada poco antes de usarse.
- c) La solución resultante se calienta en baño María durante 3 min. para la determinación cualitativa de pentosas o 20 min. para la determinación cuantitativa en las últimas condiciones la ribosa y la 3-fosfato ribosa desarrollan color de amarillo a verde.
- d) Las lecturas se toman en el punto de máxima absorbancia a una longitud de onda de 665nm.

### C.3 Determinación de Endotoxina.

Micrométodo de gelación de lisado de amebocito de *limulus*.- Esta prueba ha tenido mucha aceptación para la detección y ensayo de endotoxinas bacterianas en drogas parenterales y diversos medicamentos, comunmente la prueba se realiza en tubos de vidrio en los cuales a 0.1ml de la muestra problema se le adiciona 0.1ml del lisado de amebocito, y se incuba a 37°C durante 1 hora. La presencia de endotoxina causa la formación de un gel firme que puede detectarse fácilmente invirtiendo el tubo.

Estas pruebas tienen la ventaja de ser sencillas y de fácil interpretación de los resultados obtenidos, pero resultan muy caras en diluciones seriadas por el alto costo del reactivo.

Flower describió una modificación del método en tubo usando capilares de vidrio para leer los resultados después de la incubación de la mezcla en una placa de vidrio; Gardi y Arpagaus completaron la microtécnica mezclando directamente en el capilar 1 microlitro de la muestra con 1 microlitro del reactivo para la prueba, obteniendo los resultados al sumergir el capilar verticalmente en una solución coloreada; en presencia de endotoxina se forma un gel que impedirá el paso del colorante, en caso contrario el colorante subirá al capilar.

#### Reactivos.

Liofilizado de lisado de amebocito de *limulus*.

Liofilizado de endotoxina de *Escherichia coli*

Azul de bromofenol en una solución al 0.1% en un amortiguador etanol fosfato (22).

Agua libre de pirógenos (control negativo).

Procedimiento.

- a) En un capilar de 5 microlitros se absorbieron primero 1 microlitro de liofilizado de lisado de amebocito de limulus, y después 1 microlitro de la muestra problema; para mezclarlos bien el contenido fué soplado sobre un portaobjetos y reabsorbido en el mismo capilar.
- b) Los capilares se incubaron en posición horizontal en una cámara húmeda a 37°C durante 45 minutos.
- c) Para leer los resultados el capilar se sumerge verticalmente de 2 a 3 segundos en un tubo que contiene azul de bromofenol, a una altura de 6cm, si el colorante sube al capilar indica que no hay formación de gel por ausencia de endotoxina, siendo el resultado negativo; si el colorante no sube por la formación de un gel firme se considera que la muestra contiene endotoxina lo que indica que el resultado es positivo. (figura 2)

Previamente para poder establecer el límite de detección que tiene el lisado de amebocito de limulus utilizado se realizan diluciones seriadas de concentración conocida de un liofilizado de endotoxina de *Escherichia coli*.

MICROMETODO DE GELACION DE LISADO DE AMEBOCITO DE LINULUS

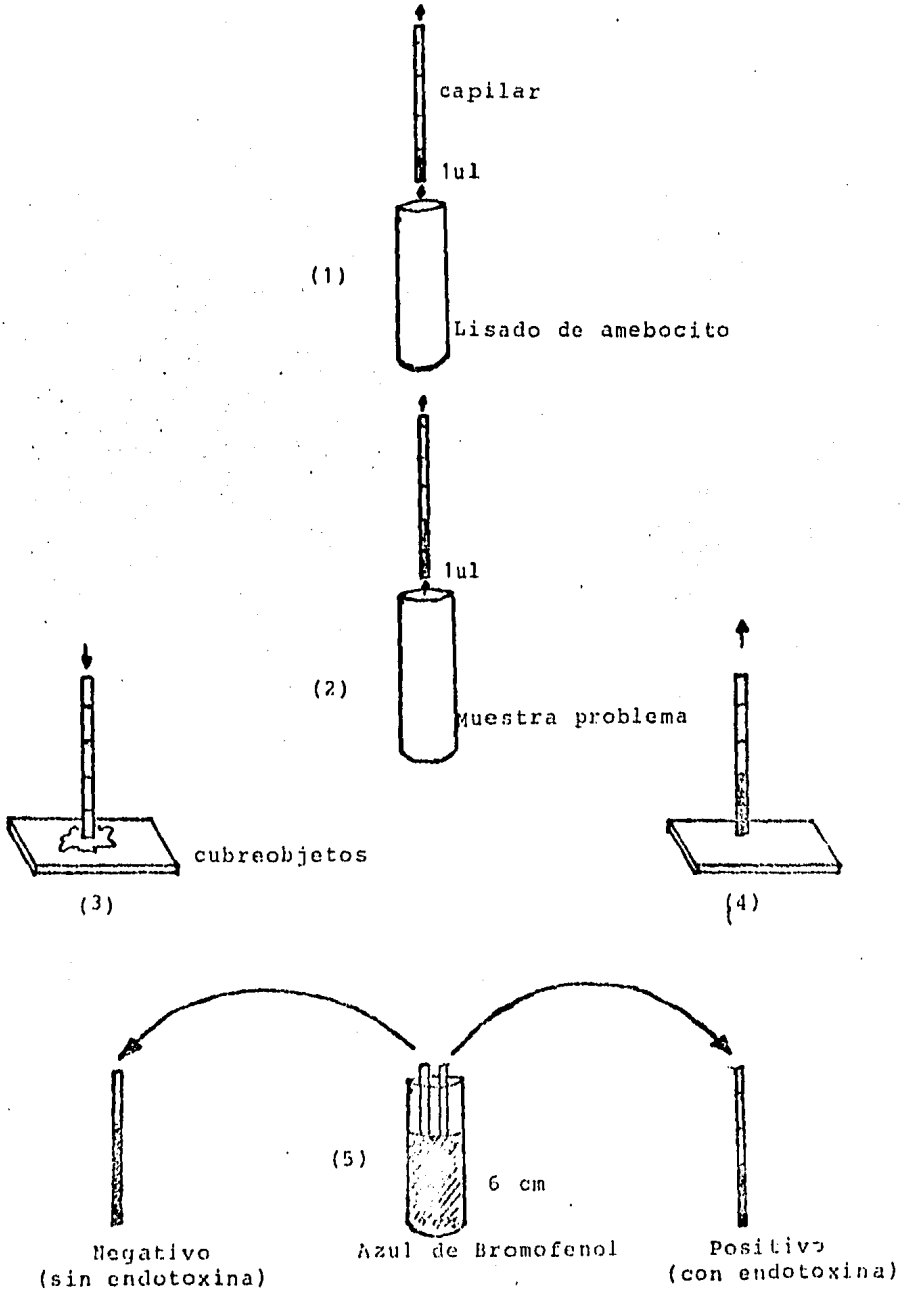


Figura 2.

#### C.4 Electroforesis.

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico. En la técnica convencional la corriente eléctrica es conducida por un amortiguador a través de un medio soporte tal como la acrilamida; la separación tiene lugar a un pH y fuerza iónica constante, los iones de la muestra se desplazan dependiendo de su carga neta hacia el ánodo o cátodo.

Geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

##### a) Gel de separación.

Reactivos.

Tris (Hidroximetilamino metano) 2M, pH 8.8

Dodecilsulfato de sodio (SDS).

Acrilamida (30% acrilamida y 0.8% bis acrilamida)

Persulfato de potasio (0.1g en 10ml)

TEMED (N N N' N' tetrametilendiamino)

Procedimiento.

Mezclar 6ml de Tris, 0.3ml de SDS, 7.5ml de acrilamida, 0.5ml de persulfato de sodio y 15.4ml de agua; el matraz que los contiene se conecta a una bomba de vacío por 5 minutos y posteriormente se adiciona el TEMED. La mezcla se vierte a la cámara de electroforesis rápidamente guardando una pequeña cantidad para observar el momento en que polimeriza.

b) Gel de condensación.

Reactivos.

Tris 2M, pH 6.8

SDS 10%

Acrilamida (30% acrilamida y 0.8% Bis acrilamida)

Persulfato de potasio (0.1g en 10ml de agua)

TEMED 0.1ml/ml

Procedimiento.

Mezclar 0.65ml de TRis, 10ml de SDS, 1ml de acrilamida, 1.05ml de persulfato de sodio y 7.1ml de agua en un matraz que se conecta posteriormente a una bomba de vacío durante 5 minutos; se adiciona el gel con la mayor rapidez quedando una pequeña cantidad en el matraz, se coloca el peine de 20 posiciones y cuando se observa en el matraz la polimerización se quita el peine quedando los pozos bien definidos.

c) Amortiguador.

Reactivos.

Tris

Glicina

SDS al 10% en agua

Procedimiento.

Mezclar 4.5g de Tris y 28.8g de glicina con 20ml de SDS al 10% y aforar a 2 litros.

d) Solución digestora.

Reactivos.

Tris

SDS

Glicerol

2-mercaptoetanol

Procedimiento.

Preparar 20ml de una solución con concentraciones finales de 0.125M de Tris, 2% de SDS y 10% de glicerol, a esta mezcla se le agrega 2.5% de 2-mercaptoetanol y 1% de rojo de fenol en concentraciones finales.

e) Preparación de las muestras.

Se colocan 200 microlitros de cada una de las muestras en tubos de ensaye debidamente etiquetados, se sumergen en nitrógeno líquido y se liofilizan. Una vez liofilizadas las muestras se les adiciona 25 microlitros de solución digestora, se resuspenden y se calientan en baño María durante 5 minutos, con la ayuda de una jeringa se colocan 25 microlitros de cada una de las muestras en los pozos. La electroforesis se realiza a 40 mA a temperatura ambiente.

f) Tinción de los geles con nitrato de plata.

Reactivos.

Metanol al 50%

Nitrato de plata

Hidróxido de sodio al 0.36%

Hidróxido de amonio 14.8M

Agua desionizada



Acido cítrico al 1%  
Formaldehído al 38%

Procedimiento.

Después de corrida la electroforesis el gel se sumerge en metanol al 50% durante 1 hora.

Preparación de soluciones.

Solución A. Se disuelve 0.8g de  $\text{AgNO}_3$  en 4ml de agua.

Solución B. Se mezclan 21ml de una solución al 0.36% de NaOH y 1.4ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  14.3M

Solución C. Se adiciona la solución A gota a gota en la solución B y se lleva a un volumen final de 100ml. Esta solución debe usarse dentro de los 5 minutos siguientes a su preparación.

Primero se tiñe el gel con la solución C durante 15 minutos manteniendolo en agitación, posteriormente se lava el gel con agua desionizada durante 5 minutos; después se revela el gel durante 15 min. en una solución de 0.25ml de formaldehído al 38% y 2.6ml de ácido cítrico al 10% en 500ml de agua y..

Finalmente el gel se lava con metanol al 50%.

g) Cálculo de la movilidad relativa de las proteínas.

La movilidad relativa de las proteínas contenidas en las muestras es el desplazamiento que sufren con respecto al corrimiento total de la muestra, obteniéndose bajo la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{d \text{ proteínas}}{d \text{ muestras.}}$$

$R_f$  = movilidad relativa

d proteínas = distancia recorrida por las proteínas

d muestras = Distancia recorrida por las muestras.

D. ANALISIS DE LA ANTIGENICIDAD DE LAS FRACCIONES.

Se utilizaron seis conejos de raza Nueva Zelanda -- adultos, con un peso promedio de 3Kg (3 machos y 3 hem-- bras), de los cuales dos se inocularon con la fracción -- PC-A, dos con la fracción PC-B y dos quedaron como con-- troles.

1. El inóculo se preparó mezclando 0.25ml de la frac-- ción PC-A o PC-B con 0.25ml de adyuvante completo de --- Freud inoculado por vía intramuscular. Siete días después se dió un refuerzo con 0.25ml de la fracción PC-A o PC-B por vía intramuscular sin adyuvante.

Quince días después de la primera inoculación se sangraron los conejos por vía intracardiaca, para deter-- minar el título de anticuerpos, dando a los 30 días otro refuerzo de 0.25ml por vía intranasal; la síntesis de -- este ensayo se muestra en la tabla siguiente:

CALENDARIO DE INOCULACION EN CONEJOS

D I A	I N O C U L A C I O N	V I A
0	0.25ml de la fracción "PC-A" o "PC-B" + adyuvante completo de Freud.	I M
7	0.25ml de la fracción "PC-A" o "PC-B" sin adyuvante.	I M
15	Sangrado para determinar el título de anticuerpos.	I C
30	0.25ml de la fracción "PC-A" o "PC-B"	I N
50	Desfío con un cultivo vivo de <i>Haemophilus pleuropneumoniae</i> (conc. $1 \times 10^9$ bacterias/mililitro).	I N
71	Sacrificio de los conejos para inspección de lesiones.	---

I M= Intramuscular

I N= Intranasal

I C= Intracardiaca

## 2. Determinación de Anticuerpos

La determinación de anticuerpos se realizó por los métodos de doble difusión y contrainmunolectroforesis.

### A. Doble difusión (método de Ouchterlony)

La doble difusión o método de Ouchterlony es la inmunodifusión en la que el antígeno y el anticuerpo difunden libremente en el gel; este método puede tener diversas aplicaciones, por ejemplo, la determinación de la posible relación inmunológica entre dos antígenos, el número de sistemas antígeno-anticuerpo presentes y la semicuantificación de antígeno o de su anticuerpo.

#### Reactivos.

a) Amortiguador

Tris 0.1M, pH 8.2

b) Gel de agarosa.

Agarosa 0.75g

Amortiguador 100ml

La solución se calienta a 90°C con agitación constante

c) Solución de lavado

NaCl 0.1M

d) Solución teñidora.

Azul de Coomassie 1g

Etanol 90ml

Acido acético 20ml

Agua 90ml

Esta solución puede usarse mucho tiempo después de su preparación.

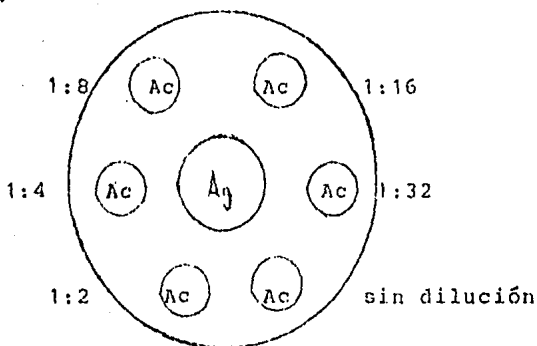
e) Solución decolorante.

Es la misma solución teñidora pero sin el azul de Coomassie.

### Procedimiento,

Para obtener un gel completamente homogéneo y uniforme las placas de vidrio (LKB 84 x 94 mm) se colocan sobre una base horizontal y nivelada; en el centro de cada placa se vierten 12ml de agarosa en solución que se difunde uniformemente.

Después de la gelificación se hacen cortes circulares con la ayuda de un sacabocados como se muestra en la figura siguiente:



En el pozo central se coloca la fracción PC-A o PC-B y en los pozos que lo rodean se colocan una serie de diluciones de antisueros de los conejos inoculados con las fracciones PC-A o PC-B y los sueros de los controles.

Las placas se mantienen en una cámara húmeda hasta la aparición de las bandas de precipitado; posteriormente se procede a teñir de 5 a 10 minutos con la solución D y finalmente se decolora.

El título de anticuerpos se interpretará como la última dilución de antisuero donde aparezca banda de precipitación.

## B. Contrainmunolectroforesis.

En la contrainmunolectroforesis, los antígenos y sus anticuerpos simultáneamente se someten a la acción de un campo eléctrico en un gel a pH 8.2; en estas condiciones los anticuerpos casi no tienen carga, por lo que no se desplazarían bajo el efecto de la corriente eléctrica, sin embargo se mueven hacia el cátodo debido al flujo endosmótico del regulador usado. Los antígenos que poseen carga negativa migran hacia el ánodo y mediante la disposición apropiada de los pozos en el agar se puede lograr que el antígeno y el anticuerpo se encuentren, reaccionen y se desarrollen bandas de precipitación en poco tiempo, dependiendo de la concentración y de la velocidad de migración de los reactivos.

### Reactivos.

Se utilizan los mismos que en el método de doble difusión.

### Procedimiento.

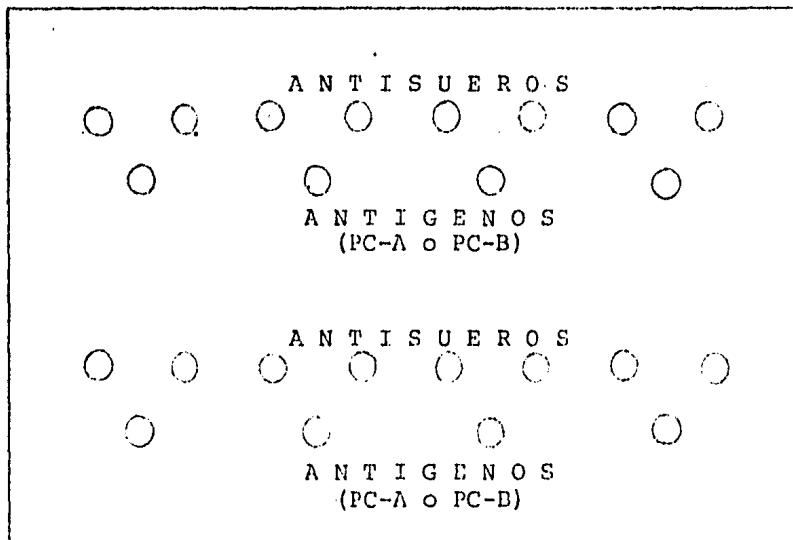
Se disuelve 1g de agarosa en el amortiguador (Tris 0.1M, pH 8.2) a la proporción 1: 100 (P/V).

Sobre las placas de vidrio (LKB 25 x 16.5cm) perfectamente desengrasadas se distribuye 65ml del gel; después de la gelificación se hacen cortes circulares de 3mm de diámetro a una distancia entre bordes de 5mm con la ayuda de un sacabocados. Los cilindros de agar del interior de la zona de corte se retiraron, creandose pozos perfectamente regulares dispuestos como se muestran en la figura.

Se coloca en un pozo la fracción PC-A o PC-B y en

cada uno de los dos pozos frontales se colocan diluciones de antisueros recolectados de los conejos que fueron inoculados con la fracción PC-A o PC-B y los sueros controles, después se lleva la placa al aparato de electroforesis y las cámaras laterales se llenan con el amortiguador, conectando la placa por medio de hojas de papel filtro humedecidas con el mismo amortiguador de la cámara; se conectó la fuente de poder y después de una corrida de 10 mA durante 60 minutos aparecen las bandas de precipitado, se saca la placa y se mantiene el gel en cámara húmeda durante 12 horas.

Se resuspende el gel 24 horas en solución amortiguadora salina fosfatada (PBS); la tinción se realizó en azul de Coomassie durante 5 minutos y se procede a decolorar el gel.





E. ENSAYO DE LA PROTECCION INDUCIDA POR LAS FRACCIONES.

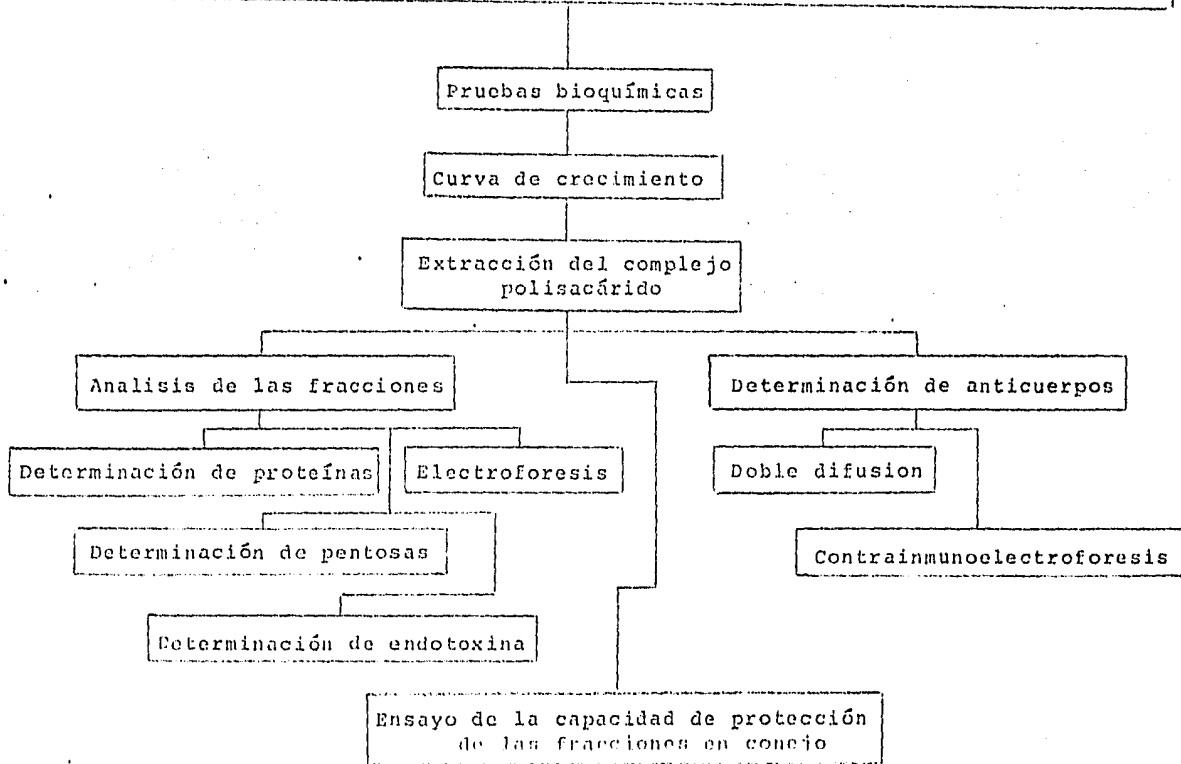
1. Técnica de desaffo.

La estandarización de la dosis bacteriana se realizó en base a la curva de crecimiento en medio de casamino-ácidos más extracto de levadura, obteniendo una concentración de  $1 \times 10^9$  bacterias/mililitro.

Se lavó la suspensión bacteriana tres veces con -- PBS 0.01M, pH 7.2 a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y a cada conejo se le inoculó 1ml por vía intranasal.

Los conejos se mantuvieron en observación midiendo la temperatura antes y después de la inoculación, se sa--- crificaron y se tomaron muestras de los pulmones para realizar exámen histopatológico.

Aislamiento y ensayo de la antigenicidad del polisacárido capsular del sobrenadante de un cultivo de *Haemophilus pleuropneumoniae* serotipo 5



CAPITULO CUATRO

RESULTADOS

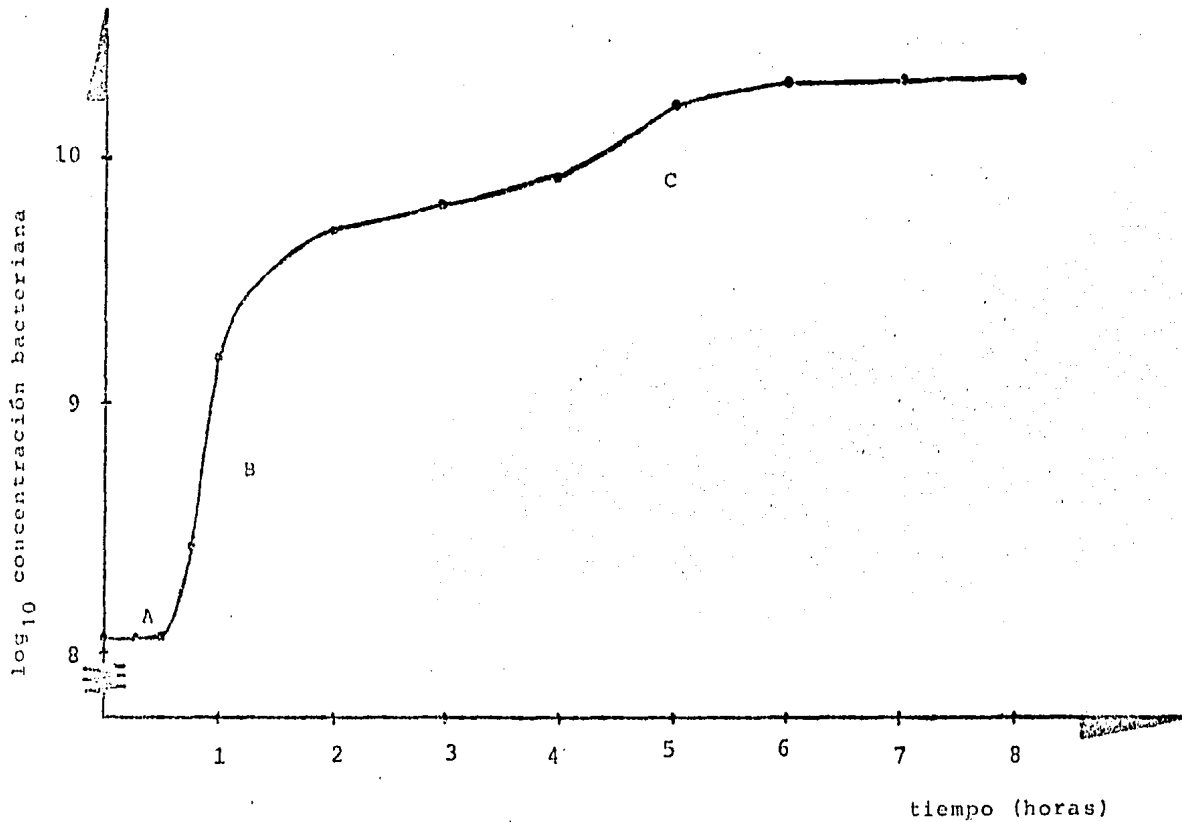
A. CURVA DE CRECIMIENTO.

En la tabla 1 se muestran los datos obtenidos de la -- curva de crecimiento para *Haemophilus pleuropneumoniae* sero tipo 5 en medio de cultivo CY.

Tiempo	Absorbancia 550 nm	log <sub>10</sub> de la conc. bacteriana	UFC/ml
0 min.	0.01	8.06	11.4 x 10 <sup>7</sup>
15 min.	0.01	8.06	11.4 x 10 <sup>7</sup>
30 min.	0.01	8.06	11.4 x 10 <sup>7</sup>
45 min.	0.03	8.43	26.9 x 10 <sup>7</sup>
1 hr.	0.16	9.20	15.8 x 10 <sup>8</sup>
2 hrs.	0.64	9.66	45.7 x 10 <sup>8</sup>
3 hrs.	1.23	9.81	64.5 x 10 <sup>8</sup>
4 hrs.	1.46	9.92	83.1 x 10 <sup>8</sup>
5 hrs.	1.48	10.20	15.8 x 10 <sup>9</sup>
6 hrs.	1.53	10.26	18.1 x 10 <sup>9</sup>
7 hrs.	1.53	10.26	18.1 x 10 <sup>9</sup>
8 hrs.	1.53	10.26	18.1 x 10 <sup>9</sup>

Tabla 1. Valores de la concentración bacteriana de la curva de crecimiento. Se utilizó un cultivo de *Haemophilus pleuropneumoniae* en medio CY líquido mantenido en agitación a 100 rpm y 36°C.

UFC= Unidades formadoras de colonia.



Curva de crecimiento de Haemophilus pleuropneumoniae

- A Fase de latencia
- B Fase logaritmica
- C Fase estacionaria

## B. EXTRACCION DEL COMPLEJO POLISACARIDO.

Al realizar la extracción, el detergente no se disolvió completamente en el sobrenadante de cultivo, sin embargo -- se fué eliminando conforme se realizaba el proceso, quedándose la mayor parte en la disolución en etanol. Los precipitados obtenidos en cada una de las etapas fuerón fácilmente disueltos en soluciones de NaCl.

Se obtuvo aproximadamente 0.5g de las fracciones PC-A y PC-B, precipitados de color grisáceo que se disolvieron en solución salina libre de pirógenos para realizarles un análisis composicional

C. ANALISIS DE LAS FRACCIONES

C.1 Determinación de Proteínas

La tabla 2 muestra la cantidad de proteínas presentes en las fracciones.

Fracciones	$\lambda=230$	$\lambda=260$	Conc. de Proteína ( $\mu\text{g/ml}$ )
pp. 10	0.780	0.966	0.093
pp. 13	1.404	1.186	0.223
snd. 16	1.314	2.640	0.054
snd. 17	3.050	3.170	0.423
PC-A (frac.14)	0.575	0.755	0.064
PC-B (frac.18)	0.768	1.489	0.036

Tabla 2. Concentración de proteína en las fracciones. La columna referida como "Concentración de proteína" muestra los resultados de la operación:

$$183 \lambda_{230} - 75.8 \lambda_{260} = \text{microgramos/mililitro}$$

Donde  $\lambda_{230}$  es el valor de la absorbancia a 230 nanómetros y  $\lambda_{260}$  es el valor de la absorbancia a 260 nanómetros de las fracciones.

C.2 Determinación de Pentosas,

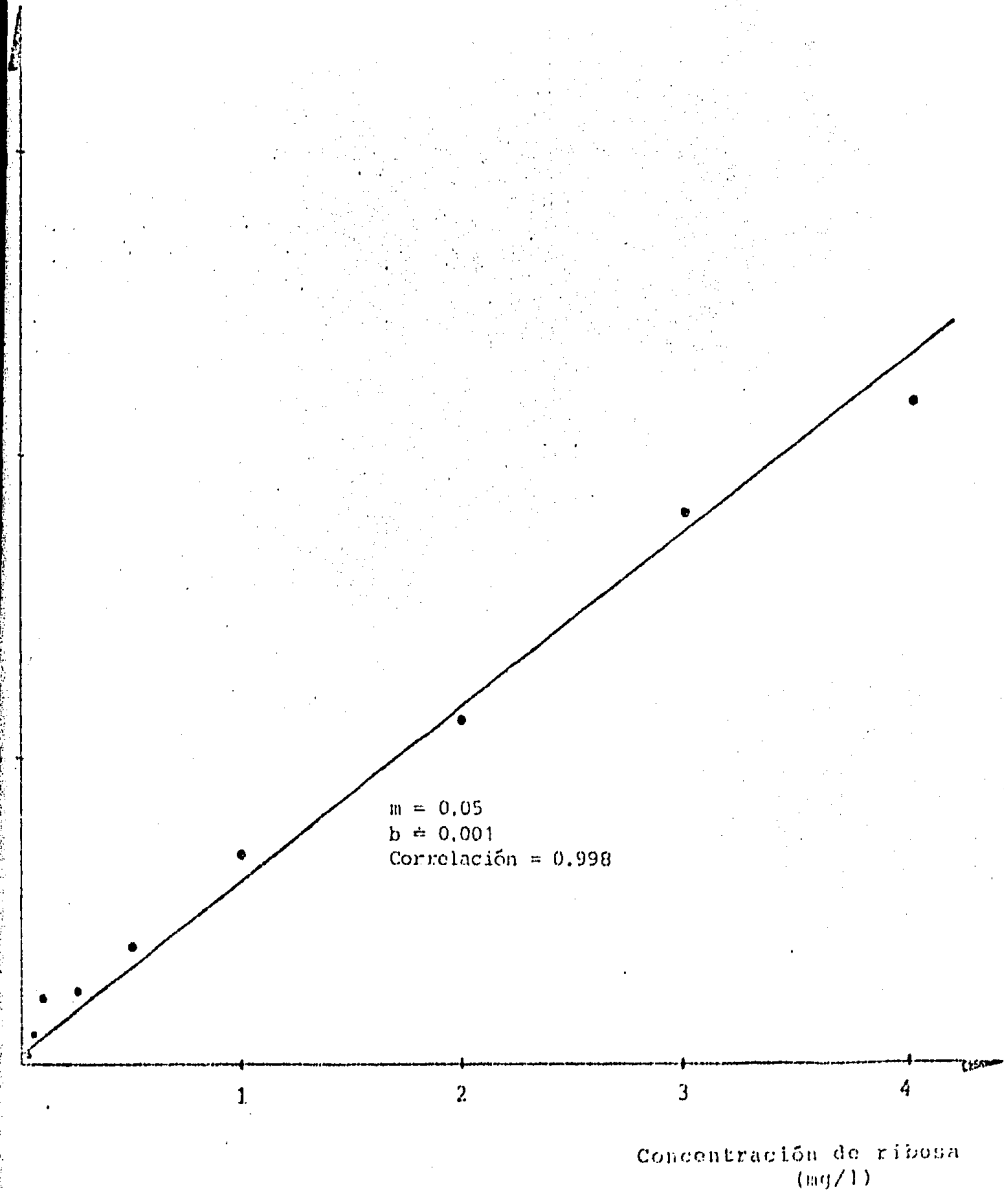
Valores de absorbancia de la curva patrón de ribosa utilizando el método de Orcinol.

Ribosa (mg/ l.)	Absorbancia ( 665 nm)
0.01	0.001
0.05	0.008
0.10	0.020
0.25	0.022
0.50	0.037
1.00	0.067
2.00	0.112
3.00	0.181
4.00	0.217
5.00	0.273

Tabla 3.

# CURVA PATRON DE RIBOSA

absorbancia





CANTIDAD DE RIBOSA EN LAS FRACCIONES

Fracciones	A	A'	A - A'	Ribosa (mg/·L)	Ribosa en la muestra ( mg. )
pp. 10	0.390	0.205	0.185	3.30	0.013
pp. 13	0.334	0.183	0.151	2.67	0.011
snd. 16	1.459	0.846	0.613	11.27	0.045
snd. 17	3.640	2.340	1.300	24.05	0.096
PC-A (frac.14)	1.193	0.709	0.484	8.88	0.035
PC-B (frac.18)	1.078	0.613	0.468	8.79	0.035

Tabla 4. Concentración de ribosa en las fracciones.  
 Con letra A se muestran los valores de absorbancia de las fracciones sin tratamiento con NaOH; con A' los valores de absorbancia después del tratamiento con NaOH 0.1N y la columna A - A' muestra las absorbancias detectadas sin la interferencia de ácidos nucleicos y derivados nucleotídicos.

### C.3 CURVA PATRON DE ENDOTOXINA

Dilución	Concentración de endotoxina	Control positivo E.coli ( µl )	Pirottest ( µl )	Resultados
Sin dil.	2 ng/ml	1	1	+
1: 10	200 pg/ml	1	1	+
1: 100	20 pg/ml	1	1	+
1: 500	4 pg/ml	1	1	+
1: 1000	2 pg/ml	1	1	+
1: 5000	0.4pg/ml	1	1	-
1: 10000	0.2pg/ml	1	1	-
Control negativo	-	-	1	-

Tabla 5.

El cambio de positivo a negativo se encuentra entre las diluciones 1: 1000 y 1: 5000 es decir entre 2 pg/ml y 0.4 pg/ml. La media de ambos valores es 1.2 pg/ml valor que tomaremos como cantidad mínima de endotoxina que puede detectar el litado de Limulus que usaremos.

DETERMINACION DE ENDOTOXINA EN LAS FRACCIONES

Dilucion	1: 10	1: 100	1: 1000	1: 10000	1: 100000
"PC-A"	+	+	-	-	-
"PC-B"	+	-	-	-	-

Tabla 6.

Sabiendo que el lisado de amebocito de limulus detectaba aproximadamente 1.2 pg/ml de endotoxina, podemos determinar la cantidad de endotoxina en las fracciones PC-A y PC-B. El siguiente cuadro resume dichos resultados.

Muestra	Primera dilucion con resultado negativo	Cantidad de endotoxina en las fracciones	
		( pg )	( ng )
"PC-A"	1: 100	480	0.48
"PC-B"	1: 1000	4800	4.8

Tabla 7.

#### C.4 Electroforesis.

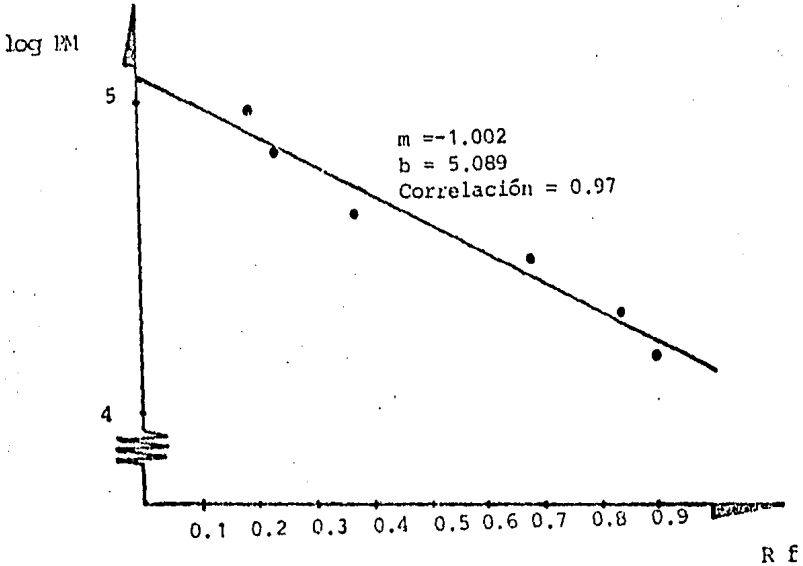
##### A) Curva patrón.

Para obtener la curva patrón se uso un equipo de calibración de Pharmacia Fine Chemicals, que contenía una serie de proteínas con peso molecular - determinado.

Proteína	Peso molecular	log PM	R <sub>F</sub>
Fosforilasa B (músculo de conejo)	94000	4.97	0.193
Albúmina sérica bovina	67000	4.83	0.232
Ovoalbúmina (huevo)	43000	4.63	0.372
Anhidrasa carbónica (eritrocito bovino)	30000	4.48	0.675
Inhibidor de tripsina (soya)	20100	4.30	0.846
Alfa lactoalbúmina (leche bovina)	14400	4.96	0.847

Tabla 8. Pesos moleculares y desplazamiento relativo de las proteínas utilizadas para realizar la curva patrón en una electroforesis en geles de poliácrilamida-dodecilsulfato de sodio, realizada a 40 mA, pH 8.3 a temperatura ambiente.

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR



En ésta gráfica se representa el desplazamiento relativo de las proteínas con respecto a su peso molecular, en una electroforesis en geles de poliacrilamida - dodecilsulfato de sodio.

voltaje = 40 mA

pH = 8.3

temperatura = 21°C

B) Análisis electroforetico de las fracciones.

De acuerdo a la gráfica de la curva patrón se realizó el análisis electroforetico de las seis últimas fracciones (figura 1), en el que se obtuvieron los pesos moleculares de las proteínas, registrados en las siguientes tablas:

$R_f$	$\log_{10} PM$	PM
0.057	5.03	107000
0.204	4.89	78000
0.227	4.86	72000
0.375	4.71	51000
0.614	4.47	30000
0.841	4.25	18000
0.909	4.18	15000
0.954	4.13	14000

Tabla 9. Pesos moleculares aproximados de las proteínas presentes en el precipitado 10.

$R_f$	$\log_{10} PM$	PM
0.047	5.04	110000
0.139	4.95	89000
0.186	4.90	79000
0.233	4.86	72000
0.279	4.81	65000
0.349	4.74	55000
0.477	4.61	41000
0.581	4.51	32000
0.605	4.48	30000
0.674	4.49	26000
0.791	4.30	20000
0.907	4.18	15000
0.953	4.13	14000

Tabla 10. Pesos moleculares aproximados de las proteínas presentes en el precipitado 13.

$R_f$	$\log_{10}$ PM	PM
0.163	4.93	85000
0.209	4.88	76000
0.233	4.86	72000
0.360	4.73	54000
0.628	4.46	29000
0.849	4.24	17000
0.895	4.19	16000
0.953	4.14	14000

Tabla 11. Pesos moleculares de las proteínas presentes en el sobrenadante 16.



$R_f$	$\log_{10}$ PM	PM
0.139	4.95	89000
0.209	4.88	76000
0.256	4.83	68000
0.372	4.74	53000
0.628	4.46	29000
0.860	4.23	17000
0.907	4.18	15000
0.965	4.12	13000

Tabla 12. Pesos moleculares aproximados de las proteínas presentes en el sobrenadante 17.

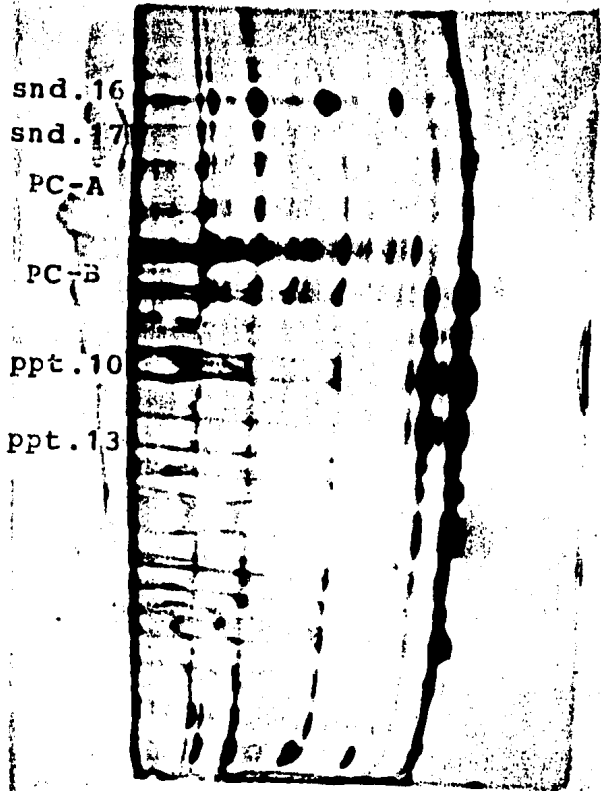
$R_f$	$\log_{10} PM$	P M
0.068	5.02	105000
0.205	4.88	76000
0.239	4.85	71000
0.364	4.73	54000
0.614	4.47	30000
0.795	4.29	20000
0.841	4.25	18000
0.898	4.19	16000
0.943	4.14	14000

Tabla 13. Pesos moleculares aproximados de las proteínas presentes en la fracción PC-A.

$R_F$	$\log_{10} PM$	PM
0.068	5.02	105000
0.114	4.98	96000
0.216	4.87	74000
0.250	4.84	70000
0.261	4.83	68000
0.284	4.81	65000
0.318	4.77	59000
0.386	4.70	50000
0.409	4.68	48000
0.709	4.39	23000
0.773	4.32	21000
0.818	4.27	19000
0.852	4.24	17000
0.886	4.20	16000
0.943	4.14	14000

Tabla 14. Pesos moleculares aproximados de las proteínas presentes en la fracción PC-B.

ELECTROFORESIS EN GEL SDS-PAGE



En esta exposición se muestran las bandas de proteínas de las fracciones ensayadas y del patrón de referencia.

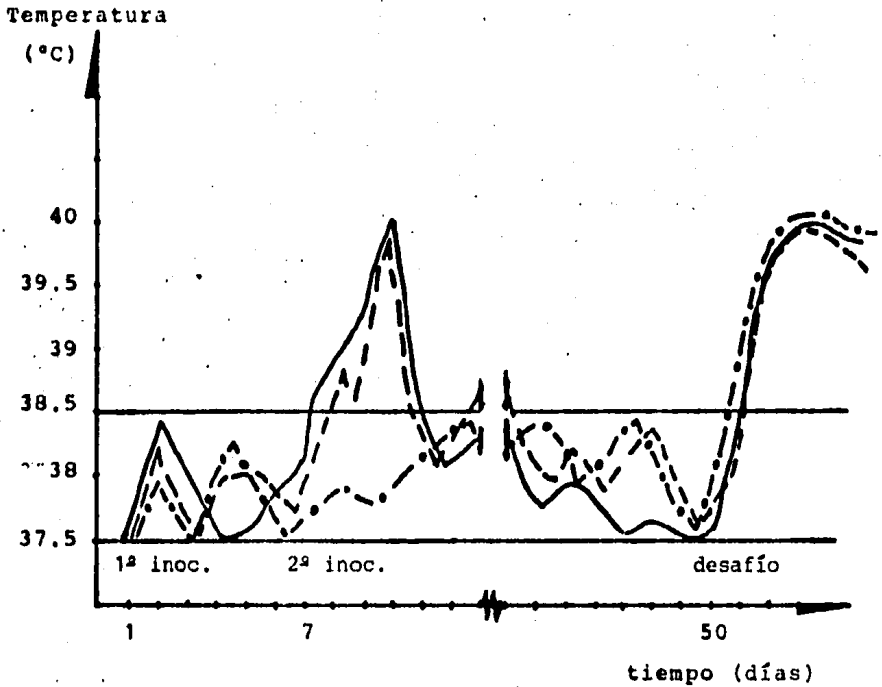
D. ANTIGENICIDAD DE LAS FRACCIONES

Conejos	Extracto	Título
1	PC-A	1: 16
2	PC-A	1: 16
3	PC-B	1: 8
4	PC-B	1:8
5	control	-
6	control	-

Tabla 15.

El título de anticuerpos se evaluó mediante pruebas de doble difusión (Ouchterlony) y contraelectroforesis.

CONTROL DE TEMPERATURA EN CONEJOS



En ésta gráfica se muestra las variaciones de temperatura en las etapas de inoculación y desafío.

- . - . - . - . Control
- - - - - PC-B
- \_\_\_\_\_ PC-A

R E S U L T A D O S

Fraccion No.	descripción	Proteína (mg/ml)	Pentosa (mg)	Endotoxina (ng)	Título de anti- cuerpos
10	precipitado obtenido de 21200 x g, 30 min.	0.093	0.013	NT	NT
13	precipitado obtenido de 21200 x g, 20 min.	0.223 x	0.011	NT	NT
16	sobrenadante después que la fracción 14 fué precipitada	0.054	0.045	NT	NT
17	sobrenadante después que la fracción 18 fué precipitada	0.423	0.960	NT	NT
14	precipitado de la -- frac.8 (200000 x g, 3 hrs.30min.) "PC-A"	0.064	0.035	4.8	1:16
18	precipitado de la -- frac.11 (200000 x g, 3 hrs.30min.) "PC-B"	0.036	0.035	0.48	1:8

NT= No tratado

Tabla 16. Resumen de resultados.

CAPITULO CINCO

DISCUSION

Anderson (4) estableció que el polirribofosfato (PRP) integrante de la cápsula bacteriana es sintetizado durante el crecimiento e inclusive en la fase estacionaria (en un medio bien amortiguado) siendo arrojado de la célula durante y al finalizar la síntesis, aparentemente sin citólisis y como una estructura muy grande. Los reportes de que este polisacárido puede inducir una respuesta de anticuerpos de larga vida sin una reacción adversa, que los anticuerpos opsonizan *in vitro*, y protegen a los animales de laboratorio apoyan la tesis de que la inoculación de éste confiere una inmunidad activa (3). Esta inmunidad se ha demostrado que potencializa un buen nivel, con la presencia en el inóculo de pequeñas cantidades de proteínas bacterianas y endotoxina (28).

El polisacárido capsular es precipitable a partir de los sobrenadantes de cultivo por medio de un detergente catiónico, al igual que los ácidos nucleicos, algunas proteínas y muy bajas cantidades de endotoxina (6), dando este procedimiento buenos resultados en la preparación de soluciones inmunologicamente activas que son de gran valor en el estudio de las respuestas a la vacunación contra especies pirogénicas gram negativas..

Aplicando esta metodología para el aislamiento del polisacárido capsular de *Haemophilus pleuropneumoniae*, encontramos que las proteínas presentes en los extractos



obtenidos están en muy baja cantidad, dentro de un amplio rango de pesos moleculares, tal y como se ha encontrado en extractos obtenidos con otras bacterias (6).

La electroforesis nos muestra que los extractos obtenidos contenían proteínas con pesos moleculares entre 13000 y 110000 daltons predominando en las últimas fracciones las de alto peso molecular; la mayor cantidad de bandas se encontró en los extractos tratados con NaCl 1M (precipitado 13 y PC-B), lo cual podría explicarse comprendiendo que el origen de ambos es el precipitado 7, el cual retiene gran cantidad de proteínas después de la extracción con NaCl 0.4M. Se ha logrado disminuir estos niveles de proteínas de los extractos con fenol frío (5).

La cantidad de PRP en los extractos la obtuvimos midiendo la concentración de pentosas en las muestras, método que ha dado buenos resultados en otros experimentos (4). Aplicando las modificaciones que propone Aswell (8) para eliminar la interferencia de los ácidos nucleicos que precipitan junto con el PRP, observamos que el material polisacárido en su mayoría fué obtenido de los extractos finales, lo que indica que la precipitación con detergente es un buen método para aislar el PRP del *Haemophilus pleuropneumoniae*, logrando aumentar el rendimiento si se estudian más profundamente los fenómenos de síntesis y liberación del polisacárido capsular de esta bacteria.

La cantidad de endotoxina presente en los extractos fué muy pequeña en comparación con la cantidad de endotoxina que puede causar daños en el organismo, este dato es clínicamente significativo y da buenas posibilidades de que este extracto pueda convertirse en un inmunógeno protector.

Se ha encontrado en otros experimentos que una traza de endotoxina presente en los extractos es inmunogénicamente muy activa (6), esto puede demostrarse en el título de anticuerpos obtenidos de la inoculación con PC-A (1:16) que es ligeramente mayor al que se obtuvo con PC-B (1:8) tal vez debido a la cantidad un poco mayor de endotoxina que presenta el primero.

En general los niveles de anticuerpos que se produjeron en las inoculaciones de PC-A y PC-B no fueron altos - probablemente debido a algunas de las siguientes razones:

- La relación de endotoxina-proteína-PRP no logró -- adecuarse para potencializar el efecto inmunogénico de la endotoxina y del polisacárido capsular.
- La inmunogenicidad del polisacárido capsular varía según su peso molecular (27) y el contenido residual de agentes inmunoprecipitantes como los lipopolisacáridos (endotoxina) (68).
- El conejo no es un modelo eficiente para detectar la inmunogenicidad del polisacárido capsular.

Las variaciones registradas de temperatura en el seguimiento de los efectos producidos por las fracciones -- inoculadas en los conejos presentaron elevaciones que --- coinciden con los días de inoculación de los extractos -- así como en el desafío de la bacteria viva registrándose en ambos casos la misma magnitud de temperatura, es decir tanto en los conejos inoculados con PC-A como con PC-B.

En el análisis histopatológico se observó que solamente en uno de los conejos inoculados con PC-A se encontró lesiones pulmonares, mientras que en los demás no se observó ninguna lesión.

Las lesiones de los pulmones del conejo inoculado con PC-A probablemente se debieron a que tenía mayor cantidad de endotoxina que la fracción PC-B. Lo anterior puede corroborar algunas observaciones en el sentido de que es la toxina bacteriana y no la bacteria la que causa los daños en el pulmón (9) y en general todas las manifestaciones de la neumonía causada por el *Haemophilus pleuropneumoniae* como un antígeno protector, sin embargo es necesario establecer el grado y condiciones óptimas para la liberación del PRP por la bacteria y repetir el experimento en cerdos para obtener más datos acerca del comportamiento del polisacárido capsular como inmunógeno.

CAPITULO SEIS

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un extracto que contiene alta concentración de polisacárido capsular y pequeñas cantidades de endotoxina y proteínas a partir de sobrenadante de cultivo de *Haemophilus pleuropneumoniae* serotipo 5 por medio de la precipitación con detergente catiónico y extracciones con NaCl y etanol.
2. La respuesta inmunológica que produce el extracto al inocularse en conejos no es muy buena, sin embargo se puede aumentar estudiando más profundamente los fenómenos de síntesis y liberación del polisacárido capsular de *Haemophilus pleuropneumoniae*.
3. El conejo no es un buen modelo para estudiar el grado de protección que produce el extracto obtenido, debe probarse en su hospedero natural para observar las posibilidades de producir una vacuna con él.
4. Es necesario realizar un balance de costo de producción y viabilidad de este inmunógeno para su aplicación como vacuna en la industria de la porcicultura.

B I B L I O G R A F I A

1. ALEXANDER, H. E. "*Haemophilus influenzae*" En: Dubos ed. Bacterial and micotic infections of man. Philadelphia, J. B. Lippincott, 1958, p. 470-485.
2. Analytical Biochemistry 118: 1981, p. 197-203
3. ANDERSON, P. A., G. Peter. y R. B. Jhonston. "Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of *Haemophilus influenzae* type b" Jour. Clin. Invest. 51: 1972, p. 39-44.
4. ANDERSON, P. A., J. Pitt y D. H. Smith. "Syntesis and release of polyribophosphate by *Haemophilus influenzae* type b *in vitro*" Infection and Immunity 13 (2): 1976, p. 581-589.
5. ANDERSON, P. A. y D. H. Smith. "Isolation of the capsular polysacharide from culture supernant of *Haemophilus influenzae* type b" Infection and Immunity 15: 1977, p. 473-477.
6. ANDERSON, P. A. y R. A. Insel "A polysacharide protein complex from *Haemophilus influenzae* type b: I. Activity in wealing rabbits and human t lymphocytes" Jour. Infect. Disceases. 144: 1981, p. 509-520.
7. ARGAMAN, M. "*Haemophilus influenzae*" Nashville, Tenn. niversity Press. 1973, p. 49-56
8. ASHWELL, G. Colorimetric analysis of sugars. Methods Enzimol. 3: 1957, p. 73-105.

9. BENDIXEN, H., P. E. Shewen. y S. Rosendal. "Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for porcine lung - macrophages peripteral blood monocytes and testicular cells" Infection and Immunity 33 (3):1981 p. 673-676.
10. BJORLUND, W. E. y B. Bernricso "Studies on pneumonia and atrophic rhinitis in pigs. On variation caused by enviroment breed and sex" Nord. Vet. Med. -- 17: 1965, p. 137-146.
11. BLAXTER, K. "The limits of animal production" Vet. Rec. 105: 1979, p. 5-9.
12. BURCH, D. "The incidence and distribution of lung lesions associated with enzootic pneumonia" Proceeding International. Pig. Vet. Cong. (1982: México).
13. BURTON, A. y G. Frase. Animal microbiology. Blackwell Oxford 1977.
14. CARTER, J. R. Essentials of Veterinary, Bacteriology and Micology. Michigan. Michigan State University Press. 1970, p. 183-185.
15. CABELL, D. H. Methods in Immunology. 2 ed. W. A. Benjamin. Inc. N. Y. 1970, p. 183-224.
16. CHAN, CH., K. Yamamoto. y S. Konishi. "Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from porcine pneumonia" Jap. Jour. Vet. Sci. 40: 103-107 1978
17. COWAN, S. T., y J. Steelśk. Manual for identification of medical bacteria . 2 th ed. Cambridge - Univ. Press. 1974, p. 137-142.

18. CRISEL, R. N., R. S. Baker y D. E. Dorman. "Capsular polymer of *Haemophilus influenzae* type b" Jour. Biol. Chem. 250 (13): 1975, p. 4926-4930
19. CRUZ J. G. y R. H. A. Martínez "Estudios sobre la -- respuesta inmune en cerdos inoculados con *Haemophilus parahaemolyticus*" México 1980 (Tesis MVZ) --- UNAM, FES-Cuautitlán.
20. DINGLE, J. H. y D. Fothergill "Purification of the - type pecific polysacharide from *Haemophilus in---* *fluenzae* type b" Jour. Immunol. 37: 1939, p. - 53-68.
21. DULBECCO, D., W. E. Ginsberg y col. Tratado de Microbiologia. Cap. 2 y 22 ed. Salvat. Barcelona España 1980, p. 25 y 256
22. GARD, A. y G. R. Arpagaus. "Improved microtechnique for endotoxin assay by the limulus amebocyte lysate test" Anal. Bioch. 109: 1980, p. 382-389.
23. GOIS, M., F. Kuska y F. Sisak. "Microbiological findings in the lungs of slaughther pigs". Proceeding International. Pig. Vet. Soc. Cong.
24. GOTSCHLICH, E. C., T. Y. Liu. y M. S. Artenstein. -- "Preparation an immunochemical properties of the - group B and group C meningococcal polysacharides" Jour. Exp. Med. 129: 1969, p. 1349-1365.
25. GUNNARSON, A., E. L. Biberstein. y B. Hurvell. "Sero logic studies on porcine strain of *Haemophilus --- parahaemolyticus (pneumoniae)*: Agglutination -- reactions" Amer. Jour. Vet. Res. 38: 1977, p. - 1111-1114.

26. HENRY, S. "*Haemophilus pleuropneumoniae* bacterins".  
Proceeding Minnessota. Pork Conference 1982, p. 106  
110.
27. HOWARD, D. G. "Treadmill neutralization of antibody  
and central inhibition separate components of neu-  
mococcal polysaccharide paralysis". *Ann. N. Y. ---  
Acad. Sci.* 191: 1971, p. 18-33.
28. HRDY, J. H., R. A. Goodman. y R. J. Wegrzyn. "Immu--  
nogenicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* vacci--  
nes in controlling laboratory induced. *Haemophilus  
pleuropneumoniae* nfection in swine". Elkhorn re---  
search center, shering animal haelth division; El-  
khorn, Nebraska. U.S.A.
29. HUNN, R. G. "Swine enzootic pneumonia: Incidence and  
rate of body wieght gain". Amer. Jour. Vet. Res.  
31: 1970, p. 1097-1108.
30. JAQUES, J. B., F. C. Monkhouse. y M. Stewart. "A me-  
thod for determination of heparin in blood". ---  
Jour. Physiol. 109: 1949, p. 41-43.
31. JERICHO, K. W. F. "Pathogenesis of pneumonia in pigs"  
Vet. Rec. 82: 1968, p. 509-516.
32. KALB, V. F. y R. W. Bernlohr. "A new spectrophotome-  
tric assay for protein in cell extracts". Anal.  
Bioch. 82: 1977, p. 362-371.
33. LANDQUIST, J. O. "Animal and enviroment in the pro--  
duction patterning pigs". Acta. Vet. Scan. Suppl.  
51: 1974.
34. LEMAN, A., G. Lack. y R. Penny. Diseases of swine 5a.  
ed. p. 365-375.



35. LITTLE, T. W. A. "Respiratory disease in pigs a study". Vet. Rec. 96: 1975, p. 540-544.
36. LOWRY, O. H., N. Y. Rosenbrough. y A. L. Farr. "Protein measurement with the folin-phenol reagent".--  
Jour. Biol. Chem. 193: 1951, p. 265-275.
37. MAIZEL, J. V. "Polyacrilamide gel electrophoresis of viral proteins". En Maramuroch, K. y A. Koprowski. methods in Virology. N. Y., Academic Press, 5: -- 1971, p. 179-246.
38. Manual de prácticas de inmunología. México, IPN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 1978, -- 141 p.
39. MAQUEDA, A. J. "Incidencia de neumonía enzootica en varios estados productores de cerdos de la República Mexicana". (1: 1977. México). México, AMVEC, - UAM. 1977.
40. Mac FADDIN, F. J. Prueba bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana, Buenos Aires, Argentina 1980, 274 p.
41. MILES, A. S. Misra. "The stimulation of the bactericidal power of the blood". Jour. Hgy. Camb. 38: 1938, p. 732.
42. MUIRHEAD, M. R. "Respiratory diseases of pigs". Er. Vet. Jour. 135: 1979, p. 497.
43. MYLREA, P., J. G. Fraser. y P. Mac Qucen. "Pleuropneumonia in pigs caused by *Haemophilus parahaemolyticus*". Aust. Vet. Jour. 70: 1974, p. 255-259.

44. NIELSEN, R. "Pleuropneumonia hos swin fremkaldt af *Haemophilus parahaemolyticus*". Nord. Vet. 22: 1970, p. 246-255.
45. NIELSEN, R. "Pleuropneumonia of swine caused by -- *Haemophilus parahaemolyticus*". Nord. Vet. Med. 23: 1972, p. 337-348.
46. NIELSEN, R. "Serological and immunological studies of pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus parahaemolyticus*". Acta. Vet. Scand. 15: 1974, p. 80-89.
47. NIELSEN, R, "Pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus parahaemolyticus*. Studies on the protection obtained by vaccination". Acta. Vet. Med. 23: 1976, p. 337-348.
48. NOGUEIRA, R. H. G., M. Rezende. y M. A. Chaquiloff. "Pulmonary lesions in swine; microbiologic and -- pathologic diagnosis in swine enzootic pneumonia in the state of Minas Gerais". Proceeding International. Pig. Vet. Soc. Cong. (IV:1982, México).
49. OCHOA G. "Aislamiento y caracterización de agentes bacterianos de pulmones neumónicos del cerdo". México, 1978. 1vol. (Tesis MVZ) UNAM Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
50. OLANDER, H, J. "A septicemic disease of swine and its causative agent *Haemophilus parahaemolyticus*". U. S. A., 1963 (Tesis Ph. D.) University of California, Davis.

51. PIJOAN, C., G. Ochoa. y D. Mendez. "Aislamiento de -  
*Haemophilus parahaemolyticus* en cerdos con neumo--  
nía". Tec. Mec. México. 34: 1978, p. 85-87.
52. PIJOAN, C., G. Cruz. y A. Martinez. "Protection and  
immunity obtained with a gel adyuvant bacterin of  
*Haemophilus pleuropneumoniae*". Proc IPVS. Cong.  
(1982 México).
53. PIJOAN, C., H. Hilley. y E. Straw. "Inactivation of  
*Haemophilus pleuropneumoniae* by embryo tracheal --  
explant". Proc. IPVS. Cong. p. 76 (1982 México).
54. PITTMAN, M. "A classification of the hemolytic bac--  
teria of the genus *Haemophilus*: *Haemophilus haemo--*  
*lyticus* Bergey et. al. and *Haemophilus parahaemo--*  
*lyticus*". Jour. Bact. 65: 1953, p. 750-751.
55. PITTMAN, M. "Variation and type specificity in the -  
bacterial species *Haemophilus influenzae*". Jour.  
Exp. Med. 53: 1931, p. 471-491.
- 55a. POHL, S., U. Berstchingen. y W. Frederiksen. "Trans--  
fer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteu--*  
*rella haemolytica* like organism causing porcine --  
necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobaci--*  
*llus* (*A. pleuropneumoniae*) on the basis of pheno--  
tipic and deoxyribonucleic acid relatedness". --  
Jour. Syst. Taxon. 33: 1983, p. 510.
56. RAMIREZ Necoechea, Ramiro. "Neumonía hemorrágica en  
cerdos: Neumonía por *Haemophilus parahaemolyticus*"  
México UAM Xochimilco, 197-, 7p.

57. ROBBINS, J. B., J. C. Parke, y R. Schneerson. "Quantitative measurement of natural and immunization-induced *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibodies". Pediatr. Res. 7: 1973 p. 103-110.
58. ROBBINS, J. B., R. Schneerson. y M. Argaman. Ann. Intern. Med. 78: 1973, p. 259-269.
59. RODRIGUEZ, L. P., R. Schneerson. y J. B. Robbins. -- "The isolation and some physiochemical, serologic and biologic properties of the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b". Jour. Immunol. 107: 1972, p. 1071-1079.
60. ROJAS Corona, R., R. Skarnes. y R. Tamakuna. "The -- limulus coagulation test for endotoxin. A comparison with other assay methods". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132: 1969, p. 599-601.
61. ROSEMBERG, E. y S. Zamenhoff. Federation Proceedings 19: 1960, p. 315.
62. ROSEMBERG, E. y S. Zamenhoff. "Further studies on -- polyribophosphate". Jour. Biol. Chem. 236:1961 p. 2845-2849.
63. ROSEMBERG, E. y S. Zamenhoff. Jour. Biol. Chem. - 237: 1962, p. 1040-1042.
64. SANFORD, E. "Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. Pathology, diagnosis and possible pathogenesis " Am. Ass. of swine Pract. Annv. Meeting. Iowa, U.S.A. 1982, p. 88-94.

65. SCOTT, J. E. "Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues". Methods. Bioch. Anal. 8: 1960, p. 145-197.
66. SHIEFER, B. Y J. Greenfield. "*Haemophilus parahaemolyticus* Saskatchewan II. Bacteriological and Experimental studies" Can. Jour. Comp. Med. 38: -- 1974, p. 105-110.
67. SCHNEERSON, R., M. Bradshaw. y J..K. Whisnant. Jour. Immunol. 108: 1972, p. 1551-1562.
68. SCHWAB, J. H. "Supresion of the immune response by - microorganisms" Bact. Rev. 39: 1975, p. 121-143.
69. SHOPE, E. "Porcine contagious pleuropneumonia I y II experimental transmission, etiology and pathology" Jour. Exp. Med. 19: 1964, p. 357-368.
70. SHULTZ, R. "Incidence of antibodies to and serotypes of *Haemophilus pleuropneumoniae*, in Iowa" Proc. IPVS. Cong. (1982 México).
71. SMITH, D. H., G. Peter. y D. L. Harding. "Children - immunized against *Haemophilus influenzae* type b" Pediatrics. 52: 1973, p. 637-644.
72. STRAW, B. E., J. Burgy. y D. Hilley. "Pneumonia an - atropic rhinitis in pigs from a test station" -- Jour. AVMA. 182: 1983, p. 607-611.
73. Serology of fungal infection and farmer lung disease A laboratory manual. The British Society for Mycopathology. 1976, p. 9-12.
74. TIELSEN, M. J. M. "Buildings, enviromental conditions and deseases". Proc. AUEA. and Prod. 1978, p. 747.

75. WALLENBORG, B. y U. B. Anderson. Immuno-electrophoretic techniques with the LKB 2117 multipor. Application laboratory LKB-produkter AB. Bromma, Sweden. Application note 249, 1978, 12p.
76. WATT, R. G. "Virological study of two comercial pig herds with respiratory disease" Res. Vet. Sci. 24: 1978, p. 147-153.
77. YSITA, M. B. y M. C. García. "Estudios sobre la obtención de mutantes estreptomycin dependientes de *Haemophilus pleuropneumoniae* con nitroso guanidina" México 1983 (Tesis QFB) UNAM, FES-Cuautitlán.
78. ZAMENHOFF, S., G. Leidy. y P. L. Fitzgerald. Jour. Biol. Chem. 203: 1953, p. 695-704.
79. ZAMENHOFF, S. y G. Leidy. Federation Proceeding. 13: 1954, p. 327.