

PROTECCION CONFERIDA POR UNA BACTERINA CONTRA *Actinobacillus pleuropneumoniae* EN CERDOS VACUNADOS Y DESAFIADOS CON LOS SEROTIPOS 1, 2, 3, 4, 5 Y 7.

Ciprián C.A.^{1*}, Mendoza E.S.¹, Lara P.H.², Díaz E.E.², Romero R.A.¹, Cruz S.T.¹, Alonso H.R.¹, Alcantara, T.¹, Altamirano, F.A.¹, Cantarel, G.¹, Castillo C.J.¹, Domínguez A.M.¹, Hernández, R.¹, Huerta, J.³, Oliva M.D.¹, Rodríguez, C.¹, Robles, G.R.¹, Sotres, C.F.¹, Trejo, B.R.¹, Trujillo, D.¹, Vargas, S.A.¹. FESC-Cuautitlán, UNAM. C-I, Lab. de Virología y Enf Resp del Cerdo. Ado postal 222, Cuautitlán Izcalli, Edo Mex, 2. Boehringer-Ingelheim, Mexico. 3. CENASA, SAGARPA.

Introducción. La pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP) es una enfermedad económicamente importante que afecta a los cerdos y es producida por los doce serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 1. La cápsula, el LPS, las proteínas de membrana externa están involucrados en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, los anticuerpos dirigidos a estos componentes, no parece ser claro, ya que no protegen de las lesiones pulmonares característica de la PCP. Las bacterinas tratadas con formaldehído o con calor aunque inducen la formación de anticuerpos, la protección es mínima y serotipo-específica (3, 4). En un primer trabajo se detectó la presencia de proteínas carbohidratos y concentración de endotoxina, así como el peso molecular de las proteínas presentes en los sobrenadantes de la bacterina con los serotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 7 (5). Sin embargo, es importante demostrar si el cerdo responde y reconoce estos factores, y si los cerdos vacunados resisten a un desafío experimental con *A. pleuropneumoniae*. El objetivo de este estudio fue demostrar la resistencia de cerdos inmunizados con la bacterina a un desafío experimental con los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae* biovariedad 1.

Material y Métodos. 1. Serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Con cada uno de los serotipos 1 (cepa Shope 4074); 2 (cepa 4226); 3 (cepa 1421); 4 (M 62); 5 (cepa K 17) y 7 (WF 83), se realizaron pases en el cerdo, para elevar su patogenicidad y tener las cepas de desafío de "bajo pasaje". 2. Se utilizaron lechones de dos meses de edad, de un peso de 12.0 a 15.0 Kg, provenientes de granjas libres de PCP, de PRRS, *Pasteurella multocida* y del virus de la enfermedad de Aujeszky. Los cerdos fueron alimentados con alimento comercial libre de antibióticos. 3. Los cerdos se colocaron en unidades individuales en donde convivieron los vacunados y los controles por el serotipo inoculado. 4. Se formaron cinco grupos de 20 cerdos cada uno y se identificaron como A, B, C, D y E. Se inmunizaron a la dosis de 2.0 ml por vía intramuscular a 10 lechones con la Bacterina y 10 lechones fueron controles sin vacunar. Todos los lechones, se desafiaron con 10⁶ bacterias por ml durante 15 minutos en una cámara de nebulización especial para cerdos (1, 6). El desafío se realizó con cada uno de los serotipos 1, 2 y 4, 3, 5 y 7. 5. A los animales controles y vacunados se les determinaron los signos clínicos respiratorios de tos, disnea, anorexia, postración y muerte con epistaxis. 6. Se determinó el tiempo de muerte, grado y extensión de las lesiones neumónicas por planimetría para su evaluación. 7. Recuperación y aislamiento de *A. pleuropneumoniae*. 8. Los cerdos se muestrearon para obtener sangre y suero cada semana, hasta tener cinco sangrados. Los sueros fueron evaluados con la técnica de aglutinación denominado NEUMOTEST-App^{MR} (Marca Registrada por la UNAM) (2) con los serotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 7 y los mismos sueros fueron evaluados por la técnica de ELISA-indirecto denominado CIVTESTTM suis APP. El peso molecular de las proteínas presentes en los sobrenadantes de los serotipos 1, 3 y 7 se determinó utilizando la técnica de electroforesis. Con estos geles se hizo la prueba de inmunotransferencia con los sueros de los seis grupos, de los muestreos del día 15 y 30 posvacunal y posvacunal/ desafío (7). 9. Los datos de los grupos de animales vacunados y controles fueron evaluados por el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey.

Resultados y Discusión. Evaluación de los signos clínicos. La temperatura de los cerdos de los grupos controles y vacunados A,B,C,D y E se mantuvo dentro de los parámetros normales (37.2°C) antes y después de ser vacunados. Todos los animales controles mantuvieron la hipertermia ascendente desde el primer día postnebulización con *Actinobacillus pleuropneumoniae* de 40.5 a 41°C, hasta la muerte de los cerdos. Algunos animales de los grupos vacunados mostraron hipertermia hasta el sacrificio. **Signos clínicos respiratorios.** Los signos respiratorios encontrados en los cerdos control y menos grave en los vacunados fue primero disnea en reposo y posteriormente

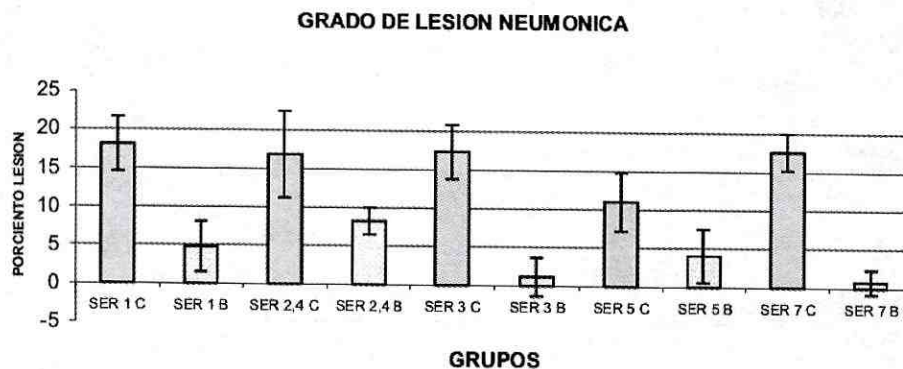
de esfuerzo, antes de la muerte se encontró polipnea, tos productiva, estornudos y hemoptisis. **Tiempo de muerte.** El tiempo de muerte encontrado en los controles fue entre 26 y 33 horas, algunos cerdos de los diferentes grupos vacunados murieron entre las 43 y las 47 horas, todos los animales se sacrificaron a las 48 horas. **Lesiones macroscópicas.** Las lesiones de los cerdos controles y de los vacunados se caracterizó por presentar lesiones de color rojo púrpura con zonas de necrosis con adherencias y pleuritis, típicas de pleuroneumonía contagiosa porcina, y se identificaron como lesiones tipo pleuroneumónicas. El porcentaje de las lesiones encontradas por planimetría fueron: Grupo A: controles 18.13 \pm 3.58, vacunados 4.77 \pm 3.29; Grupo B: controles 16.86 \pm 5.62, vacunados 8.26 \pm 1.71; Grupo C: controles 17.34 \pm 3.53, vacunados 1.12 \pm 2.5; Grupo D: controles 11.01 \pm 3.8, vacunados 4.03 \pm 3.47 y Grupo E: controles 17.64 \pm 2.41, vacunados 0.7 \pm 1.57. Los resultados fueron sometido a la prueba estadística de ANOVA y Tukey, y mostraron claramente una diferencia entre los animales vacunados y sus controles (Gráfica 1).

Recuperación y aislamiento del agente. A partir de los pulmones de animales controles y vacunados se logró recuperar el agente y se identificó en todos los serotipos inoculados de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Seguimiento serológico.** El monitoreo realizado con los sueros de los diferentes días mostró una elevación de anticuerpos contra cápsula y contra una proteína específica de cuerpo bacteriano al día 15, mientras que para el día 30 se observó claramente una respuesta anamnésica. **Inmunotransferencias.** Se encontraron bandas proteicas que con algunos serotipos se observaron teñidas intensamente, mientras que en otras no se observaron bandas (Cuadro 1).

Implicaciones. La evaluación de la bacterina en cerdos inmunizados y desafiados con *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos 1, 2 y 4, 3, 5 y 7, mostró los siguientes hallazgos: Los resultados mostraron que la bacterina protegió mejor contra algunos de los serotipos. El tiempo de muerte encontrado en los animales de los grupos controles, mostró que las cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* estaba activa. Pocos animales de los grupos vacunados tardaron más de 30 horas en morir. Se tuvo la necesidad de sacrificar a todos los animales vacunados y algunos controles agonizantes a las 48 horas posdesafío. El análisis de varianza y la prueba de Tukey practicado en los resultados del porcentaje de lesión neumónica mostró que los mejores grupos fueron los D, A y E, ya que fueron los que resistieron el desafío de los serotipos 5, 1 y 7 respectivamente. El seguimiento serológico mostró que hubo una respuesta inmunológica contra los antígenos capsulares por la prueba de aglutinación, y proteínas específicas por la prueba de ELISA; así mismo se encontraron bandas contra las proteínas de 110 a 120 KD de los sobrenadantes de los cultivos de los serotipos 1,3 y 7, en donde se encontraban las toxinas.

Agradecimientos. Por su apoyo técnico al Sr. Gabino Sánchez

Figura 1.



CUADRO 1. Inmunotransferencias realizadas con los sueros de los cerdos de los diferentes Grupos y las bandas proteicas localizadas en los geles de poliacrilamida de los sobrenadantes de los serotipos 1, 3 y 7 de *A. pleuropneumoniae*.

GRUPOS	DIA 1		DIA 15		DIA 15		DIA 30	
	SER. 1, 3 Y 7		SER. 1	SER. 3	SER. 7	SER. 1	SER. 3	SER. 7
	P: 110-120 KD	P: 110-120 KD	P: 110-120 KD	P: 110-120 KD	P: 110-120 KD	P: 110-120 KD	P: 110-120 KD	P: 110-120 KD
A	-	++	+	++	++	++	++	++
B	-	+	++	+	+	+	++	++
C	-	+	++	+	+	+	++	+
D	-	+	-	++	+	+	-	+
E	-	+	-	++	+	+	-	++

P: Proteína localizada en el gel de poliacrilamida de los sobrenadantes de cultivo de los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae*. Bandas detectadas por inmunotransferencia con los sueros de cerdos de los diferentes grupos, realizado a los días 1, 15 y 30 posvacunación. (-): Sin presencia de bandas proteicas. (+) Banda proteica teñida ligeramente. (++) Banda proteica teñida intensamente. A los sueros de los animales controles no se les detecto ninguna banda