

TITULO: EFICIENCIA PROTECTORA DE LA INMUNIZACION CON PROTEINAS DE Haemophilus pleuropneumoniae EN CERDOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.

AUTORES: VILADOMAT, C.G., De la GARZA, M., HERNANDEZ, B.E., TORTORA, P.J. Y CIPRIAN, A.

INSTITUCION(ES): CENID-MICROBIOLOGIA, INIFAP-SARH; CINVESTAV, IPN; FES-CUAUTILAN, UNAM.

AREA: SANIDAD ANIMAL

INTRODUCCION.

Haemophilus pleuropneumoniae es un agente muy virulento que produce la pleuropneumonia contagiosa porcina (PCP). Para prevenir esta enfermedad se han desarrollado varias vacunas con resultados variables tanto en condiciones de infección experimental como de campo. La protección conferida por las vacunas depende de la calidad de las mismas y de los programas de inmunización. En general, la aplicación de una sola dosis se muestra poco eficaz, mientras que dos dosis por vía subcutánea con un intervalo de 2 a 3 semanas da buenos resultados. Recientemente se ha cuestionado el grado de protección conferida por las vacunas inactivadas y suspendidas en adyuvante de hidróxido de aluminio al 15%. El empleo de adyuvante completo de Freund da mejores resultados que el hidróxido de aluminio, pero produce reacciones locales indeseables en el sitio de la inoculación. La inoculación es también importante, ya que la aplicación de dos dosis por la vía de intramuscular profunda en la tabla del cuello, da buenos resultados cuando se acompañan las células con adyuvante hidróxido de aluminio y un agente inmunoestimulante (Hall *et al.*, 1984; Hunneman, 1984; Simonson *et al.*, 1982; Straw *et al.*, 1984; Fenwick y Osburn, 1986; Rosendal *et al.*, 1986). La eficacia protectora de extractos capsulares de H. pleuropneumoniae con adyuvante hidróxido de aluminio han demostrado ser buenos inmunógenos cuando se aplica por vía subcutánea a cerdos, se ha encontrado que los anticuerpos de los cerdos convalescientes reconocen a varias proteínas de alto peso molecular y a polisacáridos o posibles lipopolisacáridos capsulares, los cuales se encuentran en los extractos celulares probados, sin embargo, no se sabe que fracción o parte del extracto es la responsable de conferir protección en el cerdo (Rapp y Ross, 1986; Rosendal *et al.*, 1986).

OBJETIVO.

El propósito de este trabajo fue comparar la eficacia de tres extractos protéicos de células completas de H. pleuropneumoniae y evaluar la inmunidad de los cerdos vacunados mediante desafío experimental.

MATERIALES Y METODOS.

Se cultivó H. pleuropneumoniae serotipo 1 aislado y tipificado de un caso clínico en medio BHI con extracto de

levadura. Se obtuvo un paquete celular mediante centrifugación 5000xg. Las células se rompieron con SDS, 2ME, y el extracto obtenido fue purificado según Nicolet *et al.* (1980). El gel se separó en dos fracciones: a) fracción de alto peso molecular (mayor de 45 000 d) y b) fracción de bajo peso molecular (menor de 45 000 d). Los que contenían las fracciones se homogeneizaron con adyuvante completo de Freund y con estas vacunas se realizaron dos aplicaciones por vía intraperitoneal con un intervalo de dos semanas. Se formaron cuatro grupos experimentales con doce lechones de seis semanas de edad: grupo A, animales testigo; grupo B, animales inoculados con gel de poliacrilamida con la fracción de alto peso molecular; grupo C, animales inoculados con un gel de poliacrilamida con la fracción de bajo peso molecular y grupo D, animales inoculados con un gel de poliacrilamida completo. Los animales se mantuvieron en unidades de aislamiento y fueron alimentados *ad libitum*. A los 60 días posteriores a la primera vacunación se desafiaron todos los cerdos mediante la exposición durante 30 min a un aerosol formado con 12 ml de suspensión de *H. pleuropneumoniae* (10 bacterias/ml). Se evaluaron los signos clínicos, tiempo de muerte, grado y extensión de la lesión neumónica y serología. Los títulos de anticuerpos fueron evaluados mediante la técnica 2-mercaptoetanol (2-ME) en tubo (Mittal *et al.* 1984) y aglutinación en tubo (Yamamoto y Ogata, 1980).

RESULTADOS

Dos cerdos del grupo A y dos del grupo B murieron entre las 20 y 30 horas posinoculación presentando todos un cuadro hiperagudo, las lesiones macroscópicas y microscópicas fueron características de la PCP. En el grupo A, ningún animal presentó anticuerpos contra *H. pleuropneumoniae*. En el grupo B se encontraron anticuerpos de la clase IGM (I 50). Todos los cerdos del grupo C murieron entre las 20 y 44 horas posinoculación presentando también un cuadro hiperagudo de PCP, las lesiones histopatológicas fueron típicas de la enfermedad, el estudio serológico reveló que la vacuna produjo una respuesta de tipo IGM con título de hasta 1:100. En el grupo D murió únicamente un cerdo a las 28 horas a pesar de que tenía un título de 1:50 (IGM). Los cerdos que sobrevivieron se sacrificaron dos semanas después del desafío encontrándose lesiones de tipo crónico; en estos cerdos se detectaron anticuerpos de tipo IgG con títulos de hasta 1:200. *H. pleuropneumoniae* se aisló del pulmón, hígado y corazón de cada uno de los cerdos que murieron de PCP, en cambio, en los animales que fueron sacrificados, solamente se aisló el microorganismo de las lesiones pulmonares crónicas.

DISCUSION

Los animales inmunizados con las fracciones de alto y bajo peso molecular no sobrevivieron al desafío experimental, sin embargo los cerdos vacunados con el extracto completo si fueron protegidos, estos resultados sugieren que se requiere que la vacuna contenga además de las proteínas (fracción de bajo peso molecular) los polisacáridos capsulares y los

lipopolisacáridos componentes de la fracción de alto peso molecular, (Raap y Ross, 1986), que por separado parecen no ser efectivos. Sin embargo, el extracto completo no previno la formación de los secuestros pulmonares.

LITERATURA CITADA

Fenwick, B.W. and Osburn, B.I. (1986): Vaccine potential of Haemophilus pleuropneumoniae oligosaccharide-tetanus toxoid conjugates. Infect. Immun. **54**: 583-586.

Hall, W., Molitor, T.W. and Pijoan, C. (1984): Immunomodulating effect of Haemophilus pleuropneumoniae vaccine administered intraperitoneally. Proceedings IPVS-Congress, Ghent, Belgium. p. 109.

Hunneman, W.A. (1984): Control of Haemophilus pleuropneumoniae infections by vaccination. Proceedings IPVS-Congress, Ghent, Belgium. p. 110.

Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. and Leblanc, D. (1984): A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of Haemophilus pleuropneumoniae infection in pigs. Am. J. Vet. Res. **45**: 715-719.

Nicolet, J., Paroz, P. and Krawinkler, M. (1980): Polyacrilamide gel electrophoresis of whole-cell proteins of porcine strains of Haemophilus. Int. J. Syst. Bacteriol. **30**: 69-76.

Rapp, V. and Ross, R.F. (1986): Antibody response of swine to outer membrane components of Haemophilus pleuropneumoniae during infection. Infect. Immun. **54**: 751-760.

Rosendal, S., Miniats, O.P. and Sinclair, P. (1986): Protective efficacy of capsule extracts of Haemophilus pleuropneumoniae in pigs and mice. Vet. Microbiol. **12**: 229-240.

Simmonson, R.R., Cecil, J., Stoll, M., Hildebrand, D. and Maheswaran, S.K. (1982): Porcine Haemophilus pleuropneumoniae: Efficacy of vaccination demonstrated using an aerosol challenged method. Proceedings IPVS-Congress, México. p. 75.

Straw, B.E., Maclechlant, J., Corbett, W. and Carter, P. (1984): Comparison of tissue reaction in swine following vaccination with Haemophilus pleuropneumoniae in six adjuvants. Proceedings IPVS-Congress, Ghent, Belgium. p. 114.

Yamamoto, K. and Ogata, M. (1980): The use of agglutination test in the serological diagnosis of Haemophilus pleuropneumoniae infection in pigs. Proceedings IPVS-Congress, Copenhagen, Denmark. p. 218.