



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLAN**

**EXPRESION DE ANTIGENOS DE *Actinobacillus
pleuropneumoniae* SEROTIPO 1 A PARTIR DE
CLONAS RECOMBINANTES DE *Escherichia coli*.**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
(AREA MICROBIOLOGIA)**

P r e s e n t a:

M. en C. VICTOR RUBEN TENORIO GUTIERREZ

Directora: Dra. MIREYA DE LA GARZA AMAYA

Cuatitlán Izcalli, Estado de México

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

S I N O D A L E S

PRESIDENTE:	DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO
PRIMER VOCAL:	DR. JORGE TÓRTORA PÉREZ
SEGUNDO VOCAL:	DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
TERCER VOCAL:	DRA. MIREYA DE LA GARZA AMAYA
SECRETARIO:	DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA
SUPLENTE:	DRA. CAMILA ARRIAGA DÍAZ
SUPLENTE:	DRA. ETHEL GARCÍA LATORRE

COMITE TUTORIAL

DRA. MIREYA DE LA GARZA AMAYA

DRA. CAMILA ARRIAGA DÍAZ

DRA. ETHEL GARCÍA LATORRE

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCA

DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA

A la memoria de mis padres

**Jesús Manuel Tenorio Mendoza
Ofelia Gutiérrez Becerril**

**A mis hermanos Luisa, Martha, Jesús,
José, Mario, Toña, Alfredo, Ignacio,
Roberto y Carlos**

Por su apoyo y aliento.

**A mi comite tutorial, por todos los conocimientos y consejos que me brindaron
para el desarrollo de este trabajo.**

**A todos mis compañeros del laboratorio 52 del Dpto. de Biología Celular del
CINVESTAV, por toda la ayuda y amistad que me han brindado siempre.**

**A todos mis compañeros del Dpto. de Bacteriología del CENID-Microbiología
por su aliento, apoyo pero principalmente por su amistad.**

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO 52 DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS, DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL Y EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA DEL CENID-MICROBIOLOGIA (INIFAP-SAGAR) Y APOYADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) MEDIANTE LA BECA CRÉDITO Registro No. 50131.

**EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*
SEROTIPO 1 A PARTIR DE CLONAS RECOMBINANTES DE *Escherichia coli*.**

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
BACTERIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA	3
TAXONOMÍA	3
DIFERENTES SEROTIPOS DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	4
FACTORES DE VIRULENCIA	5
SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS	8
EPIDEMIOLOGÍA	8
MODO DE TRANSMISIÓN	9
DISEMINACIÓN Y BROTE DE LA ENFERMEDAD	10
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	11
DIAGNÓSTICO INMUNIDAD Y CONTROL	12
1. DIAGNÓSTICO	12
a) SIGNOS CLÍNICOS	12
b) HALLAZGOS POST-MORTEM	13
c) DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO	14
d) DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO	15
2. INMUNIDAD	17
3. CONTROL POR VACUNACIÓN	18
GENERACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA	20
UNIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA	22
TRANSFORMACIÓN	23
PLÁSMIDOS COMO VEHÍCULOS EN <i>E. coli</i>	24
UTILIZACIÓN DE LA RECOMBINACIÓN <i>In vitro</i>	26
PROTEÍNAS CLONADAS DE <i>A. pleuropneumoniae</i>	27
OBJETIVOS	29
1. OBJETIVO GENERAL	29
2. OBJETIVOS PARTICULARES	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
1. CEPAS BACTERIANAS	30
2. MEDIOS DE CULTIVO	30
3. OBTENCIÓN DE SUEROS	30
4. PREPARACIÓN DE LA BACTERINA	31

5. OBTENCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y RESTRICCIÓN DE DNA CROMOSÓMICO DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	32
5.1 OBTENCIÓN	32
5.2 CUANTIFICACIÓN	32
5.3 OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS	33
5.3.1 RESTRICCIÓN	33
6. OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y RESTRICCIÓN DEL DNA DE PLÁSMIDO	34
6.1 OBTENCIÓN	34
6.2 PURIFICACIÓN	34
6.3 RESTRICCIÓN	35
7. ELECTROFORESIS DE DNA	35
8. LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DNA CROMOSÓMICO Y DE pBluescript	36
9. OBTENCIÓN DE TRANSFORMANTES	36
9.1 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	36
9.2 TRANSFORMACIÓN	37
10. OBTENCIÓN DE CLONAS QUE EXPRESAN PROTEÍNAS HETERÓLOGAS	37
10.1 TAMIZADO DE LA BIBLIOTECA DE GENES DE <i>A. pleuropneumoniae</i>	37
10.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTÍGENOS POR MEDIO DE GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS E INMUNOTRANSFERENCIA	39
11. PRUEBAS SEROLÓGICAS	41
11.1 FIJACIÓN DE COMPLEMENTO	41
11.2 INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA)	41
RESULTADOS	44
1. OBTENCIÓN DE DNA	44
2. OBTENCIÓN DE DNA DE PLÁSMIDO	44
3. CUANTIFICACIÓN	44
4. OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA CROMOSÓMICO	45
5. OBTENCIÓN DEL VECTOR RESTRINGIDO	45
6. LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DNA CROMOSÓMICO Y DE pBluescript	46
7. SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES	46
8. TAMIZADO DE LAS CLONAS RECOMBINANTES	47
9. ELECTROFORESIS E INMUNOTRANSFERENCIA	47
10. PRUEBAS SEROLÓGICAS	48
10.1 FIJACIÓN DE COMPLEMENTO	48
10.2 ELISA	50
10.3 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD	50
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	75
APÉNDICE I	76
BIBLIOGRAFÍA	80

EXPRESION DE ANTIGENOS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1 A PARTIR DE CLONAS RECOMBINANTES DE *Escherichia coli*.

RESUMEN

Actinobacillus pleuropneumoniae es el agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa porcina. Esta es una de las principales causas de pérdidas por enfermedades en la industria pórncicola en México. La clonación de antígenos involucrados en el desarrollo de la inmunidad es de gran interés, ya que estos podrían ser utilizados en pruebas diagnósticas. El objetivo de este trabajo fue el de obtener antígenos de la biblioteca genómica de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, construida en pBluescript y clonada en *Escherichia coli* DH5 α y evaluarlos utilizando sueros de cerdos infectados, vacunados y sin infección.

Por medio de un tamizado inmunológico, utilizando una mezcla de sueros positivos a *Actinobacillus pleuropneumoniae* por fijación de complemento, se seleccionó una clona recombinante de *Escherichia coli* (2732) a partir de una biblioteca genómica. En los extractos totales de esta clona, la mezcla de sueros reconoció por inmunotransferencia una proteína de >200 kDa de peso molecular aparente. Los extractos totales de esta clona fueron utilizados como antígeno en la prueba de ELISA y se comparó esta prueba con fijación de complemento en el diagnóstico de *A. pleuropneumoniae*. Para ello, se trabajaron 248 sueros de cerdos: 112 colectados de granja, 100 colectados en rastro (21 de ellos con aislamiento positivo), 3 de animales s.p.f. infectados en condiciones controladas y con aislamiento positivo, 23 de animales vacunados en condiciones controladas y 10 de animales s.p.f. considerados como controles negativos. La prueba de ELISA utilizando la clona 2732 fue capaz de diferenciar los cerdos infectados de los vacunados.

ABSTRACT

Actinobacillus pleuropneumoniae is the cause of porcine contagious pleuropneumonia, one of the most important economic losses in pig farming. The cloning antigens involved in the immunity is interesting, in order to use as diagnostic probes. The aim of this work was to obtain antigen from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 genomic libraries, constructed in pBluescript, and cloned in *Escherichia coli* DH5 α .

By using immunological screening with pooled pig sera positive to *Actinobacillus pleuropneumoniae* by complement fixation (CF), a recombinant clone of *Escherichia coli* (2732) was selected from a genomic library. The clone expressed a >200 kDa protein in crude extracts, and these were used in ELISA and compared with the CF test for *A. pleuropneumoniae* diagnosis. The assay included 248 pig sera: 112 from a farm, 100 from a slaughterhouse (21 with positive isolation), 3 from animals with positive isolation, infected in controlled conditions, 23 from animals vaccinated in controlled conditions and 10 from negative controls. The ELISA test with clone 2732 was able to discriminate between vaccinated and infected pigs.

INTRODUCCIÓN

BACTERIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

El agente infeccioso de la pleuroneumonía contagiosa porcina fue descrito por primera vez a principios de los años 60. Desde entonces, ha sido objeto de amplias investigaciones, con el fin de conocerlo mejor y definir sus factores de virulencia.

Ya que este pequeño cocobacilo Gram negativo requiere de nicotinamín-adenín-dinucleótido (NAD) para su desarrollo y gracias a sus propiedades bioquímicas y fisiológicas, Killian et. al. (1979) propuso nombrarlo *Haemophilus pleuropneumoniae*.

Taxonomía

La utilización en los últimos años de nuevas técnicas en la clasificación bacteriana con énfasis en el material genético, ha dado nuevos aspectos taxonómicos. Así, utilizando la técnica de homología de DNA, se ha demostrado que las especies de los géneros *Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella* pueden ser incluidas en un mismo grupo, el cual es llamado -HAP-, mostrando una gran relación genética (Pohl 1981). Estos hallazgos han hecho que se reconsidere la nomenclatura actual de ciertas bacterias de este grupo, proponiéndose el cambio de *H. pleuropneumoniae* a *Actinobacillus pleuropneumoniae*, debido a la gran similitud que existe en la secuencia de nucleótidos con los miembros del género *Actinobacillus*.

El hallazgo de bacterias "semejantes a *Pasteurella*" que producen lesiones similares a la pleuroneumonía en el pulmón del cerdo y que no requieren de NAD, pero que por lo

demás son fenotípicamente iguales a *A. pleuropneumoniae*, ha motivado la división de la especie, para distinguir entre biovariedad 1 (NAD-dependiente) y biovariedad 2 (NAD-independiente) (Pohl 1983) (tabla 1).

TABLE 1
Diferenciación bioquímica de las diferentes especies
de *Actinobacillus* aislados de cerdos.

	<i>A. pleurop. biotipo 1</i>	<i>A. pleurop. biotipo 2</i>	<i>A. suis</i>	<i>A. equuli</i>	<i>A. lignieresii</i>
*NAD	+	-	-	-	-
Hemólisis	+	+	+	-/+	-
Ureasa	+	+	+	+	+
Esculina	-	-	+	-	-
Trealosa	-	-	+	+	-
Manitol	+	+	-	+	+
Rafinosa	V	V	-	+	+

*Requiere para su desarrollo.
V= Variable

Los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae*

Con base en los polisacáridos capsulares y en el requerimiento de NAD del agente clásico de la pleuroneumonía contagiosa porcina, la biovariedad 1 de *A. pleuropneumoniae*, puede ser dividida en 12 diferentes serotipos, los cuales se piensa tienen varios antígenos en común (Gunnarsson et al 1978; Sebunya y Saunders 1983; Rapp et al 1986; MacInnes y Rosendal 1987; Romero 1989; Fedorka-Cray et al 1994)

Algunas cepas NAD-independientes (biovar 2) parecen tener también antígenos capsulares similares (Gunnarsson 1979; Nicolet 1982).

Los diferentes serotipos comúnmente muestran prevalencia nacional, regional o local (Rosendal y Mitchel 1983; Brandreth y Smith 1985; Vaillacourt et al 1990).

Se ha tratado de agrupar también a los 12 diferentes serotipos en base a la virulencia que presentan éstos en algunos modelos experimentales (Komal y Mittal 1990).

Factores de virulencia

De los 12 serotipos de *A. pleuropneumoniae* identificados hasta la fecha, algunos de estos producen una enfermedad más severa que otros. La inoculación con tan solo 10 000 células viables del serotipo 1, produce la muerte del cerdo en menos de 12 horas y con sólo 100 bacterias puede producirse un absceso en el pulmón. Los factores de virulencia que presenta esta bacteria son los responsables de la colonización y de las lesiones que se producen en el transcurso de la enfermedad. Muchos factores de virulencia han sido descritos para *A. pleuropneumoniae* y el papel que juega cada uno de estos factores en la patogénesis de la enfermedad ha sido sujeto de un intenso estudio en los últimos años y apenas comienza a entenderse (Inzana 1991, Fedorka-Cray et al 1994, Reimer et al 1995, Frey 1995).

Por medio de estudios de microscopía electrónica se ha demostrado que los aislados virulentos del serotipo 5 poseen una cápsula más gruesa y más adherente que las cepas avirulentas (Jensen y Bertram 1986). Jacques et al (1988) utilizando los serotipos del 1 hasta el 10, encontraron una correlación positiva entre la presencia de cápsula y virulencia. Otros estudios también han confirmado la virulencia de la cápsula, ya que mutantes deficientes de cápsula de los serotipos 1 y 5 son mucho menos virulentas que las cepas

originales capsuladas (Inzana et al 1988, Rosendal y MacInnes 1990). La cápsula es el componente principal que protege a la bacteria de las defensas del huésped. Células capsuladas de las serotipos 1-3, 5 y 7 han mostrado resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos y el complemento, tanto en sueros hiperinmunes de cerdo como de conejo (Inzana et. al. 1988; Rycroft y Cullen 1990). *A. pleuropneumoniae* también es resistente a la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares, pero es eficientemente opsonizado en presencia de anticuerpos contra la cápsula (Inzana 1991).

Pocos estudios se han hecho sobre las fimbrias, debido a la dificultad de estos apéndices de producirse *in vitro*. Esto sugiere que su presencia en la bacteria puede ser importante *in vivo* pero no son requeridas *in vitro*. Su papel en la patogénesis no ha sido determinado hasta la fecha, aunque en otras especies bacterianas estos apéndices son necesarios para la adhesión a los tejidos, por lo que en *A. pleuropneumoniae* podrían tener un papel similar (Utrera y Pijoan, 1991).

El lipopolisacárido o endotoxina de la membrana externa es otro importante factor de patogenidad. Todos los serotipos tienen un grupo central y cadena O diferentes. Dentro del mismo serotipo cada cepa puede variar en la longitud de la cadena O, pero todas tienen un grupo central igual. En el serotipo 5 se han descrito cepas rugosas y cepas lisas y ambas son serotipo-específicas y tienen epítomos en su lipopolisacárido que dan reacciones cruzadas (Altman et al 1990). Belanger et al. ((1990) encontraron que el 83% de los serotipos con LPS liso se adhieren en gran número a los anillos traqueales de cerdo, mientras que el 80% de los serotipos con LPS parcialmente rugoso se adhieren pobremente a los mismos anillos.

Las exotoxinas bacterianas juegan un importante papel en la producción de cualquier enfermedad, particularmente en los organismos que afectan mucosas. En *A. pleuropneumoniae* se demostró su presencia inoculando sobrenadante de cultivo estéril en cerdos. Las lesiones que se observaron fueron muy semejantes a las producidas en una infección natural (Rosendal et al., 1980). Desde entonces estas exotoxinas han sido activamente estudiadas. Dentro de estas exotoxinas se ha descrito una cohemolisina que produce una reacción de CAMP (Christie, Atkins, Munch y Pettersen) al presentarse el sinergismo con la toxina β de *Staphylococcus aureus* (Frey et al 1989, Lian et al 1989). También se ha descrito la presencia de exotoxinas con actividades de hemolisinas y de citotoxinas a la vez, las cuales se conocen como ApxI, ApxII y ApxIII. Estas toxinas se encuentran dentro del grupo de las toxinas RTX, es decir, tienen secuencias repetidas de aproximadamente 9 aminoácidos. A este grupo pertenecen también otras hemolisinas de bacterias Gram negativas, habiendo gran homología entre diferentes géneros. ApxI es fuertemente hemolítica y citotóxica, ApxII es débilmente hemolítica y citotóxica y ApxIII no es hemolítica pero es fuertemente citotóxica (Frey y Nicolet 1988; Kamp et al. 1991; Rycroft et al. 1991; Frey 1995). Por lo tanto, la virulencia de los diferentes serotipos depende de cuales de estas toxinas estén presentes.

Muy pocos trabajos se han hecho para determinar la importancia de las proteasas (Kilian et al 1979, Negrete et al 1994) y su papel en la patogenicidad aún no se ha esclarecido. Se cree que podrían favorecer la colonización de la bacteria por la ruptura de la inmunoglobulina A, ya que ésta es una de las barreras primarias para llegar al tracto respiratorio, así como la degradación de los tejidos cercanos, lo que permitiría la invasión.

Susceptibilidad a los antibióticos

A. pleuropneumoniae es, *in vitro*, altamente susceptible a muchos antibióticos. Son preferidas en la terapéutica las sustancias con concentraciones mínimas inhibitorias, sin embargo, las propiedades farmacocinéticas de los antibióticos y sobre todo, la posibilidad de producir resistencia bacteriana, tiene que tomarse en cuenta. En los últimos años han sido reportados plásmidos de resistencia a diferentes antibióticos (Hirsch et. al. 1982, Gilbride y Rosendal 1984, Huether et al. 1987, Willson et al 1989). Sin embargo, se ha encontrado que la resistencia a los antibióticos, en la mayoría de los casos no es codificada por plásmidos (Inoue et al 1984, Kawahara et al 1989, Colmenares et al 1989, Suzuki et al 1989, Gutiérrez et al 1993). De todos modos es necesario determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos de cada cepa aislada de *A. pleuropneumoniae*, ya que los patrones difieren dependiendo del área geográfica de donde fue aislada (Nadeau et al 1988, Willson et al 1989, Gutiérrez 1993).

Epidemiología

Actinobacillus pleuropneumoniae es un parásito del tracto respiratorio, con una alta especificidad hacia el huésped, el cerdo. En las infecciones de tipos hiperaguda y aguda, el agente no sólo puede encontrarse en lesiones neumónicas o septicémicamente, sino también en todas las mucosas del tracto respiratorio y en el moco se pueden tener más de 10^5 bacterias /ml. (Nicolet, 1985).

En cerdos infectados crónicamente, el agente etiológico está localizado en lesiones

necróticas del pulmón y/o en las tonsilas y menos frecuentemente en la cavidad nasal. Se debe señalar que en Japón, dentro de una población sana, se encontró un alto porcentaje de animales en los que se aisló el agente de cavidad nasal (Kume et al 1984). En el medio ambiente, este microorganismo no sobrevive por mucho tiempo, pero protegido por el material de descarga nasal, puede vivir unos días más, hasta que este material se deshidrate completamente. El periodo de incubación varía ampliamente ya que, en infecciones experimentales, se ha encontrado que con exposiciones a una gran cantidad de bacterias puede producirse la muerte en pocas horas o días, mientras que con bajas cantidades de bacterias puede producirse una infección subclínica (Nielsen y Mandrup 1977; Sebunya et al 1983, Fedorka-Cray et al 1994).

Modo de transmisión

Es por todos aceptado que la enfermedad se transmite por contacto directo de cerdo a cerdo, o por fomites en los corrales en un área muy reducida. En unidades de engorda, cuando hay brotes agudos la infección puede pasar de un corral a otro, sugiriendo el papel que juegan los aerosoles, a pesar de la gran distancia que exista entre los corrales. También puede haber transmisión indirecta por el personal de la granja, ya que por la gran excreción nasal que existe durante la fase aguda, la transmisión puede producirse a través de la ropa, botas o instrumental contaminado con estas descargas. La posible participación de pequeños roedores o pájaros no puede ser descartada, pues se ha logrado identificar por serología *A. pleuropneumoniae* de estos animales. Por otra parte, el ser humano no es huésped de esta bacteria y no se ha logrado aislar este agente de nariz, ni de garganta del

personal de granjas con el problema. (Nicolet 1985).

La enfermedad comúnmente se inicia en una población susceptible por la introducción a la piara de cerdos infectados crónicamente y un animal que se recupera de la infección se mantiene como portador asintomático por varios meses. Diversos factores de estrés, tales como el hacinamiento y las condiciones ambientales adversas, como cambios bruscos de temperatura, alta humedad relativa y falta de ventilación, que predisponen a cualquier tipo de neumonía, dan lugar al inicio y diseminación de la enfermedad y consecuentemente, esto incrementa los índices de morbilidad y mortalidad. Por ello no es sorprendente que las más altas incidencias de brotes sean observadas durante los meses de otoño e invierno (Nielsen y Mandrup 1977; Sebunya y Saunders 1983, Pijoan 1990).

Diseminación y brote de la enfermedad

Después de introducir un portador sano a la población susceptible, la enfermedad puede diseminarse subclínicamente hasta que los factores de estrés den cabida a la manifestación clínica (Rosendal et al. 1981, Freese 1990). En la mayoría de los casos esta se hace rápidamente evidente, acompañada por desenlaces fatales. La letalidad difiere ampliamente de acuerdo a la situación epidemiológica e inmunológica de cada explotación. En general el porcentaje de letalidad parece ser mayor en unidades de cría que en unidades de finalización (Rosendal y Mitchell 1983, Freese 1990).

El curso de la manifestación clínica y la diseminación de la enfermedad pueden ser influenciados por el grado de separación de las diferentes unidades y por la rápida terapia antimicrobiana (Pijoan 1990). Sin embargo, en unas semanas o en pocos meses después del

primer episodio agudo de la enfermedad, un alto porcentaje de animales tendrá anticuerpos específicos, esto sugiere que los animales, sin necesariamente presentar signos clínicos, han sido expuestos al agente y consecuentemente la población ha adquirido un grado de inmunidad, pero no obstante esto la enfermedad puede seguirse manteniendo subclínicamente. De esta manera una población aparentemente sana debe considerarse crónicamente infectada y representa un peligro para poblaciones susceptibles.

Las manifestaciones de la enfermedad en poblaciones infectadas crónicamente, dependen en gran parte de las condiciones de manejo y de la evolución de la inmunidad del hato. Se ha demostrado que si la granja se maneja con higiene, se separan y se detectan los portadores y si en un brote se sacan todos los animales y se repuebla con animales sanos, se logra tener una granja libre de *A. pleuropneumoniae* (Pijoan 1990, Maqueda 1994). Después de la desaparición de los anticuerpos castrales, a las 5-9 semanas, los animales pueden mantenerse seronegativos bajo condiciones óptimas y estos no transmitirán inmunidad castral a sus crías.

Distribución geográfica

A. pleuropneumoniae ha sido reportado prácticamente en todos los países en donde la reproducción del cerdo se ha industrializado (Sebunya y Saunders 1983,). Esto reafirma la idea de que los sistemas de manejo modernos favorecen la expresión de este tipo de infecciones (Brandreth y Smith 1985, Freese 1990).

La prevalencia regional de ciertos serotipos no es sorprendente, pero la relación entre diferentes serotipos de diferentes países es de gran interés, como punto de transmisión a

través del intercambio internacional de animales. Este factor puede explicar la aparición de nuevos serotipos en ciertas áreas.

En México los primeros brotes de la enfermedad fueron observados en 1976, en La Piedad, Michoacan, zona porcícola que tenía un comercio activo de cerdos con EUA y Canadá. A partir de esa fecha la enfermedad rápidamente fue afectando las principales áreas porcícolas del país y en la actualidad esta ampliamente distribuida en todos los estados, considerándose como la enfermedad respiratoria de mayor importancia. Se ha comunicado la presencia de casi todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* en el territorio nacional, siendo los serotipos 1 y 5 los más frecuentemente aislados (Ciprian et al. 1988; Díaz et al. 1989; Ontiveros et al. 1995)

Diagnóstico, inmunidad y control

1. Diagnóstico

Existen cuatro métodos principales de diagnóstico para la detección de las infecciones por *A. pleuropneumoniae* en los cerdos: a) signos clínicos y curso de la enfermedad en cada cerdo y en la piara, b) hallazgos post-mortem, c) aislamiento de la bacteria del tracto respiratorio y d) serología.

a) Signos clínicos

La infección puede ser de tres tipos: hiperaguda, aguda y crónica (Shope 1964; Nielsen 1982). En poblaciones completamente susceptibles, la pleuroneumonía se presenta repentinamente, se disemina rápidamente y afecta a todos los animales no importando la

edad, incluyendo a los lactantes y a los de finalización. Comúnmente el encargado se da cuenta de la presencia de la infección cuando varios animales han perdido repentinamente el apetito y presentan fiebre (40-41° C).

En casos rápidos y de desenlace fatal, estos signos iniciales son seguidos por cianosis de la piel y membranas, disnea, tos húmeda y los cerdos afectados presentan vómito; la afección respiratoria es tan severa que los cerdos respiran con la boca abierta y se mantienen sentados. Poco antes de la muerte hay descargas con sangre por boca y nariz y la muerte ocurre antes de 24 horas de iniciada la infección (Tenorio et al 1987, Freese 1990, Madsen et al 1995). Ocasionalmente algunos animales pueden morir súbitamente sin presentar signos. La letalidad en los casos hiperagudos es alta, entre el 80 y el 100%.

En neonatos, la infección se presenta como una septicemia y la mayoría de las camadas se pierden y aquí los disturbios nerviosos pueden ser un signo distintivo en los animales infectados. Otros cerdos pueden mostrar depresión e inmovilidad y, cuando son forzados a moverse, muestran signos de afección respiratoria y un respiro corto y forzado, la muerte puede ocurrir en 1 ó 2 días si progresa la enfermedad, o puede evolucionar a la cronicidad.

Los animales con afección de tipo crónico tienen signos tales como disminución del apetito, desarrollo lento, tos crónica, baja conversión alimenticia y su temperatura puede variar entre normal y 40-41°C.

b) Hallazgos post-mortem

Las lesiones del tracto respiratorio en las formas hiperaguda, aguda y crónica son diagnósticas de la infección. Las lesiones pueden ser descritas como neumonía fibrinosa

lobular acompañada de una pleuritis y en los casos crónicos hay una pleuritis fibrosa y los pulmones pueden presentar focos necróticos de distribución y tamaño variable (Nielsen 1982, Olander 1963, Shope 1964, Bertran 1985). Los focos necróticos muy comúnmente mantienen la infección por varios meses y los cerdos con estas lesiones son portadores de la enfermedad.

En un brote, los primeros exámenes post-mortem son importantes ya que permiten asegurar el diagnóstico. En los animales sin signos clínicos, el papel de la inspección sanitaria de las vísceras juega un papel importante, ya que una alta prevalencia de pleuritis crónica al sacrificio, da la seguridad de que hay neumonía crónica en esa población, la cual podría deberse a *A. pleuropneumoniae* (Christiasen 1984 y Nielsen 1982).

c) Diagnóstico bacteriológico

Comúnmente el cultivo puro de *A. pleuropneumoniae* es fácilmente obtenido de los pulmones en casos de tipo hiperagudo y agudo de pleuroneumonía. Las infecciones generalizadas con aislamientos de hígado y bazo, parecen ocurrir en animales afectados en forma hiperaguda, mientras que el aislamiento de este microorganismo de otros órganos o tejidos que no sean pulmones y pleura es muy variable en casos crónicos (Nielsen 1982; Sebunya et al 1983). En lesiones crónicas muy viejas es difícil el aislamiento y la serología es el método de elección para el diagnóstico.

El aislamiento de *A. pleuropneumoniae* puede realizarse en agar sangre, con la ayuda de un cultivo cruzado en línea de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* (cepa nodriza), durante toda la noche con CO₂ al 5 ó 7%. Otra forma de lograr el aislamiento es

utilizando la técnica de dilución en caldo PPLO, de donde después de incubarse durante toda la noche se siembra en agar sangre con cepa nodriza (Pijuan et al 1983).

Una parte muy importante del diagnóstico bacteriológico es la serotipificación de las cepas aisladas.

Hasta el momento 12 serotipos han sido identificados en base al antígeno capsular, esta clasificación coincide con la distribución de proteínas de membrana externa (Gunnarson 1980; Nielsen 1982; Nielsen 1984; Rosendal y Boyd 1982; Nielsen 1986). Todos los serotipos son idénticos en morfología y propiedades bioquímicas y sólo por pruebas serológicas pueden ser diferenciados.

Los serotipos encontrados en una región pueden cambiar y por lo tanto es necesario realizar la serotipificación de las cepas que se aíslan cada vez de los casos de campo.

d) Diagnóstico serológico

Las pruebas serológicas son importantes en el diagnóstico de esta enfermedad.

Durante el curso de la infección los anticuerpos pueden ser detectados por medio de pruebas serológicas como fijación de complemento (Nielsen 1982, Lombin et al. 1982), aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol (Villancourt et al 1986; Goyette et al 1986), coaglutinación (Mittal et al 1987), aglutinación en tarjeta (Ciprian et al 1990), ELISA (Nicolet et al 1981; Nielsen et al 1993; Bossé et al 1993; Nielsen 1995) y neutralización de la hemolisina (Fedorka-Cray et al 1993). Las pruebas dan un panorama de cómo se encuentra la infección en la plara y con ellas la mayoría de casos crónicos y subclínicos pueden ser detectados. En animales crónicamente infectados por *A. pleuropneumoniae* es

común que los signos clínicos no se presenten y que estos cerdos sean portadores sanos, los cuales pueden producir brutes agudos cuando se transfieren de unidad (Nielsen 1982); por lo tanto, es importante que tales serorreectores sean detectados lo más rápido posible. Algunas de estas pruebas dan un gran número de falsos positivos o negativos.

Para la realización de todas las pruebas serológicas, se ha utilizado principalmente como antígeno, las células completas de *A. pleuropneumoniae*.

En las pruebas de ELISA se ha utilizado principalmente como antígeno de captura, células completas de *A. pleuropneumoniae* (Loaftager et al. 1993; Stine et al 1993), pero también se utilizado el lipopolisacárido (Bossé et al 1993), extractos celulares (Sidibé et al 1993) y hemolisina (Ma et al 1990). Igual que cuando se utiliza la célula completa como antígeno, los resultados obtenidos con el lipopolisacárido y con los extractos celulares son serotipo-específicos, ya que en estos se encuentran los epitopes característicos de cada uno de los diferentes serotipos, pero al utilizar la hemolisina es posible realizar el diagnóstico de todos los serotipos que producen esta proteína (Ma et al 1990).

No obstante que las pruebas serológicas se utilizan individualmente para cada animal deben de ser interpretadas en base a la piara, ya que los animales infectados recientemente muy rara vez dan títulos positivos y los animales infectados crónicamente dan un alto porcentaje de serorreectores.

Cuando la serología y la vacunación son considerados como método de control y prevención de la enfermedad, es importante conocer cuáles son los serotipos presentes en la población porcina, ya que el serodiagnóstico es serotipo-específico (Gunnarson 1979; Nielsen 1982; Hunter y Livigstone 1986; Mittal et al 1987; Ontiveros et al 1995) y la

inmunidad obtenida por vacunación es expresada sólo contra el serotipo que contiene la vacuna (Gunnarson 1979; Rosendal et al 1981; Nielsen 1984; Fenwick y Osburn 1986; Izana y Mathison 1987; Cruidjzen et al 1995).

2. Inmunidad

Existen varios factores que influyen en el curso de la pleuroneumonía en una explotación. Uno de estos factores es la inmunidad, ya que en un brote de pleuroneumonía de tipo agudo, en 2 a 3 semanas la morbilidad empieza a disminuir, debido al desarrollo de la inmunidad de hato.

En explotaciones de cría con cerdos crónicamente infectados, es poco común encontrar signos en animales adultos y por otra parte las cerdas confieren inmunidad pasiva a sus camadas, la cual protege a sus lechones durante las primeras semanas de vida. Se pueden encontrar casos agudos en lechones en los cuales han disminuido los niveles de anticuerpos calostrales, pudiendo también presentarse los casos en animales no inmunes recién introducidos en la piara. Una vez que se presenta la infección, ésta se manifiesta durante períodos muy largos, ya que no se logra establecer una inmunidad de hato por el constante movimiento de animales. (Mittal et. al. 1984).

Los anticuerpos circulantes sólo pueden ser detectados por fijación de complemento 10 días después de que se inició el brote, que es cuando los niveles de anticuerpos se encuentran elevados y la morbilidad empieza a disminuir. Estos anticuerpos alcanzan sus niveles máximos después de 2 a 3 semanas de iniciado el brote, posteriormente empiezan a decaer, pudiéndose mantener bajos por varios meses (Fedorka-Cray et al 1994).

3. Control por vacunación

Estudios sobre la protección que confiere una bacterina hecha de un cultivo de 6 horas, con bacterias muertas y adyuvante incompleto de Freund, han demostrado que puede proveer de cierta protección a los animales inmunizados al ser desafiados con el serotipo homólogo al de la vacuna (Nielsen 1976; Rosendal et al. 1981; Nielsen 1982; Mason et al 1982).

Debe enfatizarse que, en contraste con la infección aérea, la cual induce una alta inmunidad, tanto para el serotipo homólogo al de la infección como para los serotipos heterólogos (Nielsen 1979; Izawa y Mathison 1987), la vacunación no confiere inmunidad cruzada. Por lo tanto, las vacunas deben contener los serotipos que existen en el área en donde se encuentra la población porcina que se desea vacunar.

En la vacunación de lechones debe ser considerado el efecto supresor de los anticuerpos colostrales y por esta razón estos animales deben ser vacunados hasta las 5 a 6 semanas de edad aproximadamente.

En poblaciones infectadas crónicamente, los animales seronegativos que se van a introducir deben ser vacunados antes de tener contacto con la población afectada.

La protección obtenida por vacunación no es total (Mason 1982; España 1986; Fedorka-Cray 1994) y la barrera inmune puede ser rota por una fuerte carga de infección, además, algo muy importante es que los animales vacunados pueden hospedar al microorganismo en sus mucosas y así actuar como portadores de la infección. Esto al parecer implica que *A. pleuropneumoniae* no pueda ser eliminado a través de programas de vacunación.

Debido a la limitada protección conferida por las vacunas comerciales se han

probado diferentes inmunógenos, hasta ahora experimentales, con el fin de proveer a los cerdos de una protección más sólida. Entre estas alternativas se han probado vacunas vivas, utilizando mutantes de *A. pleuropneumoniae* que no producen hemolisina (Inzana et al 1991) o acapsuladas (Inzana et al 1993); también se han probado algunos factores de virulencia purificados, como proteínas de membrana externa (Chiang et al 1991; Madsen et al 1995), polisacáridos capsulares (Inzana 1988; Byrd y Kadis 1992), el lipopolisacárido (Byrd y Kadis 1992), las exotoxinas (Apx) (Devlinish et al 1991; Frey y Nicolet 1991; Fedorka-Cray et al 1993; Madsen et al 1995); se ha hecho además inmunización pasiva con suero hiperinmune (Stenbaek 1992). Se han probado también vacunas con productos recombinantes, como proteínas de membrana externa y exotoxinas (Rossi-Campos et al 1993; Van der Bosh et al 1994).

Hasta ahora todos los inmunógenos probados sólo reducen las pérdidas económicas por disminución en la muerte de animales, reduciendo en muy poco la morbilidad y el daño al tejido, aumentando con esto, por otro lado, las pérdidas por la sobrevivencia de animales con lesiones y de muy poca ganancia de peso. Esto ha hecho que el control de la enfermedad sea difícil y adicionamos a lo anterior el no contar con antígenos capaces de detectar la enfermedad en sus primeras etapas o en su forma crónica y de poder diferenciar a los animales vacunados de infectados. Hasta el momento no se cuenta con antígenos específicos para este último fin, ya que las pruebas sólo detectan anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae*, sin saber si estos animales fueron inmunizados antes de realizar las pruebas.

El utilizar como herramienta la clonación de genes, puede ayudar a obtener

antígenos específicos de *A. pleuropneumoniae*. Los genes clonados o las proteínas expresadas pueden ser utilizados en una prueba diagnóstica que permita hacer la diferencia entre anticuerpos producidos por una infección de los producidos por una vacunación.

La técnica experimental conocida con los nombres de "clonación molecular" o "DNA recombinante" es actualmente la metodología más poderosa para resolver un sin número de problemas de carácter inmunológico. Resumiendo, se puede decir que 2 ó más fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) son unidos (recombinados) *in vitro*, mediante el uso de varias enzimas. Uno de los fragmentos es llamado "vector" o "vehículo molecular", y es capaz de replicarse en alguna célula huésped, y el otro fragmento es conocido como pasajero, "clonado" o "inserto" y es pasivamente replicado por el vehículo.

Generación de fragmentos de DNA

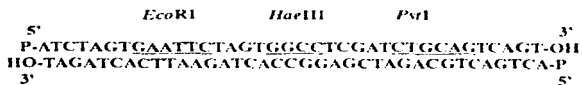
Cualquier fragmento de DNA, no importando su origen, puede ser clonado. Para la generación de estos fragmentos de DNA se conocen tres diferentes métodos. Uno de ellos es la "síntesis de novo", en donde varios grupos, utilizando esta metodología, han sido capaces de producir las hormonas somatostatina e insulina a partir de genes sintetizados químicamente (Goeddel et al 1979; Itakura 1977). Esto se ha logrado clonando copias de DNA complementario sintetizados químicamente a partir de RNA mensajeros de los diferentes genes (Efstratiadis et al 1975; Higuchi et al 1976; Rabitts 1976).

El "rompimiento mecánico controlado" (Hogness y Simmons 1964) es otro método para generar fragmentos de DNA. Este método es muy útil para producir fragmentos de más de 10 000 pares de bases (pb).

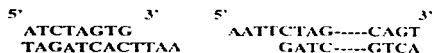
El tercer método para generar fragmentos es la "digestión con enzimas de restricción", y este es el más utilizado actualmente. El sitio de reconocimiento de una enzima de restricción, comúnmente consiste de una secuencia específica de 4 a 6 pares de bases. Estos sitios están más o menos distribuidos en el DNA, encontrándose, en promedio, entre cada 100 a 600 pb para los sitios de 4 pares de bases y cada 4 000 a 6 000 pb para los sitios de 6. Sin embargo, la distribución de estos sitios depende de la endonucleasa de restricción y de la composición de las bases del DNA que se desea digerir.

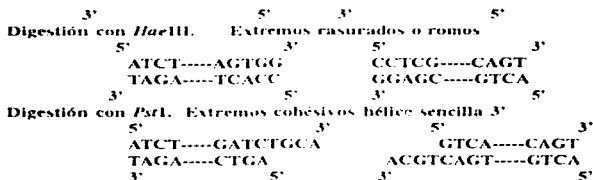
Aún cuando algunas enzimas de restricción rompen o cortan las 2 cadenas de DNA en uniones fosfodiéster localizadas una en frente de otra en la doble hélice, generando extremos "romos", sin hélice sencilla, muchas de estas endonucleasas rompen cada una de las cadenas de tal forma que las uniones fosfodiéster rotas queden desplazadas entre sí, entre 1 y 5 nucleótidos, dando lugar a la formación de fragmentos con extremos de cadena sencilla. Hay enzimas que generan extremos de hélice sencilla con un grupo fosfato en la posición 5', y otras que generan estos extremos con un grupo hidroxilo 3'. Estos extremos reciben el nombre de "cohesivos" o "pegajosos" y son idénticos en todos los fragmentos de DNA generados por la misma endonucleasa.

Ejemplo del rompimiento de DNA por endonucleasas de restricción



Digestión con *EcoRI*. Extremos cohesivos hélice sencilla 5'





Unión de fragmentos de DNA

Casuto et al (1971) fueron los primeros en construir *in vitro* un genoma funcional, a través de la unión de mitades previamente separadas del DNA del bacteriófago Lambda, para producir genomas íntegros de Lambda, capaces de infectar a *E. coli*. Este grupo tomó en cuenta el hecho de que los extremos de Lambda son altamente homólogos.

Jensen et al (1971) y posteriormente Loban y Kaiser (1973), fueron los primeros en diseñar y desarrollar un método por medio del cual es posible unir moléculas de DNA sin ninguna homología. Su diseño consistió en añadir "colas" complementarias de hélice sencilla (poli A, poli T, poli C, poli G) utilizando la enzima transferasa terminal de desoxirribonucleótidos. Cuando una molécula lineal de DNA de doble hélice es tratada con exonucleasa 5' del bacteriófago Lambda, se producen extremos de cadena sencilla con grupos 3' hidroxilo. La transferasa terminal puede polimerizar desoxirribonucleótidos trifosfato a partir de un extremo 3' hidroxilo produciendo una extensión o "cola" de hélice sencilla; esta reacción no requiere de DNA molde. Así, a uno de los fragmentos a unir se le polimeriza colas de poli A y al otro fragmento colas de poli T, y se permite que los

fragmentos se alinean espontáneamente a través de sus colas complementarias. La estructura resultante es una molécula de DNA circular unida covalentemente.

Aun cuando la ligasa de polinucleótidos del bacteriófago T4 había sido utilizada para unir fragmentos de DNA sintéticos, a extremos de hélice sencilla complementarios (Sgaramella y Khorana 1972), el uso de la ligasa para unir extremos cohesivos generados por enzimas de restricción (Dugaiczek et al 1975), fue un paso trascendental en el manejo y construcción de moléculas híbridas de DNA. Esta reacción de ligación fue utilizada inicialmente para unir covalentemente fragmentos de DNA "in vitro" (Cohen et al 1973; Smith et al 1983; González et al 1987; Nelson et al 1988), y hoy en día sigue siendo comúnmente utilizada para dicho fin. Sgaramella et. al. (1970) descubrió una propiedad importante de la ligasa codificada por el bacteriófago T4: que esta enzima es capaz de unir fragmentos de DNA que poseen extremos rasurados (Bolívar 1979).

Transformación

La unión de fragmentos de DNA "in vitro" no tendría significado si no se contara con un método que permita el aislamiento (clonación) y amplificación de un fragmento específico a partir de una mezcla heterogénea de recombinantes producidos en una reacción de ligación. Esto puede ser logrado si el recombinante deseado es capaz de replicarse y expresar un fenotipo dado en un organismo huésped. La clonación molecular se lleva a cabo por medio de la introducción y estabilización (transformación) de las moléculas de DNA recombinante en la célula huésped, de tal manera que una célula reciba cuando más una molécula recombinante. De esta forma, es posible separar las diferentes moléculas híbridas.

de tal forma que se permita su reconocimiento individual a través del fenotipo de las clonas generadas por la multiplicación de las células transformadas.

El método para transformar un organismo huésped utilizando DNA recombinante esta determinado por la identidad del organismo. *Escherichia coli* es un organismo unicelular capaz de "tomar" DNA de su "medio ambiente" después de haber sido tratada con CaCl₂ (Cohen et al 1972; Mandel 1970; Dagert y Ehrlich 1979) aún cuando solamente una subpoblación de un cultivo pueda volverse "competente" para ser transformada mediante este tipo de tratamiento (Kretschmer et al 1975). Mutaciones cromosómicas que disminuyen la degradación del DNA, generalmente aumentan la eficiencia de la transformación de *E. coli* (Ehrlich et al 1976; Yanish-Perron et al 1985).

Plásmidos como vehículos en *E. coli*

La mayor parte de los experimentos de clonación molecular, utilizan a *E. coli* como huésped. Los vectores utilizados en estos experimentos son plásmidos o derivados del bacteriófago Lambda, que se encuentran comúnmente en la naturaleza o han sido construidos en el laboratorio. Ambos tipos de vehículos pueden utilizarse para generar grandes cantidades de segmentos de DNA clonado, y en algunos casos, grandes cantidades de productos génicos (Boyer et al 1977; Goeddel et al 1979; Helinski et al 1977; Herschfield et al 1974; Itakura et al 1977; Viera y Messing 1982; González et al 1987; Douglas et al 1987; Nelson et al 1988). Otros sistemas huésped-vector están siendo investigados: entre ellos destacan *Bacillus subtilis* y algunos de sus plásmidos y fagos (Lecocq et al 1984) y *Streptomyces coelicolor* y sus plásmidos de fertilidad (Lecocq et al 1984). Un derivado del

virus SV-40 del mono ha sido utilizado para clonar fragmentos de DNA del bacteriófago Lambda en células de mono (Ganem et al 1976; Nussbaum et al 1976).

Los plásmidos que son de DNA circulares, extracromosómicos de replicación autónoma, han sido ampliamente utilizados como vectores. Dos tipos de estos han sido los más utilizados en clonación molecular. Estos tipos se distinguen por sus propiedades de replicación: uno de ellos (ejemplificado por el plásmido pSC 101 (Chang y Cohen 1974)) se replica en forma "restringida". Estos plásmidos se encuentran generalmente en un número bajo de copias por célula (Backman y Ptashne 1978). El otro tipo de plásmidos (representado por Col E1) lleva a cabo una replicación de forma "relajada"; plásmidos de esta clase se encuentran presentes en un gran número de copias por célula. Estos plásmidos pueden replicarse bajo ciertas condiciones, en donde se reprime la replicación del DNA cromosomal. También pueden ser amplificados por tratamientos con antibióticos, de tal forma que el número de copias de plásmido por célula puede ser de 1 000 a 3 000 (Clewel 1972; Yanish-Perron et al 1985).

En el primer experimento de clonación molecular se utilizó el plásmido pSC 101 como vector. Este plásmido se aisló de *Salmonella panama* (Cohen y Chang 1977), y confiere resistencia a tetraciclina, tiene un sitio único para la enzima de restricción *EcoRI* y la inserción de DNA heterólogo en este sitio no disminuye las propiedades de replicación del plásmido, ni pierde la propiedad de resistencia a tetraciclina.

Estos vehículos que llevan genes que codifican para resistencia a antibióticos, permiten una fácil selección de las células que portan estos vectores. Por ejemplo, el gene que codifica para la β -lactamasa (que fenotípicamente confiere resistencia a penicilina y sus

derivados), ha sido insertado en plásmidos a través de translocaciones *in vivo* y recombinación "in vitro" (Bolívar et al 1977a; Bolívar et al 1977b), ejemplos de estos plásmidos son pRSF2124, pBR313 y pBR322.

Uno de los problemas más importantes a resolver en cualquier experimento de clonación molecular es la selección de las clonas que llevan DNA recombinante. Es importante contar con una estrategia para poder seleccionar dentro de un cultivo que ha sido transformado, aquellas células en las que el vehículo transformante lleva un fragmento adicional de DNA y especialmente aquellas células en las cuales el vector ha adquirido la combinación particular de fragmentos que se desean.

Un gran número de esquemas han sido desarrollados para permitir la identificación de clonas en las cuales el plásmido vector contiene DNA insertado, y el procedimiento de mayor uso para identificar estas clonas se basa en la inactivación de un gene presente en el plásmido, después de la inserción del DNA heterólogo en ese gene (Bolívar et al 1977; Bolívar 1978; Chang et al 1978).

Utilización de la recombinación *in vitro* de ácidos nucleicos. (banco genómico)

Uno de los usos interesantes de esta metodología es el establecimiento de bancos de clonas. Un banco genómico es un conjunto de clonas que contienen fragmentos de DNA insertados en vehículo, representando todo el genoma de un organismo particular.

El primer banco reportado fue de *Escherichia coli* (Clarke y Carbon 1975).

El tamaño promedio de un fragmento de DNA clonado, es una fracción f , del tamaño del genoma del organismo donador. Este número también representa la posibilidad con que

una secuencia dada del genoma esté presente en una célula que lleve un plásmido recombinante.

La probabilidad de que una secuencia particular no esté presente en ninguna de las clonas totales (n) esta dada por $(1-f)^n$ que se aproxima a cero mientras el número de clonas (n) sea mayor. A través del aislamiento de un número suficientemente grande de clonas, uno puede estar seguro de que una secuencia particular del organismo donador este presente en alguna clona del banco (Clarke y Carbon 1976; Murray et al 1987).

Proteínas clonadas de *A. pleuropneumoniae*

Todo esta tecnología ha sido encaminada a la obtención de proteínas, principalmente factores de virulencia, de las cuales se quiere principalmente conocer su participación en la patogenia de la enfermedad. Se han clonado los genes que codifican para diferentes proteínas de este microorganismo, como son la cohemolisina (*cfp*, *hlyX*) (Frey et al. 1989; Lian et al. 1989), la hemolisina I (*hlyI*) (Chang et al. 1989; Gygi et al. 1991; Frey et al. 1991; Frey et al 1993), las citolisinas (*apxI*, *apxII* y *apxIII*) de diferentes serotipos (MacDonald et al 1992; Smits et al 1992; Jansen et al 1992; Jansen et al. 1993; Reimer et al 1995), el de una proteína que une hierro (*tfbA*) (Gerlach et al. 1992; Rossi-Campos et al. 1992), y una lipoproteína A (*omLA*) (Gerlach et al. 1993).

Para la clonación de la cohemolisina se utilizó como vector el plásmido pUC18, obteniendo una proteína de menos de 30 kDa de peso molecular, identificando la clona al hacerla crecer en agar sangre junto con *Staphylococcus aureus*, para observar el fenómeno de CAMP (Frey et al. 1989; Lian et al. 1989).

En la clonación de la hemolisina se utilizó el plásmido pUC19 para la obtención de una proteína de 105 kDa de peso molecular, la cual fue identificada utilizando antisuero específico contra la hemolisina producida por *A. pleuropneumoniae* (Chang et al. 1989; Gygi et al. 1991; Frey et al. 1991; Frey et al. 1993).

Para la obtención de los genes de las citolisinas se han utilizado bancos construidos en fago λ y en plásmidos. Los plásmidos utilizados fueron pUC18 y pJJE224-NX el cual contiene el "polilinker" de pBluescript, obteniéndose proteínas de entre 105-120 kDa de peso molecular utilizando para su identificación sueros de animales convalecientes (MacDonald et al. 1992; Smits et al. 1992; Jansen et al. 1992; Jansen et al. 1993; Reimer et al. 1995).

En la obtención de la proteína que une transferrina de cerdo se utilizó el plásmido pGH433, el cual expresó una proteína de 60 kDa de peso molecular, la cual es sólo un fragmento de proteína producida por *A. pleuropneumoniae* (Gerlach et al. 1992; Rossi-Campos et al. 1992).

En la clonación de la lipoproteína se utilizó el plásmido pGH432, obteniéndose una proteína de 50 kDa de peso molecular, la cual fue seleccionada por haber sido reconocida por el suero de cerdos convalecientes (Gerlach et al. 1993).

Todas las proteínas clonadas excepto la cohemolisina han sido utilizadas como inmunógenos experimentales encontrándose que, al igual que con la vacunación con fracciones celulares, se protege de la muerte pero no de la infección (Gerlach et al. 1992; Rossi-Campos et al. 1992; Gerlach et al. 1993).

OBJETIVOS

1. Objetivo general

-Obtener clonas recombinantes de *Escherichia coli* que expresen antígenos específicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 a partir de un banco genómico, que puedan ser utilizados en el diagnóstico de la pleuroneumonía contagiosa porcina.

2. Objetivos particulares

2.1. Obtener el banco genómico de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, utilizando el plásmido pBluescript como vector de clonación y expresión en *Escherichia coli* DH5 α .

2.2. Seleccionar clonas recombinantes de *E. coli* que expresen proteínas que sean reconocidas por sueros de cerdos con anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae*.

2.3. Utilizar las clonas seleccionadas como antígeno en una prueba serológica de ELISA que tenga factibilidad como prueba de campo.

2.4. Seleccionar clonas que excreten proteínas y que estos antígenos puedan diferenciar anticuerpos desarrollados por vacunación, de los producidos por una infección natural.

MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

1. Cepas bacterianas

La cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 utilizada en este trabajo fue aislada del pulmón de un cerdo con pleuroneumonía contagiosa porcina, con la cual se reprodujo la enfermedad en condiciones de laboratorio en el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (CENID-Microbiología-INEFAP), y se tipificó en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán (FES-C), UNAM. La cepa utilizada para la transformación fue *Escherichia coli* DH5 α (*hsd R17, rec A1, thi-1, rel A1, lac Z*)

2. Medios de cultivo

Para el desarrollo masivo de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, se utilizó Infusión Cerebro Corazón (BHI, Difco) adicionado con 10% de extracto fresco de levaduras como fuente de NAD. Para el crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α se utilizó el medio de Luria-Bertani (LB, Difco), y para las células transformadas, LB y Agar Mc Conkey (Difco), ambos con ampicilina (100 μ g/ml, Sigma).

3. Obtención de sueros.

Se obtuvieron sueros de cerdos de los siguientes grupos:

- I) Cerdos inmunizados con bacterina de tipo comercial. Se inocularon 13 cerdos con una bacterina comercial contra la pleuroneumonía PCP, que contenía los sorotipos 1, 3, 5 y 7, siguiendo las indicaciones del productor.
- II) Cerdos inmunizados experimentalmente con una bacterina producida con el serotipo 1 en el laboratorio. Estos animales fueron vacunados con una bacterina producida

siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Fueron utilizados para esto 10 cerdos spf. Los cerdos de los grupos que fueron inmunizados, fueron sangrado a los 15 días de haberse aplicado las bacterinas.

iii) Cerdos infectados en condiciones controladas. En una cámara de aerolización como lo describen Sebunya et al. (1983). Tres cerdos fueron infectados con una cepa *A pleuropneumoniae* serotipo 1 aislada de un caso de PCP, con 1×10^7 UFC/ml .

iv) Cerdos infectados en forma natural en el campo y con aislamiento positivo al serotipo 1. Estos animales fueron muestreados de granjas en donde se presentaron brotes de PCP y que presumiblemente murieron de la enfermedad. Tomándose muestras de sangre por punción cardiaca, y la muestra de pulmón al estar haciendo la necropsia.

v) Cerdos sacrificados en el rastro con lesiones sugestivas de PCP y con aislamiento positivo del serotipo 1. Las muestras se tomaron al momento de realizar la sangría en la línea de sacrificio. Estos animales eran marcados y seguidos para que al momento de la evisceración se tomara la muestra de pulmón de las regiones en donde se presentaban lesiones sugestivas de PCP

4. Preparación de la bacterina

Se preparó una bacterina de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 en el laboratorio, la cual fue utilizada para inmunizar a los cerdos del grupo ii) mencionados arriba. Para ello, se desarrolló *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 en BIH suplementado con SAD (10 μ g/ml de medio) y se incubó a 37° C, en agitación lenta (100 rpm) durante 6 horas. Después de esto se le adicionó formaldehído a una concentración final de 0.3% y se mantuvo a la misma temperatura durante 12 horas. El cultivo se centrifugó a 2500 g durante 20 min y las células se lavaron tres veces con PBS pH 7.2. Finalmente se suspendieron las células en el mismo amortiguador a una concentración de 2×10^8

UFC/ml, y se inocularon con adyuvante completo de Freund.

5. Obtención, cuantificación y restricción de DNA cromosómico de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

5.1 Obtención.

El cultivo de 24 hr de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 en 100 ml de medio L.B. se centrifugó a 2 000 rpm por 15 min, y la pastilla obtenida se resuspendió en 5 ml de una solución Tris-EDTA, 50 mM de pH 8.0, a la cual se le adicionaron 10 mg/ml de lisozima y se mantuvo a 4 C durante 45 min, después de los cuales se le adiciono 1 ml de solución STEP, formado por: SDS 0.5%, Tris 50 mM (pH 8.0), EDTA 0.4 M (pH 8.0) y proteinasa K 1mg/ml; se incubó a 50 C durante 1 hr, después se extrajo el material genético con 6 ml de fenol saturado y equilibrado con una solución 1 M de tris-HCl, se mezcló hasta emulsificar y se centrifugó posteriormente a 3 500 rpm por 15 min.

A la fase acuosa así obtenida se le adicionó un décimo de volumen de acetato de potasio 3 M y se precipitaron los ácidos nucleicos con dos volúmenes de etanol absoluto. Una vez precipitado el material genético se eliminó al máximo posible el etanol y se disolvió en 5 ml de solución TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) a la cual se le agregaron 10 µg/ml de RNasa y se mantuvo a temperatura ambiente por 1 hr. Posteriormente se agregó un volumen igual de cloroformo, se emulsificó la solución, la cual se centrifugó 3 500 rpm por 15 min, se separó la fase acuosa, se adicionó a ésta un decimo de volumen de acetato de potasio 3 M pH 5.0 y dos volúmenes de etanol. Una vez precipitado el DNA se procuró eliminar el etanol residual de las hebras que se formaron, las cuales finalmente se disolvieron en solución TE.

5.2 Cuantificación

Se tomó una muestra de 20 μ l del DNA por cuantificar y se adicionaron 980 μ l de agua. se mezclaron perfectamente, y se llevaron al espectrofotómetro, el cual se calibró en cero tomando como blanco 1 ml de agua. Se leyó la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm. La concentración del DNA se obtuvo multiplicando la densidad óptica por la dilución, considerando que con una densidad óptica de 1.0 a 260 nm equivale a una concentración de 50 μ g/ml de DNA Davis et al. 1986).

5.3. Obtención de fragmentos.

El DNA cromosomal fue cortado con la enzima *Sau* 3AI, ya que esta reconoce como sitio de corte una secuencia de 4 nucleótidos (GATC), y por lo tanto, los cortes generados por esta enzima ocurren más al azar que si la enzima reconociera 6 pares de bases. Por otra parte los extremos cohesivos generados con esta enzima, son compatibles con los que se producen con *Bam* HI, de la cual sólo hay un sitio de corte en el polilinker del plásmido utilizado en este trabajo.

5.3.1. Restricción.

Con el fin de obtener fragmentos con un tamaño promedio de 2 000 pares de bases (2 Kb), suficientes para clonar una proteína o epítipo inmunológicamente importante y que no fuera demasiado grande para que el vector lo pudiera mantener, fue necesario llevar a cabo una cinética de restricción en la cual sólo se varió el tiempo de acción de la enzima.

Para la restricción del DNA cromosómico que sería utilizado para la construcción del banco genómico se utilizó la enzima *Sau* 3AI. Fue necesario llevar a cabo este ensayo a diferentes tiempos para poder determinar las condiciones adecuadas, para obtener una

restricción parcial que proporcionará fragmentos de DNA de 2 Kb de tamaño promedio. Para esto por cada 1.25 μ g de DNA cromosómico se adicionaron 2 U de enzima en presencia del amortiguador apropiado e incubándose a 37 C. Las muestras de la mezcla se tomaron a los 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min, con el fin de obtener el tiempo en el cual se obtienen los fragmentos del tamaño deseado. La actividad de la enzima se detuvo mediante la incubación a 65 C durante 5 min de cada una de las muestras tomadas.

6. Obtención, purificación y restricción del DNA de plásmido

6.1. Obtención

Los plásmidos de las diferentes clonas fueron aislados de la siguiente manera: el cultivo de 5 ml de desarrollo bacteriano se centrifugó y el paquete celular se resuspendió en 400 μ l de solución I: Tris 25 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM (pH 8.0), y Glucosa 50 mM, y se mantuvo a 4 C durante 5 min. Posteriormente se agregaron 400 μ l de la solución II: NaOH 0.2 M y SDS 1%, se agitó suavemente hasta tener una solución translúcida.

Posteriormente se agregaron 300 μ l de acetato de potasio 3 M pH 5.0, y se agitó suavemente hasta formar un coágulo blanquecino. Seguidamente se congeló con hielo seco-etanol para después centrifugar a 15 000 rpm por 20 min. El sobrenadante se separó y se le adicionaron dos volúmenes de etanol y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente, después de lo cual se centrifugó a 10 000 rpm y se decantó el alcohol, finalmente el precipitado se disolvió en TE.

6.2 Purificación

Al DNA de plásmido se le agregó un volumen igual de fenol saturado y equilibrado

y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min, separando la fase acuosa en un tubo que contenía fenol saturado y equilibrado-cloroformo-álcool isoamílico (25-24-1). Esta mezcla se agitó hasta emulsificar y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min para separar las dos fases. La fase acuosa se separó y se le agregó un décimo de volumen de acetato de potasio 3 M y dos volúmenes de etanol, se mantuvo diez minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 15 000 rpm por 20 min y se desechó el alcohol. El precipitado se lavó con un volumen de etanol al 70%. El precipitado una vez libre de alcohol, se disolvió en TE (en un volumen igual al inicial en el que se tenía el plásmido disuelto).

6.3 Restricción

El plásmido pBluescript fue cortado con la enzima *Bam* III (Promega). La restricción se llevó al cabo durante 1.5 hr a 37° C, de tal forma que el corte fuera total. Como este plásmido tiene sólo 1 sitio de corte para esta enzima, con este tratamiento el plásmido se linearizó.

7. Electroforesis de DNA

Los DNAs tanto de plásmidos como de fragmentos de restricción del cromosoma fueron separados y observados por electroforesis en gel de agarosa al 0.6%.

Estos gels fueron preparados fundiendo la agarosa en TAE (Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM pH 8) y vertiendo 15 ml en una minicámara (fabricada en el taller del CINVESTAV, equivalente a la BRL H5). Una vez gelificada la agarosa, se depositaron en ésta las muestras previamente mezcladas con 1 µl de colorante de cargado tipo III (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30% en agua bidestilada estéril). Posteriormente se aplicó una diferencia de potencial de 10 Volts/cm

(80 V para un mingel) y se permitió que migraran durante aproximadamente 70 min. Una vez que terminó la corrida, se tino el gel por inmersión en una solución de 5 µg/ml de bromuro de etidio en agua, por 5-8 min y se quitó el exceso de bromuro de etidio con agua. Finalmente se observó con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (Sigma T1201).

8. Ligación de los fragmentos de DNA cromosómico y de Bluescript

La ligación de los fragmentos de DNA de *A. pleuropneumoniae* y del plásmido fue mediante la acción de la DNA ligasa del bacteriófago T4 (Promega), durante 16 hr a 10 C. Estos DNAs se encontraban en una relación de 3:1 (DNA cromosómico: DNA plásmido). La mezcla de ligación contenía MOPS 60 mM (pH 7.6), MgCl₂ 5 mM, DTT 8 mM y ATP 1 mM.

9. Obtención de transformantes

9.1 Preparación de células competentes

Para preparar esta suspensión se creció la cepa de *Escherichia coli* DH5α en 5 ml de medio LB, hasta tener una absorbancia de 1.0 (fase exponencial tardía) a 590 nm.

Con un mililitro de esta suspensión se inocularon 50 ml de medio LB, y se incubaron a 37° C con agitación hasta que el cultivo llegó a su fase exponencial temprana (aproximadamente de 0.3-0.4 DO a 590 nm). Posteriormente el cultivo se centrifugó a 2 500 g por 10 min y se resuspendieron las células en CaCl₂ 0.1 M estéril a 4°C, a un 40% del volumen inicial y se mantuvieron en hielo por 20 min, se centrifugó a 2 500 g por 10 min y se resuspendió el paquete celular en CaCl₂ 0.1 M frío a un 5% del volumen anterior. Estas células se mantuvieron a 4° C durante 16 hr.

9.2 Transformación

Para llevar a cabo la transformación se agregaron 82.7 ng de DNA ligado a 100 μ l de células competentes, manteniéndose la mezcla en hielo por 20 min, provocándose después un choque térmico al incubarse a 42° C por 2 min, después de lo cual se agregó 1 ml de medio LB precalentado a 37° C y se vació en placas con agar LB con 100 μ g/ml de ampicilina, con el fin de seleccionar las células transformadas.

Esta transformación se realizó manteniendo una relación de una bacteria por copia de plásmido. La selección de las células transformadas se realizó en agar MacConkey con ampicilina, ya que el plásmido pBluescript confiere resistencia a este antibiótico. Se seleccionaron las clonas que presentaron resistencia a la ampicilina y que no fermentaron la lactosa.

10. Obtención de clonas que expresaron proteínas heterólogas

10.1 Tamizado de la biblioteca de genes de *A. pleuropneumoniae*.

El banco genómico fue tamizado en papel filtro de nitrocelulosa (0.45 μ , Millipore), tomándose las clonas de placas de agar LB con ampicilina. Estas se desarrollaron sobre el filtro de nitrocelulosa, el cual se tomó como plantilla para replicarlo en otro papel de nitrocelulosa y en placas de agar LB con ampicilina. El filtro fue utilizado para realizar el tamizado mediante el uso de anticuerpos. El primer anticuerpo consistió en una mezcla de sueros positivos a *A. pleuropneumoniae* por fijación de complemento, provenientes de cerdos infectados con *A. pleuropneumoniae*. La dilución del primer anticuerpo fue de 1/10 en Tris salino con 3% BSA.

Las clonas replicadas en el filtro se desarrollaron hasta tener un diámetro de 1-2 mm, entonces los filtros fueron removidos del agar y fueron expuestos a vapores de cloroformo por 15 a 20 minutos (técnica de lisis *in situ* de Helfman et al. 1983). Después

cada filtro se trató individualmente con 10 ml de Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, MgCl 5 mM, 1 µg/ml de DNasa I, 40 µg/ml de lisozima y 3% de BSA. Los filtros fueron agitados suavemente durante toda la noche con la solución anterior a temperatura ambiente, posteriormente se mantuvieron en Tris salino (Tris-HCl 50 mM a pH 7.5, NaCl 150 mM) durante toda la noche, para remover todos los detritus bacterianos y se frotó suavemente con un dedo (con guante).

Es conveniente adsorber estos sueros con lisados de la bacteria huésped y de especies bacterianas relacionadas. El lisado se preparó desarrollando la cepa de *E. coli* DH5α (500 ml) hasta la fase estacionaria y por centrifugación se obtuvo el paquete celular, el cual se resuspendió en agua desionizada (5 ml) y se mantuvo en baño María durante 5-10 minutos. Un mililitro de este lisado se utilizó para adsorber 100 ml de suero diluido (1:100), durante 2 hr a 4°C.

Una vez adsorbido el suero se quitaron los restos celulares por centrifugación (10 000 g). Cada filtro fue incubado por una hora a temperatura ambiente con 8 ml de suero adsorbido, con agitación suave. Seguido de la incubación con el primer anticuerpo, los filtros se lavaron con Tris-salino a temperatura ambiente (cinco cambios de 20-30 min cada lavado).

Posteriormente se incubó cada filtro con el segundo anticuerpo anti IgG de cerdo el cual estaba previamente conjugado con peroxidasa (Sigma), diluido con 10 ml de Tris salino con 3% BSA. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, los filtros fueron nuevamente lavados con Tris salino (cinco cambios), y puestos en contacto con la solución reveladora (diamino bencidina y peróxido de hidrógeno) durante una hora con agitación suave. Es conveniente realizar todo el procedimiento por duplicado para confirmar inmediatamente los resultados, y con esto poder estar seguros de detectar

colonias positivas. La utilización de un mezcla de sueros confirmaron la detección de clonas positivas ya que un suero puede reconocer una región de la proteína sintetizada y otros sueros pueden reconocer o no otras regiones, lo cual disminuye la posibilidad de obtener falsos positivos.

Una vez detectada una colonia positiva en el primer tamizado, ésta fue aislada y nuevamente replicada en nitrocelulosa, que puede servir como plantilla para replicarla en placa de agar; por otro lado este filtro sirve para confirmar el aislamiento al realizar nuevamente todo el procedimiento del tamizado y estar seguro que es la colonia que produce la proteína detectada.

10.2 Caracterización de los antígenos por medio de geles de poliacrilamida-SDS e inmunotransferencia.

Ya purificada la clona, ésta se desarrolló hasta fase estacionaria en 3-4 ml de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$). 1-1.5 ml de cultivo fueron centrifugados (microfuga, Sorval), el medio fue desechado y el botón se resuspendió en 200 μl de amortiguador de muestra de Laemmli (1970), agregándole ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) 2 mM, etilen glicol-bis(β aminoetil eter)-N,N,N',N'-ácido tetra acético EGTA 2 mM y fenilmetilsulfonil fluoruro PMSF 2 mM. El tubo se puso a baño María por 3 min y las proteínas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida(PAGE-SDS) al 10 y 15% con SDS al 0.25% (Laemmli, 1970). Comúnmente entre 5 y 10 μl del lisado bacteriano (25 μg) fueron suficientes para observar las proteínas por tinción con azul de Coomassie. Para la identificación de los antígenos de *A. pleuropneumoniae* expresados por estas clonas, las proteínas separadas por PAGE-SDS se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente se incubaron con sueros de cerdos

infectados según el procedimiento descrito por Towbin (1979) con algunas modificaciones.

La transferencia se realizó en una cámara semiseca marca Bio-Vector modelo Electrofor, a 230 mA durante 2 horas, con amortiguador de fosfatos 0.02 M pH 7.2. Se bloqueó el papel de nitrocelulosa con leche descremada al 3%. Se utilizó como primer anticuerpo una mezcla de sueros de i) animales inmunizados con bacterina de tipo comercial, ii) animales inmunizados experimentalmente con una bacterina producida en el laboratorio, iii) infectados en condiciones controladas en una cámara de aerosolización como lo describen Sebunya et al. (1983), con una cepa *A pleuropneumoniae* serotipo 1 aislada de un caso de PCP, con 1×10^7 UFC/ml, iv) animales infectados en forma natural en el campo y con aislamiento positivo y v) animales sacrificados en el rastro con lesiones sugestivas de PCP y con aislamiento positivo, diluidos 1/10. Todos estos sueros fueron positivos a la prueba de fijación de complemento. Todos los sueros fueron adsorbidos previamente con extractos totales de *Escherichia coli* y *Pasteurella haemolytica*, con el fin de evitar la presencia de reacciones cruzadas con estas especies bacterianas. Como segundo anticuerpo se utilizó inmunoglobulinas anti-IgG de cerdo conjugado con peroxidasa (Sigma) (1/5000), utilizando 3, 3'-diaminobencidina (Sigma) para el revelado de las reacciones positivas.

Los sobrenadantes de los cultivos separados por centrifugación también fueron analizados por inmunotransferencia. Para ello, fueron precipitados con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y resuspendido el precipitado en PBS pH 7.2. Veinticinco μg de proteína fueron separados por electroforesis y electrotransferidos de la misma forma que la mencionada para los extractos, siguiendo el mismo protocolo para el ensayo inmunológico.

11. Pruebas serológicas

11.1 Fijación de complemento

La prueba de fijación de complemento se realizó en microplacas. Se utilizó como complemento suero de cuyes adultos y como antígeno células bacterianas completas. El antígeno fue preparado a partir de un cultivo de seis horas de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1. Después de la incubación las bacterias fueron cosechadas en NaCl 0.15 M y la suspensión bacteriana fue ajustada con el tubo No 3 del Nefelometro de McFarland, y posteriormente se calentaron una hora en baño María.

El complejo hemolítico se obtuvo con células rojas de borrego colectadas en solución de Alsever y lavadas con amortiguador de Veronal (pH 9.0), suspendidas finalmente al 2% en el mismo amortiguador y agregando hemolisina diluida 1:100 para tener una suspensión final del 1% la cual se mantuvo a 37°C por 30 minutos.

Antes de llevar a cabo la prueba los sueros de los cerdos fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos y se hicieron diluciones en la microplaca con amortiguador de Veronal, aquí se adicionó el antígeno, posteriormente el complemento y la placa se agitó y se incubó 30 minutos a 37°C. Después de esta incubación se agregó el complejo hemolítico y se realizó una segunda incubación de 30 minutos a 37°C. Después de este tiempo la reacción se paró agregando amortiguador de Veronal frío, las placas se centrifugaron a 2 000 g por 5 minutos. Las placas se leyeron con ayuda de un espejo observándose en el fondo de la placa la formación de botones de eritrocitos como reacción positiva.

11.2 Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Para llevar a cabo esta prueba fue necesario realizar el protocolo de

estandarización, el cual se llevó de la siguiente manera:

Sueros testigo. El primer suero testigo fue uno que tenía un alto título de anticuerpos en la prueba de fijación de complemento, el segundo suero fue un testigo positivo intermedio y por último un suero testigo negativo. También fue utilizado un testigo de amortiguador, que estaba compuesto por amortiguador de fosfatos salino-tween utilizado para diluir los sueros a probar.

Antígenos. Se utilizaron como antígenos extractos totales de la clona de *E. coli* 2732. También se utilizaron extractos de una cepa de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, como control.

Titulación del antígeno. Esta se llevó al cabo haciendo diluciones dobles del antígeno, contra diluciones de los diferentes sueros testigo, tomándose como la dilución óptima, aquella en donde se demostró la relación máxima entre los sueros testigo positivo y negativo (P/N).

Inmovilización del antígeno. Las condiciones óptimas para la absorción del antígeno fueron determinadas utilizando diferentes soluciones [NaCl 0.15 M; MgCl₂ 0.02 M; NaCl +MgCl₂; PBS (pH 7.2) 0.02 M; amortiguador de carbonato (pH 9.6) 0.1 M y 0.01 M; amortiguador de citratos (pH 4.0) 0.05 M; Tris-HCl (pH 8.5) 20 mM].

Tiempo de incubación de los sueros. Sueros positivos y negativos fueron incubados con el antígeno a diferentes tiempos (15, 30, 60, 120 y 180 min). El tiempo óptimo de incubación fue determinado por la relación P/N.

Titulación del conjugado. Se realizaron diluciones de inmunoglobulina G porcina, que fue adsorbida en los pozos por 18 h a 4°C, a las cuales se les agregaron diluciones dobles de inmunoglobulina anti-IgG de cerdo conjugada con peroxidasa, incubándose

a temperatura ambiente por 15 min y se les agregó la solución de ARTS y se agitó la placa por 10 min, haciendo la lectura de la densidad óptica (DO) a 414 nm, tomándose como la dilución del conjugado la que nos dio una DO de 1.0 como lectura de absorbancia.

Análisis estadístico. Es necesario determinar a la densidad óptica (punto de corte) a la cual es posible diferenciar los sueros positivos de los negativos. Para esto se determinará el valor promedio de los sueros controles negativos, se calculará su desviación estándar (SD) y tomarán 2SD, como límite para realizar esta diferenciación.

Sensibilidad y especificidad. El porcentaje de sensibilidad del ELISA en comparación con FC fue calculado como $[\text{positivos verdaderos}/(\text{positivos verdaderos} + \text{falsos negativos})] \times 100$. El porcentaje de especificidad fue calculado como $[\text{negativos verdaderos}/(\text{negativos verdaderos} + \text{falsos positivos})] \times 100$.

RESULTADOS

1. Obtención de DNA cromosómico

Después de la extracción de DNA del cultivo de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 por el método de fenol-agua, se corrió un minigel de agarosa al 0.6%, después de teñirse con bromuro de etidio se observó en el transiluminador de luz ultravioleta. El DNA cromosómico obtenido de *A. pleuropneumoniae* no se notó degradado, ya que se observa solamente una banda de más de 23.1 kilopares de bases (kpb) en la parte superior del gel (Figura 1, carril 2), por lo que se consideró que se encontraba en condiciones óptimas para proseguir con el trabajo.

2. Obtención de DNA de plásmido

Una vez extraído el plásmido por medio de lisis alcalina se corrió un gel de agarosa al 0.6% con el DNA obtenido y se observó en el transiluminador de luz ultravioleta. En el minigel se observan 4 diferentes bandas (Figura 1, carril 6), las cuales están formadas por el plásmido en diferentes arreglos o asociaciones consigo mismo. La banda superior de aproximadamente 17 kpb corresponde a un conglomerado de una gran cantidad de plásmidos, la segunda banda de 7 kpb, formada por la asociación de dos a tres plásmidos, a tercera banda es del plásmido en su forma circular o abierta y la última banda de 3 kpb corresponde a la forma conocida como super enrollada o trenza, en la cual hay un enrollamiento de una sola molécula.

3. Cuantificación

La lectura obtenida en el espectrofotómetro para la muestra de DNA cromosómico de *A. pleuropneumoniae* fue de 0.036, y la dilución que se realizó de la muestra fue 1/50, por lo tanto la concentración es:

Concentración de DNA = Densidad óptica x Dilución x 50 $\mu\text{g/ml}$.

Concentración de DNA = $0.036 \times 50 \times 50 \mu\text{g/ml} = 90 \mu\text{g/ml}$

Para la muestra de pBluescript la lectura en el espectrofotómetro fue de 0.270, y esta se trabajo de la misma forma que el DNA cromosómico, por la tanto:

Concentración de pBluescript = $0.270 \times 50 \times 50 = 675 \mu\text{g/ml}$

4. Obtención de fragmentos de DNA cromosómico

En la figura 2 se muestra el resultado del ensayo de la cinética de restricción, por medio de la cual se seleccionó el tiempo de 20 minutos (Figura 2, carril 6), ya que fue a este tiempo cuando se obtuvieron los fragmentos del tamaño promedio deseado (2 Kpb).

Así se lograron establecer las condiciones óptimas para llevar a cabo la restricción parcial del DNA cromosómico que fueron: por cada 1.25 μg de DNA cromosómico, se adicionó 2 U de enzima *Sau 3AI* y se incubó a 37 C por 20 minutos, para la muestra de DNA (Figura 1, carril 3).

5. Obtención del vector restringido

El plásmido pBluescript fue restringido totalmente con la enzima *Bam* III, en su sitio único de restricción que contiene este plásmido, como se observa en la figura 3 (mapa de pBluescript). Una vez abierto el plásmido, varió su patrón de corrimiento en la electroforesis (Figura 1, carril 7), encontrándose sólo una banda de aproximadamente 3.5 kpb de tamaño, lo que nos indica que se tiene una sola forma de plásmido, que es la lineal que es la deseada para la construcción del banco.

6. Ligación de los fragmentos de DNA cromosómico y de pBluescript

Para la obtención de los plásmidos recombinantes se utilizaron los fragmentos de 2 Kpb de tamaño promedio del DNA cromosómico y el plásmido linearizado, en una relación molar vector:inserto de 1:3. La mezcla de ambos DNA una vez ligados dio lugar a la genoteca de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 (Figura 5, carril 8).

7. Selección de transformantes con pBluescript recombinado

Se obtuvieron 10 146 colonias en agar LB con ampicilina, las cuales se tomaron como candidatos a contener plásmidos recombinantes.

La selección de bacterias transformadas y que llevaran plásmidos con fragmentos de DNA de *A. pleuropneumoniae* se hizo desarrollando las clonas seleccionadas en agar Mc Conkey con ampicilina, el cual tiene lactosa como fuente de carbono y rojo neutro como indicador de pH, tomándose de aquí las clonas lactosa negativas (colonias blancas) como portadoras de plásmidos con inserto de DNA heterólogo, mientras que las clonas lactosa positivas (colonias rosas) sólo habían sido transformadas por plásmido sin inserto (Figura 4).

La transformación utilizando como vector pBluescript se llevó al cabo tres veces y en cada una de ellas se obtuvo un promedio de 10 000 células transformadas. De estas clonas, aproximadamente el 32% contenían plásmidos con inserto de *A. pleuropneumoniae* (Lac⁻ Ap^r), siendo este el porcentaje esperado, ya que el plásmido pBluescript se recirculariza durante la ligación entre un 60 a 70% (Cuadro 1).

De estas clonas se eligieron algunas al azar, para realizarles la extracción de plásmidos, encontrándose en la electroforesis que los plásmidos extraídos de las colonias lactosa negativas eran de mayor tamaño (Figura 6, carriles 3, 5 y 7) que los extraídos

de las colonias lactosa positivas, los que presentaban las bandas características de pBluescript (figura 6, carriles 2, 4 y 6).

CUADRO 1 RESULTADOS DE LA TRANSFORMACIÓN

Número total de transformantes	30 438
Eficiencia (células transformadas/células viables)	6.8×10^9
Frecuencia (células transformadas/100 ng de DNA)	12 268
Número de colonias lactosa (+)	20 922
Número de colonias lactosa (-)	9 516
Eficiencia de inserción (clonas Lac Z-/clonas Lac Z+)	0.319

8. Tamizado de las clonas recombinantes

A todas las clonas seleccionadas que presentaron resistencia a la ampicilina y no fermentaron la lactosa, se les sometió al tamizado inmunológico y con esta prueba se seleccionaron 16 clonas (*E. coli* DH15 α -0029, -0122, -2516, -2527, -2535, -2614, -2620, -2631, -2632, -2634, -2702, -2707, -2708, -2710, -2732, -2801), sobresaliendo el reconocimiento por la mezcla de sueros de una de ellas (*E. coli* DH15 α -2732) (Figura 7).

9. Electroforesis e inmunotransferencia

Las proteínas totales de las 16 clonas fueron separadas por PAGE-SDS al 10% y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Como primer anticuerpo se utilizó una mezcla de sueros positivos contra *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 y como segundo anticuerpo anti-IgG porcina conjugada con peroxidasa.

Después de realizar el corrimiento electroforético y la transferencia, los sueros reconocieron proteínas de 30, 50, 70, 90, 130 y >200 kDa de peso molecular. En dos de las clonas se reconocieron más de una proteína; en la clona 2708 se reconocieron dos (50 y 70 kDa) y la clona 2620 tres (50, 70 y 130 kDa), en las 14 clonas restantes sólo se reconoció un sola proteína. Los resultados de cada una de las clonas se encuentran en el cuadro 2 y algunos de ellos observan en la figura 8. Estos resultados sólo se encontraron con los extractos crudos de las clonas ya que en el sobrenadante no reconocieron ninguna proteína los sueros utilizados.

Una de estas clonas sobresalió (2732), pues mostró una mayor cantidad de una proteína de >200 kDa, la cual no fue reconocida por los grupos de animales vacunados, pero sí por los grupos de animales infectados al utilizar los sueros individualmente (Figura 9).

10. Pruebas serológicas

Las pruebas de fijación de complemento y ELISA se realizaron a 248 sueros de cerdos. Estos sueros se clasificaron en diferentes grupos, dependiendo de donde se colectaron y si fue posible realizar el aislamiento del microorganismo. Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas se resumen en el cuadro 3, para cada uno de los diferentes grupos.

10.1 Fijación de complemento

Se tomaron como positivos todos los sueros que después de realizar la reacción de fijación de complemento, formaron un botón de glóbulos rojos en el fondo de la placa, tomándose como lectura la última dilución del suero en donde se encontraba este botón. Se encontraron sueros positivos desde 1/4 hasta 1/64. En los sueros negativos se observó la lisis de los eritrocitos sensibilizados.

CUADRO 2.
PROTEÍNAS RECONOCIDAS EN LA INMUNOTRANSFERENCIA POR LA
MEZCLA DE SUEROS POSITIVOS A *A. pleuropneumoniae*

No. DE CLONA	PROTEÍNAS RECONOCIDAS (peso molecular aparente kDa)
0029	50
0112	>200
2516	>200
2527	70
2535	130
2614	>200
2620	90; 70; 50
2631	>200
2632	130
2634	>200
2702	>200
2707	90
2708	70; 50
2710	70
2732	>200
2801	30

10.2 ELISA

Para la realización de esta prueba se determinaron las condiciones óptimas, en donde se diferenciaran mejor los sueros positivos y los sueros negativos, encontrándose que la concentración de 10 μg de proteína de la clona 2732 como antígeno, utilizando amortiguador de carbonato 0.1M. La dilución de los sueros en que se podía diferenciar entre positivos y negativos fue 1/200, con un tiempo de incubación de 30 minutos. La dilución de 1/5 000 fue la que se seleccionó para la inmunoglobulina anti-IgG de cerdo conjugada con peroxidasa.

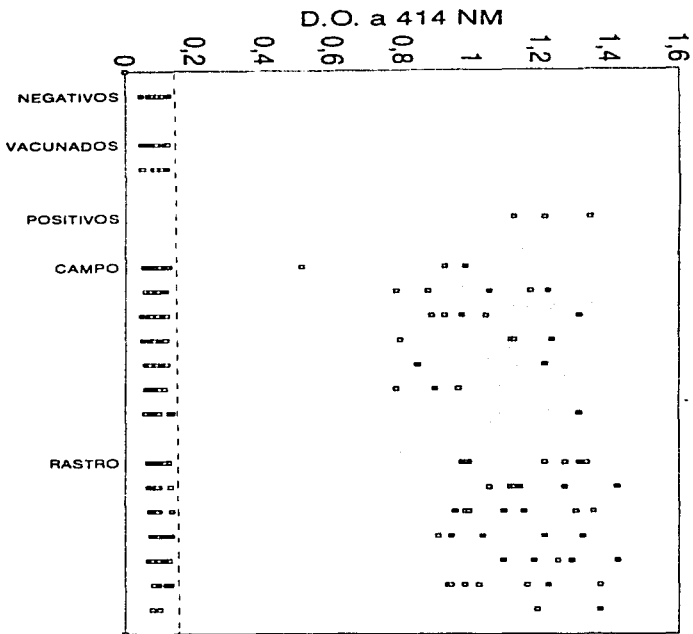
El punto de corte se seleccionó tomando el promedio de los valores de absorbancia obtenidos con los sueros negativos más dos desviaciones estándar (cuadro 4 y figura 10).

10.3 Sensibilidad y especificidad.

La sensibilidad de la prueba de ELISA en comparación con FC fue del 94.8 %, y la especificidad del 97.4 %. Para el cálculo de estos, se tomaron los resultados obtenidos de los sueros colectados en campo y en rastro.

	SUEROS+	SUEROS-
FC	71	151
ELISA	67	155

Fig. 11 LECTURAS DE ELISA DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMALES



CUADRO 3
RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS DE
FIJACION DE COMPLEMENTO* Y ELISA^a, CON LOS DIFERENTES
TIPOS DE SUEROS.

GRUPO	SUERO DE ANIMALES		FC	ELISA
I	VACUNADOS	+	13	0
	EXPERIMENTALMENTE ^c	-	0	13
II	VACUNADOS	+	10	0
	EXPERIMENTALMENTE ^d	-	0	10
III	INFECTADOS	+	3	3
	EXPERIMENTALMENTE ^e	-	0	0
IV	DE CAMPO	+	28	26
		-	84	86
Va	DE RASTRO ^f	+	21	21
		-	0	0
Vb	DE RASTRO ^g	+	22	20
		-	57	59
VI	TESTIGOS	+	0	0
	NEGATIVOS ^h	-	10	10
TOTAL			248	248

*La prueba de fijación de complemento fue hecha con células completas de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.

^aLa prueba de ELISA fue hecha con extractos totales de la clona recombinante de *E.coli* 2732.

^bVacuna comercial.

^cVacuna hecha en el laboratorio con células completas formalinizadas.

^dCerdos libres de patógenos específicos, inoculados por aerosol con 10⁷ bacterias/cerdo.

^eAislamiento positivo de *A. pleuropneumoniae* de lesiones características de PCP de pulmón.

^fNo se obtuvo el aislamiento de las lesiones de pulmón.

^gCerdos libres de patógenos específicos

CUADRO 4
DENSIDAD ÓPTICA MEDIA A 414 nm. DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMALES EN LA PRUEBA DE ELISA, UTILIZANDO COMO ANTIGENO LA CLONA 2732.

SUEROS		$\pm 2DS$
NEGATIVOS	0.0879	± 0.045
VACUNADOS	0.0871	± 0.041
POSITIVOS	1.224	± 0.227
RASTRO	0.806	± 0.302
CAMPO	1.154	± 0.384

Fig. 10 VALOR PROMEDIO DE LOS SUEROS CON LA PRUEBA DE ELISA

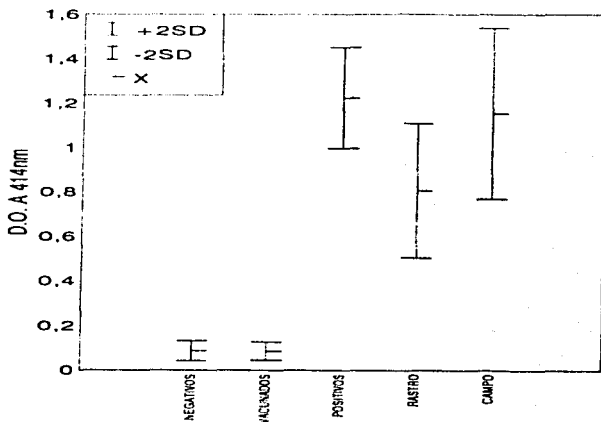




Figura 1. DNA cromosómico restringido con *Sau 3AI* y plásmido pBluescript restringido con *Bam* HI. 1 y 5) Marcador de tamaño λ *Hind* III; 2) DNA cromosómico; 3) DNA cromosómico cortado con *Sau 3AI*; 4) carril vacío; 6) Plásmido pBluescript; 7) Plásmido pBluescript cortado con *Bam* HI.

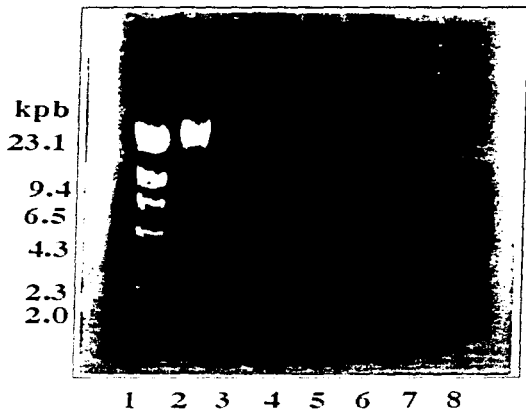


Figura 2. Cinética de restricción del DNA cromosómico con *Sau* 3AI, a diferentes tiempos (minutos) 1) Marcador de tamaño λ *Hind* III; 2) 0; 3) 5; 4) 10; 5) 15 6) 20; 7) 25; 8) 30.

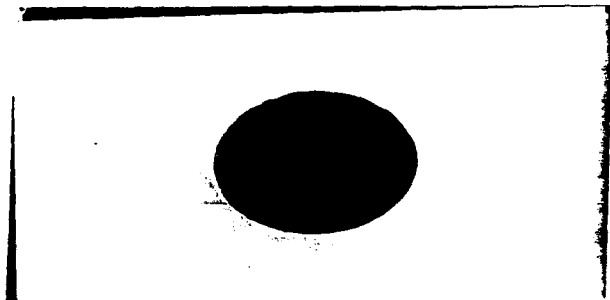


Figura 4. Desarrollo de *E coli* DH5 α , transformada con el resultado de la ligación de fragmentos de DNA cromosómico de *A. pleuropneumoniae* con el plásmido pBluscript, en Mc Conkey con ampicilina. Note se que se obtienen colonias lactosa positiva (rojas) y colonias lactosa negativa (blancas).

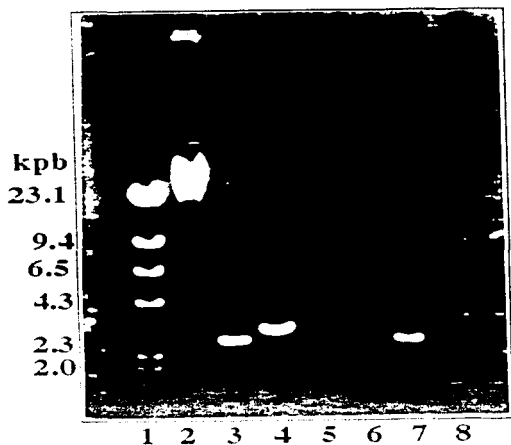


Figura 5. Ligación de los fragmentos de DNA cromosómico con el plásmido linealizado. 1) Marcador de tamaño λ *Hind* III; 2) Marcador de tamaño λ *Hind* III+ligasa de T4; 3) pBluescript cortado con *Bam* HI; 4) pBluescript cortado con *Bam* HI+ligasa de T4; 5) DNA cromosómico cortado con *Sau* 3AI; 6) DNA cromosómico cortado+ ligasa de T4; 7) Mezcla de ambos DNAs cortados; 8) Mezclas de ambos de DNAs cortados+ligasa de T4.

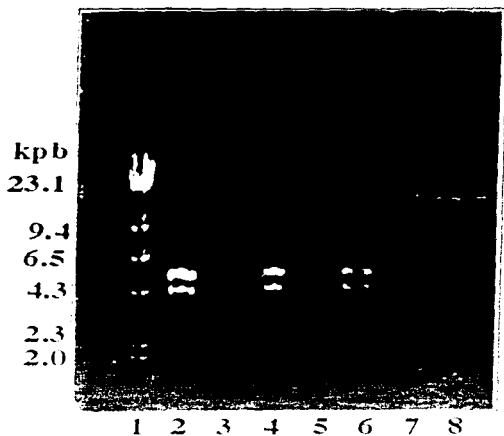


Figura 6. Plásmidos obtenidos de diferentes colonias, lactosa positivas y lactosa negativas, ambas ampicilina resistentes. 1) Marcador de tamaño λ Hind III; 2, 4 y 6) Plásmidos de 3 colonias lactosa positivas; 3, 5 y 7) Plásmidos de 3 colonias lactosa negativas.

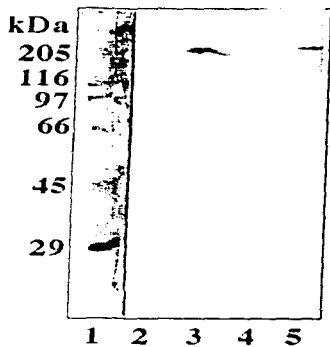


Figura 7. Tamizado inmunológico. Como se observa en la Figura los anticuerpos de la mezcla de sueros positivos a PCP reconocieron las colonias que expresaban antígenos de *A. pleuropneumoniae*.

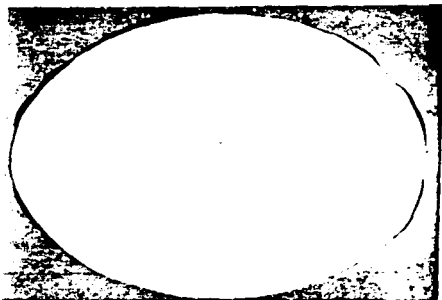


Figura 8. Inmunotrasferencia de extractos totales de clonas seleccionadas por el tamizado inmunológico. Las proteínas totales de las clonas fueron separadas por PAGE-SDS al 10% y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Como primer anticuerpo se utilizó una mezcla de sueros positivos contra *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 y como segundo anticuerpo anti-IgG porcina conjugada con peroxidasa.
Carril 1) Marcadores de peso molecular ; 2) *A. pleuropneumoniae* serotipo 1; 3) *E. Coli* DH5 α ; 4) clona 2620; 5) clona 2708; 6) clona 2801; 7) clona 2516; 8) clona 0112; 9) clona 2732; 10) *Pasteurella haemolytica*.

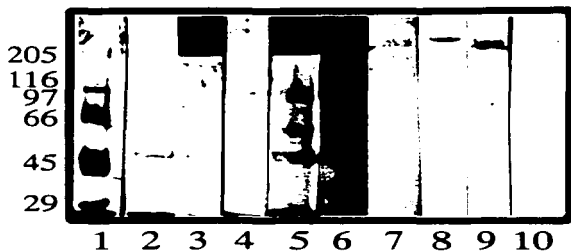


Figura 9. Immunotransferencia de extractos totales de la clona 2732 con suero de animales vacunados e infectados.
Carril 1) Marcadores de peso molecular; 2) y 4) vacunados; 3) y 4) infectados.

DISCUSIÓN

Las técnicas experimentales de Ingeniería genética, DNA recombinante y biotecnología ofrecen soluciones potenciales a un gran número de problemas en el diagnóstico de muchas enfermedades, ya que actualmente representan la metodología más provechosa en la producción de antígenos. Por este medio es posible obtener antígenos relevantes de un microorganismo patógeno en otro que no es patógeno ni relacionado con el primero, del que se conoce todo lo relacionado con su replicación, obteniéndose de esta manera grandes cantidades de antígeno. Para realizar esto, es primordial clonar los genes que codifican estas proteínas siendo necesario la construcción de la genoteca.

Para la construcción de la genoteca es de primordial importancia que el DNA cromosómico a clonar, se encuentre en las mejores condiciones posibles. Este se obtiene por lisis celular y extracción con fenol, como lo describen Maniatis et al (1989) y Silhavy et al (1984), pero el material genético se encuentra contaminado con RNA, el cual es necesario quitar antes de realizar la restricción, ya que podría interferir en la clonación. Por esto fue necesario tratar con RNAsa el material genético obtenido, siendo este método de purificación del DNA mejor que el reportado por Hackett et al (1988), en el cual realiza la precipitación del DNA con isopropanol al 50%, pero una pequeña cantidad de RNA precipita junto con el DNA contaminándolo, mientras que con la RNAsa, el RNA es digerido completamente y se obtiene puro el DNA.

El plásmido pBluescript se obtuvo por la técnica reportada por Birnboim y Doly (1979), pero fue necesario realizar además una limpieza con fenol y cloroformo, con el fin de tener el plásmido libre de proteínas que lo contaminan y que interfieren en la acción de

las enzimas de restricción.

Uno de los plásmidos más utilizados como vehículo de clonación es el pBR322, construido por Bolívar et al (1977a, 1977b), pero la utilización de pBluescript presenta ciertas ventajas. Ambos plásmidos tienen dos marcadores genéticos, los de pBR322 son genes de resistencia a tetraciclina y ampicilina, por lo que es necesario realizar una doble selección para conocer si alguno de ellos ha sido inactivado por la inserción de DNA heterólogo en una clonación pues en ambos marcadores tiene sitios únicos de restricción, en cambio, con pBluescript los sitios únicos de restricción se encuentran en uno sólo de los marcadores (gene *lacZ*), mientras que el otro marcador (gene *amp^r*) se mantiene siempre intacto. Por lo tanto se realiza una sola selección de clonas que contienen inserto. Para seleccionar estas clonas Yanish-Perron et al (1985) utiliza tres diferentes medios que contienen ampicilina y un estimulador del gene *lacZ*, que son a) lactosa, b) 5-bromo-4-cloro-3-idolil- β -D-galactosa (X-gal) y c) isopropil- β -D-galactopiranosida (IPTG) siendo estos dos últimos cromóforos y el primero se acompaña de un indicador de pH, siendo la cepa receptora LacZ negativa, seleccionando sólo las colonias blancas, pues las colonias que presentaban color, dependiendo del compuesto utilizado, transportaban plásmidos sin inserto, a diferencia de estos autores se utilizó medio de Mc Conkey el cual ya contiene lactosa y rojo neutro, y sólo se agregó la ampicilina, teniéndose los mismos resultados al momento de la selección de clonas, pues las colonias blancas eran las recuperadas y las rojas tenían plásmido sin inserto.

El plásmido pBluescript también tiene la ventaja de tener dos promotores a los lados del sitio único de restricción, los cuales se encuentran en sentido contrario uno de otro.

todo esto dentro del gene *lac Z*. Un trabajo similar se desarrollo utilizando como plásmido vector pUC19 (Tenorio 1990), el cual tiene un sitio de clonación similar a pBluescript, pero no tiene los promotores y en las clonas que portaban plásmidos recombinantes, después de un tiempo, no fue posible recuperar estos, no obstante de mantener sus características resistencia a la ampicilina y fermentación de la lactosa, lo cual no se ha encontrado en las clonas del banco construido con pBluescript, en donde si ha sido posible recuperar el plásmido.

Ya existen plásmidos construidos exclusivos para la clonación de *A. pleuropneumoniae*, como los construidos por Frey (1992) y West et al. (1995) los cuales son sumamente estables en *E. coli* y *Pasteurella haemolytica*, y estos derivan de plásmidos como pUC18/19 y pBluescript, que son los que se han utilizados en la construcción de las genotecas.

Una vez obtenidos los DNAs fue necesario llevar a cabo la cuantificación de estos, para poder realizar eficazmente tanto la restricción como la ligación. La cuantificación se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Hackett et al (1988), la cual se basa en la densidad óptica (OD) de la muestra a 260 nm y lo reportado por Davis et al (1984), que un OD=1 a esa longitud de onda equivale a 50 µg/ml de DNA, la cual proporciona un resultado más confiable que con la técnica descrita por Silhavy et al (1984) la cual se basa en la comparación a simple vista de la fluorescencia de la muestra con una curva patrón de DNA de concentración conocida.

Para descartar la posibilidad de estar considerando las proteínas dentro de la lectura a 260 nm, se realizó otra lectura a 280 nm y se tomó su relación 260/280. Si el

resultado de esta relación es superior a 1.6 según Davis et al (1984) se tiene en la muestra principalmente DNA. En las relaciones obtenidas de los DNAs extraídos los resultados siempre fueron superiores a 1.6 (DNA cromosómico 1.74: pBluescript 1.8), lo que da la certeza de que se trabajó con DNA con muy baja cantidad de impurezas.

Una vez cuantificados los DNAs, se procedió a realizar la restricción de estos, con *Sau* 3AI para el DNA cromosómico y con *Bam* HI para el plásmido. Estas mismas enzimas fueron utilizadas con el mismo fin por Frey et al. (1989), Chang et al. (1989), Gerlach et al (1993), MacDonald et al. (1992), Rossi-Campos et al. (1992) y Gerlach et al (1993) en la clonación de proteínas de *A. pleuropneumoniae*, ya que se utilizaron vectores de clonación semejantes al utilizado en este trabajo.

Para la obtención de fragmentos de DNA cromosómico fue necesario realizar un cinética de restricción para determinar las condiciones para obtener los fragmentos del tamaño deseado. Al realizar la restricción del plásmido se observó en el gel una sola banda y una variación del corrimiento, lo que indica que este se fue abierto y todo se encontraba en la forma lineal, que es lo deseado para realizar la inserción de DNA heterólogo.

Con los productos resultantes de la restricción, se llevo a cabo la ligación de los fragmentos obtenidos con el plásmido para obtener el banco genómico, utilizando la DNA ligasa del fago T4 que es el método más eficiente de los descritos hasta la fecha (Maniatis et al 1989).

El banco construido se utilizó para transformar a *E. coli* DH5 α . Esta transformación se realizó cuando la cepa receptora se encontraba a mitad de la fase *log*, ya que es necesario contar con una gran cantidad de células (10^7 a 10^8) pues Cepaldo et al (1974) reporta que

la viabilidad de las células disminuye casi un 50% al ser mantenidas en CaCl_2 . Otra razón para obtenerlas en esta fase de desarrollo es que su pared se estaba sintetizando, haciendo más factible la obtención de células competentes.

Tomando en cuenta lo anterior se llevó a cabo al transformación con 1.5×10^8 células/100 μl , y se obtuvo una frecuencia de transformación de $1.2268 \times 10^7/100$ ng de DNA, resultado muy semejante a lo obtenido por Hanahan (1983), el cual reporta otro método para la obtención de un número mayor de células competentes, utilizando para esto varios cationes como Ca^{2+} , Mn^{2+} , Rb^+ , K^+ , además de la incubación con dimetil sulfoxido y ditiotreitol, los cuales tienen acción sobre la cubierta celular. Con el tratamiento anterior Hanahan obtiene una frecuencia de transformación de $1.5 \times 10^7/100$ ng de DNA con 1.2×10^8 células/100 μl , lo que es muy semejante con lo obtenido aquí, con tratamiento mucho más sencillo de llevar a cabo, pues sólo se tratan las células con CaCl_2 , como lo describió Cohen et al (1972).

Las células después de haber sido transformadas, se desarrollaron en agar LB con ampicilina, para una primera selección. La razón de esta preselección es que junto con las clonas portadoras de plásmido se desarrollan células no transformadas (lactosa negativas, ampicilina sensibles), y por satelitismo logran su desarrollo, debido a la β -lactamasa que producen las células transformadas. Esto podría confundir al realizar la selección directamente en Mc Conkey con ampicilina, pues fenotípicamente se verían igual que las clonas con plásmidos recombinantes, y al hacer la preselección sólo se toman las colonias más grandes, lo que posiblemente disminuyó la eficiencia y frecuencia de transformación, al no seleccionar clonas transformadas que no se desarrollaron adecuadamente por estar

muy cercanas, pero da la seguridad de tener sólo células transformadas.

La ampicilina que se adiciona al medio de cultivo, cumple con dos funciones primordiales, una de ellas es como lo describen varios autores, para la selección de las células transformadas por expresión del genotipo recién adquirido, y la otra, para la replicación y mantenimiento del plásmido, ya que Dagert y Ehrlich (1979) encontraron que las células transformados con plásmidos de resistencia a antibióticos, pierden a este por la falta de presión para su expresión, por lo que una vez seleccionadas las clonas se pasaron siempre en Mc Conkey con ampicilina y se seleccionaron las clonas lactosa negativas y ampicilina resistentes, ya que estas características indican que estas células portan plásmidos híbridos, ya que no fermentan la lactosa por haber sido desfasado el gene *lac Z* por la introducción de un fragmento de DNA cromosómico de *A. pleuropneumoniae*, además estos plásmidos son más grandes que el plásmido original.

Para la selección de las clonas que expresaran proteínas de *A. pleuropneumoniae* y que fueran reconocidas como antígenos, fue necesario realizar un tamizado. Se utilizó el tamizado inmunológico, ya que se contaba con suero de animales que resultaron positivos a la prueba de fijación de complemento y en algunos casos se había logrado el aislamiento. Este es el método recomendado (Manlatis et al 1989) para la búsqueda de antígenos en bancos genómicos y este fue utilizado por Gerlach et al (1993 y 1993) en la búsqueda de proteínas membrana externa las cuales fueron reconocidas por sueros de animales convalescentes, logrando encontrar con este método la clona que expresa una proteína que une transferrina y otra clona que expresa una lipoproteína de 50 kDa. Esto demuestra que el tamizado inmunológico es un método eficiente en la selección de clonas que expresan

antígenos.

De todas las clonas que se obtuvieron, se eligió una que en la inmunotransferencia presentaba una proteína >200 kDa fue reconocida por suero de animales positivos en FC.

Se han clonado varias proteínas de *A. pleuropneumoniae*, en su mayoría son considerados factores de virulencia, pero ninguna con este peso molecular. La proteína clonada y que en principio se pensó que era la cohemolisina tiene un peso molecular de 27 kDa (Frey et al. 1989), de la cual recientemente Frey et al. (1994) y Soltes et al. (1994) reportaron que el gen clonado es gene de regulación en la actividad hemolítica, pero no es el responsable del fenómeno de CAMP. Otras de las proteínas clonadas son las toxina de la familia RTX (ApxI, ApxII y ApxIII) las cuales tienen actividad citolítica y hemolítica, que tiene pesos moleculares entre 105 a 120 kDa, lo que representa por lo menos la mitad del peso molecular de la proteína producida por la clona 2732, la cual se no presentó actividad hemolítica (García Cuellar en revisión) ante eritrocitos de cerdo y de conejo como la describe Reimer et al. (1995) en la que sí encuentra hemólisis de las citolisinas clonadas de *A. pleuropneumoniae*. También al comparar el peso molecular de la proteína producida por la clona 2732, con las proteínas clonadas por Gerlach et al. (1992) y Rossi-Campos et al. (1992) que fijan transferrina, tiene un peso molecular de 60 kDa, la cual es muy pequeña, al igual que la lipoproteína clonada por Gerlach et al. (1993) la cual tiene un peso de 50 kDa. En casi todas las clonaciones se utilizaron como vectores de clonación plásmidos (pUC18) que son muy semejantes al utilizado en este trabajo, ya que estos tienen el sitio de clonación en el gene *lac Z* y son inducidos por lactosa.

Por otro lado se han realizado estudios sobre las proteínas de la membrana externa

de *A. pleuropneumoniae*, que son unas de las estructuras que principalmente tienen contacto con el sistema inmune del cerdo y se reportan que son tres a cinco proteínas principales de peso molecular menor a 45 kDa (Rapp et al 1986; MacInnes et al 1987; Inzana 1990). También se ha reportado la presencia de dos proteínas que son producidas en la membrana externa en condiciones de restricción de hierro, estas tienen pesos moleculares de 105 y 76 kDa (Deneer et al 1989). Todas estas proteínas reportadas que se encuentran en la membrana externa de *A. pleuropneumoniae* son de peso molecular menor a la clonada y por lo tanto es difícil que se trate de alguna de ellas. Para corroborar esto es necesario llevar a cabo trabajo de laboratorio como, conocer la naturaleza de esta proteína, determinar si tiene alguna actividad citolítica o proteolítica, etc.

La utilización de esta clona como antígeno presenta varias ventajas: 1) El cultivo de *E. coli* es más accesible que el de *A. pleuropneumoniae* ya que para su desarrollo no es necesario la adición de factores de crecimiento, que limitan la cantidad de células en el cultivo. 2) El vector es multicopia y por lo tanto produce una mayor cantidad de antígeno, que la cepa de *A. pleuropneumoniae* en condiciones normales. 3) No es necesario purificar el antígeno ya que los extractos totales de la clona de *E. coli* pueden ser utilizados, pues al parecer los sueros positivos sólo reconocen esta proteína.

Diferentes pruebas serológicas han sido desarrolladas con el fin de detectar los niveles de anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae* en los cerdos. Las pruebas rutinarias de serotipificación están basadas en las pruebas serológicas y la fijación de complemento es la prueba de oro en la diagnóstico en los laboratorios, aunque ha sido recientemente cuestionada (Fenwick y Henry, 1994). Fijación de complemento (FC) tiene una alta

especificidad pero una baja sensibilidad, subestimando la prevalencia de la PCP por el alto número de resultados falsos-negativos. Esta detecta principalmente anticuerpos IgM como activadores de complemento, los cuales son producidos al principio de la PCP y en menos proporción a la IgG, la cual se encuentra presente en las fases tardías de la enfermedad y en los portadores asintomáticos. Además, FC esta basada en la detección de antígenos capsulares, los cuales están presentes en el cuerpo bacteriano y se encuentran presentes tanto en animales infectados como en animales vacunados.

La prueba de ELISA también ha sido utilizada para detectar anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae* (Iuzana y Mathison, 1987; Nicolet et al., 1981). Esta prueba da menos resultados falsos negativos que FC y tiene la ventaja de detectar varios tipos de anticuerpos. Así, los anticuerpos pueden ser detectados durante todo el tiempo que se encuentre presente la bacteria. Esta prueba y la de aglutinación presentan una alta frecuencia de resultados falsos-positivos, los cuales tienden a sobre estimar la prevalencia de la PCP (Fenwick y Henry, 1994), además de que no discriminan entre animales infectados y vacunados, ya que los antígenos utilizados son sólo células.

La neutralización de citotoxina es una prueba que da menos resultados falsos-negativos y falsos-positivos y tiene la ventaja de poder discriminar entre cerdos vacunados e infectados, ya que los anticuerpos detectados están dirigidos contra las citotoxinas excretadas por la bacteria (Kamp et al 1989). Sin embargo, esta prueba es costosa, tardada y laboriosa, ya que requiere de la purificación de la citotoxina y que esta mantenga su actividad biológica (Ma et al 1990), por otro lado no detecta los serotipos que no producen todas las citotoxinas y en la prueba sólo se detectarían los serotipos que produzcan la

citotoxina que se utilice en la prueba. Además, esta prueba requiere de cultivos de *A. pleuropneumoniae*, que requieren de suplementación con NAD, pases periódicos y trabajar con una bacteria patógena.

Para el desarrollo de la prueba de ELISA se han utilizado con antígeno de captura ya sea la célula completa de *A. pleuropneumoniae* como Loftager et al. (1993) y Stine et al. (1994), polisacárido como Bossé et al. (1993) o extractos crudos celulares como Sidibé et al (1993), siendo como el de estos últimos el tipo de antígeno que se utilizó para llevar a cabo el ELISA, encontrándose como resultado común, que con estos antígenos detectan anticuerpos serotipo específico, dependiendo de con que serotipo se este trabajando.

La utilización de los extractos crudos tiene como ventaja, que se utiliza menos antígeno que al utilizar células completas, ya que de este se pueden hacer diluciones de hasta 1/1 200 como lo reportó Trottiler et al. (1992), en este caso trabajó con 100 ng del extracto crudo obtenido del desarrollo de una noche.

Se utilizó como antígeno extractos totales de la clona, ya que cuando se utilizaron los precipitados de los sobrenadante del cultivo de esta misma clona ningún suero de los animales positivos detecto la proteína de >200 kDa. Esto significa que la proteína clonada no era excretada, y esta se encontraba en el interior de las células de *E. coli* que se utilizó como vehículo. Esto no es raro de que suceda, ya que existen otros caso en que las proteínas quedan en el espacio periplásmico (Douglas et al 1987), y para conocer si esto le ocurrió a la proteína sería necesario realizar un fraccionamiento de la célula.

Al igual que Trottiler et al. , Sidibé et al. y Bossé et al. se utilizó la dilución del suero de 1/200, ya que a partir de esta dilución es posible diferenciar los sueros de los

animales negativos de los animales positivos. Otro antígeno de captura utilizado en una prueba de ELISA montada por Ma e Inzana (1990), es la hemolisina, la cual es muy específica y que es capaz de identificar a los animales que han sido expuestos a todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* que producen esta citotoxina.

Al utilizar el antígeno clonado en este trabajo, se encontró que los animales vacunados y que resultaban positivos a la prueba de FC, en la prueba de ELISA se comportaban como negativos, lo que hace pensar que posiblemente la proteína clonada sea un producto de excreción de *A. pleuropneumoniae*, ya que los animales vacunados con células completas inactivadas no lo reconocen como antígeno, pero si los animales que estuvieron expuestos al microorganismo, como lo que sucede con la prueba de Inhibición de la citotoxina.

Se encontró que dos sueros positivos a fijación de complemento de los animales de campo y dos sueros de los animales sacrificados en rastro no fueron reconocidos por el antígeno recombinante (tabla 2, grupos IV y Vb). Se sospecha que estos cerdos pudieron ser vacunados ya que los porcicultores ocasionalmente vacunan, pero de ello no se tenía un registro. Además, puede verse en la tabla 2 que en animales vacunados bajo condiciones controladas, ya sea con vacuna comercial o con vacuna preparada en el laboratorio, la prueba de ELISA no fue positiva a *A. pleuropneumoniae*.

Por otro lado, 10 sueros de animales sacrificados en el rastro (no mostrados en la tabla) que presentaron anticuerpos contra el serotipo 5, presentaron reacción cruzada con el antígeno clonado del serotipo 1 en la prueba de ELISA, lo cual podría deberse a que este antígeno es una proteína común para ambos serotipos, como podría ser alguna de las

citotoxina que ambos producen o algún otro factor de virulencia como alguna proteasa de secreción, ya que parece ser que estas son producida por todos los serotipo de *A. pleuropneumoniae* (Negrete 1997, en revisión).

Si comparamos la sensibilidad obtenida del 94.8% es menor que la obtenida por Ma et al. (1990) que fue del 98.1% y semejante a la obtenida por Bossé et al. (1993) del 96%, pero la especificidad del 97.4% fue mejor que el 90% que el obtenido por Ma et al., pero menor que el 99.5% reportado por Bossé et al., en las pruebas de ELISA montadas por ellos. Si se tomaran sólo los resultados obtenidos con los animales infectados, vacunados y controles negativos como lo hace Nielsen (1995), se obtendría una sensibilidad y especificidad del 100%, resultado igual al reportado por este autor. Con estos resultados de sensibilidad y especificidad, la prueba descrita es una buena prueba en el diagnóstico de la PCP, sin tomar en consideración la ventaja de diferenciar a los animales vacunados de los infectados.

La utilización de esta clona como antígeno presenta varias ventajas:

- 1) El cultivo de *E. coli* es más accesible que el de *A. pleuropneumoniae* ya que para su desarrollo no es necesario la adición de factores de crecimiento, que limitan la cantidad de células en el cultivo.
- 2) El vector es multicopia y por lo tanto produce una mayor cantidad de antígeno, que la cepa de *A. pleuropneumoniae* en condiciones normales.
- 3) No es necesario purificar el antígeno ya que los extractos totales de la clona de *E. coli* pueden ser utilizados, pues al parecer los sueros positivos sólo reconocen esta proteína.

CONCLUSIONES

- 1. Se obtuvo un banco genómico de *A. pleuropneumoniae* utilizando el plásmido pBluescript como vector de clonación.**
- 2. Se obtuvieron 30 438 clonas que contenían plásmidos con insertos de *A. pleuropneumoniae*.**
- 3. Por tamizado inmunológico, se seleccionaron 16 clonas que expresaban antígenos de *A. pleuropneumoniae*.**
- 4. La clona 2732 fue identificada como la que expresaba una proteína que era reconocida con mayor intensidad por el suero de animales infectados.**
- 5. La clona 2732 fue utilizada para desarrollar una prueba de ELISA, que permitió discriminar cerdos infectados naturalmente en el campo, de los que fueron vacunados.**

APÉNDICE I: RESULTADOS DE LA PRUEBAS SEROLÓGICAS

ANIMALES TESTIGOS

POSITIVOS			NEGATIVOS		
SUERO	FC	ELISA	SUERO	FC	ELISA
1	1/32	1.123	1	-	0.090
2	1/64	1.347	2	-	0.104
3	1/64	1.214	3	-	0.078
			4	-	0.111
			5	-	0.077
			6	-	0.123
			7	-	0.068
			8	-	0.092
			9	-	0.096
			10	-	0.045

ANIMALES INMUNIZADOS

BACTERINA COMERCIAL			BACTERINA DE LABORATORIO		
SUERO	FC	ELISA	SUERO	FC	ELISA
1	1/4	0.075	1	1/8	0.121
2	1/4	0.048	2	1/4	0.104
3	1/4	0.055	3	1/4	0.089
4	1/4	0.081	4	1/8	0.114
5	1/8	0.092	5	1/4	0.066
6	1/4	0.084	6	1/4	0.091
7	1/4	0.052	7	1/4	0.087
8	1/4	0.087	8	1/4	0.081
9	1/8	0.105	9	1/4	0.057
10	1/4	0.048	10	1/4	0.067
11	1/8	0.119			
12	1/8	0.109			
13	1/4	0.0			

ANIMALES DE CAMPO

SUERO	FC	ELISA	SUERO	FC	ELISA
1	1/16	0.921	29	-	0.115
2	-	0.097	30	1/16	0.789
3	-	0.086	31	-	0.094
4	-	0.054	32	-	0.107
5	-	0.067	33	1/16	0.921
6	1/16	0.953	34	-	0.092
7	-	0.121	35	-	0.076
8	-	0.072	36	-	0.049
9	-	0.084	37	-	0.095
10	1/32	0.985	38	1/64	1.312
11	-	0.059	39	-	0.118
12	-	0.067	40	1/32	1.043
13	1/8	0.051	41	-	0.112
14	-	0.125	42	1/8	0.972
15	-	0.112	43	-	0-049
16	-	0.062	44	-	0.069
17	-	0.094	45	-	0.079
18	1/32	1.174	46	-	0.091
19	-	0.072	47	1/8	0.882
20	1/64	1.223	48	-	0.072
21	-	0.113	49	-	0.084
22	-	0.104	50	1/8	0.791
23	1/16	0.872	51	-	0.086
24	-	0.059	52	-	0.071
25	-	0.076	53	-	0.092
26	1/16	1.051	54	-	0.052
27	-	0.067	55	-	0.084
28	-	0.059	56	1/16	1.122

ANIMALES DE CAMPO

SUERO	FC	ELISA	SUERO	FC	ELISA
57	-	0.116	85	-	0.070
58	-	0.096	86	-	0.063
59	-	0.098	87	-	0.072
60	1/64	1.232	88	-	0.087
61	-	0.099	89	-	0.094
62	-	0.064	90	1/16	0.892
63	1/32	1.113	91	-	0.081
64	-	0.074	92	-	0.073
65	-	0.089	93	-	0.072
66	-	0.071	94	1/16	0.961
67	-	0.063	95	-	0.069
68	-	0.092	96	-	0.061
69	1/32	1.211	97	-	0.059
70	1/16	0.0842	98	-	0.097
71	-	0.081	99	-	0.061
72	-	0.086	100	1/4	0.135
73	-	0.0118	101	-	0.072
74	-	0.108	102	1/8	0.762
75	-	0.095	103	-	0.083
76	-	0.076	104	-	0.091
77	-	0.087	105	-	0.097
78	-	0.069	106	-	0.082
79	-	0.059	107	-	0.069
80	1/8	0.691	108	1/64	1.313
81	-	0.112	109	-	0.083
82	1/8	0.781	110	1/4	0.128
83	-	0.097	111	-	0.088
84	-	0.081	112	-	0.091

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANIMALES DE RASTRO

SUERO	FC	ELISA	SUERO	FC	ELISA
1	1/32	1.212	29	1/16	1.111
2	1/64	1.334	30	1/16	1.052
3	-	0.112	31	-	0.091
4	-	0.097	32	-	0.098
5	-	0.087	33	1/4	0.143
6	1/16	0.972	34	1/8	0.994
7	-	0.112	35	-	0.092
8	-	0.084	36	-	0.081
9	1/16	0.981	37	-	0.079
10	1/32	0.994	38	1/8	0.953
11	-	0.067	39	-	0.097
12	-	0.078	40	1/16	0.981
13	1/64	1.273	41	1/64	1.305
14	-	0.107	42	-	0.096
15	-	0.124	43	-	0.087
16	1/64	1.314	44	1/32	1.152
17	-	0.130	45	1/64	1.352
18	-	0.092	46	-	0.072
19	1/32	1.121	47	-	0.082
20	1/64	1.417	48	1/16	1.093
21	-	0.094	49	-	0.094
22	1/32	1.271	50	1/16	0.962
23	-	0.085	51	-	0.099
24	-	0.086	52	-	0.112
25	-	0.078	53	1/16	0.941
26	1/16	1.141	54	-	0.124
27	-	0.069	55	-	0.130
28	-	0.081	56	1/16	0.903

ANIMALES DE RASTRO

SUERO	FC	ELISA	SUERO	FC	ELISA
57	-	0.105	79	-	0.069
58	-	0.076	80	1/64	1.421
59	1/32	1.212	81	-	0.084
60	1/32	1.322	82	1/32	1.372
61	-	0.117	83	1/16	1.023
62	-	0.094	84	-	0.094
63	1/4	0.132	85	-	0.086
64	1/16	1.031	86	1/32	1.223
65	-	0.079	87	-	0.089
66	-	0.081	88	1/8	0.942
67	-	0.097	89	-	0.096
68	1/16	1.091	90	1/8	0.934
69	-	0.113	91	-	0.119
70	1/32	1.293	92	-	0.129
71	1/32	1.254	93	1/8	0.981
72	-	0.126	94	1/16	1.162
73	-	0.106	95	-	0.132
74	1/16	1.181	96	-	0.121
75	-	0.111	97	-	0.079
76	-	0.092	98	1/16	1.192
77	-	0.084	99	-	0.099
78	1/32	1.291	100	1/64	1.373

BIBLIOGRAFIA

- Altman, E., Griffith, D.W. and Perry, M.B., 1990.** Structural studies to the O-chains of the lipopolysaccharide produced by strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Biochem. Cell Biol.*, 68:1268-1271.
- Backman, K. and Ptashne, M. 1978.** Maximizing gene expression on a plasmid using recombination *in vitro*. *Cell*, 13:65-71.
- Bélangier, M., Dubreuil, D., Harel, J., Girard, C. and Jacques, M., 1990.** Role of lipopolysaccharide in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect. Immun.*, 58:3523-3530.
- Bertram, T.A., 1985.** Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.*, 22:598-609.
- Birnboim, H. and Doly, D., 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc.Acids Res.*, 7:6:1513-1523.
- Bolívar, F. 1979.** Recombinación *in vitro* de ácidos nucleicos. Ingeniería genética molecular. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 21:37-55.
- Bolívar, F. 1979.** Construction and characterization of new cloning vehicles: III. Derivatives of plasmid pBR 322 carrying unique Eco RI sites for selection of Eco RI generated recombinant DNA molecules. *Gene*, 4:121-136.
- Bolívar, F., Rodríguez, E., Betlach, M. and Boyer, H. 1977.** Construction and characterization of a new cloning vehicle: I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene*, 2:75-93.
- Bolívar, F., Rodríguez, R., Greene, P., Betlach, M., Heyneker, H. and Boyer, H. 1977.**

Construction and characterization of a new cloning vehicle: II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2:95-113.

Bozák, J.T., Friendship, R., Rosendal, S. and Fenwick, B.W., 1993. Development and evaluation of a mixed-antigen ELISA for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 5, and 7 infections in commercial swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5:359-362.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 95:248-254.

Brandreth, S.R. and Smith, I.M., 1985. Prevalence of pig herds affected by pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* in Eastern England. *Vet. Rec.*, August 17:143-147.

Byrd, W. and Kadis, S., 1992. Preparation, characterization, and immunogenicity of conjugate vaccines directed against *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence determinants. *Immun. Infec.* 60:3042-3051.

Cassuto, E., Lash, T., Sriprakash, K. and Radding, C. 1971. Role of exonuclease and β -pretien of phage Lambda in genetic recombination, V. Recombination of Lambda *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:7:1639-1643.

Cepaldo, F.N., Ramsey, G. and Barbour, S., 1974, Analysis of the growth of recombination-deficient strain of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 106:204-212.

Chang, A. and Cohen, S. 1974. Genome construction between bacterial species *in vitro*: Replication and expression of *Staphylococcus* plasmid genes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:4:1030-1034.

Chang, A. and Cohen, S. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy

- DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.*, 134:3:1141-1156.
- Chang, Y., Young, R., Struck, D.** 1989. Cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *DNA*, 8:9:635-647.
- Chiang, Y., Young, T., Rapp, V. and Ross, R.F.** 1991. Improved protection of swine from pleuropneumonia by vaccination with protease K-treated outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 22:49-62.
- Christensen, G.** 1984. Pleuritis in slaughter swine. *Dansk. Vet. Tidsskr.*, 21:1067-1075.
- Clarke, L. and Carbon, J.** 1975. Biochemical construction and selection of hybrid plasmids containing specific segment of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:11:4361-4365.
- Clarke, L. and Carbon, J.** 1976. A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmid representative of the entire *E. coli* genome. *Cell*, 9:91-99.
- Clewell, D.** 1972. Nature of ColE1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.*, 110:2:667-676.
- Ciprian, C.A., Colmenares, V.G. y Mendoza E.S.** 1990. La enfermedad en México. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En: Compendio sobre *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. pp. 29-42. AMVEC (Editor)
- Ciprian, C.A., Medina, A.G., Fuentes, R.M., Pijoan, A.C., Torres, A.O., Colmenares, V.G. y Camacho, M.J.** 1988. Serotipificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en México. *Veterinaria Méx.*, XIX:3:205-210.
- Cohen, S., Chang, A., Boyer, H. and Helling, R.** 1973. Construction of biologically functional

plasmids *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70:3240-3244.

Cohen, S., Chang, A. and Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:8:2110-2114.

Cohen, S. and Chang, A. 1977. Revised interpretation of the origin of the pSC101 plasmid. J. Bacteriol., 132:2:734-737.

Colmenares, G., Torres, O., Lara, V., Camacho, J., Alvarez, J., de la Garza, M. y Ciprian, A., 1988. Resistencia antimicrobiana no codificada por plásmidos en *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1. Veterinaria Méx., XIX:315-320.

Cruidjzen, T., Van Leengoed, L., Ham-Hoffes, M. and Verheijden, J., 1995. Convalescent pig are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. Infect. Immun. 63:6:2341-2343.

Dagert, M. and Ehrlich, S., 1979, Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene, 6:32-28.

Davis, L., Dibner, M., Battey, J. 1986. Basic methods in molecular biology. Elsevier, New York, USA.

Deneer, H.G., Potter, A.A. 1989. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Infect. Immunol. 57:798-804.

Devenish, L. and Rosendal, S., 1991. Immunological characterization of breakdown peptides of the 104 kilodalton hemolysin of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Vet. Microbiol., 29:85-93.

- Díaz, C., González, M., Jiménez, E. y Stéphanou, A., 1989. Identificación de diferentes serotipos de *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* aislados en México de cerdos con pleuroneumonía de 1985 a 1988. *Veterinaria Méx.*, XX:2:157-160.
- Dugalczyk, A., Boyer, H. and Goodman, H. 1975. Ligation of Eco RI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.*, 96:171-184.
- Douglas, C., Guidi-Rontani, C. and Collier, J. 1987. Exotoxin A of *Pseudomona aeruginosa*: Active, cloned toxin is secreted into the periplasmic space of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 169:11:4962-4966.
- Efstathiadis, A., Maniatis, T., Kafatos, F.C., Jeffrey, A. and Vournakis, J.N. 1975. Full length and discrete partial reverse transcripts of globin and chorion mRNAs. *Cell*, 4:367-378.
- Ehrlich, S., Sparamella, V. and Lederberg, J. 1976. Transfection of restrictionless *Escherichia coli* by bacteriophage T7 DNA: Effect of *in vitro* erosion of DNA by Lambda exonuclease. *J. Mol. Biol.*, 105:603-609.
- España, E., Costa, L.I., Riere, P. and Casadevall, P., 1986. Evaluation of three *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines by challenger infection. *Proc. Int. Pig Vet. Coc. Congr. Spain*.
- Fedoruk-Cray, P.J., Anderson, G.A., Cray, W.C., Gray, J.T. and Breish, S.A., 1994. *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Part II. Virulence Factors, Immunity and Vaccines. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 16: 117-124.
- Fedoruk-Cray, P.J., Hoffman, L., Cray, W.C., Gray, J.T., Breish, S.A. and Anderson, G.A., 1993. *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Part I. History, Epidemiology, Serotyping, and Treatment. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 15: 1447-1454.
- Fedoruk-Cray, P.J., Stine, L.D., Greenwald, J.M., Gray, J.T., Huether, M.J. Anderson, G.A.,

1993. The importance of secreted virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacterin preparation: a comparison. *Vet. Microbiol.* 37:85-100.
- Fenwick, B. and Henry, S., 1994. Porcine pleuropneumonia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 204: 1334-1340.
- Fenwick, B.W. and Osburn, B.I., 1986. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infect. Immun.*, 54:2:575-582.
- Freese, W., 1990. Síndrome clínico y procedimientos de tratamiento para *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. En: Compendio sobre *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. pp. 9-15. AMVEC (Editor)
- Frey, J. 1992. Construction of a broad host range shuttle vector for gene cloning and expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and other *Pasteurellaceae*. *Res. Microbiol.* 143:263-269.
- Frey, J., 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.*, 3: 257-261.
- Frey, J., Beck, M., Sruckl, U., Nicolet, J. 1993. Analysis of haemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene*, 123: 51-58.
- Frey, J., Kuhn, R., Nicolet, J. 1994. Association of the CAMP phenomenon in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with the RTX toxins ApxI, ApxII and ApxIII. *FEMS Microbiology Letters* 124:245-252.
- Frey, J., Meier, R., Gygi, D., Nicolet, J. 1991. Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. immun.* 59:9:3026-3032.

- Frey, J. and Nicolet, J., 1988.** Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by calcium. *Infect. Immun.* 56:2570-2575.
- Frey, J. and Nicolet, J., 1991.** Immunological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin I. *Vet. Microbiol.* 28:61-73.
- Frey, J., Perria, I. and Nicolet, J., 1989.** Cloning and expression of a cohemolysin, the cAMP factor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 57:2050-2056.
- Ganem, D., Nussbaum, A., Davoli, D. and Farred, G. 1976.** Isolation, propagation and characterization requirements of reiteration mutants of Simian Virus 40. *J. Mol. Biol.*, 101:57-83.
- Gerlach, G., Anderson, C., Potter, A., Klashinsky, S., Willson, P. 1992.** Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 60:3:892-898.
- Gerlach, G., Anderson, C., Klashinsky, S., Rossi-Campos, A., Potter, A., Willson, P. 1993.** Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* 61:2:565-572.
- Gilbride, K.A. and Rosendal, S., 1984.** Antimicrobial susceptibility of 51 strain of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.*, 48:47-50.
- Goeddel, D., Kleid, D., Bolivar, F., Heyneker, H., Vansura, D., Crea, R., Hirose, T. Kranszewski, A., Itakura, K. and Riggs, A., 1979.** Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1:106-110.
- González, F., Leachman, S., Norgard, M., Radolf, J., McCracken, G., Evans, C. and Hansen, E. 1987.** Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the

heat-modifiable major outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.*, 55:12:2993-3000.

Goyette, G., Larivière, S., Mittal, K.R., Higgins, R. and Martineau, G.P., 1986. Comparison of CFT, and tube agglutination test with 2ME in pigs from the herds with or without *Haemophilus pleuropneumoniae* infection. *Proc. Int. Pig Vet. Coc. Congr., Spain.*

Gunnarsson, A., 1979. Serologic Studies on porcine strain of *Haemophilus paraahaemolyticus* (*pleuropneumoniae*): Extraction of type-specific antigens. *Am. J. Vet. Res.*, 40:4:469-472.

Gunnarsson, A., 1980. *Haemophilus pleuropneumoniae* syn. *paraahaemolyticus*. An antigenic and diagnostic study. Tesis doctoral, Uppasala.

Gunnarsson, A., Hurvell, B. and Biberstein, E.L., 1978. Serologic studies of porcine strain of *Haemophilus paraahaemolyticus* (*pleuropneumoniae*): Antigenic Specificity and relationship between serotypes. *Am. J. Vet. Res.*, 39:8:1286-1292.

Gutiérrez, C.B., Píriz, S., Vadillo, S. and Rodríguez, E., 1993. In vitro susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains to 42 antimicrobial agents. *Am. J. Vet. Res.* 53:4:546-550.

Cygi, D., Nicolet, J., Cross, M., Koronakis, V., Hughes, C. 1990. Isolation of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* haemolysin gene and the activation and secretion of the prohaemolysin by the HlyC, HlyB and HlyD proteins of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* , 4:1:123-128.

Hackett, P., Fuchs, J. and Messing, J., 1988. An introduction to recombinant DNA techniques. Cold Spring Harbor Laboratory, N. York, USA.

Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol.*

Biol., 166:557-580.

Higuchi, R., Paddock, G., Wall, R. and Salser, W. 1976. A general method for cloning eukariotic structural gene sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929-1933.

Hirth, D.C., Martin, L.D. and Libal, M.D., 1982. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Haemophilus pleuropneumoniae*. Am. J. Vet. Res., 43:2:269-272.

Hogness, D., Simmons, J. 1964. Breakage of Lambda-dg DNA: Chemical and genetic characterization of each isolated half-molecule. J. Mol. Biol., 9:411-438.

Huetter, M.J., Fedorka-Cray, P.J. and Pfannenstiel, M.A., 1987. Plasmid profiles and antibiotic susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes 1, 3, 5 and 7. FEMS Microbiol. Lett., 48:179-182.

Hunter, D. and Livingstone, J., 1986. Detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* antigens using the coagglutination test. Vet. Rec., February 1:129.

Inoue, A., Yamamoto, K. and Hirano, N., 1984. Drugs susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs. Jpn. J. Vet. Sci., 46:175-180.

Inzana, T.J. 1990. Propiedades biofísica y de virulencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En: Compendio sobre *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. pp. 1-8. AMVEC (Editor)

Inzana, T.J., 1991. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microb. Patho. 11:305-316.

Inzana, T.J., Ma, J., Workman, T., Gogolewski, R.P. and Anderson, P., 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. Infect. Immun. 56:1880-1889.

- Inzana, T.J. and Mathison, B., 1987.** Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.*, **55**:7:1580-1587.
- Inzana, T.J., Todd, J. and Veit, H.P., 1991.** Characterization of a non-hemolytic mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of the 110 kilodalton hemolysin in virulence and immunoprotection. *Micro. Pathogen.* **10**:281-296.
- Inzana, T.J., Todd, J. and Veit, H.P., 1993.** Safety, Stability, and Efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Immu. Infect.*, **61**:1682-1686.
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Gigg, A., Heyneker, H., Bolivar, F. and Boyer, H. 1977.** Expression in ~~*Escherichia coli*~~ of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatina. *Science*, **198**:1056-1063.
- Jacques, M., Foley, B., Higgins, R. and Mittal, K.R., 1988.** Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **170**:3314-3318.
- Jensen, A.E. and Bertram T.A., 1986.** Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **51**:419-424.
- Jansen, R., Briaire, J., Kamp, E., Gielkens, A., Smits, M. 1993.** Structural analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin I (ApxI) operon. *Infect. Immun.* **61**:9:3688-3695.
- Jansen, R., Briaire, J., Kamp, E., Smits, M. 1992.** The cytotoxin genes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Proc. IPVS*, **197**.

- Jensen, R., Wodzinski, R. and Rogoff, M.** 1971. Enzymatic addition of cohesive ends to T7 DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43:2:384-392.
- Kamp, E.M., Popma, J. K., Anakotta, J. and Smith, M.A.** 1991. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins fo *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 59:3079-3085.
- Kawahara, K., Asano, H. and Nakai T.** 1989. Antibiotic susceptiblity of serotype 2 and 5 strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* isolated from 1974 to 1986. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51:359-363.
- Kilian, M., Metescky, J. and Schrohenloher, R.F.** 1979. Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. *Infect. Immun.*, 23:143-149.
- Komal, J.P. and Mittal, K.R.** 1990. Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 through 12 on basis of their virulence in mice. *Vet. Microbiol.*, 25:229-240.
- Kume, K., Nakai, T. and Sawata, A.** 1984. Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the nasal cavities of healthy pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 46:641-647.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Liao, C-J., Rosendal, S. and MacInnes, J.I.** 1989. Molecular cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 57: 3377-3382.
- Lecocq, J., Zukowski, M. and Lathe, R.** 1984. Cloning and expression of viral antigens in *Escherichia coli* and other microorganisms. *En Methods in Virology*, VII:121-171. Academic

- Press, USA.
- Lobban, P. and Kaiser, A.** 1973. Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol.*, 78:453-471.
- Loflager, M., Eriksen, L.** 1993. Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in mucosal secretions and sera of infected pigs as demonstrated by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sci.* 54:57-62.
- Lombin, L.H., Rosendal, S. and Mitchel, W.R.** 1982. Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.*, 46: 109-114.
- Ma, J., Inzana, T.** 1990. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to a 110,000-molecular-weight hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 28:6:1356-1361.
- MacInnes, J.J. and Rosendal, S.** 1987. Analysis of major antigens of *Haemophilus pleuropneumoniae* and related organisms. *Infect. Immun.*, 55:7:1626-1634.
- Madsen, M.E., Carnahan, K.G. and Thwaitts, R.N.** 1995. Evaluation of pig lungs following an experimental challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 and 5 in pigs inoculated with either hemolysin protein and/or outer membrane proteins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 131: 29-335.
- MacDonald, J., Rycroft, A.** 1992. Molecular cloning and expression of *ptxA*, the gene encoding the 120-Kilodalton cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Infect. Immun.* 60:2:2726-2732.
- Maqueda, J.J.** 1994. Metodos de manejo, inmunidad, medicación (MIIn) como sistema de

- control y eliminación de problemas respiratorios en cerdos. Pan Amer. Congr. Vet. Sci., XIV:486-487.
- Mandel, M. and Higa, A. 1970 Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol., 53:159-162.
- Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, J., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N. York, USA.
- Mason, R.W., MacKayland, R.W. and Corbould, A., 1982. Field testing of a killed *Haemophilus parahaemolyticus* vaccine in pigs. Aust. Vet. J., 58:108-110.
- Messing, J. and Vieira, J. 1982. A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strain of double-digest restriction fragment. Gene, 19:269-276.
- Mittal, K.R., Higgins, R. Larivière, S. 1984. A 2-mercaptoethanol tube agglutination tests for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. Am. J. Vet. Res. 45:5:715-719.
- Mittal, K.R., Higgins, R. Larivière, S. and Martineau, G.P., 1987. Effect of heat treatment on the surface antigens of *Haemophilus pleuropneumoniae*. Vet. Rec., January 17:62-65.
- Mittal, K.R., Higgins, R. and Larivière, S., 1987. An evaluation of agglutination and coagglutination techniques for serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates. Am. J. Vet. Res., 48:2:219-226.
- Murray, A., Moriarty, K., Mansfield, B. and Scott, D. 1987. Construction of a genomic DNA library of *Mycobacterium paratuberculosis*. N. Z. Vet. J., 35:127.
- Nadeau, M., Larivière, S. and Higgins, R., 1988. Minimal inhibitory concentrations of antimicrobial agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can. J. Vet. Res., 52:315-318.
- Negrete, E., Tenorio G.V., Serrano, J.J., García C.C. and De la Garza, M., 1994. Secreted

- proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin, and Immunoglobulin A. Can. J. Vet. Res., 58: 83-86.
- Nelson, M., Apicella, M., Murphy, T., Vankeulen, H., Spodis, L. and Recosh, D. 1988. Cloning and sequencing of ~~*Haemophilus influenzae*~~ outer membrane protein P6. Infect. Immun., 56:1:128-134.
- Nicolet, J., 1982. Observations on the relationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* and a Pasteurella-like organisms associated with pleuropneumonia in pigs. Proc. Int. Pig Vet. Cong. Congr., México.
- Nicolet, J. 1985. Compendium of swine *Haemophilus pleuropneumoniae*. Ed. Shultz, A. Asso. Swine Pract. Annual Meeting, Iowa, USA.
- Nicolet, J., Paroz, Ph., Krawinkler, M. and Baumgartner, A., 1981. An enzyme-linked immunosorbent assay, using an EDTA-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. Am. J. Vet. Res., 42:12:2139-2142.
- Nielsen, R., 1976. Pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus paraahaemolyticus*. Studies on the protection obtained by vaccination. Acta Vet. Med., 23:337-348.
- Nielsen, R., 1979. *Haemophilus paraahaemolyticus* serotypes. Pathogenicity and cross immunity. Norde. Vet. Med., 31:413-417.
- Nielsen, R., 1982. Tesis Doctoral, Copenhagen.
- Nielsen, R., 1984. Serological characterization of 8 *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 8. Acta Vet. Scand., 25:96-106.
- Nielsen, R., 1986. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. Acta Vet. Scand., 27:453-455.

- Nielsen, R.**, 1995. Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 2 in porcine colostrum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay specific for serotype. *Vet. Microbiol.*, 43:277-281.
- Nielsen, R. and Mandrup, M.**, 1977. Pleuropneumonia in swine caused by *Haemophilus paraahaemolyticus*. *Nord. Vet.-Med.*, 29:465-473.
- Nielsen, R., Plambeck, T. and Foged, N.T.**, 1993. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 8. *Vet. Microbiol.*, 34:131-138.
- Nussbaum, A., Davoli, D., Ganem, D. and Farred, G.** 1976. Constriction and propagation of a defective SV40 genome bearing an operator from bacteriophage Lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:1968-1972.
- Olander, H.J.**, 1963. A septicemic disease of swine and its causative agent, *Haemophilus paraahaemolyticus*. Thesis Doctoral, UCLA, Davis, California.
- Ontiveros, L., Camacho, J. y Alvarez de la Cuadra, J.** 1995. Correlación entre la serotipificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y su aislamiento en cerdos de rastro. *Tec. Pec. México.*, 33:1-7.
- Piñon, C.** 1990., Vacunación contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En: Compendio sobre *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. pp. 23-28. AMVEC (Editor)
- Piñon, C., Orison, R.B. and Hilley, H.D.**, 1983. Dilution technique for isolation of *Haemophilus* from swine lungs collected at slaughter. *J. Clin. Microbiol.*, 18:143.145.
- Pohl, S.** 1981. DNA relatedness among members of *Haemophilus*, *Pasteurella* and *Actinobacillus*. In Ed. Killian, M., *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus*. Academic

Press. London.

Pohl, S., Bertschinger, H.U., Frederiksen, W. and Mannheim, W., 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int. J. Syst. Bact.*, 33:510-514.

Rabbits, T.H. 1976. Bacterial cloning of plasmids carrying copies of rabbit globin messenger RNA. *Nature*, 260:221-225.

Rapp, V.J., Munson, R.S. and Ross, R.F., 1986. Outer membrane protein profile of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 52:2:414-420.

Reimer, D., Frey, J., Jansen, R., Veit, H. and Inzana, T., 1995. Molecular investigation of the role of ApxI and ApxII in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Microbial Pathogen*, 18:197-209.

Romero, R.A., 1989. Análisis de extractos membranales de *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae*, Tesis de Maestría, FES-C:UNAM, México.

Rosendal, S., Carpenter, D.S., Mitchell, W.R. and Wilson, M.R., 1981. Vaccination against pleuropneumonia of pigs caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.*, 22:34-35.

Rosendal, S. and MacInnes J.I., 1990. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.*, 51:711-717.

Rosendal, S. and Mitchell, W.R., 1983. Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs: A survey of Ontario pork producers. *Can. J. Comp. Med.*, 47:1-5.

Rosendal, S. and Mitchell, W.R., Weber, M., 1980. *Haemophilus pleuropneumoniae* lung

- lesions induced by sonicated bacteria and sterile culture supernatans. Proc. IVPS:221.
- Rosendal, S. and Boyd, A., 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. J. Clin. Microbiol., 16:840-843.**
- Rossi-Campos, A., Anderson, C., Gertsch, G. F., Klashinski, S., Potter, A.A., Wilson, P.J., 1992. Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. Vaccine., 10: 512-518.**
- Rycroft, A.N. and Cullen, J.M., 1990. Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection of swine. Am. J. Vet. Res., 51:1449-1453.**
- Rycroft, A.N., Williams, D., Cullen, J.M. and MacDonald J., 1991. The cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleurotoxin) is distinct from haemolysin and is associated with a 120 kDa polypeptide. J. Gen. Microbiol., 137:561-568.**
- Schunay, T.N.K. and Saunders, J.R., 1983. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: A review. JAVMA 182:12:1331-1337.**
- Schunay, T.N.K., Saunders, J.R. and Osborne, A.D., 1983. A model aerosol exposure system for induction of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. Can. J. Comp. Med., 47:48-53.**
- Schunay, T.N.K., Saunders, J.R. and Osborne, A.D., 1983. Dose response relationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* aerosols in pigs. Can. J. Comp. Med., 47:54-56.**
- Sgarbetta, S. and Khorana, H. 1972. CXII. Total synthesis of the structural gene for alanine transfer RNA from yeast. Enzymatic joining of the chemically synthesized polideoxynucleotides to from the DNA duplex representing nucleotide sequence 1 to 20. J. Mol. Biol., 72:427-444.**
- Sidh , M., Mezier, S., Larivière, S., Gottschalk, M., Mittal, K. 1993. Detection of**

- Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological test. Can. J. Vet. Res. 57:204-208.
- Shope, R.E., 1964. Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. J. Exp. Med., 119:357-368.
- Silhavy, T., Berman, M. and Enquist, L., 1984, Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, N. York, USA.
- Smith, G., Murphy, B. and Moss, B. 1983. Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza hemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamsters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:7155-7159.
- Smits, M., Kamp, E., Brialere, J., Jansen, R., van Leengoed, L., van Dijk, J. 1992. Induction of pneumonic lesions by recombinant cytolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Proc. IPVS. 187.
- Soites, G., MacInnes, J. 1994. Regulation of gene expression by the HlyX protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiology 140:839-845.
- Stenbaek, E., 1992. Use of passive immunization for the production of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, 6 and 12. J. Immun. Meth. 156:267-269.
- Stine, D., Fedorka-Cray, P., Huether, M., Gentry, M., Anderson, G. 1994. Comparison of serum responses in swine after vaccination and challenger exposure with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Am. J. Res. 55:9:1238-1243.
- Suzuki, S., Ohnaka, K. and Ohishi, K., 1989. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* isolated from pigs with pleuropneumonia. Jpn. J. Vet. Sci.,

51:450-452.

Tenorio, V., 1990. Construcción de un banco genómico de *Haemophilus pleuropneumoniae* serotipo 1. Tesis de Maestría, FES-Cuautitlán, UNAM.

Tenorio, G.V., Falcon, A., Ciprian, C.A. y Camacho, M.J., 1987. Patogenicidad de *Haemophilus pleuropneumoniae* en animales de laboratorio. Memorias de Reunión de Investigación Pecuaria en México.

Trottier, Y., Wright, P., Lariviéri, S. 1992. Optimization and standarization of an enzyme-linked immunosorbent assay protocol for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. J. Clin. Microbiol. 30:1:46-53.

Towbin, H., Staechelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.

Utrera, V. and Pujuan, C., 1991. Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet. Rec.*, 128:357-358.

Van Den Bosh, J.F., Pubben, A.N., Jongeneelen, I.M. and Segers, R.P., 1994. *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccine effective against all serotypes. Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens International Symposium. pp. 33, Iowa State University.

Vieira, J. and Messing, J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19:259-268.

Villancourt, J., Martineau, G.P., Larivière, S., Mittal, K.R. and Higgins, R., 1986. Use of the tube agglutination test with 2-ME for detecting piglets exposed to *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Proc. Int. Pig Vet. Coc. Congr.*, Spain.

Villancourt, J., Martineau, G.P., Larivière, S., Higgins, R., Khyali, R. and Mittal, K.R.,

1990. Seroprevalence of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype-1 infection in swine herds in Quebec. *JAVMA* 196:301-306.

Willson, P.J., Deener, H.G., Potter, A., 1989. Characterization of a streptomycin-sulfonamide resistance plasmid from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:235-238.

West, S., Romero, M., Regasa, L., Zielinski, N., Welch, R. 1995. Construction of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-*Escherichia coli* shuttle vectors: expression of antibiotic-resistance genes. *Gene* 100:81-86.

Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33:103-119.