



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores "CUAUTITLAN"

REPRODUCCION "IN VIVO" DEL CUADRO DE NEUMONIA  
FIBRINONECROTICA POR UNA TOXINA DE  
Haemophilus pleuropneumoniae  
SEROTIPO 5

**T E S I S**

Que para obtener el Título de  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P r e s e n t a n

**MARIA DE LA LUZ NOGUERA SUAREZ**  
**LUIS JULIO DE REGULES CHAVEZ**

Director de Tesis: M. en C. JOSE CAMACHO MACHIN



## **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.

# I N D I C E

	Página
R E S U M E N . . . . .	1
I N T R O D U C C I O N . . . . .	2
-- Etiología. . . . .	2
-- Epizootiología. . . . .	4
-- Patogenia. . . . .	5
-- Signos y Lesiones. . . . .	6
-- Diagnóstico y Tratamiento. . . . .	7
-- Control. . . . .	8
 TOXINAS BACTERIANAS	
-- Exotoxinas y Endotoxinas. . . . .	10
-- Obtención y Purificación de exotoxinas bacterianas. . . . .	12
 O B J E T I V O S . . . . .	14
 M A T E R I A L Y M E T O D O S	
-- Caracterización bioquímica de <u>H. pleuro pneumoniae</u> . . . . .	15
-- Curva de crecimiento para <u>H. pleuropneumoniae</u> . . . . .	16
-- Crecimiento masivo de la bacteria. . . . .	16
-- Microfiltración. . . . .	17
-- Electroforesis en gel SDS - poliacrilamida. . . . .	18
-- Prueba piloto de toxicidad. . . . .	25

	Página
- Cromatografía de exclusión molecular. . .	26
- Electroenfoque analítico en gel de poli acrilamida. . . . .	26
- Prueba final de toxicidad. . . . .	29
- Determinación de proteínas. . . . .	32

## RESULTADOS

- Concentración de proteína del sobrena - dante de cultivo de 18 horas. . . . .	34
- Curva de crecimiento. . . . .	34
- Cantidad de proteína durante las dife - rentes etapas de concentración del so - brenadante de cultivo masivo. . . . .	38
- Electroforesis en gel SDS - poliacril - amida. . . . .	39
- Cromatografía de exclusión molecular. . .	42
- Electroenfoque analítico. . . . .	42
- Pruebas de toxicidad en conejos. . . . .	42

D I S C U S I O N . . . . .	52
-----------------------------	----

C O N C L U S I O N . . . . .	57
-------------------------------	----

B I B L I O G R A F I A . . . . .	58
-----------------------------------	----

## RESUMEN

En éste trabajo, fué posible concentrar, purificar y caracterizar, de un sobrenadante de cultivo masivo de Hae mophilus pleuropneumoniae serotipo 5 (cepa 8022), una EXO TOXINA; para ello fué necesario efectuar un crecimiento masivo de la bacteria hasta finalizar su fase logarítmica de crecimiento. Una vez realizado esto, se separó el microorganismo del medio de cultivo por centrifugación a 4°C, esterilizando por filtración el sobrenadante obtenido. Para concentrar los solutos protéicos de interés (pe so molecular mayor 10 000 d) presentes en el sobrenadante de cultivo, se efectuó un proceso de microfiltración; ya concentradas al máximo estas proteínas, fueron liofilizadas. Las proteínas presentes en el liofilizado crudo, fueron ensayadas por electroforesis en geles SDS - poliacrilamida al 5% y 10% para determinar su peso molecular, detectandose al final del experimento, solamente una proteína monomérica de Peso Molecular aproximado a 14 000 d. La exotoxina fué separada de los solutos proteicos residuales de Peso Molecular menor de 10 000 d, que no pudieron ser excluidos en el proceso de microfiltración, utilizando el método de cromatografía de exclusión molecular. Por la técnica de electroenfoque analítico en gel de poliacrilamida, pudo determinarse el punto isoeléctrico de la exotoxina, resultando ser a un pH de 4.2

La toxicidad de la exotoxina aislada, fué probada en conejos raza California, los cuales fueron inoculados intranasalmente con la toxina cruda (liofilizado crudo) y purificada, de acuerdo a un calendario de inoculación. Observandose al final del experimento, que dicha exotoxina no fué capaz de desarrollar la Neumonía fibrinonecrótica característica en cerdos infectados experimentalmente con el sobrenadante de cultivo de H. pleuropneumoniae libre de bacterias; pero sí resultó ser tóxica por sí misma para los pulmones de los conejos inoculados con la exotoxina cruda y purificada.

Con los resultados de éste trabajo, se puede presumir que uno de los mecanismos que contribuyen a la patogenicidad de H. pleuropneumoniae, es su capacidad de producir una exotoxina.

## INTRODUCCION

Las cuantiosas pérdidas económicas ocasionadas por las infecciones respiratorias de Haemophilus pleuropneumoniae, han motivado a muchas comunidades científicas mexicanas y de otros países del mundo, a realizar investigaciones sobre la pleuropneumonia fibrinonecrótica en cerdos, con el objeto de conocer entre otras cosas la patogenia y posibles formas de control de esta enfermedad. Desafortunadamente se conoce relativamente poco de la enfermedad, por lo que aún no ha sido posible elaborar toxoides, vacunas vivas atenuadas, o bacterinas, capaces de prevenirla totalmente.

El nombre del género Haemophilus proviene de su necesidad de sangre (en griego haeimā, sangre; phyllus, amante). Fue aislado por primera vez en 1892 por Pfeiffer. Actualmente se le reconoce como patógeno primario y está implicado en varias condiciones patológicas en el hombre y varias especies animales (12, 14).

El género Haemophilus está constituido por bacilos Gram negativos con un requerimiento para NAD (factor V) y/o hemina (factor X) (12, 13, 20, 32).

Algunas especies del género Haemophilus son parásitos de las mucosas del hombre y aparecen como un constituyente de la flora microbiana normal del tracto respiratorio alto y menos extensivamente en las mucosas de órganos genitales; esto mismo parece ser verdad para los cerdos, aves, gatos, ratas, ratones cobayos, venados, borregos, perros y changos (21).

El género Haemophilus contiene algunos de los más importantes microorganismos patógenos primarios en cerdos (31): Haemophilus pleuropneumoniae, Haemophilus suis y Haemophilus para-suis.

Las infecciones respiratorias por H. pleuropneumoniae, fueron descritas por primera vez en Argentina (Shope 1963) (14). En México el primer aislamiento reportado correspondió a un brote en Tlaxcala en 1978 (42).

### Etiología.

Haemophilus paraahaemolyticus (Pittman 1953), actualmente

llamado Haemophilus pleuropneumoniae (Shope 1964), es un bacilo pleomórfico capsulado, principalmente cocobacilo Gram negativo (longitud de 3 a 8  $\mu\text{m}$  y diámetro de 0,3 a 0,6  $\mu\text{m}$ ), inmóvil, no esporulado, anaerobio facultativo. Al igual que otros microorganismos Gram negativos posee una pared celular compuesta entre otras cosas, por complejos de lipopolisacáridos (LPS) o endotoxina (47). Para su aislamiento requiere del factor V (NAD), pero no del factor X (hemina).

Sus características bioquímicas son:

Catalasa	*	Reducción de nitratos	+
Oxidasa	*	Esterasas	+
Sulfhídrico	-	Lactosa	-
Indol	-	Manitol	+/-
Ureasa	+	Xilosa	+/-
Fosfatasa alcalina	+	Desoxirribosa	+/-
Ornitin descarboxilasa	-	Acido de glucosa	+
Hemólisis	+	Gas de glucosa	+
Alfa - glucosidasa	-	Acido de sacarosa	+

\* dudoso (22, 29, 42)

La actividad hemolítica beta de H. pleuropneumoniae, utilizando cepa nodriza de Staphylococcus aureus, se ha demostrado en agar sangre de ternera, carnero, humano, conejo, aves de corral y caballo; siendo el agar sangre de ternera el más sensible para la detección de dicha actividad (21). Sin embargo, se ha observado que dicha actividad hemolítica se pierde después de varios pases sucesivos (14).

El crecimiento de H. pleuropneumoniae en agar sangre con cepa nodriza y en otros medios de cultivo enriquecidos con NAD (BHI más 10% de extracto de levadura fresca), se caracteriza por la formación de colonias redondas, pequeñas (0.5 a 1 mm de diámetro), convexas y con fuerte iridiscencia (14).

Se han reconocido 7 serotipos de H. pleuropneumoniae basados en sus diferencias antigénicas capsulares, entre los que predominan:

SEROTIPO

LUGAR DE AISLAMIENTO

- 1 Argentina, Australia, Canada, E.E.U.U., Holanda y Suiza.
- 2 Dinamarca, Canada, Inglaterra, Suecia y Suiza.
- 3 E.E.U.U., Inglaterra, Suecia y Suiza.
- 4 E.E.U.U., Francia, Suecia y Suiza.
- 5 Bélgica, Canada, E.E.U.U., Finlandia, - Holanda y Taiwan.
- 6 Dinamarca y Canada.
- 7 Dinamarca y Canada.

(14, 15, 45, 46)

Epizootiología

Actualmente las infecciones respiratorias por H. pleuro-pneumoniae solo han sido reportadas en cerdos, en los que la edad más afectada es de 10 a 12 semanas, aunque cualquier edad es susceptible (55).

La enfermedad puede ocurrir en forma aguda (extensión fibrinohemorrágica), la cual presenta una mortalidad alta que puede variar de 0.4 a 100%, dependiendo de la situación en particular. En la forma crónica (localizada y necrozante), disminuye la calidad en crecimiento de los animales e incrementa su costo de producción (19, 45, 48).

Las infecciones por H. pleuropneumoniae están ampliamente distribuidas y han sido reportadas en diferentes lugares del mundo: México (Pijoan A.C., Ochoa U.G. 1978), Taiwan (Wang C.N. 1975), Bélgica (Derijcke 1978), Escocia (Morgan J.H. 1978), E.E.U.U. (Cole J.R. 1978), Hungría (Szazados I. 1979), Inglaterra (Perrin G.G. 1979), Yugoslavia (Sanker S. 1980) y otros más.

La transmisión de la infección de cerdo a cerdo es debida a la proximidad entre animales de una granja; la transmisión entre granjas ocurre a través de la introducción de animales crónicamente infectados en una población sin previa experien-

cia con la enfermedad, facilitando la propagación del microorganismo, de tal forma que el brote se presenta súbitamente, detectándose por la muerte de algunos cerdos en la granja (8, 14).

Entre los factores que predisponen a los problemas respiratorios en cerdos, tenemos: cambios bruscos de temperatura, malas condiciones de higiene, adquisición de nuevos animales, humedad relativa y viento. Algunos autores consideran que el factor más importante es la densidad de población animal (8).

## Patogenia

H. pleuropneumoniae penetra por vía aérea (28, 35, 50) y las evidencias disponibles sugieren que la enfermedad ocurre cuando el invasor escapa a los mecanismos de respuesta inmunológica del tracto respiratorio alto, permitiendo la multiplicación del microorganismo a nivel alveolar. Esto seguido de su inactivación, ya sea en forma espontánea o después de su interacción con los macrófagos alveolares, para los que resulta citotóxico (2, 45).

Se ha sugerido que si la toxicidad de H. pleuropneumoniae para macrófagos alveolares de pulmón de cerdo, demostrada in vitro, prevalece también in vivo, esto podría contribuir al curso rápido y fulminante de la enfermedad (2).

Usualmente, el estado de portador dura menos de 4 meses (15).

En los aislamientos microbianos obtenidos a partir de pulmones neumónicos, se ha encontrado H. pleuropneumoniae sólo o en compañía de Pasteurella multocida, esto sugiere que H. pleuropneumoniae es capaz de producir suficiente daño en el pulmón, que eventualmente permite a P. multocida producir una neumonía aún más severa, fatal en algunos casos (2, 26).

Stanford en 1982, demostró que la endotoxina (LPS) puede causar trombosis vascular con vasculitis, exudación de fluido edematoso hemorrágico y además, que las enzimas lisosomales proteolíticas, liberadas por los macrófagos alveolares, pueden contribuir a las lesiones observadas (47, 48).

Los sobrenadantes del medio de cultivo de H. pleuropneumoniae libres de bacterias, o la bacteria no viable sonicada, pueden inducir neumonía localizada, la cual es similar microscópicamente a la causada en cerdos infectados experimentalmente con

la bacteria viable. Además, se ha probado que la bacteria muerta por calentamiento pierde su citotoxicidad (2, 45).

Por todo lo anteriormente mencionado, se ha sugerido que la patogenia de H. pleuropneumoniae, está probablemente asociada a la actividad metabólica de la bacteria (exotoxinas y/o endotoxinas).

La toxicidad asociada a los sobrenadantes de cultivo de H. pleuropneumoniae, a la bacteria no viable sonicada y a la bacteria viable, puede ser neutralizada por sueros de cerdos recuperados de la enfermedad (45).

### Signos y Lesiones.

Según el estado de inmunidad del cerdo, el curso clínico de la enfermedad puede ser:

- Hiperagudo: Membranas fibrinosas cubriendo la pleura.
- Agudo: Lesión pulmonar extensiva y fibrinohemorrágica.
- Crónico: Lesión pulmonar localizada y necrozante.

(8, 14, 54).

Los signos clínicos de la enfermedad pueden ser: Anorexia, tos, vómito, hemorragias por boca y nariz, debilidad general, temperatura y notable incremento del sonido vesicular (49, 54).

Las lesiones observadas en estudios postmortem, están restringidas al aparato respiratorio, siendo estas: pleuritis fibrinosa, áreas de infarto, pulmones extremadamente congestionados, lesiones fibrinosas que complican los lóbulos diafragmáticos y en menor grado los lóbulos anteriores (19, 32, 48).

Los hallazgos histopatológicos muestran grandes acúmulos de células, principalmente linfocitos y macrófagos, y en menor cantidad polimorfonucleares, especialmente en el fluido edematoso del septo interlobular. Los cambios histopatológicos son: bronconeumonía descamativa - proliferativa con pleuresia fibrinosa. En los casos fatales, los bronquios y tráquea se hallan obstruidos con fluido sanguinoliento y exudado mucoso. En la mayoría de los casos crónicos, se observa formación de nódulos, áreas de necrosis y adhesiones pleurales (14, 15, 17).

## Diagnóstico y Tratamiento.

El diagnóstico constituye un factor esencial en los estudios epizootiológicos y en el control de la pleuropneumonia fibrinonecrótica en cerdos (33, 46). Este puede realizarse por observación directa de las lesiones patognomónicas en exámenes postmortem. En los rebaños de engorda crónicamente infectados, las adhesiones pleurales y la necrosis, pueden ser sugestivas, aunque hace falta el diagnóstico bacteriológico. El agente infeccioso en algunas ocasiones puede ser aislado de las adhesiones pleurales y/o de las tonsilas, hasta 4 meses después de la infección (15, 17, 48).

La detección de anticuerpos contra H. pleuropneumoniae, - puede efectuarse por la prueba de fijación de complemento. Esta prueba ha sido el método de elección, sin embargo, su ejecución presenta dificultades técnicas, debidas principalmente a la actividad anticomplementaria del suero de cerdo, lo que impide una interpretación correcta de los resultados (15, 33).

La técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes ha resultado ser serotipo - específica y por lo tanto, puede ser útil para la mera detección de las infecciones por H. pleuropneumoniae, remplazando a las pruebas de aglutinación o inmunodifusión, ya que entre otras cosas, los resultados pueden obtenerse después de 3 ó 4 horas. Sin embargo, no se han realizado estudios sobre posibles reacciones cruzadas con otras bacterias comúnmente asociadas con neumonía en cerdos (P. multocida, Bordetella bronchiseptica, y otras más), por lo que ésta prueba aún no resulta muy confiable (46).

A partir de 1981, la prueba de ELISA ofrece una interesante alternativa a la prueba de fijación de complemento, estableciendo un gran campo de aplicación para la detección de anticuerpos contra H. pleuropneumoniae (33).

En la práctica clínica, las combinaciones a base de sulfas (sulfametacina, sulfameracina, sulfadiazina), y antibióticos de amplio espectro, han resultado ser útiles en el tratamiento, - sin embargo, su costo es muy elevado. La penicilina es la droga de elección en el tratamiento parenteral de la pleuropneumonia. Como segunda opción se cuenta con: cloranfenicol, tetraciclinas y furazolidonas. La estreptomycinina y los macrólidos son poco recomendables (14, 34, 54).

## Control

Se ha observado, que al provocar la neumonía experimentalmente por vía intranasal, y después desafiar con la misma cepa, hay protección y transferencia de anticuerpos de madre a hijos (37). Esto sugirió que la vacunación contra la infección por H. pleuropneumonia podría ayudar en el control de la enfermedad. Debido a esto, se han elaborado una gran variedad de bacterinas, de las cuales, la que mejores resultados ha proveído, es la que emplea un cultivo de H. pleuropneumoniae de 6 horas inactivado con formalina más un adyuvante (completo de Freud o Tween 80) - (45). Se ha obtenido una mejor protección con bacterinas más adyuvantes oleosos y no con adyuvantes de gel (19, 36). El modo de acción de los adyuvantes oleosos no está completamente entendido, pero las evidencias obtenidas indican que la mayoría de ellos actúan incrementando la función de macrófagos y células T. Esto aunado a los hallazgos histopatológicos que muestran infiltración linfocitaria en las áreas lesionadas, sugiere que la inmunidad celular tiene un papel importante en las defensas del huésped contra la infección por H. pleuropneumoniae (37, 41, 43).

La inmunidad obtenida por una bacterina con células completas, ha resultado ser más efectiva que la vacuna preparada a partir de material capsular, quizá por tener determinantes antigénicos de los cuales carecen las vacunas capsulares (36).

La respuesta celular de cerdos vacunados o infectados experimentalmente es intensa, además, la cantidad de anticuerpos e inmunidad celular producida por la vacunación, es similar a la obtenida por la infección experimental, por lo que se ha sugerido que los títulos de anticuerpos obtenidos por vacunación no son lo suficientemente fuertes como para prevenir la infección (19, 41).

En conclusión las bacterinas producidas hasta la fecha sólo reducen las pérdidas por muerte, reduciendo muy poco la morbilidad y el daño al tejido; además, no aumentan la ganancia de peso por permitir la sobrevivencia de algún porcentaje de cerdos con lesiones, de tal manera que las pérdidas económicas en cerdos mínimamente protegidos pueden ser mayores en los sobrevivientes que en los muertos.

Se ha intentado para el control de la pleuropneumonía fibrinonecrótica en cerdos, la elaboración de vacunas bacterianas vivas atenuadas, utilizando mutágenos que puedan conferir depen

dencia a alguna sustancia (nutriente o antibiótico), que la bacteria sea incapaz de sintetizar y que resulte un factor indispensable para su crecimiento; sin embargo, esto aún no ha sido posible (14).

Por todo lo anteriormente expuesto, es evidente que el conocimiento de la patogenia de la enfermedad ocasionada por H. pleuropneumoniae, es importante para lograr su control, mediante el uso de bacterinas o cualquier otro tipo de vacunas (vacunas vivas atenuadas), por lo que el propósito fundamental de este trabajo, es tratar de aportar elementos al conocimiento de la toxigenicidad de la bacteria, considerando la posibilidad de la utilización de toxoides en el control de ésta enfermedad.

## TOXINAS BACTERIANAS.

Las bacterias dan lugar a procesos patológicos a través de 3 mecanismos:

1. La invasividad, que es la capacidad para entrar en los tejidos del huésped, multiplicarse ahí y diseminarse.
2. La toxigenicidad, que es la capacidad de producir toxinas.
3. Inducción de respuestas inmunes a antígenos bacterianos o sus toxinas.

(3, 12, 13, 20, 38)

Mientras que el proceso invasor provoca lesiones en las células del huésped, sólo en la vecindad de la zona de invasión las toxinas solubles pueden causar lesiones citotóxicas situadas a distancia de la lesión original. Algunas especies bacterianas parecen deber su patogenicidad exclusivamente a su capacidad invasora (por ejemplo Diplococcus pneumoniae), mientras que otras son casi exclusivamente toxigénicas (por ejemplo Clostridium tetani). Muchas especies bacterianas son a la vez invasoras y toxigénicas (Streptococcus piogenes)(3, 12, 13, 20, 38)

Las toxinas bacterianas suelen clasificarse en:

- Exotoxinas: Son proteínas excretadas por los microorganismos que las producen al medio circundante en que crecen. Su concentración en la mayoría de los casos, parece ser paralela al crecimiento bacteriano.
- Endotoxinas: Son complejos lipopolisacáridos de la pared celular de las bacterias y se liberan al medio sólo cuando el microorganismo se autoliza, o es artificialmente fragmentado por métodos mecánicos o químicos.

(3, 12, 13, 20, 38)

Los criterios para la diferenciación de exotoxinas y endotoxinas, se muestran en la tabla No. 1

Tabla No. 1

Criterios para la diferenciación de exotoxinas y endotoxinas (3, 12, 13, 20, 38, 47).

EXOTOXINA	ENDOTOXINA
Se encuentran en el líquido en que son cultivadas las bacterias. Aunque se forman en las células, son excretadas rápidamente.	Están íntimamente ligadas a la célula bacteriana, de la que sólo pueden salir por destrucción mecánica de la bacteria, o por autólisis de las células viejas.
Son polipéptidos de 10 000 a 900 000 Daltons de peso molecular.	Son macromoléculas complejas que contienen lipopolisacáridos y fosfolípidos.
Son producidas por ciertas bacterias Gram positivas y ocasionalmente por Gram negativas.	Son producidas principalmente, sino de manera exclusiva, por bacterias Gram negativas; entre ellas <u>H. pleuro pneumoniae</u> (47).
Muy tóxicas.	Poco tóxicas (menos potentes que las exotoxinas).
Producen efectos tóxicos altamente específicos en ciertos tejidos. Tales efectos son característicos de la toxina y sirven para identificarla.	Producen efectos tóxicos no específicos.
No producen fiebre en el huésped.	Producen fiebre con frecuencia.
Son poco estables, pierden rápidamente su toxicidad por el calor a 60°C y se alteran pronto a la temperatura ordinaria o por exposición a la luz ultravioleta.	Son relativamente estables. Conservan su toxicidad después del calentamiento a 60°C. No se alteran cuando se guardan a la temperatura ordinaria, ni por exposición a la luz ultravioleta.
Son fuertemente antigénicas inyectadas en animales, estimulan la producción de grandes cantidades de antitoxina neutralizante.	Son débilmente antigénicas. No estimulan la formación de antitoxina, estimulan la formación de anticuerpos al residuo de polisacárido.
Pueden ser convertidas a toxoides atóxicos antigénicos, por tratamiento con aldehído fórmico, enzimas proteolíticas, calor, y otros.	No son convertidas a toxoides.

## Obtención y Purificación de exotoxinas bacterianas.

La separación de exotoxinas bacterianas es un proceso complicado, por el hecho de que se encuentran generalmente en muy bajas concentraciones en el sobrenadante de cultivo. Puede ser requerida la concentración de grandes volúmenes de sobrenadante de cultivo, para obtener cantidades relativamente pequeñas; además, algunas bacterias pueden fabricar más de un producto extra celular.

Es ventajoso saber o determinar, las condiciones óptimas de crecimiento bacteriano, ya que muchos antígenos extracelulares aparecen en el sobrenadante de cultivo durante la fase logarítmica de crecimiento y algunos son producidos en paralelo con el crecimiento celular, es por tanto común continuar el crecimiento bacteriano hasta la terminación de la fase logarítmica del crecimiento, ya que las células pueden lisarse liberando -- proteínas, ácidos nucleicos u otras sustancias macromoleculares las cuales pueden complicar el procedimiento de purificación, pudiendo preguntarse cuál toxina obtenida bajo tales circunstancias puede ser considerada extracelular.

El pH óptimo de crecimiento de la bacteria, la temperatura y el medio ambiente gaseoso deben ser considerados, ya que algunas enzimas o sus precursores no se liberan hasta que el pH del medio de cultivo a descendido a cierto nivel. El dióxido de carbono es requerido para la producción máxima de algunos productos de estafilococos, y la aereación por agitación vigorosa es requerida para otros.

La separación del sobrenadante de cultivo de volúmenes relativamente pequeños (4 a 12 litros), generalmente se efectúa por centrifugación. De las bacterias que sedimentan firmemente tras la centrifugación, el sobrenadante de cultivo puede ser separado por simple decantación; sin embargo, si la bacteria no es sedimentada firmemente tras la centrifugación, después de la decantación, es necesaria la filtración. No es posible centrifugar grandes volúmenes de sobrenadante de cultivo bajo condiciones estériles, por lo tanto, la centrifugación debe realizarse con la mayor asepsia posible. El enfriamiento del sobrenadante antes y durante la centrifugación, inhibe el crecimiento de bacterias extrañas contaminantes; además, permite conservar la estabilidad del producto o los productos bacterianos de interés.

(3, 12, 25, 60)

En algunas ocasiones puede ser aceptable y deseable, esterilizar el sobrenadante de cultivo bacteriano tras la centrifugación.

La filtración puede ser satisfactoria con volúmenes de sobrenadante de cultivo que no sean demasiado pequeños, ya que cantidades significativas de exotoxina pueden adsorberse al filtro durante las etapas de filtración.

La filtración es preferiblemente ejecutada en frío, particularmente cuando ésta es llevada a cabo por largos períodos de tiempo.

La concentración preliminar de los productos extracelulares, presente en el sobrenadante de cultivo bacteriano, es necesaria, ya que generalmente las cantidades de dichos productos son muy pequeñas. La concentración preliminar puede realizarse por el método de ultrafiltración, el cual tiene la ventaja de que la concentración puede ser ejecutada simultáneamente con la diálisis. La concentración por éste método puede requerir varios días y deberá ser ejecutada en un cuarto frío a 4°C.

La purificación final de las exotoxinas generalmente es realizada por una combinación de uno o más de los métodos modernos de separación de proteínas, tales como: cromatografía de exclusión molecular, electroforesis, ultracentrifugación, y otros más.

Una vez purificado el producto extracelular bacteriano deseado, puede obtenerse en forma cristalina al someterlo a variaciones de pH, temperatura, por adición de alcohol, etc. Es importante señalar que las preparaciones cristalinas no son necesariamente homogéneas.

Como muchos productos extracelulares son altamente lábiles a la temperatura ordinaria, es conveniente almacenarlos en refrigeración, ya sea en forma cristalina o después de un proceso de liofilización de las soluciones concentradas y purificadas.

(4, 6, 25, 60)

## O B J E T I V O S

Los objetivos de éste trabajo son:

- Saber si Haemophilus pleuropneumoniae serotipo 5, es capaz de producir "in vitro", bajo ciertas condiciones, - productos extracelulares de origen - protéico (exotoxinas).
- Aislar y purificar de un sobrenadante de cultivo masivo la(s) exotoxina(s) excretada por la bacteria.
- Determinar el peso molecular de la(s) exotoxina(s), y el pH al que ésta(s) proteína(s), muestra un mínimo de solubilidad (punto isoeléctrico, pI).
- Demostrar si la exotoxina es capaz de reproducir "in vivo" el cuadro típico de pleuropneumonía fibrinonecrótica.

## MATERIAL Y METODOS.

### I. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE Haemophilus pleuropneumoniae

Para este propósito, la cepa de H. pleuropneumoniae serotipo 5 (cepa 8022), aislada de campo por el Dr. Gilberto Ochoa U. (Unidad de Investigación y Estudios de Posgrado de la F.E.S "Cuautitlán"), conservada a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se descongeló totalmente, y se tomaron inóculos para sembrarlos en los siguientes medios de cultivo, durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ :

- a) Agar nutritivo.
- b) Agar nutritivo con cepa nodriza de Staphylococcus aureus.
- c) Agar sangre.
- d) Agar sangre con cepa nodriza de S. aureus.
- e) Agar BHI más 5% de extracto de levadura fresca.

De los crecimientos obtenidos en los medios de cultivo b, d y e, se seleccionaron las colonias "típicas" (ver página 3) de H. pleuropneumoniae, y se efectuaron las tinciones de Gram correspondientes; una vez elegidas las colonias formadas por cocobacilos Gram negativos, se tomaron inóculos y se sembraron en agar BHI más 5% de extracto de levadura fresca, para posteriormente incubarse a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Para mantener la actividad metabólica normal de crecimiento y reproducción de la bacteria por tiempo indefinido, se hicieron pases sucesivos de la misma, en las condiciones mencionadas anteriormente.

Se comprobó la pureza del microorganismo realizando las siguientes pruebas bioquímicas:

- |               |                  |          |
|---------------|------------------|----------|
| - Motilidad   | - Glucosa        | - Indol  |
| - Catalasa    | - Gas de glucosa | - Xilosa |
| - Oxidasa     | - Lactosa        | - Urea   |
| - Sulfhídrico | - Manitol        |          |

Una vez obtenida la cepa pura, se tomó una azada del crecimiento bacteriano en agar BHI más 5% de extracto de levadura fresca, y se inoculó en una botella de dilución de leche, conteniendo ésta 50 mls. de caldo BHI estéril más 5% de extracto de levadura fresca. Incubándose posteriormente a 37°C durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugó el crecimiento bacteriano a 3000 r.p.m. durante 15 min., y se separó el sobrenadante de cultivo.

Se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante de cultivo obtenido y del medio de cultivo estéril, utilizando para ello el método de Lowry, et al (27).

## II. CURVA DE CRECIMIENTO PARA H. pleuropneumoniae

En un volumen de 50 mls. de medio de cultivo BHI más 5% de extracto de levadura fresca, se crecieron inóculos de la bacteria durante 18 horas a 37°C; Transcurrido este tiempo, se hizo una dilución 1:10 de éste crecimiento en matraces nefelométricos conteniendo medio de cultivo fresco y estéril, incubándose con agitación constante en un agitador NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC EDISON N,J, U.S.A., a 100 r.p.m. y 37°C.

Se leyeron las absorbencias en un espectrofotómetro BAUSCH & LOMB. SPECTRONIC 88, a una longitud de onda de 500 nm., a los tiempos 0, 15, 30, 45 min. y a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 hrs., de iniciado el crecimiento; se utilizó como blanco de lectura un matríz nefelométrico conteniendo medio de cultivo fresco y estéril.

Se tomó 1 ml. del crecimiento bacteriano a las 3 y 6 hrs. para cuenta viable (14)

## III. CRECIMIENTO MASIVO DE LA BACTERIA

Con un crecimiento de 18 hrs. de H. pleuropneumoniae, se inocularon 5 litros de caldo BHI más 5% de extracto de levadura, en una proporción de 1:10 y se efectuó el crecimiento masivo del microorganismo con agitación constante de 100 r.p.m. a 37°C, durante 6 hrs. Transcurrido este tiempo, se centrifugó dicho crecimiento en una centrifuga DAMON/ICE DIVISION DPR -

6000, bajo las siguientes condiciones: 60 min., a 4°C, 3000 r. p.m. con rotor 949.

Efectuada la centrifugación, se separaron los sobrenadantes de cultivo por decantación y se esterilizaron utilizando un filtro Millipore (GSWP 142 50) con membranas de filtración de 0.22  $\mu$ m de diámetro de poro, para eliminar totalmente las bacterias que hubieran quedado en el sobrenadante de cultivo. Todo esto se efectuó a una temperatura de 4°C.

Se cuantificó la concentración de proteína del sobrenadante de cultivo estéril por el método de Lowry, et al (27).

El sobrenadante de cultivo masivo estéril se almacenó a -70°C.

#### IV. MICROFILTRACION.

Para separar del sobrenadante de cultivo estéril los solutos de bajo peso molecular (menor de 10 000 d), y concentrar los de peso molecular mayor de 10 000 d, fué necesario pasar dicho sobrenadante por un sistema de ultrafiltración (MICROFILTRATION SYSTEMS MODEL No. UHP-76) (4, 5, 6, 7, 44, 52), utilizando membranas tipo F (MWCQ 10K, DIA: 76 MM), aplicándose una presión positiva de 4 Kg/cm<sup>2</sup>, generada por una compresora de aire (MODELO B 131 C, SERIE CY 1049). Este proceso se realizó en un cuarto frío a una temperatura de 4°C, hasta reducir el volumen original (aproximadamente 5 litros), a un volumen final de 300 mls.

Finalizada la microfiltración, se determinó la concentración de proteína del concentrado final y del filtrado excluido utilizando el método de Lowry, et al (27).

Con el objeto de concentrar aún más y conservar por tiempo indefinido los solutos de peso molecular mayores de 10 000d presentes en los 300 mls. del concentrado final de ultrafiltración, se liofilizaron de la siguiente forma: el volumen final del concentrado de microfiltración se distribuyó en 12 matracas erlenmeyer de 125 mls. de capacidad, conteniendo cada uno 25 mls. de tal concentrado. Estos matracas, se incorporaron en una mezcla de reacción etanol - hielo seco, con agitación constante hasta que su contenido fué congelado totalmente, inmediatamente después se colocaron en el interior de una cámara de liofilización (LABCONCO FREEZE DRY-5), y se aplicó el vacío

hasta que la liofilización fué de un 100% (72 horas continuas)

Se determinó la concentración de proteína del liofilizado de un matraz por el método de Lowry, et al(27), resuspendiendo se en 5 mls. de agua destilada.

Los liofilizados se almacenaron en refrigeración a 4°C.

## V. ELECTROFORESIS EN GEL SDS - POLIACRILAMIDA

Para separar las proteínas contenidas en los liofilizados del concentrado final de microfiltración (liofilizado crudo), y determinar sus pesos moleculares, se efectuó la técnica de -electroforesis (25, 58)(LKB BROMMA 2117 MULTIPHOR), analizando se también por ésta técnica muestras de medio de cultivo fresco estéril y muestras del filtrado excluido en el proceso de -microfiltración, para descartar el hecho de que éstas pudieran contener proteínas de peso molecular mayor a 10 000 d.

Se utilizaron geles SDS - poliacrilamida al 5% y 10%.

Para ésta técnica de electroforesis se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A: Solución Stock de Buffer fosfatos  
(0.2 M, pH = 7.1)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	.....	23.4 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.....	61.32 g.
SDS	.....	6.0 g.
H <sub>2</sub> O (destilada)	.....	3 litros.

Solución B: Buffer de electrodos.

Solución stock de buffer de fosfatos	... 1 parte
H <sub>2</sub> O (destilada)	..... 1 parte

Solución C: Buffer de fosfatos para la muestra  
(0.01 M, pH = 7.1)

Solución stock de buffer de fosfatos ..	5.0 ml
2 - Mercaptoetanol .....	1.0 ml
SDS .....	1.0 g.
H <sub>2</sub> O (destilada) .....	Hasta 100 ml.

Solución D: Solución de acrilamida

Acrilamida .....	22.2 g.
Bis-acrilamida .....	0.6 g.
H <sub>2</sub> O (destilada).....	100.0 ml.

Se filtró la solución con papel filtro Whatman No. 1 y se guardó en botella oscura a 4°C.

Solución E: Solución de persulfato de amonio

Persulfato de amonio ...	0.15 g.
H <sub>2</sub> O (destilada) .....	10.0 ml.

Se guardó ésta solución en botella oscura a 4°C.

Solución F: Azul de bromofenol.

Azul de bromofenol ...	0.03 g.
H <sub>2</sub> O (destilada) .....	12.0 ml.

Solución G: Solución detergente.

Triton X-100 .....	0.1 ml.
H <sub>2</sub> O (destilada) ...	100.0 ml.

Solución H: Solución fijadora.

Acido tricloroacético ...	57.0 g.
Acido sulfosalicílico ...	17.0 g.
Metanol .....	150.0 ml.
H <sub>2</sub> O (destilada) .....	350.0 ml.

Se añadieron los ácidos a la mezcla de reacción metanol-H<sub>2</sub>O (destilada).

Solución I: Solución teñidora.

Azul Coomassie Brillante R-250 ...	1.25 g.
Metanol .....	227.0 ml.
H <sub>2</sub> O (destilada) .....	227.0 ml.
Acido acético glacial .....	46.0 ml.

Se disolvió el colorante en la solución de metanol y agua. Se añadió el ácido acético y se eliminó el material insoluble por filtración con papel filtro Whatman No. 1; esta solución se guardó en botella oscura.

Solución J: Solución desteñidora.

Etanol .....	1500,0 ml.
Acido acético.	500.0 ml.
H <sub>2</sub> O (destilada)	500.0 ml.

Solución K: Solución conservadora.

Etanol .....	300.0 ml.
Acido acético ..	100.0 ml.
Glicerol .....	100.0 ml.
H <sub>2</sub> O (destilada).	500.0 ml.

Desarrollo del Método.

1. Preparación de los geles de SDS - poliacrilamida.

Se lavaron las placas de vidrio con detergente de laboratorio y se aclararon con agua destilada, se montó el equipo para la fabricación de los geles de acuerdo a:

Tipo de gel:	<u>5%(2x10<sup>4</sup> a 3.5x10<sup>5</sup> d)</u>	<u>10%(1x10<sup>4</sup> a 1x10<sup>5</sup> d)</u>
H <sub>2</sub> O (destilada)	14.9 ml.	-
Solución A	33.0 ml.	33.0 ml.
Solución D	14.8 ml.	29.7 ml.
Solución E	1.8 a 2.0 ml.	1.8 a 2.0 ml.
TEMED	0.06 ml.	0.06 ml.

Se mezcló el agua destilada, la solución A y D en un matraz de vacío. Se eliminó el aire de ésta mezcla durante 10 min. y se añadió la solución E y el TEMED, mezclándose con precaución para evitar la entrada de aire a la mezcla de reacción. Se vertió inmediatamente la solución en el molde ya preparado, agregándose los últimos mls. de ésta solución con una pipeta Pasteur. Se cerró la banda de plástico sin atrapar aire. La polimerización se produjo después de 40 min. de iniciada la reacción.

Acabada la polimerización, se puso el molde sin las pinzas en un refrigerador a 4°C durante 15 min. Se quitó la banda de plástico, y se desprendieron las placas de vidrio teniendo cuidado de romper el gel. Se eliminó la acrilamida no polimerizada con papel filtro Whatman No. 1, y se almacenó el gel a temperatura ambiente durante 12 hrs. Los geles se utilizaron después de transcurridas 12 hrs. de su preparación, pero no después de 4 días.

## 2. Preparación de las muestras de proteína.

Se necesitó una relación mínima de SDS - proteína de 3:1 por lo que la concentración final de proteína en cada una de las muestras problema y patrones de peso molecular (ver inciso 7), fué de 0.2 a 2.0 mg/ml.

Las soluciones muestra (problemas y patrones), se incubaron durante 2 min. a 100°C. Se añadieron 10  $\mu$ l de azul de bromofenol y 10  $\mu$ l de 2 - mercaptoetanol, a 250  $\mu$ l de cada una de las soluciones muestra.

### 3. Preelectroforesis.

Para detectar el frente del marcador de migración de las proteínas problema y patrones de peso molecular durante la electroforesis, se colocó un papel blanco bajo la placa enfriadora del aparato. Se llenó cada cámara de electrodo con 1.2 litros de buffer para electrodos.

Se pusieron unos mls. de solución detergente en la placa de enfriamiento para conseguir un buen contacto térmico con el gel.

Se colocó el gel sobre la placa de enfriamiento, cuidando de no dejar aire entre ambas.

Como contacto entre el gel y la solución de electrodos, se emplearon de 8 a 10 papeles filtro por cámara, previamente empapados con el buffer para electrodos; se aseguró que los bordes estuvieran paralelos. Se conectó el enfriador de agua hasta obtener una temperatura de 5°C. Se colocó la placa anticondensadora y se inició la preelectroforesis a una corriente constante de 150 mA durante 30 min.

### 4. Aplicación de las muestras.

Se aplicaron 10  $\mu$ l de cada una de las muestras ya preparadas en sus pozos correspondientes (cercaos al polo negativo). Esto se realizó lo más rápido posible, ya que el azul de bromofenol difunde rápidamente.

### 5. Electroforesis.

Una vez aplicadas las muestras en el gel, se ajustó la corriente a 20 mA y se mantuvo así durante los primeros 10 min.

de la corrida, después de los cuales, se ajustó a las siguientes condiciones eléctricas:

Concentración del gel	5%	10%
Corriente (mA)	200	190
Voltaje (V)	5	6
Velocidad de migración del frente de colorante (cm/hr.)	1.5	1.2
Tiempo total de corrida (hrs.)	4	5

La corrida electroforética de las muestras problema y patrones de peso molecular, se realizó manteniendo constante la corriente.

Terminada la electroforesis, se midieron las distancias de migración del colorante de cada una de las muestras, del centro de las bandas formadas al lugar de aplicación.

## 6. Tinción y conservación de los geles.

Tras la electroforesis, los geles fueron fijados inmediatamente con la solución fijadora durante 1 hr. a temperatura ambiente.

Una vez fijados los geles, se desprendieron de la placa de vidrio soporte y se dejaron en la solución de teñido durante 2 hrs. a temperatura ambiente.

Después de teñidos los geles, se pasaron a la solución desteñidora, el tiempo suficiente para remover los restos de colorante en las partes de los geles que no contenían proteína.

Para evitar que los geles se destruyeran al desacarlos, se pusieron en la solución conservadora durante 1 hr. a temperatura ambiente.

El secado de los geles se hizo a temperatura ambiente.

### 7. Cálculo del peso molecular.

Se determinó la movilidad relativa de cada una de las proteínas ensayadas, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$M.R = \frac{\text{Distancia de la migración de cada proteína} \times \text{Tamaño del gel antes de secar}}{\text{Tamaño del gel después de secar} \times \text{Distancia de migración del frente del colorante.}}$$

Los pesos moleculares de las muestras problema, se determinaron por interpolación de su movilidad relativa en una gráfica construida con el  $\text{Log}_{10}$  del peso molecular de cada patrón contra la movilidad relativa de los mismos.

Los patrones de peso molecular (SCHWARZ/MANN ORANGEBURG, N.Y., B-D) utilizados fueron los siguientes:

<u>PATRON</u>	<u>PESO MOLECULAR (d)</u>
Citocromo "C"	13 370
Mioglobina	16 900
Quimiotripsinógeno	23 240
Ovoalbúmina	45 000
Albúmina bovina	69 000
Gamma-globulina	160 000

## VI. PRUEBA PILOTO DE TOXICIDAD.

Esta prueba se efectuó para determinar si la(s) proteína - (s) presente en el liofilizado crudo del concentrado final de microfiltración del sobrenadante de cultivo de H. pleuropneumoniae, resultaba ser tóxica para conejos. Para esta prueba se utilizaron 3 conejos raza California, con un peso aproximado de 200 a 400 g. Estos animales se inocularon por vía intranasal - durante 4 días consecutivos de acuerdo a lo siguiente:

Conejo No.	Peso aproximado	Sustancia administrada.	Dosis por día	Vía de administración
1	200 g.	Liofilizado crudo	1.0 ml.	Intranasal
2	400 g.	Liofilizado crudo	1.0 ml.	Intranasal
3	400 g.	BHI más 5% de extracto de - levadura	1.0 ml.	Intranasal

Para administrar el liofilizado crudo, se resuspendió el contenido de un matraz erlemmeyer con 5 ml. de agua destilada y se esterilizó por filtración utilizando membranas de 0.22  $\mu$  - (Tipo G.S. 0.22  $\mu$ ).

Se programó sacrificar a los animales al séptimo día después de la primera inoculación; el conejo No. 1 se sacrificó al quinto día debido a su gravedad.

Después de sacrificar a los animales y practicar las disecciones, se buscaron lesiones macroscópicas sugestivas de pleuro pneumonia fibrinonecrótica.

Efectuamos cortes de tejido pulmonar de las lesiones ma -

croscópicas observadas, para realizar su estudio histopatológico de acuerdo a lo siguiente: los cortes se fijaron durante 72 hrs. en formalina amortiguada al 10%; los tejidos se incluyeron y cortaron con parafina (según rutina); los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina (según rutina) y se observaron al microscopio compuesto.

## VII. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR.

Se empacó una columna con Sephadex G - 50-150, de una longitud de 14.5 cm. y un diámetro aproximado de 1.2 cm. (1,25). La columna se lavó varias veces con una solución amortiguadora de fosfatos con azida de sodio ( $\text{pH} = 7.4$ ), antes de ser usada.

El volumen de exclusión se determinó utilizando azul dex - tran (Blue Dextran 2000. Pharmacia fine Chemical AB Uppsala, - Sweden).

El liofilizado crudo de dos matraces erlenmeyer se disolvió con 2.8 ml. de la solución tampo<sup>n</sup> antes mencionada, y se eluyó en la columna. Las fracciones de eluato obtenidas tras la elución, fueron de 55 gotas por minuto. Las absorbencias de cada una de las fracciones, se midió a una longitud de onda de 280 nm, utilizando un espectrofotómetro ZEISS Germany PM 2 D, y se trazo una gráfica de absorbencias contra número de fracción de eluato.

Las fracciones de eluato que formaron parte de un mismo pico en la gráfica de cromatografía de exclusión molecular, se liofilizaron y se analizaron por electroforesis en geles SDS - poli<sup>a</sup>crilamida al 5% y 10%, de acuerdo al punto No. V (pág. 18)

## VIII. ELECTROENFOQUE ANALITICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Para determinar el punto isoelectrico de la exotoxina purificada por cromatografía de exclusión molecular, y sin purificar (liofilizado crudo), se efectuó la técnica de electroenfoque analítico (25, 59, 61).

Para éste análisis se utilizaron geles de poli<sup>a</sup>crilamida - prefabricados, con un rango de  $\text{pH} = 3.5 - 9.5$  (LKB BROMMA. AM - PHOLINE PAGplate 1804 - 101), y se prepararon las siguientes so

luciones:

Solución A: Solución de electrodos.

Estas soluciones se prepararon de acuerdo al rango de pH - del gel de poliacrilamida utilizado.

- Anodo:  $H_3PO_4$  1 M.

- Cátodo: NaOH 1 M.

Solución B: Solución fijadora

Acido tricloroacético .... 57.7 g.

Acido sulfosalicílico .... 17.3 g.

H<sub>2</sub>O (destilada) .....500.0 ml.

Solución C: Solución teñidora

Azul Coomassie Brillante R-250 .. 0.46 g.

Solución desteñidora .....400.0 ml.

Solución D: Solución desteñidora

Etanol ..... 500.0 ml.

Acido acético .. 160.0 ml.

H<sub>2</sub>O (destilada). hasta 2 litros.

Solución E: Solución conservadora

Glicerol ..... 50.0 ml.

Solución desteñidora. 500.0 ml.

Desarrollo del método.

1. Preparación de las muestras.

La concentración final de proteína en cada una de las muestras problema, y en el patrón de pI (Mioglobina), fué de 50 - 150  $\mu\text{g}$ .

## 2. Preelectroenfoque.

Se colocó la plantilla para electroenfoque analítico (PAG-plate) sobre la placa de enfriamiento del aparato, la cual contenía una cantidad suficiente de una solución aislante (Keroseno). El gel de poliacrilamida, soportado por una placa de plástico, se depositó sobre la plantilla cuidando de no dejar aire entre ambas. Una vez saturados los papeles filtro para electrodos, con sus soluciones respectivas, se colocaron sobre el gel de poliacrilamida, cortandose las partes sobresalientes de estos electrodos. Se colocó la placa de electroenfoque y la cubierta del aparato.

Se conectó el enfriador de agua hasta obtener una temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$ , una vez logrado ésto, se inicio el preelectroenfoque con un poder constante de 25 W, hasta obtener un voltaje de 310 V. y una corriente de 78 mA, todo esto con el fin de establecer el gradiente de pH en el gel.

## 3. Aplicación de las muestras.

Se aplicaron 20  $\mu\text{l}$  de cada una de las muestras a analizar sobre la superficie del gel, en una zona cercana al cátodo.

## 4. Electroenfoque.

Una vez aplicadas las muestras sobre el gel, se efectuó el electroenfoque analítico aproximadamente durante 2 hrs., obteniéndose al final del experimento un voltaje de 970 V. y una corriente de 25 mA.

## 5. Tinción y conservación de los geles.

Transcurrido el tiempo de electroenfoque, las proteínas se fijaron inmediatamente, sumergiendo el gel en la solución fijadora durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Terminado el tiempo de fijación, se colocó el gel en la solución desteñidora por 5 minutos.

El gel fué teñido por 10 minutos, utilizando la solución desteñidora, a una temperatura de 60°C. Para eliminar el exceso de colorante adherido al gel, éste se sumergió en la solución desteñidora, el tiempo necesario. Aclarado totalmente el fondo del gel, se introdujo en la solución conservadora durante 1 hr. El gel fué secado a temperatura ambiente.

## 6. Cálculo del punto isoeléctrico.

La determinación del punto isoeléctrico de las muestras problema, se efectuó midiendo sus distancias de migración en el gradiente de pH establecido en el gel, y comparándose con la distancia de migración del patrón de punto isoeléctrico conocido (Mioglobina,  $pI = 7.0$ ).

## IX. PRUEBA FINAL DE TOXICIDAD

Para probar la toxicidad de la proteína (exotoxina) purificada por cromatografía de exclusión molecular, y ampliar los resultados de la toxicidad encontrada por la administración intranasal del liofilizado crudo (ver punto VI, pág. 25), se efectuó la prueba final de toxicidad, utilizando 11 conejos raza California con pesos aproximados entre 250 y 350 g., los cuales fueron inoculados intranasalmente durante 7 días.

La distribución de los animales y dosis administradas, se muestran en las tablas No. 2 y 3.

El liofilizado crudo y el liofilizado de la proteína purificada, se resuspendieron con 5 mls. de agua destilada y se esterilizaron por filtración, antes de ser administrados.

Tabla No. 2

Distribución de los conejos utilizados en la prueba final de toxicidad.

LOTE No.	CONEJO No.	PESO APROXIMADO	SUSTANCIA ADMINISTRADA	VIA DE ADMINISTRACION
1	1	250 g.	—	—
	2	300 g.	—	—
	3	350 g.	—	—
2	4	250 g.	BHI más 5% de extracto de - levadura	Intranasal
	5	300 g.	BHI más 5% de extracto de - levadura	Intranasal
	6	350 g.	BHI más 5% de extracto de - levadura	Intranasal
3	7	250 g.	Liofilizado crudo	Intranasal
	8	300 g.	Liofilizado crudo	Intranasal
	9	350 g.	Liofilizado crudo	Intranasal
4	10	300 g.	Protefna purificada	Intranasal
	11	300 g.	Protefna purificada	Intranasal

Tabla No. 3

Calendario de inoculación y dosis administradas (ml/día), por lote de conejos.

DIA \ LOTE No.	1	2	3	4
1	—	1.0 ml.	1.0 ml.	1.0 ml.
2	—	1.0 ml.	1.0 ml.	1.0 ml.
3	—	1.0 ml.	1.0 ml.	1.0 ml.
4	—	1.0 ml.	1.0 ml.	1.0 ml.
5	—	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.
6	—	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.
7	—	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.
8	—	—	—	—
21	*	*	*	*

(\*) día de sacrificio de todos los animales.

Una vez sacrificados los animales, se tomaron muestras de sangre del plexo braquial y se efectuó su disección, con el fin de encontrar lesiones patognomónicas. Además, se efectuaron cortes asépticos de las lesiones observadas en pulmón para llevar a cabo un aislamiento bacteriano, utilizando como medio de cultivo agar sangre; y por otro lado, se efectuó el estudio histopatológico de las lesiones macroscópicas observadas.

## X. DETERMINACION DE PROTEINAS (Método de Lowry).

Para ésta determinación fué necesario preparar las siguientes soluciones:

Solución A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en  $\text{NaOH}$  0.1 N

Solución B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  al 0.5% y Citrato de sodio al 1%

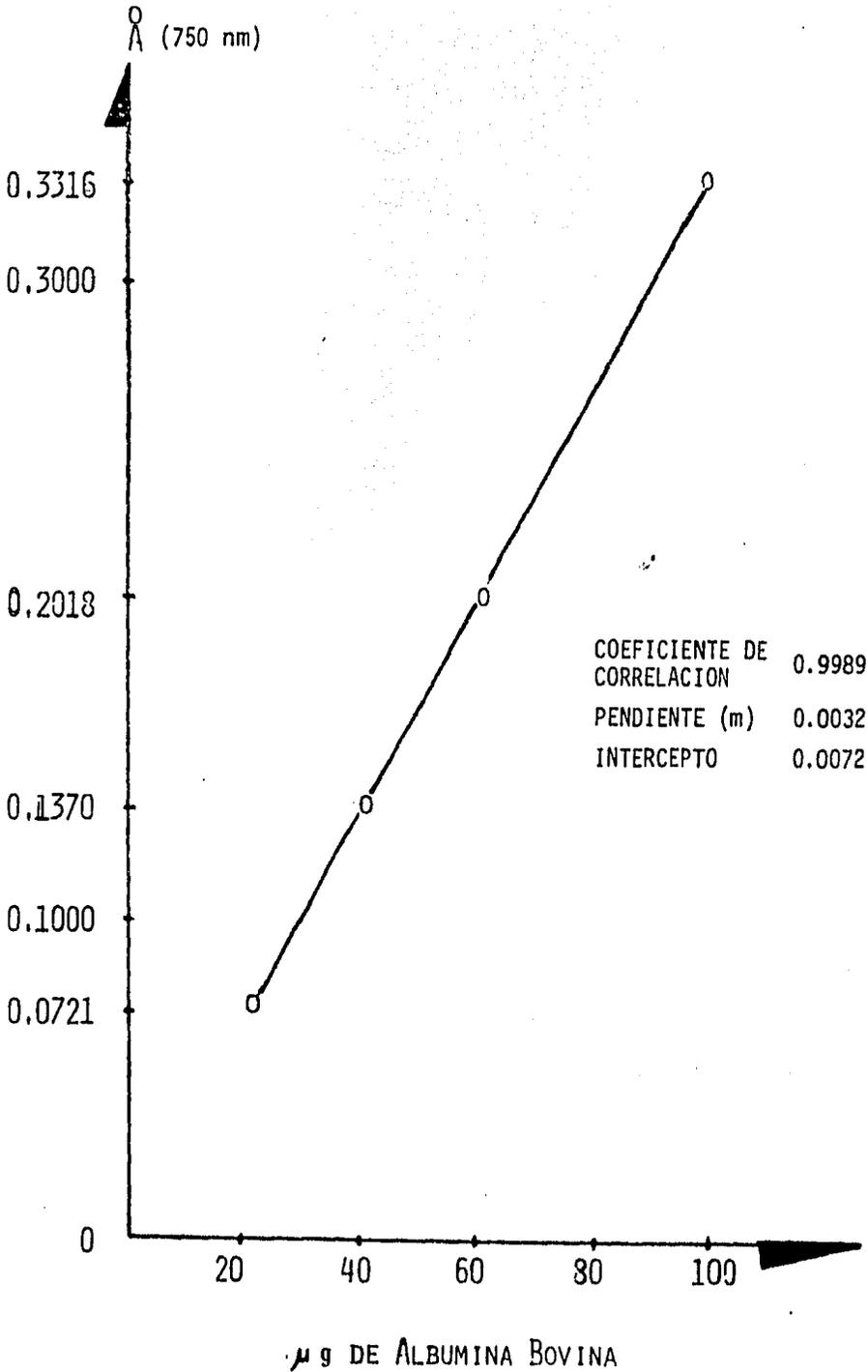
Solución C: Se preparó con 50 mls. de la solución A y 1 ml de la solución B.

### Desarrollo del método:

A  $20 \mu\text{l}$  de la muestra se le agregaron 3 mls. de la solución C y se dejó reposar 10 min. Se adicionó entonces 0.1 ml. de reactivo de Fenol (Phenol SIGMA), se agitaron y se dejaron en reposo 20 min. a temperatura ambiente. En seguida se leyeron a una longitud de onda de 750 nm. en un espectrofotómetro BAUSCH AND LOMB.

La concentración de proteína de las muestras problema, fué determinada por interpolación de sus absorbencias en una curva patrón, preparada con diferentes concentraciones de albúmina bovina (Figura No. 1).

CURVA PATRON DE PROTEINAS ( MÉTODO DE LOWRY )



## R E S U L T A D O S .

### I. Concentración de proteína del sobrenadante de cultivo de - 18 hrs. de H. pleuropneumoniae.

Por las diferencias encontradas en la concentración de - proteína (Método de Lowry, et al) entre el medio de cultivo es téril y el sobrenadante de cultivo de 18 hrs., fué evidente - que H. pleuropneumoniae es capaz de excretar al medio de cul- tivo, bajo ciertas condiciones, sustancias de naturaleza proté- ica. Las diferencias antes mencionadas, son mostradas en la - tabla No. 4

Tabla No. 4

M U E S T R A	CONCENTRACION DE PROTEINA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
a) BHI más 5% de extracto de levadura fresca estéril.	8 5
b) Sobrenadante de cultivo de 18 horas.	1 3 0

### II. Curva de crecimiento.

En la Tabla No. 5 se muestra la curva de crecimiento de H. pleuropneumoniae serotipo 5. Observándose que aproximada- mente a la primera hora de incubación se inicia la fase loga- rítmica de crecimiento, prolongándose durante 5 horas más, an- tes de llegar a la fase estacionaria (ver Figuras No. 2 y 3).

Tabla No. 5

Datos obtenidos del crecimiento de  
Haemophilus pleuropneumoniae.

TIEMPO	ABSORBENCIA (500 nm.)	Log <sub>10</sub> de la Concentra ción bacteriana.	UFC/ml
0 min.	0.02	9.056	11.4 x 10 <sup>8</sup>
15 min.	0.03	9.232	17.1 x 10 <sup>8</sup>
30 min.	0.04	9.357	22.8 x 10 <sup>8</sup>
45 min.	0.06	9.534	34.2 x 10 <sup>8</sup>
1 hr.	0.09	9.710	51.3 x 10 <sup>8</sup>
2 hrs.	0.29	10.218	16.5 x 10 <sup>9</sup>
3 hrs.	0.81	10.664	46.2 x 10 <sup>9</sup>
4 hrs.	1.46	10.920	83.2 x 10 <sup>9</sup>
5 hrs.	1.68	10.981	95.7 x 10 <sup>9</sup>
6 hrs.	1.76	11.001	10.0 x 10 <sup>10</sup>
7 hrs.	1.76	11.001	10.0 x 10 <sup>10</sup>
8 hrs.	1.76	11.001	10.0 x 10 <sup>10</sup>

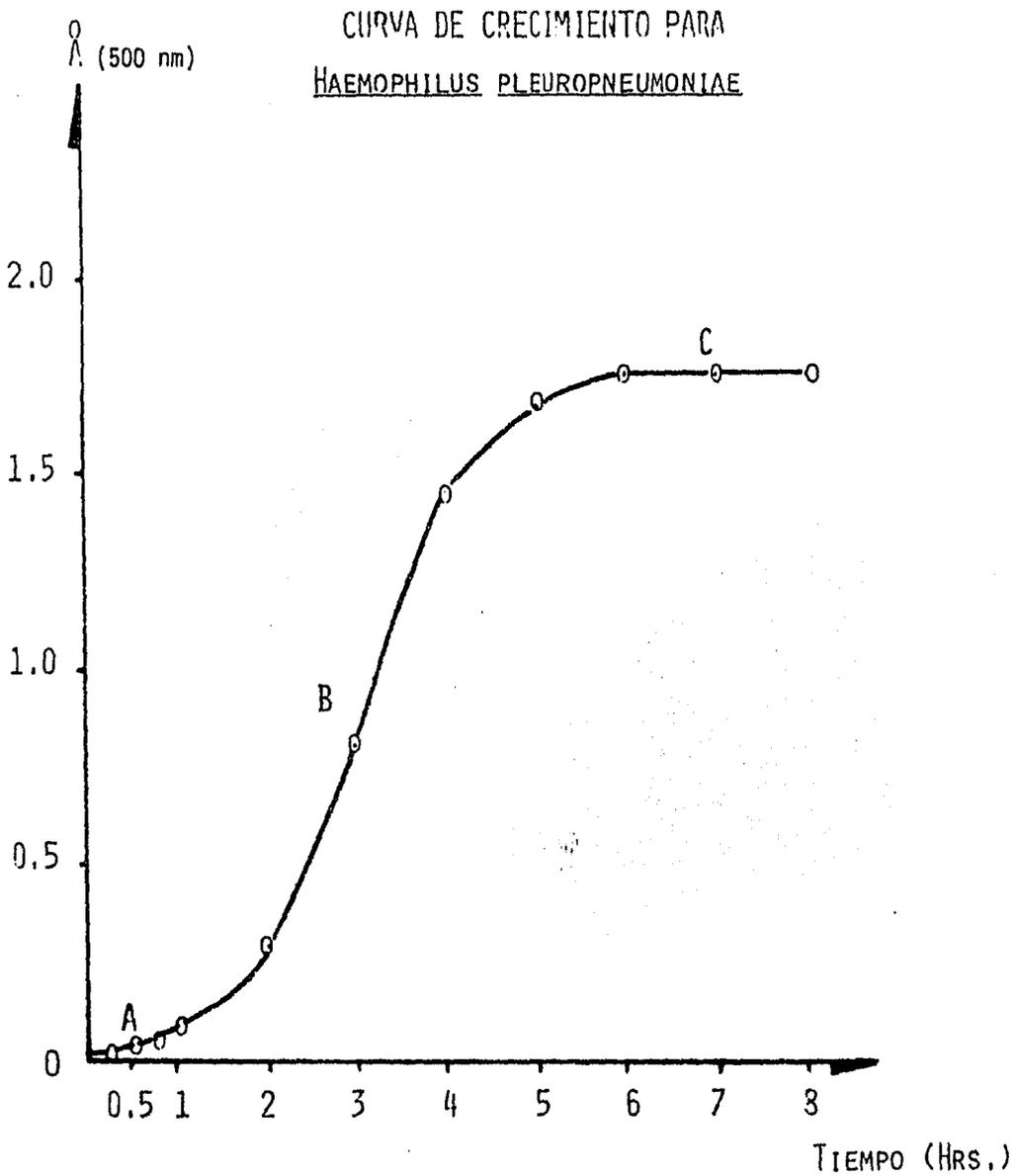


FIGURA No. 2.- En ésta gráfica se representan las diferentes etapas de crecimiento de la bacteria: A) Fase de latencia, B) Fase logarítmica de crecimiento, C) Fase estacionaria.

CURVA DE CRECIMIENTO PARA  
HAEMOPHILUS PLEUROPNEUMONIAE

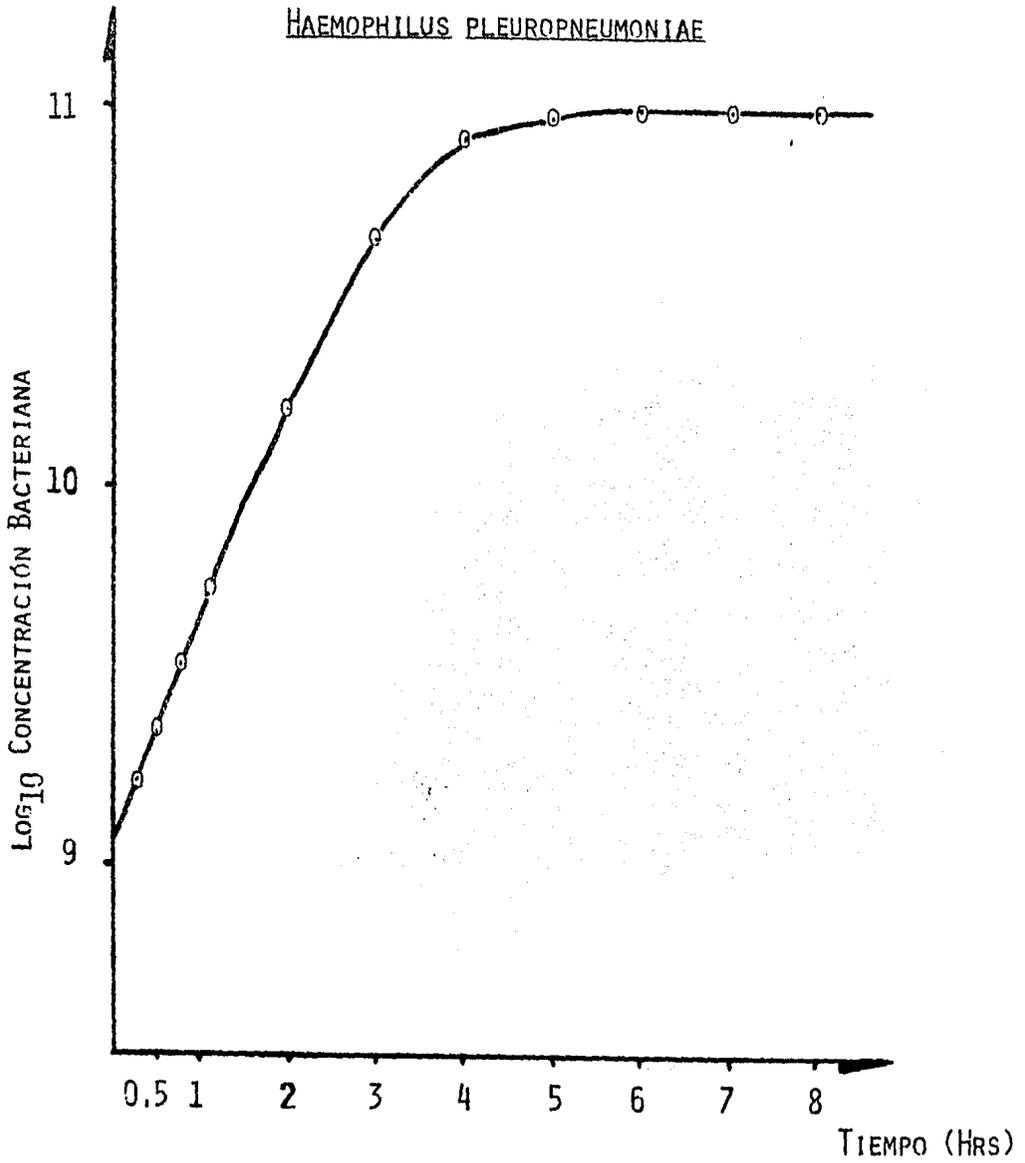


FIGURA No. 3

III. Cantidad de proteína durante las diferentes etapas de -  
concentración del sobrenadante de cultivo masivo.

Como la concentración de sustancias de naturaleza protéica de peso molecular mayor de 10 000 d (exotoxina), excretada por H. pleuropneumoniae se encontraba en concentraciones muy bajas en el sobrenadante de cultivo (ver Tabla No. 4), - además de estar mezclada con proteínas de bajo peso molecular (menor de 10 000 d), provenientes del mismo medio de cultivo, fué necesario separar y concentrar las proteína de interés.

La determinación de proteína durante las diferentes etapas de concentración, son mostradas en la Tabla No. 6

Tabla No. 6

Resultado de la determinación de proteína del sobrenadante de cultivo masivo durante las diferentes etapas de su concentración.

M U E S T R A	CONCENTRACION DE PROTEINA (ug/ml)
a) Sobrenadante de cultivo masivo de 6 horas.	292.89
b) Concentrado final de microfiltración.	190.89
c) Filtrado excluído en el proceso de microfiltración.	102.0
d) Liofilizado del concentrado final de microfiltración (Liofilizado crudo).	245.43 *

\* Esta concentración se obtuvo después de haber disuelto el liofilizado crudo, contenido en un matraz Erlenmeyer, con 5 mls. de agua destilada.

#### IV. Electroforesis en gel SDS - poliacrilamida.

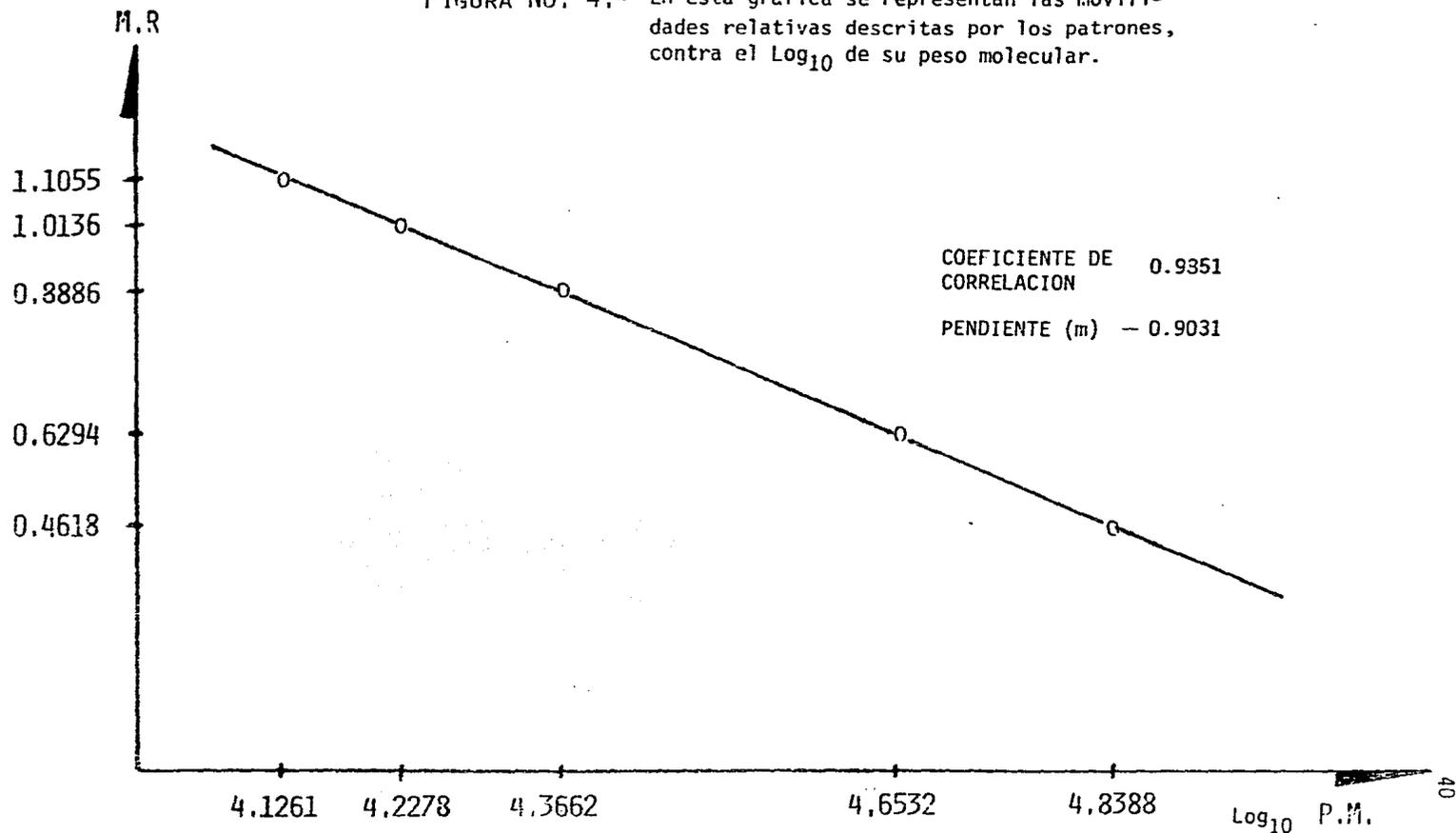
En la Tabla No. 7 se muestran las movilidades relativas y pesos moleculares aproximados de las muestras de proteína analizadas. Observándose que el liofilizado crudo describe una sola banda de proteína, cuyo peso molecular aproximado es de 14 000 d. El medio de cultivo estéril (BHI más 5% de extracto de levadura), y el filtrado excluido en el proceso de microfiltración, no describieron ninguna banda de proteína en los gels de poliacrilamida ensayados (5% y 10%), debido a que las proteínas contenidas en dichas muestras eran de peso molecular menor de 10 000 d. (ver Figura No. 4 y Lámina No. 1).

Tabla No. 7

A) MUESTRA PROBLEMA	MOVILIDAD RELATIVA	PESO MOLECULAR (d)
a) BHI más 5% de extracto de levadura.	—	—
b) Filtrado excluido en el proceso de microfiltración.	—	—
c) Liofilizado crudo	1.0769	14 000
B) PATRONES DE PESO MOLECULAR		
d) Citocromo "C"	1.1055	13 370
e) Mioglobina	1.0137	16 900
f) Quimiotripsinógeno	0.8887	23 240
g) Ovoalbúmina	0.6295	45 000
h) Albúmina bovina	0.4618	69 000

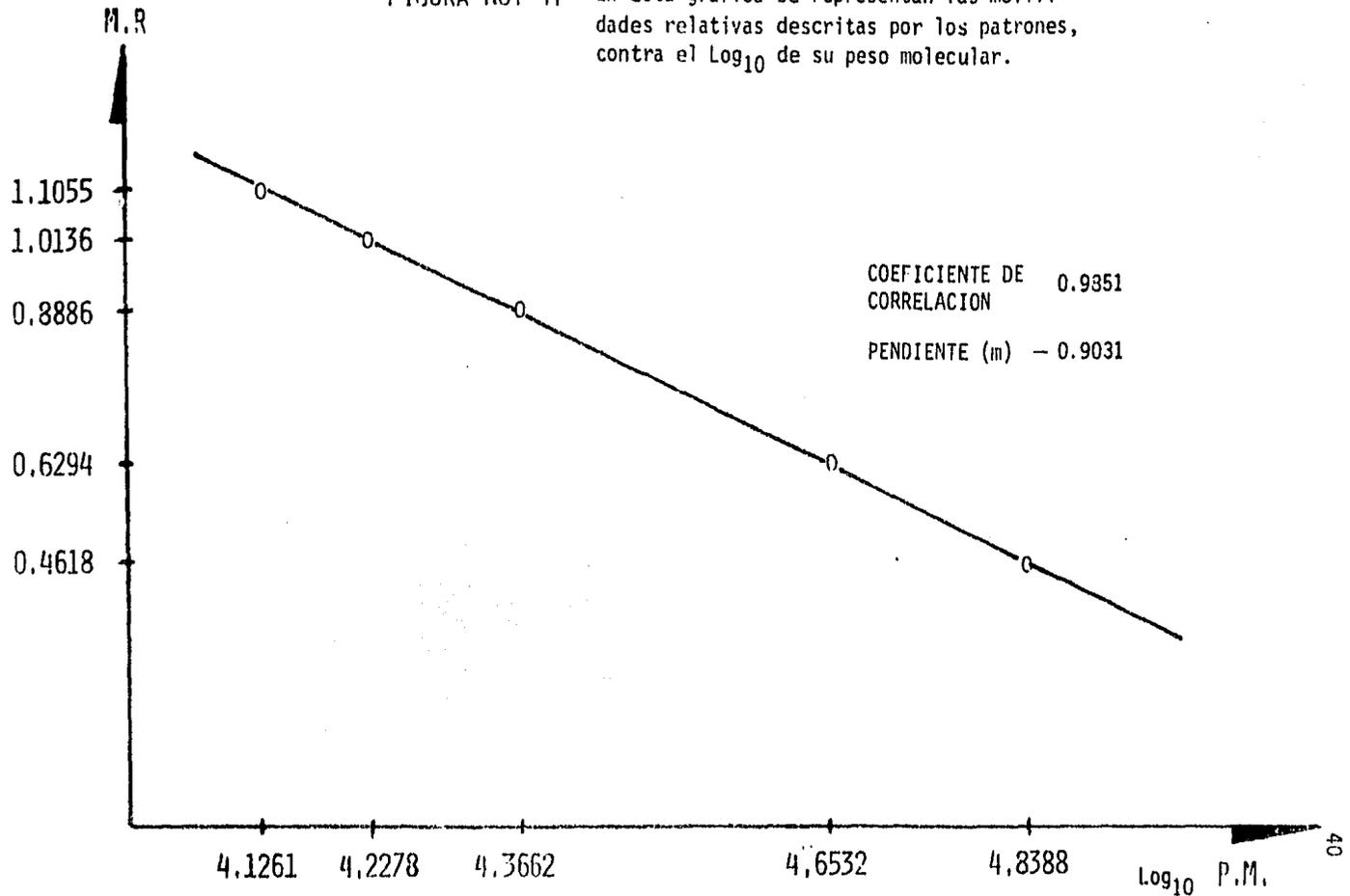
# CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE PESO MOLECULAR

FIGURA No. 4.- En ésta gráfica se representan las movi-  
dades relativas descritas por los patrones,  
contra el  $\text{Log}_{10}$  de su peso molecular.



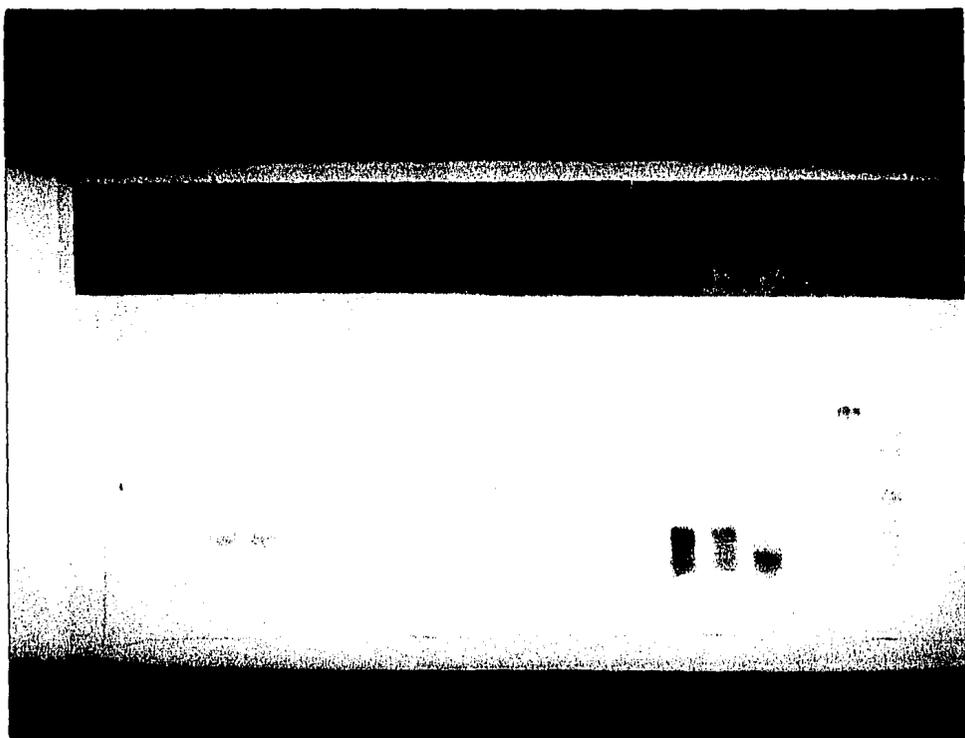
# CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE PESO MOLECULAR

FIGURA No. 4.- En ésta gráfica se representan las movi-  
dades relativas descritas por los patrones,  
contra el  $\text{Log}_{10}$  de su peso molecular.



LAMINA No. 1

## ELECTROFORESIS EN GEL SDS - POLIACRILAMIDA



En ésta fotografía se muestran las bandas de proteína descritas por las diferentes muestras ensayadas (Problemas y Patrones de Peso Molecular):

<u>No. Pozo</u>	<u>Muestra</u>	<u>No. Pozo</u>	<u>Muestra</u>
3	Liofilizado crudo.	15	Mioglobina.
4	Liofilizado crudo.	16	Quimiotripsinógeno.
12	Proteína del pico mayor de la gráfica de cromatografía	17	Ovoalbúmina.
		18	Albúmina bovina.
		19	Gamma globulina.
14	Citocromo "C"		

## V. Cromatografía de exclusión molecular.

Por este método fué posible separar del liofilizado crudo dos proteínas. Observándose que únicamente la proteína que constituía el pico mayor de la gráfica de cromatografía, describía después de la electroforesis en geles SDS - poliacrilamida (5% y 10%), una sola banda cuyo peso molecular aproximado fué de 14 000 d. Esta observación demostró que la proteína que conformaba el segundo pico, en la gráfica de cromatografía de exclusión molecular, estaba constituida por moléculas proteicas de peso molecular menor de 10 000 d, seguramente polipéptidos no excluidos durante el proceso de microfiltración; por lo que dicha fracción fué descartada en el ensayo de toxicidad (ver Lámina No. 1 y Figura No. 5).

## VI. Electroenfoque analítico.

El pH de solubilidad mínima descrito por la proteína que constituía el pico mayor de la gráfica de cromatografía de exclusión molecular (proteína purificada), resultó ser de 4.2 El liofilizado crudo, describió también una banda de precipitación similar a la anteriormente mencionada.

Del resultado de éste análisis podemos decir que la toxina aislada, está formada principalmente por aminoácidos ácidos, ya que dicha proteína migró hacia el polo positivo del campo eléctrico (ánodo) (ver Figura No. 6).

## VII. Pruebas de toxicidad en conejos.

El liofilizado crudo y la proteína purificada, provocaron en los animales inoculados, los siguientes signos clínicos:

- Debilidad general.
- Notable disminución de crecimiento y peso corporal.
- Congestión de vías respiratorias superiores.

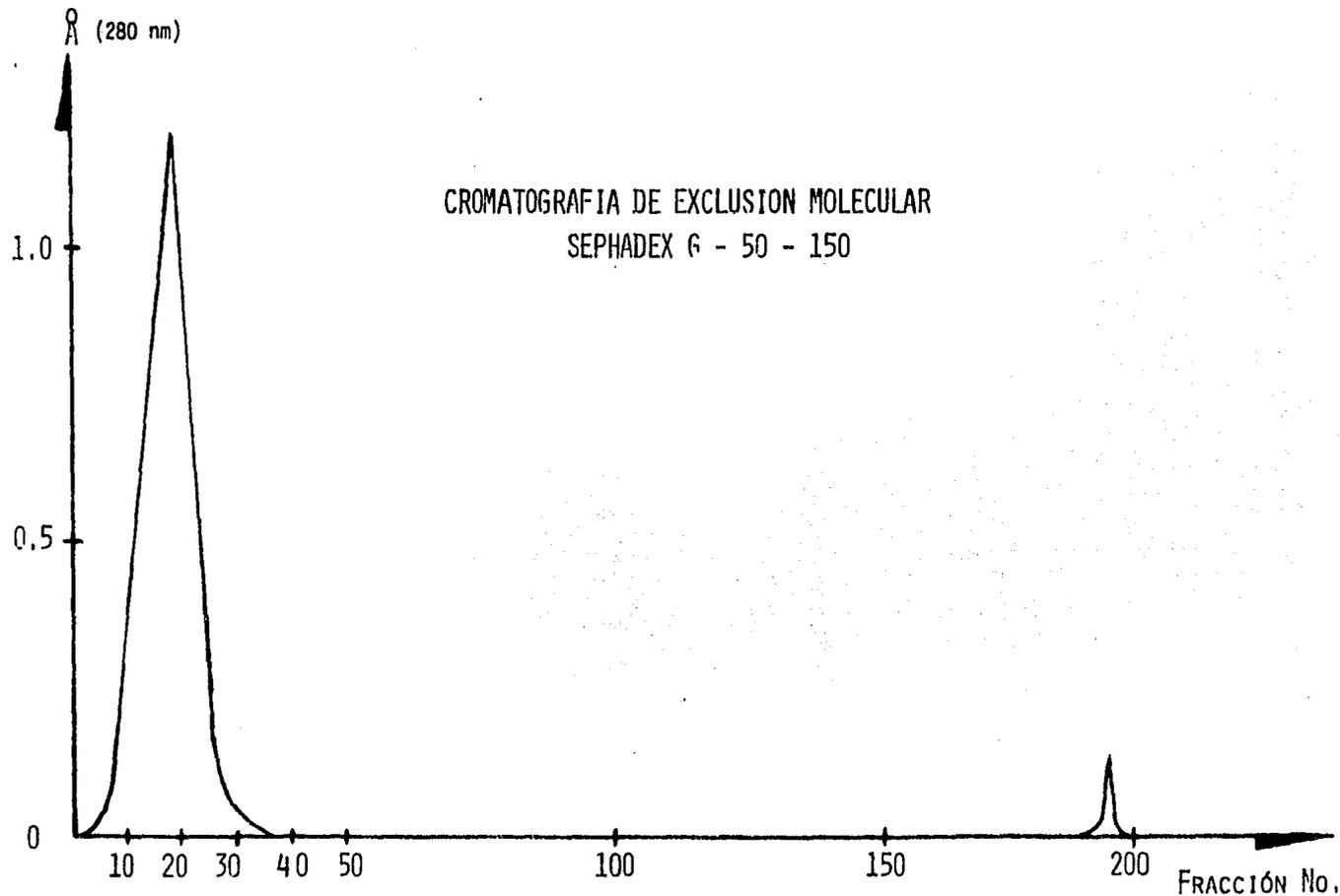


FIGURA No. 5.- En ésta gráfica se representa la absorbencia de cada una de las fracciones obtenidas durante la cromatografía de exclusión molecular del liofilizado crudo.

## DETERMINACION DE PUNTO ISOELECTRICO

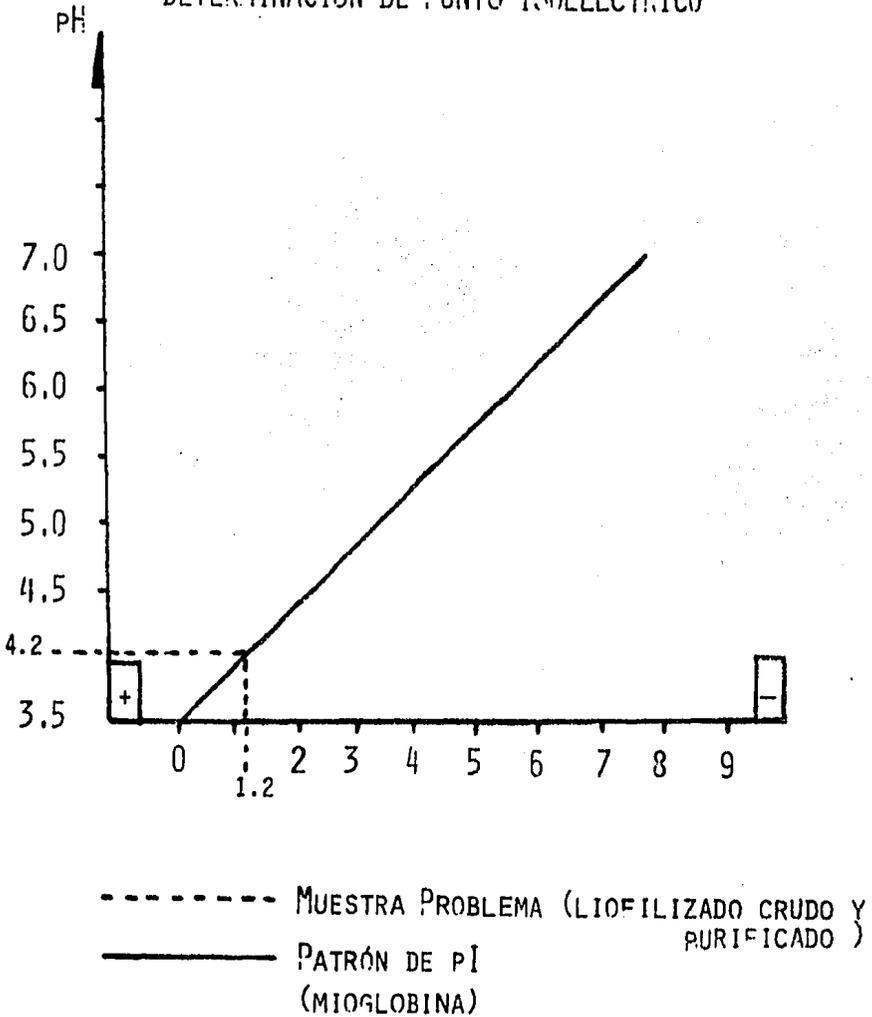


FIGURA No. 6.- Representación gráfica de la migración de Mioglobina (pI 7) y muestras problema (pI 4.2), en un gradiente de pH.

- Estornudos.
- Estertoria.
- En algunos casos, aparición de cianosis en nariz, orejas, boca y uñas.

Las lesiones macroscópicas observadas en los pulmones de los conejos tratados con el liofilizado crudo, son mostradas en la Lámina No. 2. Observándose la presencia de abundantes focos hemorrágicos y zonas de consolidación.

Las lesiones macroscópicas observadas en los conejos tratados con la proteína purificada, resultaron ser de menor intensidad a las observadas en los animales tratados con el liofilizado crudo.

Los conejos que no fueron tratados con ninguna sustancia (lote No. 1), y los tratados con BHI más 5% de extracto de levadura (lote No. 2), no presentaron ninguna alteración macroscópica ni microscópica.

Los estudios histopatológicos de los pulmones de los animales tratados con el liofilizado crudo y con la proteína purificada, mostraron en forma constante y a diferencia de los controles, los siguientes cambios que se consideraron significativos:

- En todos los casos fué notorio el incremento de eosinófilos infiltrados en los septos alveolares, y en acúmulos perivasculares y bronquiales.

- Otro elemento constante, fué la presencia de grandes células de citoplasma acidófilo y núcleos grandes de cromatina clara. Estas células de aspecto "blastoide", se observaron en grosando los septos y en acúmulos que aparentemente ocupaban las luces alveolares. Por su aspecto, éstas células pueden corresponder a fibroblastos, considerando que en algunos casos aparecieron formando cordones o con citoplasma estrellado.

- La presencia de mononucleares en la luz vascular y alrededor de los vasos sanguíneos, se observó en diferentes casos, incluso con aparente discontinuidad de la pared vascular.

LAMINA No. 2

ASPECTO MACROSCOPICO DE PULMON DE CONEJO TRATADO  
CON LA EXOTOXINA DE Haemophilus pleuropneumoniae



- En las zonas de pulmón con abundantes eosinófilos, no se presentaban o eran escasas las células de tipo fibroblasto antes mencionadas.

- Proliferación linfocítica perivascular y peribronquial con presencia de linfoblastos, en dos de los casos, tratados con el liofilizado crudo.

(ver Láminas Nos. 3, 4, 5 y 6)

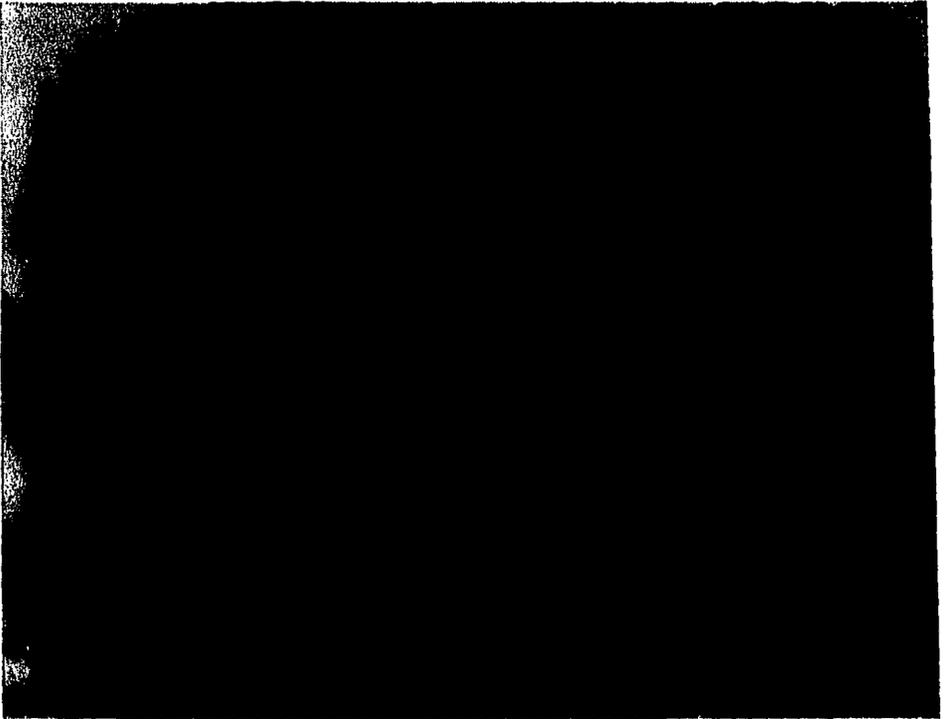
Los cambios señalados anteriormente, fueron más notables en los animales tratados con el liofilizado crudo, que en los tratados con la proteína purificada.

En general, las zonas afectadas mostraron marcado colapso y engrosamiento de septos alveolares. Observándose en tres de las muestras la presencia de focos hemorrágicos.

Los aislamientos bacterianos realizados a partir de los pulmones lesionados, sólo detectaron la presencia de Bacillus s.p.p.

LAMINA No. 3

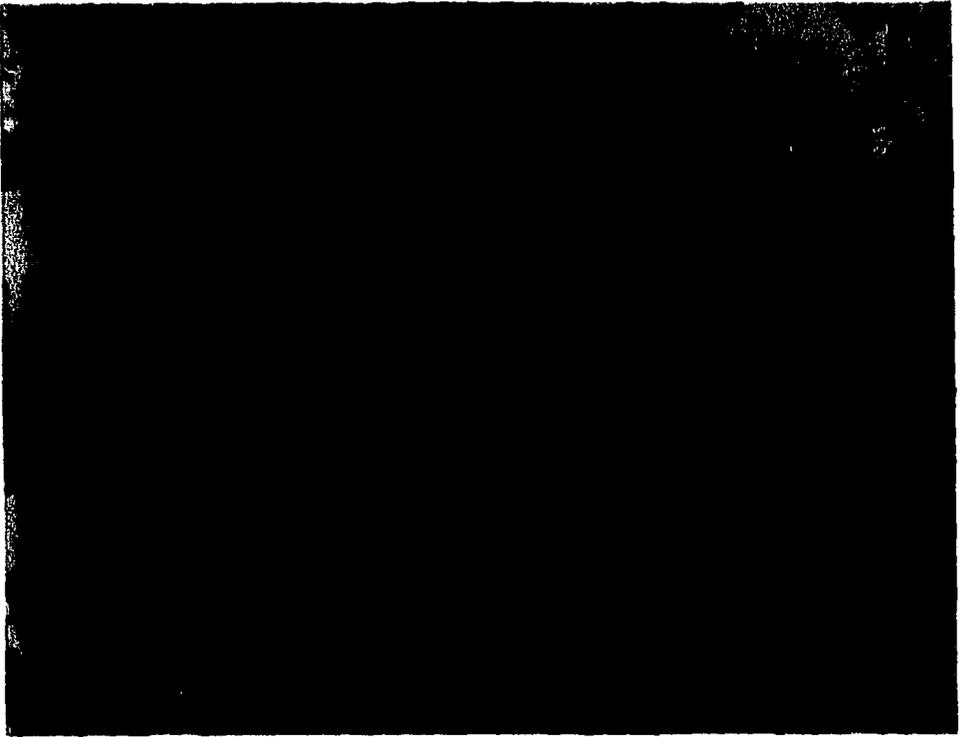
PULMON DE CONEJO (H.E.) 400 X



Se observa la presencia de células "blasto" de citoplasma acidófilo y núcleo de cromatina abierta, engrosando el septo alveolar (A). Igualmente se observa la presencia de abundantes eosinófilos (B). Observese que las luces alveolares se presentan libres de exudados inflamatorios (C).

LAMINA No. 4

PULMON DE CONEJO (H.E.) 480 X



Se observa abundante cantidad de células "blasto" en la proximidad de la luz bronquiolar (D), presencia de infiltrado de células mononucleares (E). Obsérvese que tanto la luz bronquiolar como los espacios alveolares visibles, se presentan libres de exudados inflamatorios.

LAMINA No. 5

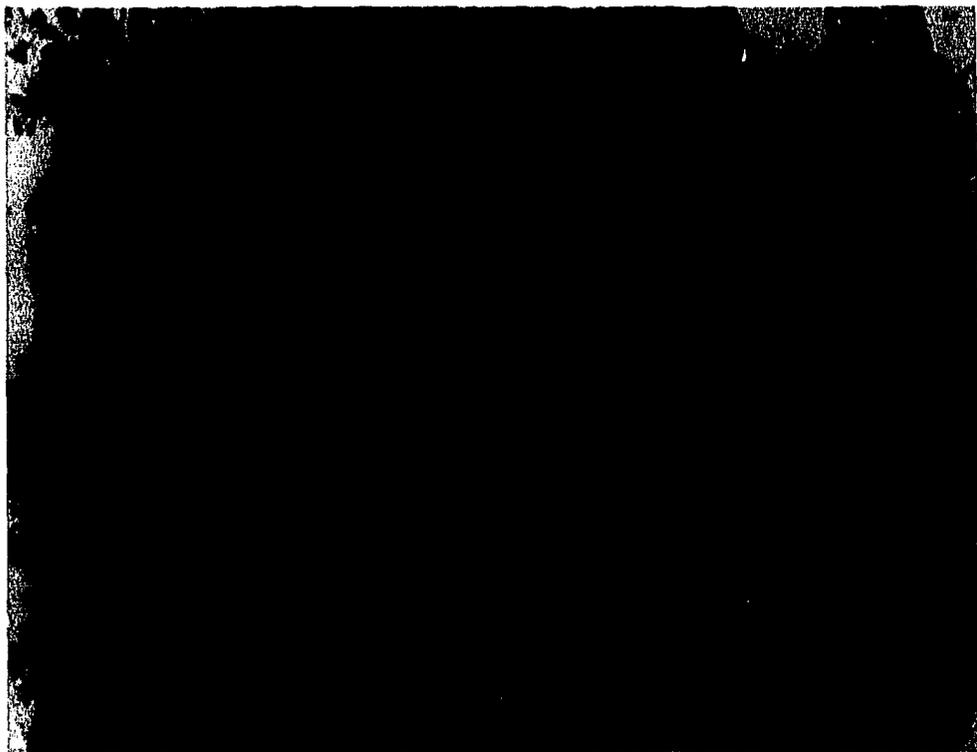
PULMON DE CONEJO (H.E.) 600 X



Presencia de eosinófilos en la proximidad de un vaso sanguíneo (F), y en el espesor del septo alveolar (G).

LAMINA No. 6

PULMON DE CONEJO (H.E.) 360 X



Se detecta la presencia de infiltrado de mononucleares en la proximidad de un vaso sanguíneo (H). Notese la abundancia de éste tipo celular en la periferia (I), y en contacto con la pared del vaso sanguíneo.

## D I S C U S I O N .

La neumonía fibrinonecrótica ocasionada por Haemophilus pleuropneumoniae ha constituido durante muchos años, uno de los problemas económicos de la industria del cerdo en México y en muchos otros países del mundo.

Los numerosos esfuerzos que hasta ahora se han hecho para tratar de controlar los brotes de ésta enfermedad, no han sido suficientes, ya que aún no ha sido posible desarrollar alguna bacterina, o vacuna bacteriana viva atenuada, capaz de prevenirla totalmente. Esto aunado al relativamente escaso conocimiento de la patogenia de dicha enfermedad, ha motivado el desarrollo de esta investigación, con el propósito fundamental de determinar si la patogenia de H. pleuropneumoniae está también asociada a la producción de exotoxinas, que contribuyan a la implantación y diseminación del microorganismo a nivel alveolar, escapando a los mecanismos de resistencia del tracto respiratorio.

Los experimentos reportados por Rosenda y colaboradores en el año de 1980, en los cuales se demostró, que el sobrenadante de cultivo de H. pleuropneumoniae libre de bacterias, era capaz de producir neumonía, similar microscópicamente a la causada en cerdos infectados experimentalmente con la bacteria viable. y los resultados de Bendixen y colaboradores en 1981, en los que se demostró también la toxicidad de los sobrenadantes de cultivo de la bacteria para macrófagos alveolares de pulmón de cerdo, sirvieron como evidencias para suponer que H. pleuropneumoniae, es capaz de excretar sustancias tóxicas (exotoxinas), responsables de los efectos observados por los investigadores antes mencionados.

Nosotros, basados en los datos en los que se establece que una exotoxina, es una sustancia de naturaleza protéica excretada por los microorganismos que la producen al medio circundante en que crecen, procedimos a cuantificar la concentración de proteína del medio de cultivo estéril (BHI más 5% de extracto de levadura), y del sobrenadante de cultivo de H. pleuropneumoniae libre de bacterias. Observando que la concentración de proteína del sobrenadante de cultivo de 18 horas, era mayor a la encontrada en el medio de cultivo estéril; éste resultado nos llevó a confirmar que la bacteria en cuestión es capaz de excretar proteína al medio circundante en que crece.

Establecido el hecho de que H. pleuropneumoniae excreta sustancias de naturaleza protéica, era necesario obtener dicha sustancia en la mayor concentración posible para poder efectuar su caracterización bioquímica y probar su toxicidad. Para ésto, fué necesario efectuar un crecimiento masivo de la bacteria hasta finalizar su fase logarítmica de crecimiento. Una vez terminada ésta fase, las bacterias fueron removidas del medio de cultivo masivo por centrifugación, esterilizando por filtración el sobrenadante obtenido.

Lo mencionado anteriormente se efectuó para evitar que el producto, o los productos extracelulares de interés, presentes en el sobrenadante de cultivo, estuvieran mezclados con bacterias viables, o con proteínas, ácidos nucléicos u otras sustancias macromoleculares, entre ellas, endotoxinas, provenientes de la autólisis de bacterias viejas, que además de dificultar la purificación, pudieran contribuir a la toxicidad asociada a dicho sobrenadante; tal es el caso del LPS, que fué reportado por Stanford y colaboradores en 1982, como causante de trombosis vascular con vasculitis, y exudación de fluido edematoso hemorrágico.

Para eliminar del sobrenadante de cultivo masivo estéril las proteínas del medio de cultivo que no llegaron a ser utilizadas por la bacteria (fundamentalmente péptidos de peso molecular menor de 10 000 d), y concentrar las proteínas excretadas por H. pleuropneumoniae (peso molecular mayor de 10 000 d), se efectuó la microfiltración de dicho sobrenadante. Una vez concentrada la proteína o proteínas de interés (exotoxina), fué liofilizada hasta un 100%.

Para saber si las proteínas contenidas en el liofilizado crudo, desarrollaban un efecto tóxico, se efectuó una prueba piloto de toxicidad. Observándose que los conejos tratados con dicho liofilizado, presentaban manifestaciones clínicas y lesiones pulmonares (macroscópicas y microscópicas), como consecuencia de la administración intranasal de dicha sustancia.

Para determinar cuantas proteínas de peso molecular mayor a 10 000 d, podría atribuirse la toxicidad encontrada, se llevó a cabo el estudio electroforético de dicho liofilizado, utilizando geles SDS - poliacrilamida al 5% y 10%. Al final de éste experimento fué posible demostrar la presencia de una sola proteína monomérica de peso molecular aproximado a 14000 d.

La proteína detectada en el liofilizado crudo, fué puri-

ficada por cromatografía de exclusión molecular, eliminando de ésta forma los solutos protéicos residuales de peso molecular menor de 10 000 d., que no pudieron ser excluidos en el proceso de microfiltración. Esto quedó demostrado por electroforesis, en la cual se observó que de los dos picos obtenidos en la gráfica de cromatografía, sólo las fracciones que conformaban el primer pico, describían una banda de proteína similar a la descrita por el liofilizado crudo.

Mediante la técnica de electroenfoque analítico en gel de poliacrilamida, fué posible determinar el punto isoeléctrico de la exotoxina ( $pI = 4.2$ ), el cual permitirá en investigaciones futuras la obtención más rápida de dicha sustancia.

La toxicidad de la exotoxina en su forma cruda y purificada, quedó demostrada con la prueba final de toxicidad. En esta prueba, se observaron mayores lesiones macroscópicas y microscópicas en los conejos inoculados con el liofilizado crudo, hecho que nos hace pensar que el método de purificación no se efectuó adecuadamente, o bien, que hubo una disminución de la actividad tóxica de dicha sustancia, al ser separada del extracto crudo.

La presencia de eosinófilos revelada en los estudios histopatológicos de los pulmones afectados, puede interpretarse como parte de un posible fenómeno alérgico, inducido por la toxina, o bien, por algún elemento contaminante.

Las células blastoides que han sido interpretadas como fibroblastos, pueden corresponder a las formas previas de las células modificadas que se observan en los pulmones neumónicos de cerdos afectados por H. pleuropneumoniae, o bien, ser la modificación correspondiente en conejos. Con menor probabilidad, debe considerarse la posibilidad de que se trate de macrófagos o células epiteliales, aunque ésta posibilidad no debe descartarse totalmente. Estas observaciones, permiten suponer algún efecto del liofilizado crudo y purificado sobre las células, que indujo su transformación.

Las lesiones vasculares: trombosis, hemorragias que se presentan en los pulmones neumónicos de cerdos afectados por la bacteria, no fueron observados en los conejos tratados con la exotoxina (cruda y purificada), pero los cambios observados en algunos de los vasos sanguíneos de los conejos lesionados, podrían ser el preámbulo a estos cambios. Sin embargo, debe recordarse que la trombosis ha sido asociada a la endotoxina de la bacteria (47).

El infiltrado de mononucleares perivascular, observado en -

los conejos tratados con la exotoxina, es un elemento también presente en los cerdos afectados por haemophilosis (14, 15, - 17).

Por lo anteriormente dicho, es evidente que las lesiones encontradas en estos conejos, no indican una neumonía fibrino necrótica como la observada por Rosendal y colaboradores en - 1981, esto puede deberse a que el modelo experimental fué diferente y el conejo puede estar dando una respuesta distinta a la del cerdo. Además, las lesiones descritas en los conejos, sugieren un efecto presumiblemente tóxico y de mayor especificidad que el observado por el investigador antes mencionado, quien utilizó el sobrenadante de cultivo completo, el cual probablemente contenía entre otras cosas, endotoxina, resultante de la lisis bacteriana.

El no haber observado polimorfonucleares en los pulmones afectados, sugiere que las lesiones observadas no pueden ser atribuidas a contaminantes bacterianos. Este hecho quedó reforzado por el resultado de los aislamientos bacterianos de los pulmones lesionados, en los cuales no se encontró ningún microorganismo que pudiera estar asociado a las lesiones encontradas.

La posibilidad de que las lesiones observadas en los pulmones de los conejos tratados con la exotoxina, fueran ocasionadas por Virus, Clamidias, o Micoplasmas, debe ser descartada por las siguientes razones:

- Las lesiones observadas no corresponden a estos microorganismos.
- Los animales controles, a pesar de estar confinados en la misma jaula de los animales problema, no presentaron lesiones macroscópicas ni microscópicas de ningún tipo.

Se intentó conocer la respuesta inmune humoral generada en contra de la exotoxina, utilizando la técnica de doble difusión. Los resultados negativos pueden sugerir que la toxina no pasa a sangre, ya que no fué posible detectar la presencia de anticuerpos en el suero de los animales lesionados (resultado no reportado en éste trabajo). Además, las disecciones de los animales afectados no mostraron lesiones macroscópicas en otros órganos, por lo que puede suponerse que ésta exotoxina como muchas otras, es órgano - específica. El resultado de estas observaciones no es concluyente, y consideramos necesario un estudio más profundo, debido a la escasa sen

sibilidad de la técnica empleada.

Sería deseable en un futuro, repetir el experimento de toxicidad de la exotoxina en cerdos, aunque el conejo resultó un buen modelo experimental.

Los resultados de toda esta investigación, además de contribuir al conocimiento actual de la patogenia de H. pleuropneumoniae, consideramos que pueden ser útiles para investigaciones futuras, enfocadas al control de ésta enfermedad, mediante la elaboración de toxoides. Siempre y cuando, sea demostrado que el toxoide es capaz de desarrollar inmunidad, protectora (antitoxina) contra los efectos de ésta exotoxina, y que además, se demuestre que dicha exotoxina es de importancia crítica en la presentación de la enfermedad.

## C O N C L U S I O N

Haemophilus pleuropneumoniae serotipo 5 (cepa 8022), es un microorganismo capaz de producir, bajo ciertas condiciones, una exotoxina monomérica de peso molecular aproximado a 14 000 d, con un punto isoeléctrico de 4.2 unidades de pH. Dicha exotoxina, no fué capaz de desarrollar la neumonía fibrinonecrótica característica en cerdos infectados experimentalmente con la bacteria viable, pero sí resultó ser tóxica por sí misma para pulmón de conejo.

Por lo anteriormente mencionado, puede presumirse que uno de los mecanismos que contribuyen a la patogenia de H. pleuropneumoniae, está dado por su capacidad de producir una exotoxina.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.) Ackers G.K. (1970). Analytical Gel Chromatography of Proteins. Adv. Protein Chem., 24 p:343
- 2.) Bendixen P.H., Shewen P.E., Rosendal S., Wilkie B.N. (1981). Toxicity of Haemophilus parahaemolyticus for porcine lung macrophages peripheral Blood monocytes and Testicular cells. Infect. Immun. 33(3) p: 673 - 676
- 3.) Bier Otto. (1977). Bacteriología e Imunología. 18a. Ed. Cap 16, p: 260 - 264. Ed. Melhoramentos, Brasil.
- 4.) Bixler H.J., Huasslein R.W., Nelsen L.M. (1969). Separation and Purification of Biological Materials by Ultrafiltration. Nat. Meet. Am. Inst. Chem. Eng. Cleveland.
- 5.) Blatt W.F. (1968). Membrane Ultrafiltration: The Diafiltration Technique and its Application to Microsolute Exchange and Binding Phenomena. Anal. Biochem. 26(1) p: 151
- 6.) Blatt W.F. (1968). The Application of Selective Ultrafiltration to Protein Chemistry. Tech. Report No. 68-40, U.S. Army Res. Inst. Environmental Medicine, Natick Mass.
- 7.) Blatt W.F. (1969). Ultrafiltration, A Preparative Procedure for Protein Chemistry. Am. Laboratory p: 21 - 30
- 8.) Christensen Gorm. (1981). Pleuropneumoni hos Svin Fremkaldt af Haemophilus pleuropneumoniae s. parahaemolyticus. Nord. Vet. Med., 33 p: 121 - 133
- 9.) Cole J.R., Jr.; Sangster L.T.; Cooper J.A. (1978). Haemophilus parahaemolyticus associated with pleuropneumonia in Georgia Swine. Vet. Med. & Small An. Clin. 73(11) p: 1444 - 1446
- 10.) Cowan S.T.; Steel K.J. (1982). Manual para la Identificación de bacterias de Importancia Médica. 2a. Ed. Cap. 7 p: 167 - 170. Ed. Continental S.A., México.
- 11.) Derijcke J., Devriese L., Hoorens J., Roose P. de, Castryck F. (1978) Haemophilus pleuropneumoniae infections in Swine. Vlaams Diergenees Kunding Tijdschrift. 47(5) p: 405 - 417
- 12.) Dulbecco D., Ginsberg W.E. y col. (1980). Tratado de Microbiología. 2a. Ed. Cap. 22: 652 - 664, Cap. 30: 818 - 823. Ed. Salvat editores S.A. Barcelona (España).
- 13.) Fuerst Robert. (1981). Microbiología. 14a. Ed., Cap. 17: 242 - 246,

- Cap. 30 : 384 - 389. Ed. Interamericana, México.
- 14.) García J. Tesis: Estudios sobre la obtención de mutantes estreptomicina dependientes de Haemophilus pleuropneumoniae con nitrosoguanidina, FES - C (1983)
  - 15.) Gunnarsson A. (1979). Evaluation of Different Antigens in the Complement-Fixation Test for Diagnosis of Haemophilus pleuropneumoniae (parahaemolyticus) Infections in Swine. Am. J. Vet. Res. 40(11) p:1564-1567
  - 16.) Hajsig D., Herceg M., Naglic T., Vrbanac I. (1980). Isolation of Haemophilus pleuropneumoniae from sporadic out breaks of porcine pleuropneumonia in Yugoslavia. Vet. Archiv. 50(5) p: 239 - 243
  - 17.) Hani H., Brandli A., Nicolet J., Konig H., Luginbuhl. (1976). Occurrence and Importance of pig diseases: Analysis of post-mortem material (1971 - 1973). IV. Diseases of the respiratory system. Schweizer Archiv. fur Tierheilkunde 118(2) p: 43 - 57
  - 18.) Harrison L.R., Kingler R.B., Shoey A.R., McGowan M.G. (1978). Haemophilus parahaemolyticus associated pleuropneumonia in Pennsylvania swine. A review of Bacteriologic and Pathologic findings from 55 cases presented to the Pennsylvania Bureau of Animal Industry Laboratory between August 1974 and May 1978. Proc. Am. Ass. Vet. Lab. Diag. 21 p: 209 - 215
  - 19.) Henry S. (1982). Haemophilus pleuropneumoniae bacterins. Proc. Minnesota Pork Conference p: 106 - 110
  - 20.) Jawetz Ernest, Melnick J.L., Adelberg E.A. (1975). Manual de Microbiología Médica. 6a. Ed. Cap. 11: 151 - 159, Cap. 19: 261 - 265 Ed El Manual Moderno S.A., México.
  - 21.) Kilian M. (1976). The Haemolytic Activity of Haemophilus spp. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B p: 339 - 341
  - 22.) Kilian M., Nicolet J., Biberstein E.L. (1978). Biochemical and Serological characterization of Haemophilus pleuropneumoniae (Matthews and Pattison 1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain. Int. J. Syst. Bact. 28 p: 20 - 26
  - 23.) Kiupel H. (1975). Diagnostic and Epidemiological observations on the occurrence of Haemophilus pleuropneumoniae in pigs. Monatshfte fur Veterinamedizin 30(18) p: 685 - 687
  - 24.) Lazary S., Sholl E., Rivera E. (1978). Immune Response to Haemophilus parahaemolyticus infection in the pig part I in vitro test to detect sensitized cells in the Blood of Infected and Vaccinated animals Vet. Microbiol. 3(2) p: 143 - 154

- 25.) Lehninger A. (1982). *Bioquímica*. 2a. Ed. Cap. 7: 161 - 187. Ed. - Omega, Barcelona (España).
- 26.) Little TWA., Harding JDJ. (1980). The Interaction of Haemophilus paraahaemolyticus and Pasteurella multocida in the Respiratory Tract of the pig. *Br. Vet. J.* 136(4) p: 371 - 383
- 27.) Lowry O.H., Rosenbrough N.Y., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 p: 266 - 275
- 28.) Martin J., Gunther H., Kielstein P. (1977). Experimental Haemophilus infection of SPF piglets. (Haemophilus haemolyticus, Haemophilus parasuis). II. Comparative pathology and histology. *Arch. Ex. Vet. Med.* 31(3) p: 347 - 357
- 29.) Molnar L., Glavits R. (1981). Pleuropneumonia caused by Haemophilus paraahaemolyticus in swine 2. Reproduction of the disease. *Magy Allatorv. Lapja* 36(2) p: 88, 93 - 98
- 30.) Morgan J.H., Phillips J.E. (1978). Isolation of Haemophilus paraahaemolyticus from pigs in Scotland. *Vet. Rec.* 103(7) p: 139 - 140
- 31.) Muirhead M.R. (1979). Respiratory diseases of pigs. *Brit. Vet. J.* - 135(6) p: 497 - 508
- 32.) Mylrea P.J., Fraser G., Macqueen P., Lambourne D.A. (1974). Pleuropneumonia in Pigs caused by Haemophilus paraahaemolyticus. *Aust. Vet. J.* 50(6) p: 255 - 259
- 33.) Nicolet J., Paroz (1981). An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, using an EDTA - Extracted Antigen for the Serology of Haemophilus pleuropneumoniae. *Am. J. Vet. Res.* 42(12) p: 2139 - 2142
- 34.) Nicolet J., Schifferli D. (1982). In vitro susceptibility of Haemophilus pleuropneumoniae to antimicrobial substances. *Proc. IPVS Cong. (México)* p: 71
- 35.) Nielsen R. (1979). Haemophilus paraahaemolyticus serotypes, (I). Serological response. (II). Pathogenicity and cross immunity. *Scand. Vet. Med.* 31(10) p: 401 - 413
- 36.) Nielsen R. (1976). Pleuropneumonia of swine caused by Haemophilus paraahaemolyticus. Studies on the Protection obtained by vaccination. *Acta. Vet. Med.* 23 p: 337 - 348
- 37.) Nielsen R. (1974). Serological and immunological studies of Pleuropneumonia of swine caused by Haemophilus paraahaemolyticus. *Acta. Vet. Scand.* 15 p: 80 - 89
- 38.) Pelczar M.J., Reid R.D. (1980). *Microbiología*. 2a. Ed. Cap. 23: -

361 - 371, Apéndice B: 619. Ed. McGraw Hill, México.

- 39.) Perrin G.G., Lorant J.M. (1979). Isolation and Demonstration of Haemophilus pleuropneumoniae on several swine farms in Brittany. Rec. Med. Vet. 155(6) p: 571 - 575
- 40.) Pijoan A.C. (1982). Haemophilus pleuropneumoniae in Pigs: Pathogenesis and control. Ann. Meet. Am. Ass. Swine Pract. Des Moines, Iowa U.S.A. p: 94 - 101
- 41.) Pijoan A.C., Cruz G., Martínez A., Arizpe H. (1982). Protection and immunity obtained with a Gel - adjuvant bacterin of Haemophilus pleuropneumoniae. Proc. IPVS Cong. (México) p: 73
- 42.) Pijoan A.C., Ochoa U.G. (1978). Isolation of Haemophilus parahaemolyticus from swine with pneumonia (México). Tec. Pec. Mex. 34 p: 85 - 87
- 43.) Pijoan A.C. (1982). Pneumonia control by immunization. Proc. Minnesota Pork Conference p: 66a - 66e
- 44.) Porter M.C., Michaelis A.S. (1971). Membrane Ultrafiltration. Chem. Tech. 1, 56
- 45.) Rosendal S., Carpenter D.S., Mitchell W.R., Wilson M.R. (1981). Vaccination against Pleuropneumonia of Pigs caused by Haemophilus pleuropneumoniae. Can. Vet. J. 22 p: 34 - 35
- 46.) Rosendal S., Lombin L., DeMoor J. (1981). Serotyping and Detection of Haemophilus pleuropneumoniae by Indirect Fluorescent Antibody Technique. Can. J. Comp. Med. 45 p: 271 - 274
- 47.) Sanford E. (1982). Porcine Haemophilus pleuropneumoniae: Pathology, Diagnosis and possible Pathogenesis. Am. Ass. of Swine Pract. Annu. Meet., Iowa U.S.A. p: 88 - 94
- 48.) Schiefer B., Greenfield J. (1974). Porcine Haemophilus parahaemolyticus pneumonia in Saskatchewan. II. Bacteriological and Experimental studies. Can. J. Comp. Med. 38(2) p: 105 - 110
- 49.) Schiefer B., Moffat R.E., Greenfield J. (1974). Porcine Haemophilus pleuropneumoniae pneumonia in Saskatchewan. I. Natural occurrence and findings. Can. J. Comp. Med. 38(2) p: 99 - 104
- 50.) Sebunya T.N.K., Saunders J.R., Osborne A.D. (1983). A Model Aerosol Exposure System for Induction of Porcine Haemophilus pleuropneumoniae Can. J. Comp. Med. 47 p: 48 - 53
- 51.) Shirasaka S., Hiramata Y., Nakagawa H., Tsuchida E. (1977). Haemophilus parahaemolyticus infections in swine, found at slaughter-houses in - the suburbs of Tsuchiura. Sci. Rep. Fac. Agric. Ibaraki Univ. 25 p: 5 - 10

- 52.) Strathman H. (1970). Separations of Materials by Piessure Filtration with Semi - Permeable Membranes (in German). Chem. Ing - Techn. 42 - (17) p: 1095
- 53.) Szazados I., Kadas I. (1979). Ocurrence of Pleuropneumonia caused by Haemophilus parahaemolyticus in Hungary (Preliminary report). Magy - Allatorv. Lapja 34(10) p: 681 - 682, 685
- 54.) Van Hoffen K.K., Van Dijk J.E. (1981). Clinical and Pathological features of Haemophilus pleuropneumoniae infection in Pigs. Tijdschrift voor Diergenees Kunde 106 (17) p: 873 - 880
- 55.) Vena M.M., Blanco V., Pereira J.J., Carrillo B.J. (1979). Isolation of Haemophilus parahaemolyticus from swine with pleuropneumonia. Rev Med. Vet. Argentina 60(6) p: 356 - 361
- 56.) Wallernborg B., Andersson U.B., LKB Application Note 249 (March 1978)
- 57.) Wang C.N., Hsu F.S., Liu J.L. (1975). Haemophilus parahaemolyticus - isolated from pigs with fibrinous pleuropneumonia in Taiwan. Chin. J. Microbiol. 8(4) p: 300
- 58.) Weber K., Osborn M. (1969). The Reliability of Macromolecular weight Determinations by Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electroforesis. J. Biol. Chem. 244 p: 4406
- 59.) Wellner D. (1971). Electrofocusing in Gels. Anal. Chem. 43 p: 597
- 60.) Williams C.A., Chase M.W. (1967). Methods in Immunology and Immuno - chemistry. Vol. I, Cap. 1: 64 - 75 Ed. Academic Press, New York - (U.S.A.)
- 61.) Winter Anders, et al. LKB Application Note 250 (December 1977).