



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**

**RESPUESTA DE FASE AGUDA Y ESTUDIO DE LA  
INMUNIDAD HUMORAL EN CERDOS VACUNADOS  
CON DIFERENTES FORMULACIONES FRENTE A  
*Haemophilus parasuis*.**

*Memoria que presenta para optar al grado de Doctor*

**SONIA MARTÍNEZ MARTÍNEZ**

*León. Diciembre de 2010.*



Para mis padres, para Jorge



Lo primero, quiero agradecer a mis directores, Ferri y César, por darme un voto de confianza y creer en “esta bióloga” para un proyecto de investigación que me ha proporcionado tanto en estos últimos años. Gracias por apoyarme y ayudarme a crecer no solo profesionalmente, sino también a nivel personal. Este trabajo no sería posible sin vosotros.

Gracias a Laboratorios SYVA por la financiación aportada para los primeros años de mi investigación y porque gracias a ellos comencé en este mundo de la Sanidad Animal. En especial gracias a Óscar, que además de buen jefe ha sido siempre un consejero en el que apoyarme en las decisiones importantes. Al Ministerio de Ciencia e Innovación por la actual beca de la que disfruto y que me permite realizar las estancias pertinentes para desarrollar mi trabajo.

Gracias a Bruno González Zorn, del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por transmitirme los primeros conocimientos de Biología Molecular. Gracias al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, por su ayuda en el estudio de las proteínas de fase aguda, principalmente a Fermín Lampreave, que me trató como una más del grupo el tiempo que pasé con ellos. Gracias al grupo de Concha Gil, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por dejarme asomar al mundo de la inmunoproteómica y haberme permitido conocer a compañeros, que ahora ya son amigos.

Gracias a la Unidad de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, por su ayuda en el estudio anatomopatológico. En especial, a Claudia y María José que con paciencia me ayudaron a la realización del trabajo mostrando siempre una gran amabilidad para explicarme mis dudas.

Gracias a todos los que hicieron posible llevar a cabo la prueba experimental de los cerdos privados de calostro, en especial a todos esos ganaderos de la provincia de León que de manera desinteresada nos proporcionaron el calostro necesario para la cría de los lechones y a Ana por su hospitalidad en esos duros días.

Al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, donde he podido desarrollar mi trabajo de Tesis Doctoral. Gracias

a todos mis compañeros. A Judith, por su trabajo previo y sus consejos. A Rafa, porque los dos hemos comenzado juntos nuestros trabajos de Tesis y ahora en la recta final valorando todas las experiencias vividas, soy consciente de que ha sido muy importante para mí. A Sara, por aguantar mis agobios en estos últimos meses y darme tanto apoyo, espero que llegues muy lejos. A Sheila, Luís Ignacio, Jose Luis... Gracias a Javier, nunca olvidaré esas gratas conversaciones a primera hora de la mañana. Gracias a Pani y a Susana por sus consejos y por preocuparse tanto de mí.

Gracias a todos mis amigos, gracias por todos esos momentos de diversión y risas que me han ayudado a desconectar de mis problemas. Gracias por el apoyo incondicional que he recibido y por hacerme sentir arropada. En especial a Andrea, María, Irene y Victoria que me conocen a la perfección y saben lo que significa para mí terminar este trabajo doctoral.

Gracias a mis hermanos por haberme ayudado y escuchado en este tiempo, me han proporcionado en todo momento optimismo y mucha fuerza. A mis sobrinos, Alba e Iván, que con sus “cosas de niños” me han permitido ver los días de desánimo desde otro punto de vista y me han arrancado muchas sonrisas preguntándome por mis cerditos.

Gracias a mis padres, a ellos les debo todo lo que soy. Siempre me han apoyado y comprendido en todo lo que he decidido. No hay palabras que puedan explicar cuanto les agradezco su ayuda. Ellos han creído siempre en mí, han sufrido cuando yo he sufrido y han disfrutado de mis éxitos tanto como yo.

Gracias a Jorge, esta Tesis es tanto suya como mía. A su lado he aprendido a ver el vaso medio lleno, gracias a su hombro nunca me he derrumbado y gracias a sus ánimos este trabajo ha salido adelante. Su paciencia me ha ayudado en los momentos difíciles y su confianza en mí ha sido la fuerza que necesitaba para seguir.

**¡GRACIAS A TODOS!**

# ÍNDICES



**ÍNDICE**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. <i>Haemophilus parasuis</i></b>	1
1.1. Caracteres generales	1
1.2. Taxonomía y tipificación	2
1.3. Factores de virulencia	5
<b>2. El sistema inmune en el ganado porcino</b>	15
2.1. Respuesta innata	16
2.2. Respuesta adaptativa	22
2.3. Memoria inmunológica	24
2.4. Respuesta inmune humoral y celular	26
2.5. Inmunidad de mucosas	29
2.6. Respuesta inmune frente a diferentes microorganismos	31
<b>3. Enfermedad de Glässer</b>	35
3.1. Epidemiología	35
3.2. Patogénesis	36
3.3. Respuesta inmune frente a <i>H. parasuis</i>	37
3.4. Cuadro clínico y lesiones	40
3.5. Diagnóstico	41
3.6. Interacciones de <i>H. parasuis</i> con otros microorganismos	45
3.7. Prevención, control y erradicación	46
<b>4. Tecnología del ADN recombinante</b>	51
4.1. Preparación del ADN recombinante	51
4.2. Vectores de clonación	52
4.3. Métodos de transformación celular	54
4.4. Métodos para analizar clones	54
4.5. Campos de aplicación de la tecnología del ADN recombinante	56
4.6. Proteínas recombinantes	57

<b>5. Identificación de proteínas</b>	59
5.1. Estrategias de identificación de proteínas	59
5.2. Inmunoproteómica	61
<b>II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</b>	63
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	67
<b>1. Cepas bacterianas</b>	69
<b>2. Medios de cultivo</b>	69
<b>3. Antibióticos y suplementos</b>	71
<b>4. Productos y reactivos</b>	72
4.1. Extracción de sobrenadantes ricos en proteínas de la membrana externa	72
4.2. Obtención de proteínas de fusión	72
4.3. Obtención de proteínas de unión a la transferrina	73
4.4. Valoración de la concentración de proteína total	74
4.5. Electroforesis en gel de agarosa	75
4.6. ELISA	75
4.7. SDS- PAGE electroforesis	76
4.8. Tinción de geles	77
4.9. <i>Immunoblotting</i>	78
4.10. Identificación de proteínas	79
4.11. Inmunoproteómica	79
<b>5. Laboratorios e instalaciones utilizadas</b>	81
<b>6. Obtención de la proteína TbpA-r</b>	83
6.1. Cepas usadas y medios de cultivo	83
6.2. Extracción del ADN y amplificación mediante PCR	83
6.3. Extracción de ADN a partir de gel. Elección fragmento antigénico	84
6.4. Clonaje, expresión y solubilización del fragmento antigénico	85
6.5. Purificación del fragmento antigénico	89
<b>7. Inmunización de los conejos. Producción anticuerpos policlonales.</b>	90
7.1. ELISA	91

<b>8. Prueba experimental con cerdos privados de calostro</b>	93
8.1. Animales y mantenimiento	93
8.2. Inmunización de los animales	96
8.3. Infección de los animales	98
8.4. Signos clínicos, necropsia y aislamiento bacteriano	99
<b>9. Detección y aislamiento de <i>Haemophilus parasuis</i></b>	100
<b>10. Acción bactericida del suero</b>	100
<b>11. Estudio de la repuesta de fase aguda</b>	101
<b>12. Estudio de la respuesta inmune humoral</b>	103
12.1. ELISA con cuerpos bacterianos completos, inactivados	103
12.2. ELISA con las proteínas de la membrana externa	105
12.3. ELISA con las proteínas nativas de unión a la transferrina	106
12.4. ELISA IgA	107
<b>13. Identificación de las proteínas nativas de unión a la transferrina</b>	107
13.1. Digestión de las muestras	108
13.2. Identificación de las muestras	109
<b>14. Inmunoproteómica</b>	109
14.1. Realización de geles 2 DE	110
14.2. <i>Immunoblotting</i>	111
<b>IV. RESULTADOS</b>	113
<b>1. Obtención de la proteína TbpA recombinante</b>	115
1.1. Determinación de la secuencia del gen <i>tbpA</i> en <i>Haemophilus parasuis</i>	115
1.2. Estudio de las regiones conservadas de la proteína TbpA	115
1.3. Clonación	116
1.4. Expresión y solubilización	117
1.5. Purificación	119
<b>2. Inmunización de los conejos. Producción anticuerpos policlonales.</b>	121
2.1. ELISA	121
2.2. Actividad bactericida del suero	122
2.3. Verificación de la especificidad de los anticuerpos policlonales mediante <i>immunoblotting</i>	124

<b>3. Prueba experimental con cerdos privados de calostro</b>	125
3.1. Monitorización de la temperatura	125
3.2. Signos clínicos y lesiones anatomopatológicas	126
3.3. Estudio anatomopatológico	127
<b>4. Detección y aislamiento de <i>Haemophilus parasuis</i></b>	133
4.1. Cerdos inmunizados con TbpA recombinante	133
4.2. Cerdos inmunizados con TbpB recombinante	134
4.3. Cerdos inmunizados con vacuna comercial	136
4.4. Cerdos inmunizados con proteínas nativas de unión a transferrina por vía intramuscular	137
4.5. Cerdos inmunizados con proteínas nativas de unión a transferrina por vía intratraqueal	138
4.6. Cerdos control, inoculados con PBS	139
4.7. Resumen de los resultados	140
<b>5. Acción bactericida del suero</b>	143
5.1. Determinaciones preliminares	143
5.2. Resultados del ensayo de actividad bactericida de los sueros	144
5.3. Ensayo de confirmación de actividad bactericida de los sueros	146
<b>6. Estudio de la respuesta de fase aguda</b>	149
6.1. Cerdos inmunizados con TbpA recombinante	149
6.2. Cerdos inmunizados con TbpB recombinante	155
6.3. Cerdos inmunizados con vacuna comercial	161
6.4. Cerdos inmunizados con proteínas nativas de unión a transferrina por vía intramuscular	166
6.5. Cerdos inmunizados con proteínas nativas de unión a transferrina por vía intratraqueal	171
6.6. Cerdos control, inoculados con PBS	176
6.7. Estadística global	181
<b>7. Estudio de la respuesta inmune humoral</b>	183
7.1. Cerdos inmunizados con TbpA recombinante	183
7.2. Cerdos inmunizados con TbpB recombinante	187
7.3. Cerdos inmunizados con vacuna comercial	191
7.4. Cerdos inmunizados con proteínas nativas de unión a transferrina por vía intramuscular	194

7.5. Cerdos inmunizados con proteínas nativas de unión a transferrina por vía intratraqueal	198
7.6 Cerdos control, inoculados con PBS	201
7.7. Estadística global	204
7.8 ELISA para cuantificar IgA	206
<b>8. Identificación de las proteínas nativas de unión a transferrina</b>	<b>211</b>
<b>9. Inmunoproteómica</b>	<b>213</b>
9.1. Cerdos inmunizados con proteínas nativas de unión a transferrina por vía intramuscular	213
9.2. Cerdos inmunizados con proteínas nativas de unión a transferrina por vía intratraqueal	216
9.3. Cerdos inmunizados con vacuna comercial	219
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>223</b>
1. Preparación y producción de la proteína TbpA-r	225
2. Prueba experimental con los cerdos privados de calostro	227
3. Acción bactericida del suero	232
4. Estudio de la respuesta de fase aguda	233
5. Estudio de la respuesta inmune humoral	235
6. Identificación de proteínas nativas de unión a transferrina. Inmunoproteómica	240
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>245</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>249</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>271</b>
<b>IX. RESUMEN</b>	<b>303</b>
<b>X. SUMMARY</b>	<b>309</b>



**ÍNDICE DE FIGURAS****INTRODUCCIÓN**

<b>Figura 1.1.</b> Crecimiento de <i>Haemophilus parasuis</i> en agar chocolate y agar sangre con una estria de <i>Staphylococcus aureus</i> . Ambas placas incubadas a 37°C durante 48 horas.	1
<b>Figura 1.2.</b> Representación esquemática de la ruta de inducción de la respuesta de fase aguda.	18
<b>Figura 1.3.</b> Esquema de las proteínas de fase aguda positivas y negativas.	19
<b>Figura 1.4</b> Activación del sistema del complemento y la cascada de acontecimientos subsiguientes que conducen a la lisis de células y bacterias.	20
<b>Figura 1.5.</b> Esquema de las vías de activación de la cascada del complemento.	21
<b>Figura 1.6.</b> Inmunoglobulinas características en las respuestas primaria y secundaria.	27
<b>Figura 1.7.</b> Esquema de obtención de proteínas recombinantes.	54
<b>Figura 1.8.</b> Esquema de pasos a seguir en una identificación proteica.	60
<b>Figura 1.9.</b> Ejemplo de geles de dos dimensiones sometidos a <i>immunoblotting</i> en un momento cero y tras un tratamiento concreto, para observar diferencias en la expresión de algunas proteínas.	61

**MATERIAL Y MÉTODOS**

<b>Figura 3.1.</b> Distintos momentos de la crianza de los animales, previa a los experimentos.	96
<b>Figura 3.2.</b> Ejemplo de un gel de inmunodifusión radial para cuantificar las diferentes concentraciones de proteínas de fase aguda.	102
<b>Figura 3.3.</b> Ejemplo de un ELISA tapizado con proteínas de membrana (OMPs), utilizando como anticuerpo secundario sueros de los animales experimentales en diferentes momentos del estudio.	103
<b>Figura 3.4.</b> Aparatos utilizados para llevar a cabo la primera y segunda dimensión en los geles de acrilamida 2D donde correr muestras proteicas.	108

**RESULTADOS**

<b>Figura 4.1.</b> Gel de agarosa donde se muestran los clones positivos que contenían bien insertado y orientado el fragmento TbpA a recombinar.	116
<b>Figura 4.2.</b> SDS-PAGE. Expresión de la proteína de fusión.	118
<b>Figura 4.3.</b> <i>Immunoblotting</i> donde se observa el reconocimiento de la proteína recombinante frente al anticuerpo monoclonal del vector.	119
<b>Figura 4.4.</b> SDS-PAGE con la purificación de la proteína de fusión.	119
<b>Figura 4.5.</b> Densidades ópticas mediante ELISA después de las diferentes inmunizaciones.	121
<b>Figura 4.6.</b> Actividad bactericida del suero dependiendo de las diferentes preparaciones de las proteínas recombinantes TbpA o TbpB.	123
<b>Figura 4.7.</b> <i>Immunoblotting</i> utilizando como anticuerpo primario suero frente a la TbpA.	124
<b>Figura 4.8.</b> Evolución del cuadro clínico agudo (36 horas después del desafío) de los animales no protegidos. Postración e inflamación de la articulación tibio-tarsiana.	126
<b>Figura 4.9.</b> Lesiones inflamatorias encontradas en la necropsia en los animales que sobrevivieron y en los que murieron tras la infección.	128
<b>Figura 4.10.</b> Lesiones vasculares encontradas en la necropsia en los animales que murieron tras la infección.	129
<b>Figura 4.11.</b> Lesiones esplénicas encontradas en la necropsia en animales que sobrevivieron y en los que murieron tras la infección	130
<b>Figura 4.12.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 1.	133

## Índices

<b>Figura 4.13.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 2.	133
<b>Figura 4.14.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 3.	133
<b>Figura 4.15.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 4.	133
<b>Figura 4.16.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 5.	134
<b>Figura 4.17.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 6.	134
<b>Figura 4.18.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 7.	134
<b>Figura 4.19.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 8.	134
<b>Figura 4.20.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 9.	135
<b>Figura 4.21.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 10.	135
<b>Figura 4.22.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 12.	135
<b>Figura 4.23.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 18.	136
<b>Figura 4.24.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 19.	136
<b>Figura 4.25.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 20.	136
<b>Figura 4.26.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 21.	136
<b>Figura 4.27.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 22.	136
<b>Figura 4.28.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 23.	136
<b>Figura 4.29.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 24.	137
<b>Figura 4.30.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 25.	137
<b>Figura 4.31.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 26.	137
<b>Figura 4.32.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 27.	137
<b>Figura 4.33.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 28.	137
<b>Figura 4.34.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 29.	137
<b>Figura 4.35.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 30.	138
<b>Figura 4.36.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 31.	138
<b>Figura 4.37.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 32.	138
<b>Figura 4.38.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 33.	138
<b>Figura 4.39.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 34.	139
<b>Figura 4.40.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 35.	139
<b>Figura 4.41.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 13.	139
<b>Figura 4.42.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 14.	139

<b>Figura 4.43.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 15.	139
<b>Figura 4.44.</b> Resultado de las PCR del cerdo nº 16.	139
<b>Figura 4.45.</b> Resultado de la actividad bactericida del suero en los diferentes grupos experimentales.	145
<b>Figura 4.46.</b> Gráfica de la necesidad del complemento en los sueros.	147
<b>Figura 4.47.</b> Evolución de los niveles de pig MAP en el grupo TbpA-r.	149
<b>Figura 4.48.</b> Media de la concentración de pig MAP en el grupo TbpA-r.	150
<b>Figura 4.49.</b> Evolución de los niveles de haptoglobina en el grupo TbpA-r.	151
<b>Figura 4.50.</b> Media de la concentración de haptoglobina en el grupo TbpA-r.	151
<b>Figura 4.51.</b> Evolución de los niveles de Apolipoproteína A-I en el grupo TbpA-r.	152
<b>Figura 4.52.</b> Media de la concentración de Apolipoproteína A-I en el grupo TbpA-r.	152
<b>Figura 4.53.</b> Evolución de los niveles de proteína C reactiva en el grupo TbpA-r.	153
<b>Figura 4.54.</b> Media de la concentración de proteína C reactiva en el grupo TbpA-r.	153
<b>Figura 4.55.</b> Evolución de los niveles de pig- MAP en el grupo TbpB-r.	155
<b>Figura 4.56.</b> Media de la concentración de pig- MAP en el grupo TbpB-r.	156
<b>Figura 4.57.</b> Evolución de los niveles de haptoglobina en el grupo TbpB-r.	157
<b>Figura 4.58.</b> Media de la concentración de haptoglobina en el grupo TbpB-r.	157
<b>Figura 4.59.</b> Evolución de los niveles de Apolipoproteína A-I en el grupo TbpB-r.	158
<b>Figura 4.60.</b> Media de la concentración de Apolipoproteína A-I en el grupo TbpB-r.	158
<b>Figura 4.61.</b> Evolución de los niveles de proteína C reactiva en el grupo TbpB-r.	159
<b>Figura 4.62.</b> Media de la concentración de proteína C reactiva en el grupo TbpB-r.	159
<b>Figura 4.63.</b> Evolución de los niveles de pig MAP en el grupo vacuna comercial.	161
<b>Figura 4.64.</b> Media de la concentración de pig MAP en el grupo vacuna comercial.	161
<b>Figura 4.65.</b> Evolución de los niveles de haptoglobina en el grupo vacuna comercial.	162
<b>Figura 4.66.</b> Media de la concentración de haptoglobina en el grupo vacuna comercial.	162
<b>Figura 4.67.</b> Evolución de los niveles de Apolipoproteína A-I en el grupo vacuna comercial.	163
<b>Figura 4.68.</b> Media de la concentración de Apolipoproteína A-I en el grupo vacuna comercial.	163
<b>Figura 4.69.</b> Evolución de los niveles de proteína C reactiva en el grupo vacuna comercial.	164
<b>Figura 4.70.</b> Media de la concentración de proteína C reactiva en el grupo vacuna comercial.	164
<b>Figura 4.71.</b> Evolución de los niveles de pig MAP en el grupo Tbp-nat (im).	166
<b>Figura 4.72.</b> Media de la concentración de pig MAP en el grupo Tbp-nat (im).	166

<b>Figura 4.73.</b> Evolución de los niveles de haptoglobina en el grupo Tbp- nat (im).	167
<b>Figura 4.74.</b> Media de la concentración de haptoglobina en el grupo Tbp-nat (im).	167
<b>Figura 4.75.</b> Evolución de los niveles de Apolipoproteína A-I en el grupo Tbp-nat (im).	168
<b>Figura 4.76.</b> Media de la concentración de Apolipoproteína A-I en el grupo Tbp-nat (im).	168
<b>Figura 4.77.</b> Evolución de los niveles de proteína C reactiva en el grupo Tbp-nat (im).	169
<b>Figura 4.78.</b> Media de la concentración de proteína C reactiva en el grupo Tbp-nat (im).	169
<b>Figura 4.79.</b> Evolución de los niveles de pig MAP en el grupo Tbp- nat (it).	171
<b>Figura 4.80.</b> Media de la concentración de pig MAP en el grupo Tbp-nat (it).	171
<b>Figura 4.81.</b> Evolución de los niveles de haptoglobina en el grupo Tbp-nat (it).	172
<b>Figura 4.82.</b> Media de la concentración de haptoglobina en el grupo Tbp-nat (it).	172
<b>Figura 4.83.</b> Evolución de los niveles de Apolipoproteína A-I en el grupo Tbp-nat (it).	173
<b>Figura 4.84.</b> Media de la concentración de Apolipoproteína A-I en el grupo Tbp-nat (it).	173
<b>Figura 4.85.</b> Evolución de los niveles de proteína C reactiva en el grupo Tbp-nat (it).	174
<b>Figura 4.86.</b> Media de la concentración de proteína C reactiva en el grupo Tbp-nat (it).	174
<b>Figura 4.87.</b> Evolución de los niveles de pig MAP en el grupo control.	176
<b>Figura 4.88.</b> Media de la concentración de pig MAP en el grupo control.	176
<b>Figura 4.89.</b> Evolución de los niveles de haptoglobina en el grupo control.	177
<b>Figura 4.90.</b> Media de la concentración de haptoglobina en el grupo control.	177
<b>Figura 4.91.</b> Evolución de los niveles de Apolipoproteína A-I en el grupo control.	178
<b>Figura 4.92.</b> Media de la concentración de Apolipoproteína A-I en el grupo control.	178
<b>Figura 4.93.</b> Evolución de los niveles de proteína C reactiva en el grupo control.	179
<b>Figura 4.94.</b> Media de la concentración de proteína C reactiva en el grupo control.	179
<b>Figura 4.95.</b> Evolución de las IgGt en el grupo TbpA-r.	184
<b>Figura 4.96.</b> Evolución de las IgM en el grupo TbpA-r.	184
<b>Figura 4.97.</b> Evolución de las IgG1 en el grupo TbpA-r.	185
<b>Figura 4.98.</b> Evolución de las IgG2 en el grupo TbpA-r.	186
<b>Figura 4.99.</b> Evolución de las IgGt en el grupo TbpB-r.	187
<b>Figura 4.100.</b> Evolución de las IgM en el grupo TbpB-r.	188
<b>Figura 4.101.</b> Evolución de las IgG1 en le grupo TbpB-r.	188
<b>Figura 4.102.</b> Evolución de las IgG2 en le grupo TbpB-r.	189

<b>Figura 4.103.</b> Evolución de las IgGt en el grupo vacuna comercial.	190
<b>Figura 4.104.</b> Evolución de las IgM en el grupo vacuna comercial.	191
<b>Figura 4.105.</b> Evolución de las IgG1 en el grupo vacuna comercial.	191
<b>Figura 4.106.</b> Evolución de las IgG2 en el grupo vacuna comercial.	192
<b>Figura 4.107.</b> Evolución de las IgGt en el grupo Tbp- nat (im).	194
<b>Figura 4.108.</b> Evolución de las IgM en el grupo Tbp- nat (im).	195
<b>Figura 4.109.</b> Evolución de las IgG1 en el grupo Tbp-nat (im).	195
<b>Figura 4.110.</b> Evolución de las IgG2 en el grupo Tbp-nat (im).	196
<b>Figura 4.111.</b> Evolución de las IgGt en el grupo Tbp- nat (it).	198
<b>Figura 4.112.</b> Evolución de la IgM en el grupo de Tbp-nat (it).	199
<b>Figura 4.113.</b> Evolución de la IgG1 en el grupo Tbp-nat (it).	199
<b>Figura 4.114.</b> Evolución de la IgG2 en el grupo de Tbp-nat (it).	200
<b>Figura 4.115.</b> Evolución de las IgGt en el grupo control.	201
<b>Figura 4.116.</b> Evolución de las IgM en el grupo control.	202
<b>Figura 4.117.</b> Evolución de las IgG1 en el grupo control.	202
<b>Figura 4.118.</b> Evolución de las IgG2 en el grupo control.	202
<b>Figura 4.119.</b> Evolución de las IgA en el grupo TbpA-r.	206
<b>Figura 4.120.</b> Evolución de las IgA en el grupo TbpB-r.	207
<b>Figura 4.121.</b> Evolución de las IgA en el grupo vacuna comercial.	207
<b>Figura 4.122.</b> Evolución de las IgA en el grupo Tbp-nat (im).	208
<b>Figura 4.123.</b> Evolución de las IgA en el grupo Tbp-nat (it).	208
<b>Figura 4.124.</b> Evolución de las IgA en el grupo control.	209
<b>Figura 4.125.</b> Gel 1D teñido con azul Coomassie coloidal con el extracto de proteínas con afinidad por la transferrina.	211
<b>Figura 4.126.</b> <i>Immunoblotting</i> de cuatro momentos de la prueba experimental con los diferentes “spots” proteicos, encontrados en el grupo de animales inmunizado con las Tbp-im.	214
<b>Figura 4.127.</b> “Spots” diferentes en el grupo Tbp-im, marcados en gel 2D, teñido con azul Coomassie coloidal.	214
<b>Figura 4.128.</b> <i>Immunoblotting</i> de cuatro momentos de la prueba experimental con los diferentes “spots” proteicos encontrados en el grupo de animales inmunizados con las Tbp-it.	216
<b>Figura 4.129.</b> “Spots” diferentes en el grupo Tbp-it, marcados en gel 2D, teñido con azul Coomassie coloidal.	217
<b>Figura 4.130.</b> <i>Immunoblotting</i> de cuatro momentos de la prueba experimental con los “spots” proteicos diferenciales encontrados en el grupo de animales inmunizados con la vacuna comercial.	219
<b>Figura 4.131.</b> “Spots” diferentes en el grupo vacuna comercial, marcados en gel 2D, teñidos con azul Coomassie coloidal.	220



## ÍNDICE DE TABLAS

### MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Tabla 3.1.</b> Distribución de los seis lotes experimentales de cerdos privados de calostro en inmunizaciones con distintos antígenos..	96
--	----

### RESULTADOS

<b>Tabla 4.1.</b> Resultados de concentración de proteína recombinante en µg/ml obtenidos a partir de diferentes concentraciones y de diferentes tiempos del inductor arabinosa.	117
<b>Tabla 4.2.</b> Estudio estadístico entre diferentes inmunizaciones llevados a cabo en la producción de anticuerpos policlonales en conejos y cuantificado mediante ELISA.	122
<b>Tabla 4.3.</b> Estudio estadístico de la acción bactericida del suero en las diferentes inmunizaciones llevadas a cabo en la prueba experimental de conejos.	123
<b>Tabla 4.4.</b> Tabla de monitorización de la temperatura de los cerdos desde el momento de la infección hasta su muerte o sacrificio.	274
<b>Tabla 4.5.</b> Resumen de las principales lesiones macroscópicas y microscópicas en los diferentes grupos experimentales de los cerdos privados de calostro.	131
<b>Tabla 4.6.</b> Resultados de la PCR para la detección de la TbpA de <i>H. parasuis</i> en cada uno de los 8 tipos de muestras recogidas, en los diferentes lotes experimentales.	140
<b>Tabla 4.7.</b> Ensayo preliminar de estabilidad de la concentración bacteriana para probar la actividad bactericida de los sueros.	143
<b>Tabla 4.8.</b> Ausencia de anticuerpos fijadores del complemento en los animales control para probar la actividad bactericida de los sueros.	144
<b>Tabla 4.9.</b> Acción bactericida del suero de los cerdos de los distintos lotes de prueba, tras las inmunizaciones.	144
<b>Tabla 4.10.</b> Estudio estadístico entre la acción bactericida del suero en los diferentes tratamientos experimentales.	146
<b>Tabla 4.11.</b> Necesidad del complemento para la acción bactericida del suero.	146
<b>Tabla 4.12.</b> Resultados de la determinación de las proteínas de fase aguda en cada uno de los animales del grupo inmunizado con la proteína TbpA-r.	154
<b>Tabla 4.13.</b> Resultados de la determinación de las proteínas de fase aguda en cada uno de los animales del grupo inmunizado con la proteína TbpB-r.	160
<b>Tabla 4.14.</b> Resultados de la determinación de las proteínas de fase aguda en cada uno de los animales del grupo inmunizado con la vacuna comercial.	165
<b>Tabla 4.15.</b> Resultados de la determinación de las proteínas de fase aguda en cada uno de los animales del grupo inmunizado con las Tbp-nat (im).	170
<b>Tabla 4.16.</b> Resultados de la determinación de las proteínas de fase aguda en cada uno de los animales del grupo inmunizado con las Tbp-nat (it).	175
<b>Tabla 4.17.</b> Resultados de la determinación de las proteínas de fase aguda en cada uno de los animales del grupo inoculado con PBS.	180
<b>Tabla 4.18.</b> Diferencias estadísticamente significativas entre grupos, en cada una de las proteínas de fase aguda estudiadas.	182
<b>Tabla 4.19.</b> Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (clases y subclases de Ig) medidas por distintos tipos de ELISA en tres momentos de la prueba experimental en el grupo TbpA-r.	186
<b>Tabla 4.20.</b> Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (clases y subclases de Ig) medidas por distintos tipos de ELISA en tres momentos de la prueba experimental en el grupo TbpB-r.	189
<b>Tabla 4.21.</b> Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (clases y subclases de Ig) medidas por distintos tipos de ELISA en tres momentos de la prueba experimental en el grupo de vacuna comercial.	193
<b>Tabla 4.22.</b> Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (clases y subclases de Ig) medidas por distintos tipos de ELISA en tres momentos de la prueba experimental en el grupo Tbp-nat (im).	197
<b>Tabla 4.23.</b> Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (clases y subclases de Ig) medidas por distintos tipos de ELISA en tres momentos de la prueba experimental en el grupo Tbp-nat (it).	200

## Índices

<b>Tabla 4.24.</b> Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (clases y subclases de Ig) medidas por distintos tipos de ELISA en tres momentos de la prueba experimental en el grupo control.	203
<b>Tabla 4.25.</b> Diferencias estadísticamente significativas entre grupos, en cada una de las clases o subclases de inmunoglobulinas estudiadas para diferentes ELISA utilizados. Sólo se representan los valores que fueron significativos ( $p < 0,005$ ).	205
<b>Tabla 4.26.</b> Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (IgA) medidos por distintos ELISAs en tres momentos de la prueba experimental en el grupo Tbp-it.	209
<b>Tabla 4.27.</b> Diferencias estadísticamente significativas entre grupos, en la IgA, para diferentes ELISA utilizados. Sólo se representan los valores significativos ( $p < 0,005$ ).	210
<b>Tabla 4.28.</b> Características de las nueve proteínas identificadas en el extracto de Tbp.	211
<b>Tabla 4.29.</b> Características de las proteínas seleccionadas en el grupo inmunizado con Tbp-nat (im).	215
<b>Tabla 4.30.</b> Características de las proteínas seleccionadas en el grupo inmunizado con Tbp-nat (it).	218
<b>Tabla 4.31.</b> Características de las proteínas seleccionadas en el grupo inmunizado con la vacuna comercial.	220

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>Apo- I</b>	Apolipoproteína A-I
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosómico
<b>ATP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i> (adenosina trifosfato)
<b>BALT</b>	<i>Bronchus associated lymphoid tissue</i> (tejido linfoide asociado a bronquios)
<b>BHI</b>	Infusión de cerebro y corazón
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i> (albúmina sérica bovina)
<b>CMH</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad (Complejo principal de histocompatibilidad)
<b>CRP</b>	Proteína C- reactiva
<b>DE</b>	<i>Electrophoresis dimension</i> (dimensión electroforética)
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DOC</b>	Deoxicolato sódico
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicoltetracético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (enzimoinmunoensayo)
<b>ERIC- PCR</b>	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR</i> (PCR basadas en secuencias intergénicas consenso repetidas de enterobacterias)
<b>Fhu</b>	Ferric hydroxamate uptake (captador de hidroxamato férrico)
<b>FLPC</b>	Cromatografía líquida de alta presión
<b>FTM</b>	Medio líquido de tioglicolato
<b>Fur</b>	Ferric uptake regulador (regulador de la captación de hierro)
<b>GALT</b>	<i>Gut associated lymphoid tissue</i> (tejido linfoide asociado a intestino)
<b>HPT</b>	Haptoglobina

## Índices

<b>IFN</b>	Interferón
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LOS</b>	Lipooligosacárido
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MALT</b>	<i>Mucosal associated lymphoid tissue</i> (tejido linfoide asociado a mucosas)
<b>MS</b>	Espectometría de masas
<b>NAD</b>	Dinucleótido de adenine y nicotinamida
<b>NCBI</b>	<i>Nacional Center of Biotechnology Information</i>
<b>NK</b>	<i>Natural Killer cells</i> (células asesinas naturales)
<b>OMP</b>	<i>Outer membrana proteins</i> (proteínas de membrana externa)
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffer saline</i> (tampón fosfato)
<b>PBST</b>	Tampón fosfato con Tween 20
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PFA</b>	Proteína de fase aguda
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PPLO</b>	Pleuro pneumonie like organisms
<b>PRRS</b>	<i>Porcine reproductive and respiratory síndrome</i> (síndrome respiratorio y reproductivo porcino)
<b>REF</b>	<i>Restriction endonuclease finger printing</i> (huella de endonucleasas de restricción)
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institut medium</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SPF</b>	<i>Specific pathogen free</i> (libres de patógenos específicos)
<b>Tbp</b>	<i>Transferrin binding protein</i> (proteína de unión a la transferrina)
<b>TbpA-r</b>	<i>Recombinant transferrin binding protein A</i>

<b>TbpB-r</b>	<i>Recombinant transferrin binding protein B</i>
<b>Tbp-nat</b>	<i>Native transferrin binding protein</i>
<b>TCR</b>	<i>T-cell receptor</i> (receptor de células T)
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetramethylethylene-diamina
<b>TMB</b>	3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TSB</b>	Caldo de triptona y soja
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>YAC</b>	<i>Yeast artificial chromosome</i> (cromosomas artificiales de levaduras)



# **I. INTRODUCCIÓN**

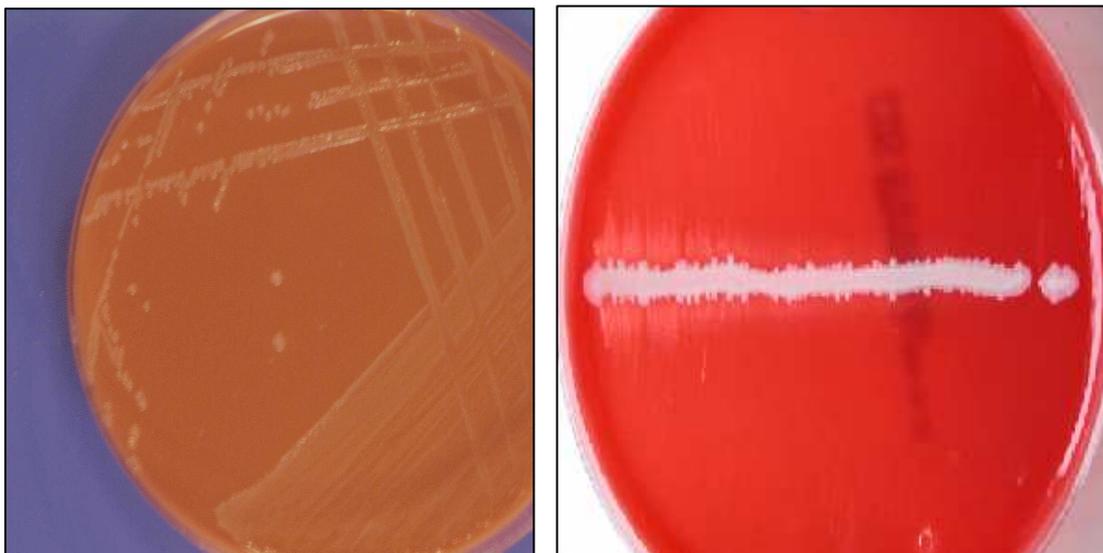


## 1. *Haemophilus parasuis*

### 1.1. Caracteres generales

*Haemophilus parasuis* se integra en el género *Haemophilus* de la familia *Pasteurellaceae* y es el microorganismo responsable de la enfermedad de Glässer. Morfológicamente se define como un pequeño cocobacilo Gram negativo, pleomórfico y de tamaño variable. En ocasiones, presenta filamentos superficiales semejantes a fimbrias. Su longitud es variable, desde 1 a 7  $\mu\text{m}$  de largo y 1  $\mu\text{m}$  de ancho. Es dependiente del factor V de coagulación de la sangre (NAD). Crece bien en agar chocolate o en agar Columbia, con un 5% de sangre de cordero con estría de *Staphylococcus aureus*, al que satelitiza. Las colonias, después de 24 horas de crecimiento a 37°C en una atmósfera microaerófila, presentan un aspecto translúcido, de pequeño tamaño y no son hemolíticas, lo que permite diferenciarlo rápidamente de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y otros microorganismos próximos, también dependientes de NAD.

Posee actividades catalasa y oxidasa débiles, pero no ureasa. Bioquímicamente produce ácido de la glucosa, manosa, maltosa y sacarosa, pero no a partir de la xilosa, ramnosa, arabinosa o lactosa.



**Figura 1.1.** Crecimiento de *Haemophilus parasuis* en agar chocolate (izquierda) y en agar sangre (derecha) con una estría de *Staphylococcus aureus*. Ambas placas fueron incubadas a 37°C durante 48 horas.

En relación con la cápsula, más de la mitad de los aislamientos son acapsulados y se corresponden con las cepas más virulentas, aunque también se han descrito cepas avirulentas acapsuladas (Morozumi y Nicolet, 1986).

### 1.2. Taxonomía y tipificación

*H. parasuis* ha recibido a lo largo de los años diversas denominaciones. Inicialmente fue descrito como *Haemophilus suis* y como *H. influenzae suis* (Lecce *et al.*, 1960). Biberstein y White (1969) y Kilian (1976) justificaron el cambio de denominación a *H. parasuis*, al observar su independencia del factor X de coagulación de la sangre (hemina u otras porfirinas). La posición taxonómica actual dentro de la familia *Pasteurellaceae* es aún incierta, debido a la falta de homología a nivel de ADN con otras bacterias del género *Haemophilus* (Morozumi y Nicolet, 1986). Mediante la aplicación de diversos procedimientos genómicos y de base inmunológica, se han descrito en esta especie una gran diversidad de cepas y serotipos (Olvera *et al.*, 2006), hecho que podría suponer una futura reconsideración de su posición taxonómica.

#### 1.2.a. **Métodos serológicos de tipificación**

Bakos *et al.* (1983) fueron los primeros en diferenciar cuatro serotipos (A, B, C y D) mediante un sistema de precipitación, que utilizaba como base la diferenciación de extractos antigénicos. Este método fue sufriendo modificaciones, hasta llegar al actual, propuesto por Kielstein y Rapp-Gabrielson (1992), que define un total de 15 serotipos a partir de una técnica de inmunodifusión en gel, utilizando antisueros obtenidos en conejo frente a un antígeno complejo, termoestable y resistente a enzimas proteolíticas. El mayor inconveniente de esta técnica consiste en que alrededor del 45% de las cepas no resultan tipificables.

Del Río *et al.* (2003) efectuaron la tipificación a partir de anticuerpos policlonales de conejos para los 15 serotipos de *H. parasuis*, usando extractos salinos y hervidos. Se comparó su utilidad en la tipificación de aislamientos de campo mediante técnicas de coaglutinación y hemaglutinación indirecta. Mientras que con la primera no se obtuvieron resultados específicos, debido a la presencia de innumerables reacciones cruzadas, con la segunda, optando por extractos salinos como antígenos, se obtuvieron reacciones específicas para todos los serotipos, con una mínima reacción cruzada entre el 1 y el 10, por una parte, y entre el 13 y el 6, por otra.

### **1.2.b. Métodos moleculares de tipificación**

#### **1.2.b.1. Electroforesis de enzimas multilocus (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*, MEE)**

Es un método de caracterización de microorganismos mediante la movilidad relativa, bajo condiciones de electroforesis, de un gran número de enzimas intracelulares. Esta técnica fue utilizada inicialmente por Rapp-Gabrielson y Gabrielson (1992) con 8 serotipos de referencia y 40 cepas clínicas de *H. parasuis* en Australia, demostrando una considerable heterogeneidad genética.

Blackall *et al.* (1997) describieron 34 patrones electroforéticos entre cepas de *H. parasuis* aisladas también en Australia. El análisis de los patrones permitió agrupar todas las cepas menos una en dos grupos, el A y el B. El grupo A estaba formado por dos cepas de referencia del serotipo 5, por aislados de campo de los serotipos 4, 5 y 13 y por algunas cepas no tipificables. El grupo B estaba constituido por cepas de campo de los serotipos 1, 2, 7, 9, 10 y 13, y por las cepas de referencia de los serotipos 1, 2, 3, 4, 8 y 9. No se observó relación entre la pertenencia a uno u otro grupo y su virulencia, lo que confirma la existencia de una gran heterogeneidad en esta especie y que el serotipo no representa un marcador epidemiológico ni de virulencia seguro.

#### **1.2.b.2. Huellas de endonucleasas de restricción (*Restriction Endonuclease Fingerprinting*, REF)**

Consiste en la digestión del ADN por endonucleasas de restricción y el análisis posterior de los fragmentos por electroforesis. Para estudiar la distribución de *H. parasuis*, se compararon aislados que procedían de cerdos sanos de granjas convencionales y de cerdos SPF, así como de cerdos enfermos, utilizando este método con la enzima de restricción *Bam*HI (Smart *et al.*, 1988). Este estudio permitió reconocer 34 patrones REF únicos, en un total de 69 aislamientos. Los 35 aislamientos restantes se agruparon en 13 grupos REF. En la mayoría de las granjas estudiadas se constató una gran heterogenicidad en los serotipos prevalentes, por lo que es lógico pensar que aún podían existir otras cepas presentes en esas granjas, que no hubieran sido identificadas. Dicho estudio no pudo demostrar la presencia de cepas de *H. parasuis* comunes, al comparar las granjas convencionales y las granjas SPF.

1.2.b.3. Proteínas de la membrana externa (*Outer membrane protein*, OMP)

Podemos diferenciar dos grandes grupos dentro de las OMP, aquéllas que se anclan a la membrana por su extremo N- terminal, que se denominan lipoproteínas, y las OMP integrales de membrana. Entre sus posibles funciones, se puede destacar la resistencia frente a péptidos antimicrobianos (Stumpe *et al.*, 1998) y frente a la acción bactericida del suero, impidiendo la activación del sistema del complemento (Carbonetti *et al.*, 1990), así como la protección frente al efecto de las sales biliares.

Cuando se comparaban los patrones de ADN y de las OMPs de cepas aisladas de pulmón, tanto de animales sanos como de enfermos, se encontró un 29% de heterogeneidad entre las cepas que provocaban neumonía, frente a un 34% de los animales que no la presentaban (Ruiz *et al.*, 2001). Del Río *et al.* (2005) pusieron de manifiesto que algunas de las OMPs se producen en mayor concentración en condiciones restrictivas de hierro, facilitando la supervivencia del agente en el hospedador.

1.2.b.4. ARN ribosómico 16S

Dewhist *et al.* (1992), basándose en las secuencias de ARN ribosómico 16S, agruparon en cuatro patrones distintos 54 cepas de la familia *Pasteurellaceae*. Las cepas de *H. parasuis* se incluyeron en el tercer grupo, con las cepas tipo de *P. multocida*, *P. anatis*, *P. avium*, *P. canis*, *P. dogmatis*, *P. gallinarum*, *P. langaa*, *P. stomatis*, *P. volatium*, *H. haemoglobinophilus*, *H. paracuniculus*, *H. paragallinarum* (*Avibacterium paragallinarum*) y *A. capsulatus*.

Oliveira *et al.* (2006) pusieron de manifiesto que en las cepas de *H. parasuis* existe una gran variabilidad. Utilizando este método que servía para realizar estudios epidemiológicos, descubrieron una posible transferencia lateral de genes entre *H. parasuis* y algunas especies del género *Actinobacillus*.

1.2.b.5. PCR- RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism)

Es una técnica basada en la amplificación de un gen, su digestión con endonucleasas de restricción y el análisis de los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa. De la Puente *et al.* (2003) y del Río *et al.* (2006) llevaron a cabo estudios de PCR-RFLP con los genes *tbpB* y *aroA*, respectivamente. En el caso del gen *tbpA* (de la Puente *et al.*, 2003), se consiguió un elevado índice de tipabilidad, lo que permitió el desarrollo de un sistema de detección e identificación por PCR denominado DITPAR (detección, identificación y tipado de *H. parasuis*). En el caso del gen *aroA* (del Río *et al.*, 2006), se observaron patrones de restricción comunes entre algunos serotipos de referencia de *H. parasuis* y miembros del género *Actinobacillus*.

1.2.b.6. PCR basada en secuencias consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence PCR, ERIC-PCR)

Se trata de una PCR que emplea oligonucleótidos obtenidos de secuencias intergénicas repetitivas, descrita inicialmente en enterobacterias (Rafiee *et al.*, 2000). Los quince serotipos de *H. parasuis* se agrupan en un mismo patrón ERIC-PCR.

Este sistema posee ventajas sobre los métodos serológicos convencionales de tipificación, al permitir la identificación y clasificación de todos los aislados, pero genera patrones muy complejos y se necesita un ADN de gran pureza para asegurar su digestión completa.

Oliveira *et al.* (2003) establecieron la idoneidad de esta técnica para la realización de estudios epidemiológicos, concluyendo que la mayoría de las cepas de *H. parasuis* con un genotipo similar se integran en el mismo serotipo, lo que indica que el genotipo de un aislado es un buen indicador del serotipo.

1.3. Factores de virulencia

La capacidad de los microorganismos patógenos para producir enfermedad necesita de la acción coordinada de muchos genes. El agente patógeno debe ser capaz de obtener nutrientes para su supervivencia, evadiendo la respuesta inmune del hospedador. Para la identificación y caracterización de los determinantes de virulencia

se han desarrollado diversos estudios: estudios de respuesta bacteriana a cambios de pH, (Olson, 1993), de temperatura (Miller *et al.*, 1989), estudios sobre los niveles de captación de hierro (Goldberg *et al.*, 199; Bormann, 1996) o estudios sobre la supervivencia en macrófagos (De Groot *et al.*, 1997).

### **1.3.a. Factores de virulencia relacionados con la captación de hierro**

El hierro constituye un factor necesario para la supervivencia de los microorganismos, habida cuenta de su participación en diferentes funciones esenciales, como el transporte y almacenamiento de oxígeno. Además, el hierro es un catalizador en el proceso de transferencia de electrones, participa en la síntesis de ADN, actúa como cofactor para enzimas como la ribonucleótido reductasa y para otras que intervienen en el metabolismo del oxígeno, como la superóxido dismutasa.

Es importante destacar que en condiciones fisiológicas de presencia de oxígeno y pH normales, el hierro libre del que se dispone en el medio orgánico extracelular es muy escaso ( $10^{-12}$   $\mu\text{M}$ ) y que las concentraciones que necesitan las bacterias para sus funciones son del orden de 0,05-0,5  $\mu\text{M}$  (del Río *et al.*, 2003). En consecuencia, para su supervivencia, las bacterias han tenido que desarrollar sistemas capaces de obtener hierro a partir de complejos que lo contienen, por lo general, proteínas.

Con el fin de identificar la expresión génica que tiene lugar en condiciones hostiles que incluyen la limitación de hierro, además de factores referidos a los cambios de temperatura y acidez, que se producen en el curso de la infección, se han llevado a cabo numerosos estudios, identificando no menos de 75 genes, la mayoría de los cuales codifican transportadores de hierro y enzimas metabólicas. Estos genes presentan una gran homología con otros relacionados con la virulencia en diferentes bacterias (Melnikow *et al.*, 2005), lo que conduce a pensar en un posible papel en el desarrollo de la enfermedad.

En 2003, Zehr *et al.* caracterizaron las proteínas reguladas por la concentración de hierro en *H. parasuis*, dado su papel esencial en la supervivencia, como hemos señalado. A partir de lisados bacterianos realizaron electroforesis e *immunoblotting* con suero de cerdos convalecientes y seleccionaron algunas bandas proteicas para su identificación. Las proteínas inmunorreactivas que eran reguladas positivamente por el

hierro incluían dos OMP y una proteína de unión a la hemoglobina, mientras que las que eran reguladas negativamente incluían una proteína Fur, una ureasa y una proteasa.

Las bacterias han desarrollado multitud de mecanismos para la captación de hierro, la mayoría de los cuales se han relacionado con la virulencia (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003). En el caso de *H. parasuis* (Morton y Williams, 1989) se formularon, inicialmente la hipótesis de que los sideróforos representaban el único sistema de captación de hierro, hecho que fue cuestionado por Charland *et al.* (1995), quienes atribuyeron la captación de hierro a unas proteínas de unión a la transferrina porcina. En los últimos años, del Río *et al.* (2005) han puesto de manifiesto que *H. parasuis* posee ambos mecanismos de captación para el abastecimiento de este elemento.

#### 1.3.a.1. Mecanismos dependientes de los sideróforos

Los sideróforos son moléculas capaces de unir eficaz y muy específicamente  $\text{Fe}^{3+}$  procedente de complejos presentes en el hospedador. Los sideróforos incluyen catecoles, hidroxamatos e hidroxicarboxilatos.

En estudios llevados a cabo por del Río *et al.* (2004), se ha demostrado que todos los serotipos de *H. parasuis* son capaces de producir sideróforos, basándose en la amplificación de la región *fhu* (*ferric hydroxamate uptake*) del genoma de estas bacterias. Se cree que los mecanismos implicados en la captación de la energía necesaria para llevar a cabo la translocación de los sideróforos cargados con hierro desde la membrana externa al periplasma recurren a la hidrólisis del ATP, acoplado el gradiente quimiosmótico necesario (Bradbeer, 1993). El complejo TonB-ExbB-ExbD resulta esencial para la transferencia de energía a la membrana externa.

En la proteína TonB se diferencian tres dominios: el extremo N-terminal, que funciona como un dominio que fija la proteína a la membrana citoplasmática y participa en la transferencia energética (Postle y Skare, 1988); un segundo dominio, que contiene repeticiones ricas en prolina, que se expanden y proyectan al periplasma y, finalmente, el extremo C-terminal, que forma un cilindro que interacciona con las cajas TonB de los receptores de membrana externos y su delección impide que se establezcan estas interacciones.

## Introducción

Una vez que el sideróforo ha atravesado la membrana externa, es transportado al citoplasma mediante la unión a una proteína localizada en el periplasma, que lo cederá posteriormente a los transportadores tipo ABC (*ATP Binding-Cassette*), localizados en la membrana citoplasmática. Las proteínas FhuB y FhuC son proteínas de la membrana citoplasmática, componentes de un sistema transportador tipo ABC, que internalizan el hidroxamato férrico. La FhuB es una proteína integral de membrana extremadamente hidrofóbica, que representa un papel esencial en la translocación del sustrato, debido a la interacción con las proteínas FhuC y FhuD (del Río, 2004).

El proceso de captación de hierro debe estar regulado, para que se produzca el mantenimiento de la concentración de hierro intracelular en los límites requeridos en cada momento. En las bacterias Gram negativas, la regulación de la captación de hierro está mediada por la proteína Fur (Carson *et al.*, 1999), que funciona como un represor del sistema cuando las condiciones de hierro son suficientes, para lo cual se une al ADN e inhibe el acceso de la ARN polimerasa a los promotores. Por el contrario, cuando el hierro intracelular es escaso, la proteína Fur pierde la capacidad de unión y se permite la transcripción de los genes que estaban reprimidos en las condiciones anteriores. Se puede concluir, por tanto, que la transcripción de los genes que intervienen en la captación de hierro se encuentra regulada por la concentración de hierro intracelular.

Debido a que los niveles de hierro libre en el hospedador se encuentran por debajo de los requerimientos del microorganismo, la posesión de sistemas de captación resulta de especial importancia en la virulencia bacteriana. Se ha comprobado que ciertos sistemas de captación de hierro mediante sideróforos refuerzan la virulencia de determinadas cepas patógenas de la especie *E. coli* (Williams *et al.*, 1978).

Mikael *et al.* (2002) estudiaron y caracterizaron el receptor para el ferricromo (FhuA) en *A. pleuropneumoniae*, demostrando que esta proteína no está regulada por la concentración de hierro presente en el medio de cultivo, sino que se expresa constitutivamente, al contrario de lo que sucede con la mayoría de los sistemas de adquisición de hierro, en los que su expresión es inducible en ausencia de este elemento. Un ejemplo de ello son las proteínas de unión a la transferrina, TbpA y TbpB, que se regulan en función de la disminución de los niveles de hierro (Gerlach *et al.*, 1992).

### 1.3.a.2. Mecanismos independientes de los sideróforos

Dentro de este grupo es preciso citar los que se refieren a la presencia de receptores para complejos que incluyen hierro en su molécula, como es el caso de la hemina, ferritina, transferrina o lactoferrina.

La ferritina es el compuesto de almacenamiento primario de hierro en la mayoría de los organismos. Se encuentra no sólo en animales, sino también en plantas (fitoferritinas) y en microorganismos (bacterioferritina). Tiene un peso molecular aproximado de 500 kDa y está compuesta por 24 subunidades proteicas, que forman una esfera hueca en la que se asientan más de 4.000 átomos de  $\text{Fe}^{+3}$  (Belanger *et al.*, 1995).

El término “hemina” indica que el ión protoporfirina IX se encuentra en su estado oxidado. Tiene un peso molecular de aproximadamente 600 Da, un tamaño que puede limitar su capacidad para atravesar la membrana externa a través de los canales de las porinas, aunque puede difundir pasivamente a través de la bicapa lipídica. Los patógenos extracelulares, para poder utilizar la hemina, necesitan disponer de un sistema de captación y transporte compuesto por hemóforos que se unen a la hemina, a la hemoglobina y a la hemopepsina, junto con proteasas que degradan el receptor durante su paso a la membrana externa. Este sistema se ha encontrado en especies como *A. pleuropneumoniae* (González *et al.*, 1995).

Las proteínas de unión a la transferrina (Tbp: *transferrin binding protein*) se han descrito en todos los miembros de la familia *Pasteurellaceae*. El receptor de la transferrina está constituido por dos proteínas presentes en la membrana externa. Un primer componente denominado **TbpB**, de unos 60-80 kDa (Rokbi *et al.*, 1993), con capacidad de reconocer la forma cargada de la transferrina, por la que presenta una gran especificidad (Retzer *et al.*, 1998), se encuentra anclado a la membrana externa por dominios transmembrana. Posee una secuencia muy conservada, particularmente en la región N- terminal (Cornelissen *et al.*, 1997).

El segundo componente, denominado **TbpA**, tiene un tamaño de unos 100 kDa. Se trata de una proteína integral de membrana cuya función consiste en actuar de canal a través de la membrana para que el hierro atraviese hasta el espacio periplásmico (Rutz *et al.*, 1992). La TbpA posee también residuos conservados en especies

## Introducción

relacionadas y algunos estudios han demostrado que esta zona tan conservada coincide con la región responsable del paso del hierro (Gray-Owen *et al.*, 1995).

De la Puente Redondo *et al.* (2003) pusieron de manifiesto la presencia de los genes *tbpB* y *tbpA* que codifican, respectivamente, las proteínas de unión a la transferrina TbpB y TbpA en todos los serotipos de *H. parasuis*. Posteriormente, del Río *et al.* (2004), clonaron y secuenciaron el gen *tbpB* de los serotipos 2, 3 y 5, y más adelante el de los serotipos restantes.

Del Río *et al.* (2004) demostraron también la presencia de los genes *tonB*, *exbB* y *exbD* en todos los serotipos de *H. parasuis*. Además, se describió que se encontraban dispuestos de manera consecutiva a los genes *tbpB* y *tbpA* en el cromosoma bacteriano, lo que podría indicar que fueron adquiridos simultáneamente para desarrollar un sistema eficaz de captación de hierro, estableciéndose grados de homología entre estos cinco genes, dentro de diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Se concluyó que las regiones menos conservadas correspondían a las proteínas expuestas a la superficie extracelular, mientras que las proteínas integrales presentaban un grado de conservación mayor.

Bigas *et al.* (2006) demostraron la existencia de la proteína Fur mediante la construcción de una librería genómica en *E. coli*. Esta proteína presentaba una secuencia conservada, relacionada con la unión de los metales. La importancia del gen *fur* se puso de manifiesto cuando se observó que los mutantes deficientes en dicho gen no eran viables, debido a que en *H. parasuis*, esta proteína regula la expresión de los genes relacionados con la captación de hierro y su ausencia impide la activación del mecanismo, lo que provoca la muerte bacteriana.

Las Tbps meningocócicas producen anticuerpos bactericidas en modelos animales (Danve *et al.*, 1993). De la misma forma, las Tbps de *A. pleuropneumoniae* inducen respuesta inmune (Rossi-Campos *et al.*, 1992) y son factores de virulencia en esta especie. La expresión *in vivo* de las Tbps en *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*, e *in vitro* en *A. pleuropneumoniae*, indican que el receptor para la transferrina es crítico para la supervivencia de estos microorganismos. Las dos proteínas de unión a transferrina presentan una variabilidad diferente. Mientras que la TbpA posee variabilidad antigénica restringida a puntos localizados estratégicamente, la proteína TbpB presenta

mayor variabilidad antigénica, debido en principio a la heterogeneidad que existe entre las TbpBs dentro de una misma especie y, además, a su localización en la superficie de la bacteria, circunstancia que las hace más accesibles al sistema inmunológico.

Algunos estudios han demostrado la eficacia de estas proteínas de unión a la transferrina, en cuanto a la inmunidad que confieren en especies próximas a *H. parasuis*, como sucede con *A. pleuropneumoniae* (Kim *et al.*, 2007) y con *N. gonorrhoeae* (Price *et al.*, 2005).

### **1.3.b. Otros factores de virulencia**

#### **1.3.b.1. Cápsula**

Está compuesta, en los serotipos y cepas que la poseen, por un polímero de carbohidratos con grupos ácidos de elevado peso molecular, que le proporcionan carga negativa. En 1986, Morozumi y Nicolet describieron la cápsula de los primeros 9 serotipos por medio de técnicas de aglutinación con acriflavina y hervido, de producción de iridiscencia y de precipitación del polisacárido ácido con Cetavlon<sup>®</sup> o hexadecil trimetil amonio (en este último caso, algunas de las cepas capsuladas precipitaron, lo que llevó a pensar en la existencia de diferencias químicas en su composición). Morozumi y Nicolet (1986) clasificaron los serotipos 2 y 3 como capsulados y el serotipo 5 como no capsulado.

#### **1.3.b.2. Lipooligosacárido (LOS)**

Debido a que las endotoxinas del género *Haemophilus*, a diferencia de las presentes en la familia *Enterobacteriaceae*, por ejemplo, carecen de cadenas laterales O, se prefiere denominar lipooligosacárido (LOS) al componente fundamental de la membrana externa de *H. parasuis*, en lugar de lipopolisacárido (LPS), nomenclatura que se utiliza también en otras bacterias. La principal función del LOS se relaciona con la inflamación y se piensa que es un factor de toxicidad muy importante, que correlaciona con la aparición de trombosis y coagulación intravascular diseminada (Amano *et al.*, 1997). Parece que la estructura del LOS de *H. parasuis* es semejante a la de *H. influenzae* y *H. somnus*, pues el estudio en SDS-PAGE revela la ausencia de la escalera típica del antígeno O, con bandas de alto peso molecular (Fenwick *et al.*, 1986). Se considera que el LOS es uno de los estimuladores más potentes de la respuesta inmune mediada por monocitos y macrófagos, ya que cuando estas células se exponen a

## *Introducción*

la acción del LOS de *H. parasuis*, secretan una amplia variedad de mediadores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 6 (IL-6).

### 1.3.b.3. Proteínas de la membrana externa (*Outer Membrane Protein*, OMP)

Bajo la denominación de proteínas de la membrana externa (OMP), se incluyen las proteínas integrales de la membrana externa y las lipoproteínas que se anclan en ella por su extremo N-terminal. En la respuesta adaptativa de las bacterias patógenas al estrés del medio en que se encuentran, intervienen este tipo de proteínas. La resistencia de algunas bacterias Gram negativas a los péptidos antimicrobianos (AMPs) viene dada por la producción de proteasas asociadas a la membrana externa, que se adhieren a los AMPs, degradándolos después (Stumpe *et al.*, 1998). En la misma línea, se puede impedir la unión de los AMPs a la membrana externa mediante la modificación de las propiedades de la superficie celular o por la disminución de la permeabilidad de la membrana externa (Ernst *et al.*, 1999).

En los últimos años, se han realizado diversos estudios que ponen de manifiesto una relación clara entre estas proteínas y la virulencia (Ruiz *et al.*, 2001), basándose en la existencia de homología entre los patrones de ADN y de las OMPs de los aislados clínicos. En nuestro laboratorio (del Río *et al.*, 2005), se pudo demostrar que algunas proteínas se producen en mayor concentración en condiciones restrictivas de hierro, facilitando la supervivencia del agente en el hospedador.

### 1.3.b.4. Superóxido dismutasa (SOD)

Las SODs son metaloenzimas que catalizan la conversión de radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno, constituyendo una defensa importante contra la toxicidad del oxígeno generado en el proceso de la respiración bacteriana. En todas las especies del género *Haemophilus* se ha descrito una SOD con resistencia a la cianina y al peróxido de hidrógeno, pero además, en el caso concreto de *H. parasuis*, se ha observado una segunda SOD dependiente de cobre y zinc (Langford *et al.*, 1992).

### 1.3.b.5. Neuraminidasa (Sialidasa)

La neuraminidasa capta residuos de ácido siálico de los glucoconjugados del hospedador encargados del desenmascaramiento de los receptores necesarios para la

colonización e invasión de sus células, además de interferir con los mecanismos de defensa inmune, disminuyendo la viscosidad de la mucina y alterando las funciones de los mediadores inflamatorios. Por esta razón, se considera una diana perfecta para el desarrollo de vacunas o intervenciones terapéuticas (Pilatte *et al.*, 1993).

En *H. parasuis* se ha demostrado la presencia de una neuraminidasa asociada a la membrana, que no requiere cationes divalentes para su actividad (Lichtensteiger y Vimr, 1997), ya que no resulta inhibida ni por EDTA (ácido etilendiaminotetracético) ni por EGTA (ácido etilenglicoltetracético), pero sí por el inhibidor específico Neu-Ac2. No presenta actividad frente a la mucina ni el ácido colomínico pero, sin embargo, sí es activa frente a la N-acetilneuroaminolactosa y la  $\alpha$ -ácido glicoproteína. Cuando se purificó y renaturalizó, presentaba un peso molecular de 82 kDa (Lichtensteiger y Vimr, 2003). Tras someter un cultivo bacteriano a un proceso de centrifugación, se encontró que la mayor parte de la actividad enzimática residía en el sedimento bacteriano y sólo un 10% en el sobrenadante. La adición de ácido siálico al medio de cultivo de *H. parasuis* determinó un crecimiento bacteriano, con una densidad óptica cuatro veces superior a la observada en condiciones normales, lo que ponía de manifiesto que el ácido era metabolizado por la bacteria (Lichtensteiger y Vimr, 1997).

#### 1.3.b.6. Fimbrias y adhesinas

La adherencia a la superficie de las células epiteliales representa un aspecto importante para la colonización y patogenicidad de numerosas especies bacterianas. Munch *et al.* (1992) han estudiado la producción de fimbrias en *H. parasuis*, comprobando que su expresión es dependiente de las condiciones de cultivo. En este caso particular, los autores utilizaron como modelo embriones de pollo de diez días, inoculados en la membrana corioalantoidea. Después de la inoculación con una suspensión de *H. parasuis* que contenía  $10^8$  UFC/ml de suero, se llevaron a cabo los análisis de las membranas al cabo de 72 horas de incubación a 37°C, observándose una disminución muy evidente de la vascularización, en comparación con las membranas de los embriones control, no tratados. En el mesodermo se identificaron focos de *H. parasuis*, particularmente en zonas en las que habían desaparecido las células epiteliales de la membrana corioalantoidea. Su estudio al microscopio electrónico reveló que el grosor de la pared celular bacteriana era superior al habitual. En ocasiones se observaban, también, complejos que formaban parte de la membrana, localizados en el

## Introducción

citoplasma, lo que indicaba un proceso de invaginación de la membrana citoplasmática. Adyacente al glucocálix, se observaron, igualmente, estructuras filamentosas de unos 3 nm de diámetro, que atravesaban la pared celular y mantenían conexión con otras bacterias adyacentes, asumiendo que estas estructuras eran fimbrias. Cuando la bacteria se cultivaba en un medio sólido, estas estructuras se perdían siendo, en cualquier caso, muy frágiles, incluso cuando se teñían mediante tinción negativa, perdiéndose a veces durante el procedimiento. Posiblemente, también se pierdan las fimbrias con los pases sucesivos de la bacteria en agar durante un periodo de tiempo prolongado.

Se han caracterizado las adhesinas P5 y P2 en todos los serotipos de *H. parasuis*. Son de carácter proteico y presentan una gran homología con las descritas previamente en *H. influenzae*. La adhesina P5 es una proteína reconocida por los anticuerpos monoclonales desarrollados frente a la adhesina de *H. influenzae*, por lo que el epitopo diana se encontraría muy conservado. A diferencia de la adhesina P2 o de las adhesinas P5 de otras bacterias, como las del género *Neisseria*, no se une al antígeno de la familia del antígeno carcinoembrionario humano (CEA), aunque se desconoce si lo podría hacer al porcino (McVicker y Tabatabai, 2006). La adhesina P2 también presenta epítomos conservados; su peso molecular es de 48 kDa en los serotipos virulentos y de 55 kDa, en los avirulentos (Zimmerli y Tabatai, 2006).

## **2. El sistema inmune en el ganado porcino**

El sistema inmune está formado por un conjunto de mecanismos y órganos que, entre otros hechos, protegen a los seres vivos de infecciones, por medio de la identificación y eliminación de agentes patógenos. Para que tenga lugar la respuesta inmune, debe suceder previamente el reconocimiento del antígeno seguido de la activación de las células inmunocompetentes y, por último, la fase efectora, consistente en la eliminación del antígeno.

Los cerdos presentan, igual que el resto de animales, unos órganos primarios, donde tiene lugar el proceso de diferenciación de las células inmunocompetentes (linfocitos). Están representados por el timo, donde se diferencian los linfocitos T, y la médula ósea, donde se diferencian los linfocitos B. También presentan órganos secundarios, donde tiene lugar la captación, el reconocimiento y el procesamiento de los antígenos; entre ellos, se encuentran el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT).

Los ganglios linfáticos se dividen en zona cortical y medular. En la primera es donde se localizan los linfocitos, mientras que en la segunda se encuentran los monocitos y macrófagos. La distribución celular y la circulación linfática en los ganglios del cerdo es inversa a la del resto de los mamíferos, porque la zona cortical se localiza en el centro del ganglio mientras que la medular se dispone en la periferia. Por su parte, el bazo reconoce los antígenos que llegan por vía sanguínea. Está constituido por la pulpa blanca, donde se encuentran los folículos linfoides, con linfocitos B y células presentadoras de antígeno, y la pulpa roja, formada por los cordones esplénicos, con monocitos, eritrocitos y senos venosos, en los que se sitúan los macrófagos (Liebler-Tenorio y Pabst, 2006).

El MALT (tejido linfoide asociado a mucosas) está constituido por folículos linfoides y áreas interfoliculares. Los folículos linfoides están formados por células B rodeadas por células dendríticas foliculares y macrófagos. Las áreas interfoliculares contienen principalmente linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. En el sistema inmune del ganado porcino podemos encontrar regiones MALT en la conjuntiva (CALT), nasofaringe (anillo de Waldeyer), laringe (LTALT), bronquios (BALT), estómago (MALT gástrico) e intestino (GALT) (Bailey y Haverson, 2006).

## 2.1. Respuesta innata

Los microorganismos que penetran en el organismo encuentran como primera barrera los mecanismos del sistema inmune innato. Estas defensas no son específicas, lo que significa que estos sistemas reconocen y responden a los patógenos de una forma genérica. Este sistema no confiere una inmunidad duradera contra el patógeno, pero representa el sistema dominante de protección en la gran mayoría de los animales.

### 2.1.a. **Respuesta de fase aguda**

Los animales superiores poseen mecanismos de defensa innatos con los que reaccionan de forma inmediata frente a aquellas situaciones que suponen una amenaza para la integridad de su organismo. Ante la presencia de agentes infecciosos, daño tisular, traumatismos, estrés, crecimiento tumoral o alteraciones inmunes, se desencadenan una serie de cambios fisiológicos, endocrinos y metabólicos muy complejos, que en su conjunto reciben el nombre de respuesta de fase aguda (RFA). Entre estos cambios se producen variaciones en la concentración de algunas proteínas sanguíneas, las denominadas proteínas de fase aguda (PFA) (Lampreave *et al.*, 1994; Murata, 2007).

Se consideran PFA aquellas proteínas que modifican su concentración plasmática durante la respuesta de fase aguda en al menos un 25% de incremento sobre los valores basales. Las PFA principales aumentan por encima de 10 veces e incluso, aquéllas que se encuentran en el suero en baja concentración, pueden aumentar cientos de veces. Estas proteínas se pueden considerar positivas cuando su concentración se eleva en sangre durante la respuesta, o negativas, cuando su concentración disminuye. Dentro de las proteínas plasmáticas de fase aguda positivas se incluyen la  $\alpha_1$ -MAP, la proteína C reactiva, la haptoglobina, el fibrinógeno, el amiloide sérico A y la  $\alpha_1$ -antiquimotripsina. Entre las proteínas plasmáticas de fase aguda negativas figuran la albúmina, la transferrina y la apolipoproteína A-I (Kushner, 1982).

Las PFA participan también en la regulación de otros mecanismos que se desencadenan durante la respuesta de fase aguda (Gabay y Kushner, 1999) y su utilización puede resultar interesante como marcadores generales e inespecíficos de situaciones patológicas (Petersen *et al.*, 2004).

El comportamiento de las PFA durante la respuesta ha sido estudiado en numerosos modelos experimentales, como infecciones bacterianas (Jacobson *et al.*, 2004; Sorensen *et al.*, 2006; Martín de la Fuente *et al.*, 2009), víricas (Carpintero *et al.*, 2007) y parasitarias (Jungersen *et al.*, 1999). Las PFA pueden utilizarse también para determinar el estado sanitario de las granjas, evaluar diferentes sistemas productivos y detectar los momentos en los que se están produciendo problemas (Pallarés *et al.*, 2008).

#### 2.1.a.1. Regulación de la expresión de las proteínas de fase aguda

La estimulación de la síntesis de las PFA se atribuye a las linfoquinas, productos de secreción de los monocitos, queratinocitos y macrófagos activados (Baumann y Gauldie, 1994). Estas moléculas actúan como mediadores entre la zona afectada y los hepatocitos.

La liberación de citoquinas por parte de los macrófagos activados inicia una serie de mediadores, de los cuales las citoquinas de la familia de la interleucina 1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral (TNF) son de particular importancia en la iniciación de la cascada de reacciones en los fibroblastos y células endoteliales. En el sitio de reacción, la IL-1 y el TNF producen la liberación de una onda secundaria de citoquinas, que inicia la respuesta celular de fase aguda. El hígado es el órgano diana principal de los mediadores inflamatorios. Dichos mediadores pueden agruparse en cuatro categorías:

- Citoquinas tipo IL-6
- Citoquinas tipo IL-1
- Glucocorticoides
- Factores de crecimiento

Las citoquinas actúan como estimuladores primarios de la expresión de los genes de fase aguda mientras que los glucocorticoides y los factores de crecimiento funcionan más como moduladores de la acción de las citoquinas (Baumann, 1994).

La IL-1 y el TNF estimulan la síntesis de las proteínas de fase aguda denominadas de tipo I, como la proteína C reactiva, el amiloide sérico o la

## Introducción

haptoglobina, e inhiben la síntesis del otro grupo de proteínas de fase aguda de tipo II, tales como el fibrinógeno y los inhibidores de proteasas. La IL-6 induce la síntesis de la mayoría de las PFA, en particular las de tipo II. En el caso particular del cerdo, se ha estudiado el efecto de las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  sobre la producción de haptoglobina (HPT), pig MAP y albúmina por parte de los hepatocitos.

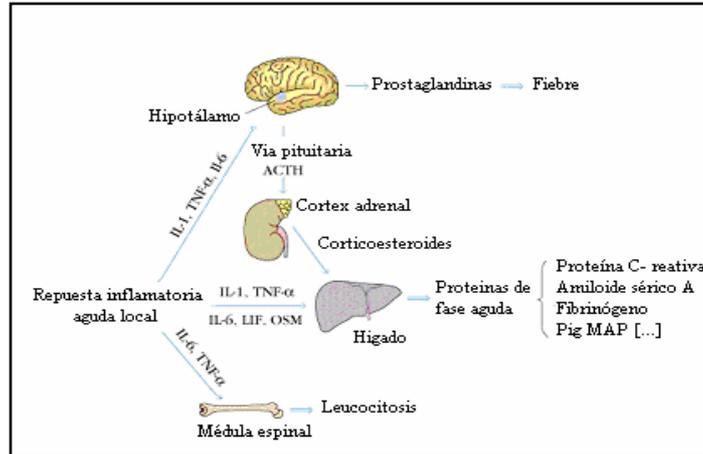


Figura 1.2. Representación esquemática de la ruta de inducción de la respuesta de fase aguda

### 2.1.a.2. Principales alteraciones y cambios producidos durante la respuesta de fase aguda

Las principales funciones de la RFA incluyen las siguientes (Thompson *et al.*, 1992):

- Proporcionar energía y sustratos para la lucha frente a los agentes patógenos invasores
- Evitar la transferencia de metabolitos necesarios para los patógenos
- Aumentar la presión osmótica
- Limitar el daño causado por los patógenos y/o eliminar el tejido dañado o infectado a la vez que se restaura el tejido sano
- Llevar a cabo el transporte de sustancias liposolubles

La haptoglobina forma complejos estables con la hemoglobina liberada por los eritrocitos y también controla la proporción de hemoglobina circulante. La pig-MAP pertenece a la familia del inhibidor de proteasas plasmáticas y se relaciona con la regulación y modulación de la migración y proliferación celular (Piñeiro, 1999). La

proteína C-reactiva participa en la activación del sistema del complemento y en la acumulación de macrófagos en zonas dañadas.

Cuando se produce la RFA, tiene lugar una serie de cambios fisiológicos entre los que se incluyen:

- Cambios neuroendocrinos: fiebre, anorexia, descenso de la concentración de tiroxina total y aumento de la concentración de cortisol
- Cambios metabólicos: pérdida de masa muscular y aumento de la lipólisis
- Cambios hematopoyéticos: anemia, leucocitosis y trombocitosis

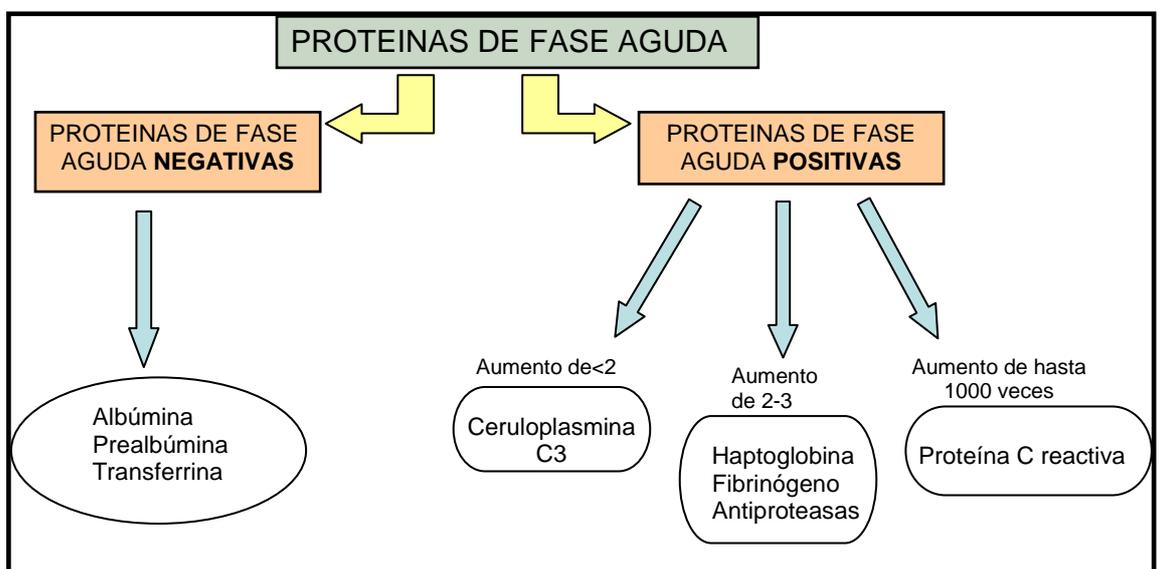


Figura 1.3. Esquema de las proteínas de fase aguda positivas y negativas.

### 2.1.b. Activación del sistema del complemento

El sistema del complemento fue descrito en el siglo XIX por Bordet como “algo” presente en el suero inmune, que ayudaba a “complementar” el efecto de los anticuerpos.

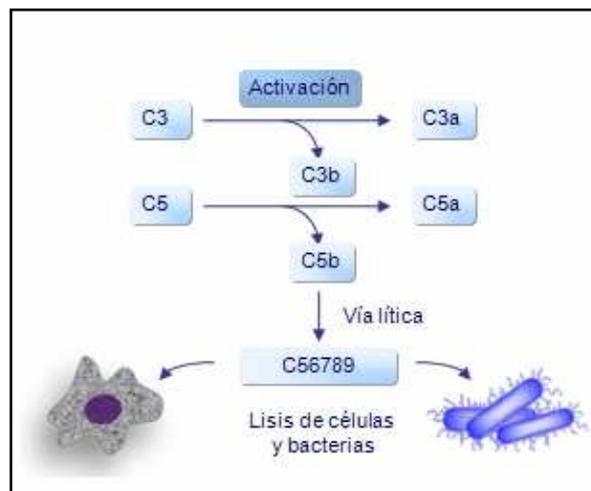
Parte de los factores del complemento potencian la inflamación y la fagocitosis y actúan produciendo la lisis de los microorganismos, lo que resulta de gran importancia en la defensa de los animales, esencialmente como parte de la respuesta innata. La mayor parte de los factores del sistema del complemento son proteínas plasmáticas y una pequeña parte de ellos son proteínas de membrana. Muchos de los componentes del complemento son polimórficos, es decir, que aunque se encuentran en todos los

## Introducción

individuos, no son idénticos en todos ellos, sino que existen diferencias alélicas entre unos y otros (Lachmann, 2006).

El hepatocito es la principal célula productora de factores del complemento, pero también los macrófagos activados pueden producir la mayoría de los factores en el foco inflamatorio. Además, las citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF) y el IFN-  $\gamma$  incrementan la síntesis de algunos factores del complejo en el hígado.

En la activación del complemento se ponen en marcha reacciones en cascada, de forma que en cada reacción se genera un producto activo, que además de determinar que la cadena prosiga hasta la reacción siguiente, puede efectuar acciones biológicas importantes en la defensa del organismo (Nielsen *et al.*, 2000).



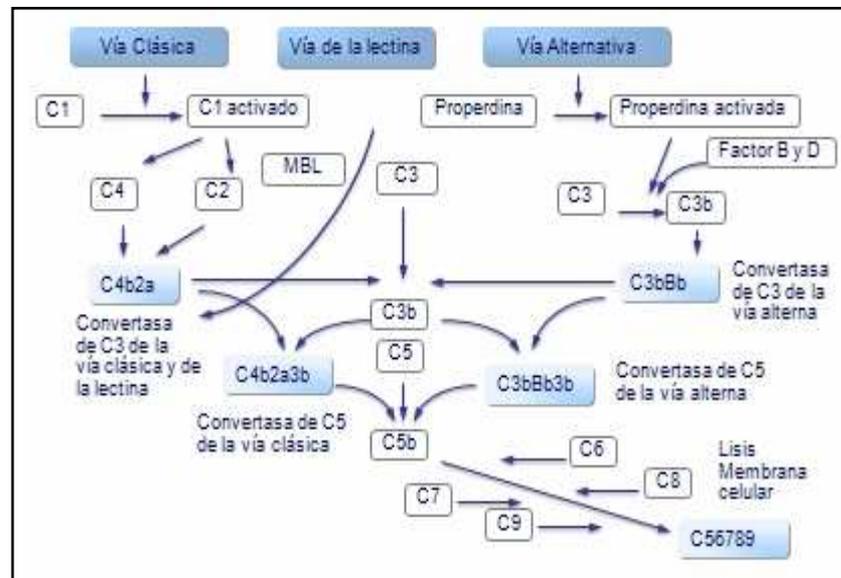
**Figura 1.4.** Activación del sistema del complemento y la cascada de acontecimientos subsiguientes que conducen a la lisis de células animales y bacterias. (tomado de "Inmunologiaonline" de José Peña Martínez, Universidad de Córdoba).

La activación del sistema del complemento puede iniciarse de tres formas distintas, dando lugar a lo que se denominan las tres vías del complemento. Éstas son:

- La vía clásica: que se inicia por la unión antígeno-anticuerpo
- La vía alternativa: que es activada por las membranas bacterianas directamente
- La vía de las lectinas de unión a manosa: da comienzo a partir de la manosa presente, por lo general, en la superficie de bacterias

En todos estos procesos de activación se llega a un paso común en el que la molécula C3 se escinde en C3a y C3b; después, C5 se escinde en C5a y C5b. El C5b es el primer factor de la llamada *vía terminal o lítica*, en la que confluyen las tres vías del complemento mencionadas. Al final, se producen poros en las membranas de las bacterias o células eucariotas, originando su lisis.

El complemento es un sistema muy eficiente en la lucha del organismo contra las infecciones. Es termolábil, de forma que si el suero es calentado a 56 ó más grados, su efecto se anula. Varios estudios han mostrado el papel del complemento en una infección bacteriana, estudiando la resistencia a la actividad bactericida de determinados sueros de animales infectados con anterioridad (Rautema y Meri, 1999).



**Figura 1.5.** Esquema de las vías de activación de la cascada del complemento. (tomado de Inmunologiaonline de José Peña Martínez, Universidad de Córdoba)

### 2.1.c. Activación de los fagocitos

Los fagocitos se activan gracias a sus receptores para los factores del complemento (C3b), cuando éste se deposita en la superficie del agente infeccioso.

## 2.2. Respuesta adaptativa

La inmunidad adaptativa, que se desarrolla cuando los agentes infecciosos logran evadir los mecanismos innatos de defensa y está generada por la penetración de una dosis inicial de antígeno, se hace efectiva sólo después de varios días, tiempo

## *Introducción*

requerido para que los linfocitos T y B reconozcan dichos antígenos, se diferencien y se conviertan en células efectoras.

Las células del sistema inmune adaptativo son una clase especial de leucocitos, los linfocitos B y T, que derivan de células madre hematopoyéticas pluripotenciales de la médula ósea (Janeway, 2001). Las células B están involucradas en la respuesta inmune humoral, mientras que las células T se reservan la respuesta inmune mediada por células. Las células B y T contienen moléculas receptoras que reconocen objetivos o blancos específicos. Las células T reconocen un objetivo “no propio”, como un patógeno, sólo después de que los antígenos hayan sido procesados y presentados en combinación con un receptor adecuado, una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (CPH).

Existen dos subtipos principales de células T: las células T citotóxicas (Tc) y las células T colaboradoras o ayudantes (Th). Las primeras sólo reconocen antígenos acoplados a moléculas del CPH de clase I, mientras que las segundas sólo identifican antígenos previamente unidos a moléculas del CPH de clase II. Estos dos mecanismos de presentación de antígenos reflejan los diferentes cometidos de los dos tipos de células T. Un tercer subtipo de menor importancia lo forman las células T $\gamma$   $\delta$ , capaces de reconocer antígenos intactos, que no están acoplados a receptores CPH (Holtmeier y Kabelitz, 2005).

El receptor específico de antígeno de las células B es una molécula de inmunoglobulina situada en su superficie, capaz de reconocer patógenos completos sin necesidad de que los antígenos sean procesados previamente. Cada linaje de células B expresa en su superficie una inmunoglobulina diferente, de forma que el conjunto completo de receptores de antígenos de las células B del organismo representa todas las inmunoglobulinas que ese organismo es capaz de sintetizar (Janeway, 2001).

Las células T citotóxicas (Tc) son un subgrupo de células T que destruyen células infectadas o alteradas por otras causas (Harty y White, 1999). Son activadas cuando su receptor de células T (TCR) se liga a su antígeno específico en un complejo con el receptor del CPH de clase I de otra célula. Las células T así activadas viajan a través del organismo en busca de células cuyos receptores del CPH de clase I porten

este antígeno. Cuando toman contacto con ellas, liberan citotoxinas que forman poros en la membrana de las células diana, provocando su apoptosis (Radoja *et al.*, 2006).

Las células T colaboradoras (Th) regulan tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa y ayudan a determinar qué tipo de respuesta presentará el organismo animal frente a un patógeno concreto (Abbas *et al.*, 1996). No son citotóxicas y no destruyen células infectadas, sino que dirigen a otras células para que lleven a cabo esa función. Estas células expresan receptores de células T que reconocen antígenos ligados a moléculas del CPH de clase II. Las células Th presentan una asociación más débil con el complejo CPH-antígeno que el observado en las células Tc, lo que significa que es necesario que se ligen muchos receptores (entre 200 y 300); por ello, las células Th requieren un tiempo más prolongado de acoplamiento con la célula presentadora de antígeno (Kovacs *et al.*, 2002).

### **2.2.a. Características de la respuesta inmune adaptativa**

A diferencia de la inmunidad innata, la adquirida posee:

--*Especificidad*: Es debida a que este tipo de respuesta va dirigida específicamente frente a una determinada molécula antigénica. La porción del antígeno que es reconocida por los linfocitos se conoce como determinante antigénico o epítipo. Esta especificidad es posible porque los linfocitos contienen receptores de membrana capaces de identificar y distinguir diferencias sutiles entre diversos antígenos. Se plantea que todos los individuos poseen numerosos clones (conjunto de células derivadas de un único precursor), cuya progenie cuenta con los receptores de superficie de la célula que les dió origen y puede responder a determinantes antigénicos específicos para ellas. Así, el desarrollo de clones específicos de antígeno resulta previo e independiente a la exposición del antígeno, el cual selecciona un clon específico preexistente y lo activa hasta provocar su proliferación y diferenciación.

--*Memoria*: Se refiere al incremento en la intensidad de la respuesta inmune ante los siguientes contactos con el mismo antígeno.

--*Heterogeneidad o diversidad*: El número total de linfocitos con diferentes especificidades en un individuo ha recibido el nombre de repertorio linfocítico, cuya

extraordinaria diversidad es el resultado de la variabilidad en la estructura de los sitios donde se unen los antígenos en los receptores linfocíticos.

--*Multifactorialidad*: La respuesta inmune depende de múltiples factores, tanto del agente biológico que la origina como del hospedador que responde: por ejemplo, el tipo, la virulencia, la cantidad o la dosis del agente agresor y su vía de penetración pueden generar diferentes tipos de respuestas. También la edad y la conformación genética del hospedador pueden constituirse en elementos determinantes.

### 2.3. Memoria inmunológica

Una de las consecuencias más importantes de la respuesta inmune adaptativa es el establecimiento del estado de memoria inmunológica, que consiste en la habilidad del sistema inmune para responder más rápida y eficazmente a microorganismos con los que ha tenido un contacto previo (han infectado previamente al hospedador) y refleja la preexistencia de una población expandida clonalmente de linfocitos específicos de antígeno. La respuesta de memoria es conocida también como respuesta secundaria, terciaria, etc., en dependencia del número de exposiciones anteriores al mismo antígeno. Difiere cuantitativa y cualitativamente de la respuesta primaria.

Se denomina respuesta inmune primaria a la que se produce en el organismo animal al ponerse en contacto por primera vez con un agente extraño y de la cual se derivan una serie de eventos que incluyen los mecanismos de defensa innatos inespecíficos y los de respuesta adaptativa, si el patógeno ha logrado sobrevivir a los primeros. Comienzan los macrófagos, como células especializadas en reconocer, internalizar y exponer los determinantes antigénicos de los microorganismos en su superficie, unidos a antígenos propios del complejo principal de histocompatibilidad, siendo ésta la forma en que los antígenos son identificados por los linfocitos colaboradores (Th), los cuales se van a diferenciar en dos clases de células efectoras: Th1 y Th2. El modo como surgen ambas líneas celulares no ha sido totalmente definido, pero sí parece clara la influencia de algunas citoquinas (IL-12 y el IFN- $\gamma$ ) producidas por los macrófagos y células NK (*Natural Killer*) en fases tempranas de la infección y como respuesta a los virus y bacterias intracelulares, que suelen inducir una respuesta de una población tipo Th1. Si la célula colaboradora es activada en presencia de IL-4 e IL-6, tiende a diferenciarse hacia Th2 (Takamatsu *et al.*, 2006).

Si los microorganismos agresores estimulan la vía de defensa humoral, la población que predomina es la Th2, cuya función será activar los linfocitos B, que proliferarán y se diferenciarán hasta células plasmáticas productoras de anticuerpos. La producción de inmunoglobulinas durante la respuesta primaria será pobre, de baja afinidad por los antígenos correspondientes, con predominio de IgM, y de duración corta.

Durante el primer contacto con el agente patógeno aparecerá además una segunda población de células B, que no llegarán a convertirse en células plasmáticas, porque se diferenciarán parcialmente: son las llamadas células de memoria. Para que éstas logren su total diferenciación, se impone un segundo contacto con el mismo agente por lo que, de no ocurrir, estas células quedaran circulando, listas para completar su maduración. Si los antígenos desencadenan una respuesta celular, la población predominante será Th1, que actuará de dos formas:

- Produciendo linfoquinas capaces de reclutar las células fagocitarias hacia el lugar de agresión y de activarlas, para que potencien su acción. Entre ellas, podemos mencionar el factor activador de macrófagos (MAF) o el factor inhibidor de migración (MIF). Este proceso, conocido como reclutamiento celular, es crucial para la defensa del organismo animal frente a los patógenos intracelulares.

- Las células Th1 pueden también activar los linfocitos T citotóxicos, que proliferan y se diferencian para actuar directamente en la destrucción de las células infectadas por patógenos intracelulares.

De igual manera, a través del mecanismo de defensa celular se producen células de memoria, que completan su diferenciación ante un nuevo contacto con el mismo agente patógeno. Cuando esto sucede, se inicia la respuesta de memoria o secundaria, con la cual se obtiene más rápidamente una mayor población de células efectoras y, en correspondencia, una respuesta más intensa.

## 2.4. Respuesta inmune humoral y celular

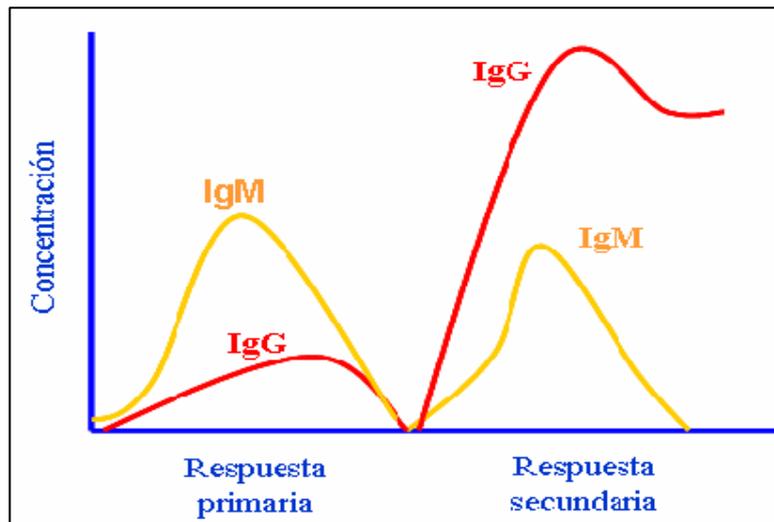
### **2.4.a Respuesta inmune humoral**

La respuesta inmune humoral está mediada por linfocitos B, que reconocen el antígeno a través de las inmunoglobulinas de membrana. Para que se inicien los procesos de proliferación de estas células, es necesario que los linfocitos B, además del estímulo antigénico, reciban el de ciertas interleuquinas.

El elemento efector final de la respuesta humoral son las inmunoglobulinas. El término inmunoglobulina fue propuesto por Heberman (1978), para designar todas las sustancias con capacidad de anticuerpo, es decir, con capacidad de anteponerse al antígeno. Las inmunoglobulinas poseen la propiedad de unirse específicamente al antígeno que indujo su formación.

Tras la unión antígeno-anticuerpo, las sustancias extrañas (o antígenos) son destruidas por las inmunoglobulinas a través de mecanismos que pueden ser diferentes, según el tipo de inmunoglobulina que participe. Esto se debe a que aunque las distintas clases de inmunoglobulinas tienen una estructura igual en ciertas partes de la molécula, en otras presentan una estructura distinta. Podemos afirmar que las inmunoglobulinas, al detectar al antígeno y unirse a él, actúan como transductores de la información de su presencia, por lo que estos serán posteriormente destruidos por el mecanismo más idóneo, en el que colaborarán, además del propio anticuerpo, el sistema del complemento, los macrófagos, en polimorfonucleares neutrófilos o las células NK, entre otros tipos celulares.

Las inmunoglobulinas descritas en la especie porcina incluyen: IgM, IgG, IgA e IgE (Butler *et al.*, 1981). Ninguna de ellas atraviesa la placenta. La transferencia de inmunoglobulinas de la madre al feto se realiza, por tanto, a través del calostro: los lechones absorben por vía intestinal las inmunoglobulinas, que difunden posteriormente hacia suero (Prescott *et al.*, 2004).



**Figura 1.6.** Inmunoglobulinas características en las respuestas primaria y secundaria. (Tomado de curso de Introducción a la Inmunología. J.M. Sánchez Vizcaíno)

**IgM:** Es la primera inmunoglobulina en producirse en la respuesta inmune y el isotipo predominante en la respuesta primaria. Se trata de la segunda inmunoglobulina en concentración en suero, después de la IgG, representando entre un 10 y un 12% del total de inmunoglobulinas porcinas. Aunque no se han descrito subclases, se ha señalado una variante alotípica. Su concentración en suero oscila entre 1 y 5 mg/ml; en la leche materna, entre 0,3-0,9 mg/ml y en el calostro, entre 2,5 y 3,2 mg/ml (Curtis *et al.*, 1971).

**IgG:** La IgG es el isotipo principal de inmunoglobulinas en el cerdo. Entre el 80 y el 85% del total, se encuentra distribuida en el suero y calostro, siendo además el anticuerpo más importante en la respuesta secundaria. Su concentración en el suero oscila entre 17-29 mg/ml; en leche materna, entre 1-3 mg/ml y en calostro, entre 30-70 mg/ml. Se han descrito, al menos, cinco subclases (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4) y cuatro alotipos. Sin embargo, el estudio del ADN ha puesto en evidencia que existen hasta ocho genes que codifican la región constante C $\gamma$ , lo que probablemente represente aún una mayor variabilidad potencial. El papel de esta inmunoglobulina en la respuesta humoral resulta fundamental (Curtis *et al.*, 1971).

**IgA:** Es la inmunoglobulina más importante del cerdo, como en otras especies animales, participante en la inmunidad de las mucosas, y la principal clase en la lactancia del animal. Representa alrededor del 3% del total de inmunoglobulinas. Su concentración en suero es escasa, entre 0,5 y 5 mg/ml; en leche materna se eleva hasta 3-7 mg/ml y en calostro, hasta 9,5-10 mg/ml. Se han descrito dos subclases en el cerdo,

## *Introducción*

IgA1 e IgA2, y dos variantes alélicas, una de las cuales determina una región bisagra integrada por seis aminoácidos y la otra, una región bisagra formada sólo por dos.

La actividad de la IgA está relacionada de forma esencial con la inmunidad de las mucosas, donde puede actuar evitando la penetración de los antígenos a través la pared del intestino y neutralizando la actividad de algunos virus, incluso dentro de las células epiteliales o fuera de ellas. La IgA no activa la cascada del complemento ni puede actuar como opsonina.

**IgE:** Representa menos del 0,01% de las inmunoglobulinas circulantes en el ganado porcino y su actividad se relaciona, principalmente, con problemas de hipersensibilidad.

### **2.4.b. Respuesta inmune celular**

La respuesta inmune de tipo celular cubre una importante función como mecanismo inmunológico de defensa, actuando principalmente frente a bacterias intracelulares y virus, a la vez que contrarresta la aparición y desarrollo de células tumorales. La respuesta inmune de tipo celular es compleja en sus efectos y acciones finales, igual que en su iniciación y desarrollo. En ella participan esencialmente los linfocitos T colaboradores (Th) y citotóxicos (Tc) (Groux, 2001). Los linfocitos reconocen el antígeno mediante receptores TCR y lo hacen sólo cuando el antígeno es degradado y procesado en el interior de las células presentadoras de antígeno, y sus determinantes antigénicos son expuestos en la superficie de éstas, acompañados de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad.

Las moléculas del CPH, a las que nos hemos referido en este sistema, son una serie de glicoproteínas presentes en las membranas de todas las células nucleadas, entre las que se encuentran las células inmunocompetentes. Estas moléculas son esencialmente de dos tipos o clases, clase I y clase II. Poseen, entre otras funciones, las de presentar el antígeno a los linfocitos, así como la de participar en el proceso de maduración de los linfocitos en el timo.

Las células presentadoras de antígeno son las encargadas de captar, procesar y presentar el antígeno a los linfocitos T. El reconocimiento del antígeno por las células T exige que previamente sea procesado proteolíticamente en el interior de las células

presentadoras de antígeno. Aunque existen excepciones, la separación de las funciones de los linfocitos Th y Tc viene dada por el origen de los antígenos que reconocen y, en último término, por el modo de procesamiento en las células presentadoras de antígeno y su posterior presentación en la superficie de las moléculas del CPH. Los linfocitos Tc reconocen los antígenos que han sido procesados endógenamente en el citosol de la célula infectada y presentados por las moléculas del CPH de clase I, mientras que los linfocitos colaboradores interactúan con el antígeno cuando es presentado por moléculas de clase II. Este fenómeno se conoce como restricción por el CPH, es decir, que el TCR que reconoce específicamente el antígeno ha de encontrarlo presentado por moléculas CPH propias. En el proceso de reconocimiento e interacción de una célula con otra intervienen, además, toda una serie de moléculas llamadas moléculas accesorias, que se encuentran en la superficie de los linfocitos T o en las células presentadoras de antígeno. Estas moléculas interactúan entre sí o con otros ligandos, reforzando la unión entre el TCR y el complejo CPH-péptido e incrementando la adherencia intercelular y su afinidad (Lunney *et al.*, 1987).

Cuando tiene lugar el reconocimiento antigénico entre el TCR y la molécula CPH que porta el antígeno, se desencadena una cascada de reacciones bioquímicas en el citoplasma de la célula T, que da lugar al proceso de activación, proliferación y diferenciación celular. Estos mecanismos implican la participación de una serie de sustancias intracitoplasmáticas, conocidas como segundos mensajeros, que son ciertas sustancias lipídicas y proteínicas, que adquieren su carácter funcional al fosforilizarse esencialmente en los aminoácidos serina y treonina. Como consecuencia de estos eventos, se producirá finalmente la activación de la transcripción de los genes implicados en la síntesis de IL-2 u otros factores (Solheim, 1999).

La consecuencia final de este tipo de respuesta es la formación de células Th activas, productoras de interleuquinas y de células citotóxicas que poseen la capacidad de lisis de las células que portan el antígeno que indujo su activación. Este tipo de respuesta requiere varios días para su desarrollo.

## 2.5. Inmunidad de mucosas

El sistema inmune de las mucosas constituye la primera línea de defensa del organismo. Las membranas mucosas son la principal vía de entrada de

## Introducción

microorganismos, alérgenos y carcinógenos. La superficie más vulnerable y extensa es la mucosa gastrointestinal (200 veces mayor que la superficie cutánea), pero también son importantes las mucosas de las vías aéreas, urinaria y genital, así como la conjuntiva que recubre los ojos. Este sistema protector está formado por la mayor colección de células inmunocompetentes del organismo (Stokes *et al.*, 1989).

La inmunidad sistémica favorece las reacciones frente a antígenos extraños: reacciones específicas de citotoxicidad linfocitaria, citotoxicidad mediada por anticuerpos y la activación del complemento; por el contrario, la inmunidad de mucosas mantiene la absorción selectiva y la función de la barrera intestinal, a pesar del continuo estímulo antigénico, discriminando entre patógenos y moléculas de la dieta inofensivas. Estas respuestas se caracterizan por la hiperactividad de los mecanismos de inmunorregulación, que promueven la exclusión no agresiva de patógenos mediante anticuerpos protectores locales (IgA secretora), así como la supresión activa, tanto de las respuestas sistémicas específicas frente a antígenos inertes (tolerancia), como de la amplificación de los mecanismos efectores de la inmunidad innata (Oswald, 2006).

El tejido linfoide asociado al intestino es el lugar más importante de inducción del sistema inmune de las mucosas y, debido a su tamaño y características, también de la inmunidad adaptativa. Está formado por tejido linfoide organizado y especializado, con rasgos anatómicos que lo diferencian de otros tejidos linfoides secundarios (no posee cápsula definida ni vasos linfáticos aferentes). Contiene órganos bien definidos, como las placas de Peyer, que asientan preferentemente en el intestino delgado y están recubiertas por un epitelio especializado (células M) para el transporte de antígenos desde la luz (Bimczok *et al.*, 2006). También están presentes agregados celulares bien organizados (ganglios linfáticos mesentéricos) y células linfoides dispersas que se distribuyen en dos compartimentos, el epitelio y la lámina propia intestinal (donde predominan las células plasmáticas productoras de IgA).

Los linfocitos recirculan continuamente entre los órganos linfoides a través de los vasos sanguíneos y linfáticos. Las células T y B tienen propiedades de migración y asentamiento tisular características. Tras la estimulación en el GALT (tejido linfoide asociado al digestivo), la mayoría de estas células migran a los ganglios linfáticos regionales y, tras diferenciarse, pasan a la circulación. Son células de memoria estimuladas que expresan moléculas de adhesión (como la integrina  $\alpha E\beta 7$ ), cuyos

ligandos correspondientes (adhesinas) se encuentran en las células del endotelio de la lámina propia intestinal (así como en las placas de Peyer y en los ganglios linfáticos). Una subpoblación de células T migra al epitelio, donde son retenidas por la expresión de cadherina-E en los enterocitos. La diseminación integrada de células específicas del GALT a todos los tejidos exocrinos permite definir el concepto de MALT o sistema inmune común a las mucosas, base funcional de las vacunas orales (Snoek *et al.* 2006).

## 2.6. Respuesta inmune frente a diferentes microorganismos

Las respuestas inmunes contra los microorganismos, aunque múltiples y variadas, presentan algunas características generales. La primera de ellas consiste en que la defensa contra los agentes patógenos está mediada por mecanismos efectores, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. Muchos microorganismos han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir a la respuesta inmune innata y la protección contra ellos requiere la participación activa de la inmunidad adaptativa. Los agentes infecciosos pueden diferir mucho en sus patrones de invasión y de colonización, así como en la inmunogenicidad de sus antígenos. Por lo tanto, una respuesta inmune eficaz contra microorganismos distintos puede requerir la activación de diferentes tipos de mecanismos efectores, tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa.

La supervivencia y la patogenicidad de los microorganismos en el hospedador están influenciadas por su capacidad de evadir o resistir la inmunidad protectora, para lo cual han desarrollado diferentes estrategias. Otra característica en común es que en muchas infecciones, el daño tisular y la enfermedad producida puede ser la consecuencia de la propia respuesta inmune del hospedador contra el patógeno, más que de la acción del microorganismo en sí mismo.

### **2.6.a. Inmunidad frente a bacterias extracelulares**

Las bacterias extracelulares pueden causar enfermedad por dos mecanismos distintos. El primero es la inflamación, que provoca la destrucción de los tejidos en el sitio de infección; un ejemplo de ello son las infecciones producidas por *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. El segundo mecanismo consiste en la producción de toxinas con distintos efectos nocivos. La endotoxina de las bacterias Gram negativas es un potente estimulador de la producción de citoquinas y de la activación de los macrófagos. Muchas exotoxinas son citotóxicas, pudiendo matar por distintos mecanismos las

## *Introducción*

células a las que se fijan. Otras interfieren con las funciones celulares esenciales; por ejemplo, la toxina diftérica inhibe la síntesis proteica bloqueando la función del factor de elongación 2, necesario para la síntesis de todos los polipéptidos. Otro ejemplo serían algunas toxinas clostridiales, como las producidas por *Clostridium perfringens*, que provocan una extensa necrosis de los tejidos, que conduce a la gangrena gaseosa.

### 2.6.a.1. Inmunidad innata

Los mecanismos fundamentales de la inmunidad innata que actúan contra las bacterias extracelulares son la fagocitosis, la respuesta inflamatoria y la activación del sistema del complemento. Los fagocitos pueden unirse a las bacterias extracelulares mediante una serie de receptores y dicha interacción activa los fagocitos incrementando su capacidad fagocítica y microbicida. La activación de los fagocitos provoca la secreción de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y las interleuquinas IL-1, IL-6 e IL-8, que inducen la adhesión de neutrófilos y monocitos al endotelio vascular en el sitio de la infección, seguida de la migración, acumulación local y activación de las células inflamatorias que eliminan las bacterias. La activación del complemento en ausencia de anticuerpos también ejerce un papel importante en la eliminación de estas bacterias. El peptidoglicano de las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y el LPS de las paredes celulares Gram negativas activan la vía alternativa del complemento, promoviendo la formación de la convertasa del C3. Las bacterias que expresan manosa en su superficie pueden unir una lectina, homóloga al C1q, que activa el sistema de complemento por la vía de esta denominación. Como resultado de la activación de este sistema, se genera C3b que opsoniza las bacterias y mejora su fagocitosis. Igual sucede cuando se genera C5b. Además, la activación de la cascada del complemento podría terminar con la formación de complejos de ataque a las membranas y la consiguiente lisis bacteriana.

### 2.6.a.2. Inmunidad adaptativa

La inmunidad humoral es la principal respuesta específica protectora contra este tipo de bacterias. Los polisacáridos de las paredes celulares y de las cápsulas constituyen sus componentes más inmunógenos y son el prototipo de antígeno T independiente. Dichos antígenos estimulan las células B, que generan una respuesta específica de IgM, aunque también pueden sintetizarse otros isotipos de inmunoglobulinas. La liberación de citoquinas promueve el cambio de isotipo,

modificando las cadenas pesadas de la inmunoglobulina. Los anticuerpos producidos contra los antígenos de superficie (polisacáridos o proteicos) y las toxinas bacterianas estimulan tres tipos de mecanismos efectores:

- Las IgG opsonizan las bacterias favoreciendo la fagocitosis; estos anticuerpos se unen a los receptores Fcγ presentes en los monocitos, macrófagos y neutrófilos

- Las IgG y las IgM neutralizan las toxinas bacterianas impidiendo que se unan a sus células blanco, promoviendo su fagocitosis. En la mucosa respiratoria y gastrointestinal, la IgA secretora desempeña un papel importante en la neutralización de toxinas y en la prevención de la colonización de dichos tejidos

- Tanto la IgG como la IgM activan el sistema del complemento, lo que conduce a la formación, en la superficie bacteriana, de un complejo de ataque a la membrana, cuya función lítica es importante sólo para eliminar algunos microorganismos inflamatorios que finalizan con la producción del síndrome de choque tóxico

### **2.6.b. Inmunidad frente a bacterias intracelulares**

Algunas bacterias son capaces de sobrevivir y replicarse dentro de células del hospedador. Algunas incluso lo hacen dentro de los fagocitos. Como estas bacterias se encuentran en un nicho inaccesible a los anticuerpos circulantes, su eliminación requiere mecanismos inmunes distintos a los descritos para las bacterias extracelulares.

#### **2.6.b.1 Inmunidad innata**

Los mecanismos centrales de la inmunidad innata frente a estas bacterias incluyen la fagocitosis y la acción de células *natural killer* (NK). Sin embargo, las bacterias intracelulares son resistentes a la degradación dentro de los fagocitos mononucleares. Dicha resistencia permite que algunos patógenos intracelulares puedan permanecer durante largos períodos en el hospedador; por otro lado, las bacterias intracelulares inducen la activación de células NK, ya sea directamente o mediante la producción de citoquinas (específicamente, IL-12) derivadas de macrófagos. Las células NK activadas secretan interferón (IFN-γ), que es a su vez un potente activador de los macrófagos, mejorando su capacidad fagocítica y microbicida.

2.6.b.2. Inmunidad adaptativa

La principal respuesta inmune protectora contra las bacterias intracelulares está representada por la inmunidad mediada por células. Muchos antígenos proteicos de estas bacterias estimulan las respuestas de células Th y Tc y ambos tipos celulares contribuyen al desarrollo de la inmunidad protectora contra las bacterias intracelulares. Una función efectora central para eliminar estos microorganismos se encuentra mediada por macrófagos activados por citoquinas (particularmente, IFN- $\gamma$ ) derivadas de células Th1 activadas. Por otro lado, las mismas células Tc activadas pueden actuar como linfocitos citotóxicos sobre las células infectadas.

Las diferencias en el tipo de respuesta mediada por las células T pueden explicar las distintas manifestaciones clínicas que determinan la infección por un microorganismo en individuos diferentes. En algunas situaciones, esto se ha explicado por el entorno de las citoquinas secretadas en el transcurso de la respuesta, lo que determina la expansión de un grupo de células Th1 ó Th2, que inducen mecanismos efectores distintos: mientras que una respuesta de tipo 1 favorece la inmunidad celular y determina niveles bajos de anticuerpos, una de tipo 2 induce todo lo contrario.

Por otro lado, como ya se mencionó, estas bacterias han desarrollado mecanismos que las vuelven resistentes a la fagocitosis, por lo que persisten durante largos períodos aún en individuos con una inmunidad celular eficaz. Dicha persistencia genera una estimulación antigénica crónica, que puede conducir a la formación de colecciones locales de macrófagos activados (granulomas), que rodean los microorganismos impidiendo su diseminación. La inflamación granulomatosa es una característica histológica propia de muchas infecciones producidas por micobacterias, que se asocia con necrosis y fibrosis, conduciendo a lesiones funcionales graves. Así pues, la respuesta inmune del hospedador es la causa principal de la lesión tisular en muchas infecciones producidas por bacterias intracelulares, como las micobacterias. La respuesta inmune desarrollada frente a este tipo de infecciones puede variar entre los individuos, siendo determinante de la progresión de la enfermedad y del pronóstico clínico.

### 3. Enfermedad de Glässer

#### 3.1. Epidemiología

Esta enfermedad fue descrita por primera vez por K. Glässer en Alemania, en 1910, como una inflamación fibrinosa de las articulaciones de los cerdos jóvenes, asociada a condiciones estresantes de manejo o traslados, con alta mortalidad. Afecta ya a los lechones de una semana de vida, de cuyas fosas nasales se puede aislar *H. parasuis*, en ocasiones sin relación con cuadro clínico alguno (Rodríguez- Ferri *et al.*, 2000). *H. parasuis* representa una de las especies bacterianas más prevalentes en los lechones. En el aparato respiratorio, este microorganismo se comporta como un oportunista, que produce enfermedad asociado con otros agentes bacterianos o víricos.

La enfermedad se ha descrito principalmente en animales de entre dos semanas y cuatro meses de edad. Este proceso se vuelve más relevante cuando afecta a explotaciones libres de patógenos, donde los animales no han tenido contacto con la bacteria. Es en estos casos cuando produce mortalidad y morbilidad elevadas. El aparato respiratorio constituye la entrada habitual del agente, desde el que se puede difundir a todo el organismo y es un comensal común en las fosas nasales de los animales sanos (Vahle *et al.*, 1997).

La enfermedad de Glässer se ha descrito en un gran número de países, siendo muy diversa la distribución geográfica de los distintos serotipos, aunque siempre predominan algunos en particular. En América del Norte, Australia y Japón, los serotipos más frecuentes son el 4, el 5 y el 13, con un 15% (o incluso más, en el caso de Japón) de cepas no tipables (Rapp-Gabrielson *et al.*, 1992). En España, además se ha descrito una incidencia elevada de los serotipos 2 y 5 (Rubies *et al.*, 1999).

*H. parasuis* es un microorganismo muy lábil en las condiciones habituales de trabajo, en el medio ambiente y en los medios de cultivo. En estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio (Rodríguez- Ferri *et al.*, 2000) con el serotipo 5 (cepa Nagasaki) se puso de manifiesto que en un caldo de cultivo a base de BHI enriquecido con NAD y glucosa a temperatura ambiente, la viabilidad se anulaba a partir del cuarto día, prolongándose hasta el día 21 si se mantenía a 4°C. Con el uso de suero, la viabilidad aumentaba sustancialmente, especialmente a 4°C, ya que incluso podían recuperarse bacterias vivas hasta un mes después de iniciados los experimentos. Estos estudios

demonstraron que, pese a su extrema labilidad, la bacteria es capaz de sobrevivir algún tiempo protegida por la materia orgánica.

Otros estudios revelaron que hasta un 85% de los animales estudiados dentro de una misma explotación eran seropositivos (Moller *et al.*, 1993), pero sólo se podía aislar la bacteria del 30% de ellos. Este dato se puede justificar teniendo en cuenta que existen muchos serotipos apatógenos y que las técnicas de aislamiento poseen escasa sensibilidad y, sobre todo, que *H. parasuis* es un colonizador nasal muy precoz, que induce una respuesta de anticuerpos que no se corresponde con el padecimiento de la enfermedad.

### 3.2. Patogénesis

*H. parasuis* se transmite de forma directa, por contacto, o indirectamente a través de la vía aerógena, aunque la capacidad de difusión puede alcanzar alguna distancia por el aire. El proceso comienza con la presencia, como comensal, de *H. parasuis* en las fosas nasales; desde allí, podría pasar al oído y producir otitis media, o también ocasionar un proceso derivado de faringitis y sinusitis, que acabará en neumonía (Cu *et al.*, 1998). El microorganismo también puede entrar en contacto con la sangre (septicemia), lo que provocaría la muerte del animal o la colonización de las serosas, con la consiguiente producción de los cuadros típicos de meningitis, encefalitis y poliserositis, que con mucha probabilidad acabarán determinando también la muerte del animal (Amano *et al.*, 1997).

Valhe *et al.* (1997) estudiaron la patogenia y lesiones causadas por esta bacteria, tras la inoculación por vía intranasal de cerdos privados de calostro. A partir de las cuatro horas desde la infección, ya se observaba una infiltración de neutrófilos en la submucosa nasal, que se iba reduciendo en las horas posteriores. A las doce horas se aislaba la bacteria de la cavidad nasal y de la tráquea y, desde ese momento hasta la muerte del animal, la bacteria difundía a diferentes órganos, y tejidos, por el torrente circulatorio.

En 2003, Muller *et al.* estudiaron los cambios sanguíneos que se producían tras una infección con  $4 \times 10^{10}$  UFC del serotipo 5, por vía intratraqueal. Comprobaron que el número de leucocitos totales, la neumonía y la aparición de radicales libres se encontraban relacionados entre sí.

En *H. parasuis* podemos diferenciar dos grupos de cepas, las cepas virulentas y las no virulentas, que pueden encontrarse en el aparato respiratorio de animales sanos. Con la comparación de estos dos grupos podemos detectar factores de virulencia y sus mecanismos de acción; así, se puede estudiar la resistencia a la fagocitosis (Olvera *et al.*, 2009), la resistencia al suero (Cerde-Cúellar *et al.*, 2008) o la invasión de células endoteliales (Vanier *et al.*, 2006). Estos últimos investigadores comprobaron mediante estudios *in vitro* la capacidad de *H. parasuis* de invadir las células del endotelio microvascular del cerebro y Aragón *et al.* (2009) concluyeron que las cepas más virulentas de *H. parasuis* invadían las células endoteliales de manera mucho más eficaz que las cepas del epitelio nasal, poniendo de manifiesto el papel que desempeña la invasión en la virulencia de esta bacteria.

En nuestro laboratorio, se llevó a cabo un experimento con cerdos de unas ocho semanas, en los que la infección fue llevada a cabo mediante inoculación intratraqueal con el serotipo 5 de *H. parasuis*, a una dosis letal de  $5 \times 10^9$  UFC (Martín de la Fuente *et al.*, 2009). Se probaron diferentes composiciones vacunales, comparándolas con un grupo control, infectado pero no vacunado, que presentaba una sintomatología que variaba desde septicemia aguda con poliartritis y postración de los animales, hasta muerte rápida, en pocas horas.

### 3.3. Respuesta inmune frente a *H. parasuis*

#### **3.3.a. Inmunidad innata**

Como se ha señalado, con carácter general, la inmunidad innata es un mecanismo de defensa inespecífico al que recurre el hospedador de forma inmediata, o en el plazo de unas pocas horas, después de la exposición al agente patógeno. En dicha respuesta actúan como mediadores la fagocitosis y la activación del sistema de complemento. Paumusch *et al.* (1998) observaron, en experimentos llevados a cabo con cerdos infectados con *H. parasuis*, que los macrófagos alveolares y los neutrófilos no aumentaban la producción de óxido nítrico, pero estudios posteriores realizados por Muller *et al.* (2003) sí observaron que en los perfiles sanguíneos de los cerdos, después de la infección, aumentaban los radicales libres.

La primera barrera física de protección en el aparato respiratorio está representada por el propio epitelio recubierto de cilios y de moco, capaces de retener y

## *Introducción*

expulsar al exterior aerosoles que contengan microorganismos potencialmente patógenos. La segunda barrera la constituyen los macrófagos alveolares y otras células fagocíticas de la sangre, como los monocitos y los neutrófilos (Green *et al.*, 1977).

La exposición natural del hospedador a los microorganismos comensales con los que convive, desencadena respuestas de tipo humoral representadas por los anticuerpos naturales, los cuales pueden reconocer epítomos compartidos con otros microorganismos patógenos, actuando, directa o indirectamente, como una barrera complementaria de primera línea frente a la infección (Kearney *et al.*, 1984) activando el complemento por la vía clásica, con la consiguiente lisis bacteriana. Además, el complemento puede activarse por la vía alternativa, que junto con la de las lectinas, es capaz de activar este sistema en ausencia de anticuerpos y de generar el fragmento C3b que opsoniza la superficie bacteriana y facilita así el proceso de fagocitosis. Lillie *et al.* (2006) observaron, en el suero de animales convalecientes, la presencia de una proteína de 32 kDa capaz de unirse a la bacteria y también a microesferas de manosa-sacarosa. Comprobaron que la secuencia genética de esta proteína presentaba una gran homología con las lectinas de unión a manosa, lo que abriría la puerta para su posible intervención en fenómenos de activación del complemento.

Existen también mediadores químicos como las citoquinas, que se liberan tras la activación de los fagocitos, como ocurre en el caso del TNF- $\alpha$ , que ayudan a controlar la infección. El TNF- $\alpha$  es producido por macrófagos como respuesta al LPS liberado por las bacterias Gram negativas (Harding *et al.*, 1997).

### **3.3.b. Inmunidad adquirida**

En términos generales, la inmunidad adquirida puede dividirse en dos niveles de expresión independientes, pero interconectados, la inmunidad pasiva, que consiste en la transferencia de inmunoglobulinas desde la madre al recién nacido, a través del calostro, y la inmunidad activa, en la que participan las células B y T, dando lugar a dos formas clásicas de expresión, la inmunidad humoral y la de base celular.

#### **3.3.b.1. Inmunidad pasiva natural**

En el caso del cerdo, la inmunidad pasiva natural es generada por la madre y transmitida al recién nacido vía calostrado, porque en esta especie no existe transferencia de anticuerpos a través de la placenta.

Blanco *et al.* (2004) compararon el efecto de la infección con *H. parasuis* de cerdos criados de modo convencional y de cerdos privados de calostro. Con los primeros no fue posible reproducir la enfermedad, ya que estos animales presentaban anticuerpos frente a la bacteria por inmunización materna, mientras que en los cerdos privados de calostro se pudo reproducir perfectamente, además de otras ventajas relativas a la ausencia de contagio natural desde la madre y a la colonización precoz de las fosas nasales.

### 3.3.b.2. Inmunidad adquirida

#### 3.3.b.2.1. Respuesta humoral

Frente a *H. parasuis*, se han detectado anticuerpos específicos en suero, mediante diversas técnicas serológicas como la fijación del complemento, el *immunoblotting* y el ELISA, lo que pone de manifiesto la capacidad inmunógena de este agente.

Nielsen *et al.* (1993) demostraron la presencia de reacciones cruzadas entre los serotipos 1 y 3, igual que el serotipo 5 con el 2, 4, 6 y 7, mediante fijación del complemento, pero ni en un caso ni en otro, este hecho afectaba a la capacidad protectora neutralizante.

Miniats *et al.* (1991) detectaron también anticuerpos dirigidos frente a varias OMP, tras la inmunización con diferentes cepas de *H. parasuis*, pero no detectaron anticuerpos frente al lipooligosacárido. También observaron que los anticuerpos que se producían después de la inmunización con cepas poco virulentas no protegían frente al desafío heterólogo con otras cepas más virulentas.

En cualquier caso, se ha demostrado la existencia de una clara relación entre protección e inmunidad humoral, porque la inmunización con bacterinas originaba seroconversión, con el mantenimiento del título de anticuerpos durante un tiempo y la aparición de protección frente al desafío con el serotipo homólogo (Takahashi *et al.*, 2001; Martín de la Fuente *et al.*, 2009).

#### 3.3.b.2.2. Respuesta celular

Con carácter general, las citoquinas desempeñan un papel importante en la respuesta inmune adaptativa. Durante la infección bacteriana se secretan principalmente

## Introducción

IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8 (Lorenzo *et al.*, 2006). Cada una de estas citoquinas, que tienen carácter proinflamatorio, aparecen de manera sistémica (Van Reeth *et al.*, 2002). Si sus niveles llegan a resultar excesivos, producen daño tisular, choque endotóxico o incluso la muerte del animal (Murtaugh y Foss, 2002).

Los estudios llevados a cabo por Martín de la Fuente *et al.* (2009) pusieron de manifiesto la expresión de varias citoquinas en los ganglios linfáticos, pulmón, bazo y cerebro tras la infección por *H. parasuis* de cerdos privados de calostro, que habían sido inmunizados con diversas preparaciones vacunales. Se comparó la cantidad de las citoquinas expresadas en los animales supervivientes y en los que murieron y se encontró una diferencia entre ambos lotes, lo que pone de manifiesto el papel desempeñado por las citoquinas en la patogénesis de la enfermedad de Glässer.

### 3.4. Cuadro clínico y lesiones

Existen muchos signos clínicos que se asocian con la infección por *H. parasuis*, como la muerte súbita, los signos neurológicos, la anorexia, la pérdida de apetito, las alteraciones en las articulaciones, los problemas respiratorios, fiebre, abortos, descarga nasal, rinitis, periorquitis y presencia de exudado fibrinoso o fibrinopurulento en las superficies mucosas y en las articulares. Las diferencias en la capacidad para producir neumonía pueden deberse a las diferencias en la vía de infección, la dosis o el potencial patógeno de las cepas implicadas (Oliveira *et al.*, 2003).

La enfermedad afecta principalmente a animales de entre 5 y 12 semanas, en los que se aprecia hipertermia, inapetencia y apatía, en los primeros estadios. Se observan también problemas en la movilidad, debido a la inflamación de las articulaciones y, en algunos casos, se ve afectada la respiración, observándose disnea, con descarga nasal y taquicardia. Las lesiones más comunes son la poliserositis y la poliartritis fibrinopurulenta, en la que la fibrina se dispone en láminas o capas que pueden incluso cubrir los órganos. En las cavidades abdominal y torácica se aprecia líquido serofibrinoso y en las articulaciones, un líquido sinovial menos viscoso de lo normal. Cuando aparecen síntomas nerviosos, éstos suelen indicar meningitis, lo que anatomopatológicamente se manifiesta por una opacidad de las meninges y un aumento del líquido cefalorraquídeo (Segalés *et al.*, 1997).

En los casos septicémicos se observan petequias y equimosis en el hígado, riñón y meninges, así como trombos de fibrina en multitud de órganos. En ocasiones, puede observarse un cuadro septicémico agudo, con cianosis generalizada, edema subcutáneo y pulmonar, que puede ocasionar la muerte. En algunos animales se aprecia alteración de la coagulación de la sangre y un descenso del número de plaquetas. Cuando a estos animales se les realiza la necropsia, se observa congestión y edema en numerosos órganos. Las bacterias se localizan en pequeños vasos, así como en el interior del citoplasma de las células que constituyen el infiltrado inflamatorio (Amano *et al.*, 1997).

### 3.5. Diagnóstico

Aunque la historia clínica, los datos epidemiológicos y los antecedentes pueden resultar muy orientativos en el diagnóstico de la enfermedad de Glässer, es en el laboratorio donde el diagnóstico se convierte en definitivo.

#### **3.5.a. Diagnóstico directo**

Se lleva a cabo mediante el aislamiento de la bacteria a partir de cultivos de hisopos nasales, de las cavidades del animal y de los diferentes órganos, tanto afectados clínicamente como no afectados. El tiempo transcurrido entre la toma de muestras y la inoculación en los medios de cultivo para el aislamiento resulta muy importante. Lo ideal es que si la siembra no va a ser inmediata, se utilicen medios de transporte que mejoren la supervivencia de la bacteria y faciliten su recuperación. Entre los medios descritos para llevar a cabo el aislamiento podemos mencionar el agar sangre con una estría de *S. aureus* productor del factor V, el agar chocolate, el agar PPLO, el agar Levinthal, el de Gilbride y Rosendal o BHI suplementado con suero de caballo, extracto de levadura, glucosa y un 0,025% de NAD. Las condiciones de cultivo incluyen un periodo de incubación de 24-48 horas a 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub> (Rodríguez *et al.*, 2000).

Como claros inconvenientes de este tipo de diagnóstico podemos mencionar la alta probabilidad de contaminantes y los elevados requerimientos nutritivos que necesita *H. parasuis* para su crecimiento, que se traducen en un porcentaje de recuperación moderado, aún en presencia de clínica y lesiones sospechosas.

### **3.5.b. Diagnóstico indirecto**

#### **3.5.b.1. MÉTODOS SEROLÓGICOS**

##### **3.5.b.1.1. ELISA indirecto**

En la actualidad, los métodos serológicos se consideran poco específicos porque en condiciones naturales, la mayoría de los animales son portadores y, en consecuencia, presentan anticuerpos que no se relacionan directamente con la enfermedad clínica.

En una primera descripción de esta técnica se utilizó un antígeno bacteriano, sin tener en cuenta su virulencia ni su patogenicidad, obteniendo resultados poco específicos y sensibles. Posteriormente, se describió otro ELISA indirecto basado en la utilización de antígenos obtenidos a partir de un serotipo virulento (Segalés, 1996). Los niveles de sensibilidad y especificidad eran aceptables, aunque no discriminaba entre serotipos, debido a la existencia de reacciones cruzadas. La técnica ELISA también se ha utilizado para la detección de anticuerpos maternos, empleando como antígeno una suspensión en PBS de la misma cepa que se había utilizado para infectar a los animales, inactivada con formalina al 0,6% (Solano-Aguilar, 1999).

##### **3.5.b.1.2. Fijación del complemento**

Esta técnica se ha utilizado en el diagnóstico de la enfermedad de Glässer para la detección de anticuerpos circulantes en el suero de animales después de una infección experimental por aerosol o vía intranasal de cerdos SPF con 7 serotipos de referencia (Segalés *et al.*, 1997). Aunque los serotipos 1 y 5 resultaron patógenos y produjeron las lesiones típicas de la enfermedad de Glässer, la infección intranasal con los serotipos 2, 3, 4, 6 y 7 no produjo enfermedad, pero indujo la presencia de anticuerpos circulantes, detectados por fijación de complemento. Estos datos sugieren que los serotipos 1 y 5 podrían compartir determinantes antigénicos con los serotipos no patógenos, y que los anticuerpos fijadores del complemento no se producen, necesariamente, frente a los factores de virulencia propios de la bacteria.

Cuando se llevó a cabo la infección experimental con aerosoles que contenían los serotipos 2, 3, 4 y 7 (Nielsen, 1993), se observó que los cerdos resistían el desafío, producido dos semanas más tarde, con una cepa virulenta danesa perteneciente al serotipo 5. En estos animales pudo demostrarse la presencia de anticuerpos fijadores de complemento, aunque la inmunidad cruzada no se asoció a los títulos de los anticuerpos

por fijación de complemento, ya que, por ejemplo, los cerdos infectados con el serotipo 3 sólo indujeron anticuerpos frente a este serotipo, pero fueron capaces de resistir el desafío con una cepa del serotipo 5. Esto permite asegurar que esta técnica serológica no resulta muy adecuada como método de diagnóstico.

### 3.5.b.2. OTROS MÉTODOS INDIRECTOS DE BASE INMUNE

#### 3.5.b.2.1. Inmunohistoquímica

Se ha aplicado a la detección de *H. parasuis* en órganos que previamente habían sido fijados con formalina y embebidos en parafina, por medio de un sistema biotina-avidina inmunoperoxidasa. Se revela como una técnica sensible y muy específica en el pulmón, pero poco fiable en el moco traqueal, al obtenerse reacciones cruzadas con *A. pleuropneumoniae* (Segalés *et al.*, 1997).

Amano *et al.* (2004) detectaron la presencia de *H. parasuis* en lesiones de cerdos que habían sido infectados por vía intranasal. En este caso, el anticuerpo primario estaba marcado con biotina y se revelaba con estreptavidina-peroxidasa.

#### 3.5.b.2.2. Immunoblotting

Se ha descrito un *immunoblotting* que caracteriza el LOS mediante el empleo de anticuerpos policlonales y monoclonales frente a la cepa virulenta H54 del serotipo 2. La ventaja de este método reside en que en el LOS parece que se alojan determinantes antigénicos específicos de cada cepa, lo que puede resultar bastante útil en los estudios de carácter epidemiológico (Zucker *et al.*, 1994).

### 3.5.b.3. MÉTODOS MOLECULARES

#### 3.5.b.3.1. PCR basada en la secuencia del ARN 16S

Se ha utilizado la secuencia del ARNr 16S para sintetizar oligonucleótidos que amplificaban de forma específica un producto de 821 pb en *H. parasuis*, mientras que en otras especies relacionadas como *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida*, *A. porcinus*, *A. minor* o *A. suis*, el resultado fue negativo (Oliveira *et al.*, 2001). En el caso de *A. indolicus* solamente se detecta una banda de amplificación débil. Este sistema de PCR resulta adecuado para la identificación de *H. parasuis* tanto en cultivo puro como para

su detección en muestras clínicas. Puede utilizarse de forma alternativa a los métodos bioquímicos y resulta más específico que éstos en la detección de *H. parasuis*.

### 3.5.b.3.2. Sistema de identificación DIPTAR

De la Puente *et al.* (2001) desarrollaron un sistema de identificación a partir de una reacción de PCR para el gen *tbpA* con cebadores comunes a *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* y *A. suis*, que hibridaban en zonas homólogas. El producto de amplificación obtenido para *H. parasuis* fue de 1,9 kb, mientras que alcanzó 2,7 kb para las otras dos bacterias. La causa de la variación estribaba en que el oligonucleótido se anillaba dentro del gen *tbpA* en diferentes lugares para las tres especies.

### 3.5.b.3.3. Hibridación en placa (*Oligonucleotide-Specific Capture Plate Hybridization Assay, OSCPH*)

Calsamiglia *et al.* (1959) desarrollaron un sistema de hibridación captura en placa para la detección de manera rápida, específica y sensible de *H. parasuis* a partir de muestras de secreciones nasales. El método se basa en la amplificación del ARNr 16S con oligonucleótidos universales. Durante la PCR, el amplicón se marca con digoxigenina (dig-11-dUTP) y los oligonucleótidos que contienen las secuencias de *H. parasuis* específicas del ARNr 16S se marcan con biotina y se incuban en placas de ELISA cubiertas con estreptavidina. Después de la reacción de PCR, el producto de amplificación marcado con digoxigenina es capturado, de forma específica, por la sonda. Posteriormente, se añade a los pocillos un conjugado marcado con peroxidasa anti-digoxigenina. La reacción se revela a 405 nm, mediante la adición del sustrato y no se han demostrado reacciones cruzadas con otras especies bacterianas relacionadas, residentes habituales del tracto respiratorio.

### 3.6. Interacciones de *H. parasuis* con otros microorganismos. Complejo Respiratorio Porcino

La explotación intensiva ha cambiado sustancialmente los patrones patológicos de muchas especies. En el ganado porcino, por ejemplo, diversos agentes patógenos considerados secundarios se asocian con otros (bacterias y virus fundamentalmente) y dan lugar a complejos etiológicos que se traducen en procesos que comprometen la salud de los animales y son causa de pérdidas económicas importantes. El Complejo Respiratorio Porcino es, probablemente, el mejor ejemplo de este tipo de asociaciones y *H. parasuis* se convierte en un candidato permanente en la asociación con otras bacterias y virus.

#### **3.6.a. Interacción entre *H. parasuis* y *Streptococcus suis***

Los dos son colonizadores tempranos del tracto respiratorio superior y se transmiten verticalmente de las hembras a los lechones, en el momento del parto o durante las primeras horas después del nacimiento. El comienzo de ambas patologías se asocia con la desaparición de los anticuerpos maternos y con el porcentaje de lechones colonizados durante el destete. Aunque esta coinfección se observa muy frecuentemente, no se dispone de información sobre la interacción directa entre estos microorganismos. Las condiciones ambientales y la respuesta inmune frente a estos agentes parecen ser los factores relacionados con esta coinfección en el destete (Lars *et al.*, 2007).

#### **3.6.b. Interacción entre *H. parasuis* y el virus de la enfermedad de Aujeszky**

Narita *et al.* (1994) describieron dicha coinfección en cerdos obtenidos por cesárea, privados de calostro. Los cerdos con ambas infecciones presentaban recuentos menores de lo habitual de macrófagos y mayores de neutrófilos en el fluido obtenido a partir del lavado broncoalveolar. Además, en las necropsias se observó una neumonía purulenta grave y se aisló *H. parasuis* en cultivo puro de los pulmones. La coinfección del virus de Aujeszky y *H. parasuis* en el pulmón se confirmó mediante inmunohistoquímica.

### **3.6.c. Interacción entre *H. parasuis* y *Bordetella bronchiseptica***

Brockmeier *et al.* (2004) evaluaron la influencia de infecciones previas con *B. bronchiseptica* en la colonización de la cavidad nasal por *H. parasuis*. Los resultados demostraron que la exposición a *B. bronchiseptica* aumenta la colonización del tracto respiratorio superior por parte de *H. parasuis*. Aún no se han descrito las interacciones entre estos dos patógenos.

### **3.6.d. Interacción entre *H. parasuis* y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS)**

La interacción entre el virus del PRRS y *H. parasuis* es una de las asociaciones más comunes y evidentes en las granjas que sufren PRRS en el destete. En ellas se observa una incidencia más alta de cerdos con signos clínicos y lesiones características de la infección por *H. parasuis*. Solano *et al.* (1997) fueron los primeros en tratar de reproducir experimentalmente la interacción *in vivo* entre estos dos patógenos y aunque la mortalidad aumentó en cerdos infectados con ambos, la infección con PRRS seguida de *H. parasuis* no agravó la poliserositis, en comparación con el grupo inoculado solamente con *H. parasuis*.

Estudios posteriores sobre el efecto de la infección por PRRS, una vez que el sistema inmune ha eliminado *H. parasuis* mediante los macrófagos alveolares porcinos, demostraron que de *H. parasuis* no resultó afectado en los lechones que fueron expuestos al virus durante periodos cortos. Sin embargo, en etapas posteriores a la infección, los cerdos infectados por PRRS mostraban una capacidad disminuida de eliminar *H. parasuis*, con afectación del estallido respiratorio en la fagocitosis.

## **3.7. Prevención, control y erradicación de la enfermedad**

### **3.7.a. Prevención**

Los programas de prevención pueden estar basados en el empleo de vacunas y/o antibióticos; no obstante, es importante practicar normas de manejo adecuadas que reduzcan los agentes patógenos respiratorios. Entre éstas se incluyen, por ejemplo, el manejo sanitario correcto a fin de controlar el flujo de animales para evitar la mezcla en todas las fases de producción, el control de la temperatura de las salas, evitar el hacinamiento y todas las operaciones que conlleven la producción de estrés, evitar corrientes de aire, restringir en todo momento el acceso de personas y vehículos ajenos

a la explotación, controlar que cada lechón reciba la máxima cantidad de calostro posible y proporcionar una buena higiene dentro de las salas de parto.

### **3.7.b. Vacunación**

#### **3.7.b.1. Bacterinas**

Los primeros estudios que describieron el uso de bacterinas de *H. parasuis* fueron desarrollados por Smart y Miniats (1989). Las cepas de *H. parasuis* incluidas en el producto se inactivaron mediante formol y como adyuvante se utilizó hidróxido de aluminio. Se probaron varias bacterinas y cuando se producía la infección experimental con la cepa homóloga se observó que los animales inmunizados mantenían la temperatura corporal normal, así como el apetito y la actividad, mientras que los no inmunizados y sólo infectados mostraban signos clínicos de la enfermedad en un tiempo de 3 a 5 días después del desafío. En este mismo grupo (Miniats *et al.*, 1991), con el mismo protocolo, se demostró posteriormente que los cerdos vacunados desarrollaban inmunidad protectora contra la infección por *H. parasuis*, independientemente de la edad de los animales. Se encontró además una diferencia en la inmunidad protectora dependiendo de la cepa de *H. parasuis*, por lo que se especuló con una posible relación entre virulencia e inmunidad.

Posteriormente, Tahakahashi *et al.* (2001) utilizaron bacterinas que contenían los serotipos 2 y 5, formuladas con hidróxido de aluminio como adyuvante. Realizaron varias pruebas con diversas combinaciones de la cepa con la que habían sido vacunados los animales y con la cepa con la que fueron desafiados. Observaron que ninguno de los cerdos vacunados con la bacterina bivalente (serotipos 2 y 5), que habían sido desafiados independientemente con los serotipos 2 ó 5, mostraba signos clínicos de la enfermedad de Glässer. Además, los cerdos inmunizados con el serotipo 2 se encontraban protegidos contra el desafío con la cepa homóloga; sin embargo, cuando el desafío se producía con el serotipo 5, el 75% de los cerdos mostraba signos clínicos de la enfermedad, mientras que cuando se inmunizaba con el serotipo 5, la bacterina protegía frente al serotipo homólogo, pero no frente al serotipo 2. Estos resultados indicaban que la inmunidad inducida mediante inoculación era específica de cada serotipo.

## Introducción

Rapp-Gabrielson *et al.* (1992) inmunizaron cerdos privados de calostro con bacterinas de los serotipos 2, 4, 5, 12, 13 y 14, los más prevalentes en América del Norte y demostraron que el serotipo 5 protegía frente a la infección por el serotipo 4 pero no al contrario; sin embargo, el serotipo 5 protegía frente al 2, 12 y 13, pero no siempre; en definitiva, se trató de resultados escasamente concluyentes.

Estudios llevados a cabo por Bak y Riisin (2002) comprobaron la protección heteróloga de una bacterina del serotipo 5 frente a los serotipos 1, 12, 13 y 14, considerando como factor determinante la edad de los animales vacunados. Nuestro grupo de investigación (Martín de la Fuente *et al.*, 2009) ha puesto de manifiesto igualmente que la inmunización con una bacterina del serotipo 5 (cepa Nagasaki) resulta eficaz frente a la infección con el serotipo homólogo.

### 3.7.b.2. Vacunas recombinantes

Son vacunas obtenidas utilizando la tecnología del ADN recombinante en alguna etapa de su producción, en la que se aíslan y clonan los genes que codifican las proteínas inmunógenas y se introducen mediante técnicas de ingeniería genética en un hospedador alternativo no patógeno (bacterias, levaduras o células de mamíferos), que las producen en gran cantidad en el laboratorio. Esta técnica se utilizó por primera vez en 1986, con la producción de un antígeno del virus de la hepatitis B dentro de levaduras. La principal ventaja de estas vacunas reside en que ofrecen una mayor seguridad al no tener que inocularse el microorganismo entero, sino sólo las partes necesarias del agente, que estimulan una respuesta inmune protectora.

Diversas proteínas de membrana externa de *H. parasuis* se han considerado buenos inmunógenos candidatos (Ruiz *et al.*, 2001). Tadjine *et al.* (2004) llevaron a cabo estudios a partir de una proteína de la membrana externa de 35 kDa denominada OmpA y la recombinaron en *E. coli*, demostrando que era un buen antígeno, común a los serotipos 4 y 5. Las OMP recombinantes de otras bacterias Gram negativas relacionadas, como puede ser el caso de *P. multocida*, han sido consideradas buenas candidatas para el desarrollo de vacunas y con fines diagnósticos (Boyce *et al.*, 2006).

Estudios sobre el desarrollo de la respuesta inmune han revelado también la presencia de anticuerpos frente a diversas OMP de *H. parasuis*, pero no frente al lipopolisacárido, sugiriendo que estas proteínas resultan más inmunógenas que otros

componentes. Por esta razón, las posibles vacunas recombinantes basadas en OMP proporcionarían una protección parcial frente al desafío con *H. parasuis* (Martín de la Fuente *et al.*, 2009).

### 3.7.b.3. Vacunas futuras

Para el desarrollo de un buen producto vacunal es importante conocer si los antígenos son expresados durante toda la infección o solo en una etapa concreta. Una buena vacuna debe tener la habilidad de bloquear más de un paso durante la infección y por eso parece interesante la posibilidad de incluir en la composición de la vacuna, antígenos implicados en diferentes estadios de la infección. Existen datos que confirman que los autotransportadores monoméricos y triméricos (VtaA) de *H. parasuis* son antigénicos y se expresan *in vivo*, aunque resultan muy escasos *in vitro* (Olvera *et al.*, 2009); por ello, una mezcla de VtaA podría proteger parcialmente a los cerdos frente a la infección.

### 3.7.c. **Tratamiento**

En los brotes graves de enfermedad de Glässer, la utilización de antibióticos posee un valor escaso, debiéndose administrar dosis altas de los productos más convenientes al comienzo del proceso, en cuanto empiezan a manifestarse signos clínicos. Se debe tratar la totalidad del grupo, sin esperar a que manifiesten signos o síntomas. La mayoría de las cepas son sensibles *in vitro* a la ampicilina, fluoroquinolonas, cefalosporinas, gentamicina, espectinomicina y sulfamidas potenciadas (de la Fuente *et al.*, 2007) Por el contrario, se ha descrito un gran número de resistencias a tetraciclinas, eritromicina y lincosamida (Méndez- Trigo *et al.*, 1996).

La tilmicosina se utiliza bastante en el control de las enfermedades respiratorias en los ganados bovino y porcino. Se ha demostrado su actividad contra bacterias Gram negativas asociadas a cuadros respiratorios, como *P. multocida*, *M. haemolytica* y *A. pleuropneumoniae*. De Rosa *et al.* (2004) determinaron la susceptibilidad *in vitro* a la tilmicosina en patógenos respiratorios porcinos, entre ellos *H. parasuis*. La acumulación intracelular de tilmicosina en el punto de la infección ofrece un mecanismo único de liberación del antibiótico, lo que aumenta el número de bacterias ingeridas en los fagolisosomas, y la producción de enzimas como la fosfatasa ácida y la  $\beta$ -glucuronidasa.



## 4. Tecnología del ADN recombinante

La tecnología del ADN recombinante es el conjunto de técnicas que permiten aislar un gen de un determinado organismo, para su posterior manipulación e inserción, en su caso, en otro diferente. De esta manera, un organismo puede producir una proteína totalmente extraña. Entre sus aplicaciones, se encuentra precisamente la producción de grandes cantidades de proteína, como por ejemplo, de proteínas humanas en cantidad suficiente para que puedan ser utilizadas como fármacos (Herbertson, 2004). Las proteínas obtenidas mediante esta técnica se denominan proteínas recombinantes (ver apartado anterior).

La tecnología del ADN recombinante se desarrolla en tres pasos sucesivos: el aislamiento del gen de interés, su clonación y expresión, y la producción a gran escala del producto de su expresión, es decir la proteína codificada por el gen. Cada uno de estos procesos precisa de unas herramientas específicas.

### 4.1. Preparación del ADN recombinante

Para llevar a cabo la clonación es imprescindible fragmentar y aislar el ADN del que se parte, sea el ADN genómico total de un organismo de interés, el ADN sintetizado a partir de un molde de ARN por transcripción inversa, el ADN sintetizado por la reacción en cadena de la polimerasa o incluso el ADN sintetizado *in vitro*, a partir de nucleótidos. Si la fuente de la que se parte es el ADN genómico, generalmente se corta con enzimas de restricción para contar con una mezcla de fragmentos que unir mediante un vector de clonación.

Existe un grupo de enzimas con funciones diferentes, con gran aplicación en ingeniería genética. Nos referiremos con más detalle a las endonucleasas de restricción, o enzimas de restricción, y a la ADN ligasa, como herramientas útiles en el proceso de clonación de genes.

- Endonucleasas de restricción: Las endonucleasas son enzimas que cortan el ADN en secuencias específicas dentro de la molécula (al contrario que las exonucleasas, que digieren las moléculas de ADN por sus extremos). Estas enzimas se encuentran en una amplia variedad de especies bacterianas y su función biológica consiste en el reconocimiento y rotura del ADN ajeno que puede penetrar en la célula (por ejemplo, el

## Introducción

ADN procedente de bacteriófagos). De esta forma, estas endonucleasas restringen el funcionamiento de los fagos en el interior de la bacteria, motivo por el cual originalmente se les llamó enzimas de restricción. El ADN propio, sin embargo, no es digerido porque las bacterias cuentan con un mecanismo que impide que esto ocurra. Así, al conferir la naturaleza este sistema de defensa a las bacterias, otorgó también a los científicos un arsenal de enzimas muy específico para manipular el ADN (Akyuz *et al.*, 2002).

- ADN ligasa: La ADN ligasa es una enzima que posee la capacidad de formar enlaces fosfodiéster en una cadena de ADN rota, pudiendo unir covalentemente ADNs de diferentes orígenes para constituir moléculas híbridas. Existen diversos métodos en los que se aprovecha la acción de esta enzima para la unión del fragmento que se desea clonar con el vector. La selección de uno u otro depende de las características de los extremos de ambas moléculas de ADN.

### 4.2. Vectores de clonación

Los primeros experimentos destinados a producir proteínas humanas en microorganismos fallaron porque, a pesar de que se conseguía introducir el gen en la célula hospedadora que debía fabricar la proteína humana, en lugar de llevar a cabo este proceso, la célula o la degradaba o, a medida que la célula se dividía, sólo una de las células hijas recibía copia del gen, por lo que su presencia iba diluyéndose progresivamente. Estos problemas se fueron solucionando cuando se descubrió que se podía recurrir a los plásmidos.

Los plásmidos son moléculas de ADN circular que se encuentran en muchas bacterias y levaduras, y que se caracterizan porque pueden replicarse independientemente del genoma de la célula. Muchos de ellos contienen genes de resistencia a antibióticos, lo que permite distinguir las células que han incorporado el plásmido, dado que son capaces de crecer en un medio con el antibiótico, a diferencia de las demás. Los plásmidos permiten introducir el gen de interés en la célula hospedadora, por lo que actúan como vectores (Wang, 2002).

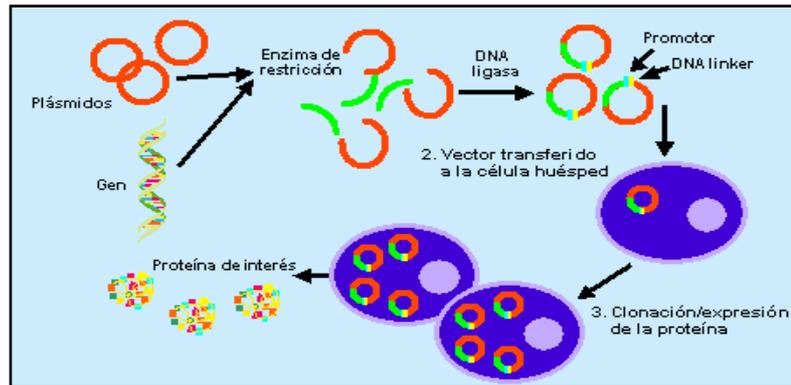
En la actualidad, además de los plásmidos, se utilizan como vectores de clonación los siguientes:

- Bacteriófagos: Son virus que infectan las bacterias y están constituidos, por un núcleo de ADN o ARN y una cubierta proteica. Todos ellos son incapaces de replicarse autónomamente, por lo que necesitan infectar la célula bacteriana para poder hacerlo. Son capaces de transportar fragmentos de hasta unas 45 kb de longitud. Dentro de los fagos más utilizados como vehículos moleculares de clonación, se encuentran el  $\lambda$  y sus derivados (Chan, 1995).

- Cósmidos: Son vectores híbridos desarrollados por combinación de plásmidos con el genoma del fago  $\lambda$ . Constan de una molécula de ADN de 5kb que porta genes de resistencia a antibióticos, el origen de replicación de un plásmido bacteriano, los extremos cos del ADN del fago  $\lambda$  y sitios únicos de restricción para la inserción del ADN a clonar. Son capaces de transportar fragmentos de hasta 50 kb de longitud. (Masai *et al.*, 2002).

- Fagémidos: Son vectores compuestos por un plásmido al que se le ha incorporado el origen de replicación de un fago filamentoso (fagos de ácido desoxirribonucleico ADN monocatenario), tales como el fago M13 ó F1. De este modo, mantiene todas las utilidades de los plásmidos pero además posee la capacidad de producir ADN monocatenario.

- "Cromosomas artificiales" de levadura: Además de los vectores anteriormente mencionados, existe otro tipo que permite clonar hebras de ADN de gran tamaño, que se conocen como cromosomas artificiales de levadura (YAC, del inglés "yeast artificial chromosome"). Este tipo de vector es capaz de replicarse en el hospedador *Saccharomyces cerevisiae* y su estructura es semejante a la de los cromosomas de las levaduras normales (Chae *et al.*, 2002).



**Figura 1.7.** Esquema de obtención proteínas recombinantes.  
(www.medicalbiochemistry.com)

### 4.3. Métodos de transformación celular

Una vez obtenido el ADN recombinante, el siguiente paso es introducirlo dentro de una célula hospedadora que le ofrezca la maquinaria necesaria para su autorreplicación. Existen diferentes métodos para llevarlo a cabo: electroporación, transfección mediada por calcio-fósforo o DEAE-dextrano (dietil-amino etil-dextrano), empleo de polibreno, fusión de protoplastos, empleo de liposomas, microinyección directa al núcleo, uso de virus y otros.

Se diferencian tres tipos de células hospedadoras: las bacterias, las levaduras y ciertas células eucariotas como las líneas celulares derivadas de algún mamífero. Cada uno de estos tipos celulares cuenta con ventajas e inconvenientes. Las bacterias se caracterizan porque su material genético es muy simple, suelen crecer muy rápido y las condiciones de crecimiento son bastante sencillas, pero poseen como inconveniente que no llevan a cabo algunas de las modificaciones que sí realizan las células eucariotas en las proteínas, por ejemplo, la glicosilación. Las levaduras y las líneas celulares son más complicadas, especialmente estas últimas, porque no crecen tan rápido y suelen ser más difíciles de tratar (Beitzinger, 2007). No obstante, la ventaja consiste en que ambos sistemas pueden llevar a cabo modificaciones como las descritas anteriormente.

### 4.4. Métodos para analizar clones

Un paso importante en el proceso de clonación es la identificación de los clones que contienen el ADN recombinante. Aún en las mejores condiciones, los plásmidos se mantienen de forma estable sólo en una minoría de la población bacteriana. Para identificar estos transformantes se emplean varios métodos.

La hibridación molecular es uno de los pilares de la mayor parte de las metodologías que se utilizan en Biología Molecular. Un grupo de estas técnicas se ha diseñado para identificar determinadas secuencias en los ácidos nucleicos. La hibridación se refiere al apareamiento específico que ocurre entre cadenas de ácidos nucleicos con secuencias complementarias, proceso que es análogo a la reacción antígeno-anticuerpo, pero con la diferencia de que en la hibridación en lugar de anticuerpos se emplean sondas. Las sondas son fragmentos cortos de ADN o ARN sintetizados *in vitro*, que se marcan con sustancias radiactivas fluorescentes o de otro tipo, a fin de hacer posible su detección posterior y, de esta manera, la identificación de la secuencia de ADN o ARN de interés.

A continuación, se señalan diferentes procedimientos de laboratorio que utilizan el principio de hibridación, en los que la variación viene dada por el tipo de ácido nucleico utilizado, el soporte en que se lleva a cabo la hibridación y la forma de colocar los ácidos en la membrana.

- *Southern blot*: Es una técnica empleada para detectar secuencias específicas de ADN. Para llevar a cabo hibridaciones de este tipo, se aísla el ADN de un tejido o línea celular, luego se purifica y se digiere con enzimas de restricción específicas. Los fragmentos generados se separan mediante electroforesis y después son transferidos a la membrana que sirve de soporte (gel de agarosa). Este proceso se lleva a cabo colocando el gel de agarosa sobre un papel filtro previamente humedecido en una solución de transferencia (solución salina concentrada). A continuación, se sitúa la membrana sobre el gel y encima de ésta varias capas de papel de filtro seco. Por capilaridad, la solución de transferencia es atraída hacia el de papel de filtro, arrastrando consigo al ADN hacia la membrana, donde queda inmovilizado, conservando la misma posición relativa que ocupaba en el gel. Luego, el ADN puede ser hibridado en la membrana con una sonda marcada.

Debido a que la transferencia del ADN del gel a la membrana se produce por capilaridad, con el mismo principio utilizado durante años para limpiar manchas con papel secante, el proceso se conoce en inglés como *blotting*. Southern propuso utilizar el término *blot* (secado) o *blotting* para referirse a esta técnica y actualmente se conoce como *Southern blot* (Mercado y Gamba, 1997).

## Introducción

- Northern blot: Es una variante del método anterior, en la que en lugar de utilizar ADN como sustrato de estudio, se emplea ARN. El procedimiento que se sigue es similar al del *Southern blot* y por analogía con éste se le conoce como *Northern blot*. Esta técnica se ha aplicado en estudios de la modulación de la síntesis de IL-6, en el análisis de expresión de receptores que participan en la síntesis de moléculas en cultivos celulares, en análisis de mutaciones y alteraciones del ARNm de enzimas, y en la regulación de la expresión génica de marcadores moleculares de células leucémicas humanas y moléculas de reconocimiento inmunológico.

- Western blot: No es un método de análisis directo de los ácidos nucleicos, sino del producto de la expresión de los genes, o sea, de las proteínas. Aunque difiere de los anteriores en cuanto a que no existe hibridación, sino que la identificación de las proteínas se realiza con anticuerpos marcados, se mantiene el principio de la transferencia a la membrana que sirve de soporte posterior a la electroforesis y previo a la identificación (Mercado y Gamba, 1997).

- Dot blot y slot blot: Su procedimiento es similar al *Northern*, con la diferencia de que el ARN no es sometido a electroforesis sino que se sitúa directamente sobre la membrana. Este tipo de análisis requiere un molde asociado a succión con vacío para colocar el ARN que puede producir círculos o puntos (*dot blot*) o hendiduras (*slot blot*). Este tipo de prueba resulta muy útil cuando se quiere estudiar gran número de muestras, pero presenta la limitación de no ofrecer información sobre el tamaño de las bandas del ARN hibridado (Correa-Rotter y Gamba, 1997).

### 4.5. Campos de aplicación de la tecnología del ADN recombinante

Uno de los principales objetivos de la Ingeniería Genética ha sido la producción de grandes cantidades de proteínas, que podrían resultar difíciles de obtener a partir de sus fuentes naturales, bien porque son producidas en baja concentración por la célula o porque su manipulación resulta demasiado peligrosa (Better y Freifelder, 1983). La importancia de obtener tales proteínas por esta vía estriba, entre otros aspectos, en su bajo costo de producción.

- Aplicaciones médicas: La producción de proteínas sintetizadas mediante ingeniería genética reviste utilidad médica de gran importancia en el caso de la producción de somatostatina, insulina o de la hormona del crecimiento. Se han llevado a

cabo interesantes avances con el maíz y la soja transgénicos para producir anticuerpos monoclonales para uso médico y también puede ser posible la utilización de plantas desarrolladas mediante ingeniería genética para producir vacunas orales (Prescott *et al.*, 2006).

- Aplicaciones industriales: Entre otras aplicaciones del ADN recombinante se encuentra la fabricación de productos proteicos utilizando bacterias, hongos y células de mamíferos cultivadas como verdaderas factorías. Una gran beneficiaria de estas técnicas es la industria farmacéutica.

- Aplicaciones en Agricultura: Se puede, mediante el ADN recombinante, transferir directamente las características deseables a animales y plantas. Así, se pueden aumentar tasas de crecimiento y la producción global de proteínas de los animales de granja. Se ha invertido también un esfuerzo considerable en la transferencia a otras plantas de cultivo, de las capacidades fijadoras de nitrógeno de las bacterias asociadas a las leguminosas pero, por ahora, las células receptoras no han sido capaces de fijar el nitrógeno. Las investigaciones en el campo de la Agricultura que más éxito han obtenido son las relacionadas con el desarrollo de plantas resistentes a las condiciones ambientales adversas.

#### 4.6. Proteínas recombinantes

En los últimos años han sido publicados diversos estudios focalizados a la optimización de la producción a gran escala de proteínas recombinantes (proteínas producidas en el laboratorio mediante ingeniería genética, en células distintas a las que se sintetizan en la naturaleza) para uso médico, veterinario e industrial. Aunque se han producido en células de mamíferos, insectos y levaduras, la bacteria *E. coli* continúa siendo el microorganismo más empleado para la expresión de genes heterólogos o recombinantes (Wu *et al.*, 2006).

Muchas proteínas heterólogas expresadas intracelularmente en *E. coli* se sintetizan rutinariamente con niveles superiores al 15% del total de proteínas celulares producidas en esta bacteria, a menudo en forma de agregados insolubles intracelulares, llamados cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión están determinados por una combinación de factores relativos a la velocidad de plegamiento y agregación,

## *Introducción*

solubilidad de la proteína, estabilidad termodinámica y plegamiento intermedio, así como por la susceptibilidad a la degradación proteolítica e interacción con chaperonas.

Al elegir un sistema de expresión de proteínas recombinantes para incrementar sus niveles de producción, deben tenerse en cuenta muchos factores. Éstos incluyen características del crecimiento celular, niveles de expresión, intracelular y extracelular, modificaciones post-traduccionales, actividad biológica de la proteína de interés, así como características especiales en el caso de la producción de proteínas terapéuticas.

## 5. Identificación de proteínas

En los últimos años, el gran avance tecnológico ha impulsado el desarrollo de estrategias, como la Genómica, Proteómica o Metabólica que permiten analizar los problemas biológicos desde un punto de vista global e integrado. Así, el desarrollo de la Genómica ha supuesto la identificación y anotación de una gran cantidad de genomas, tanto de eucariotas, como de procariontes. La Proteómica aborda el estudio global de las proteínas codificadas por estos genes, desde los puntos de vista funcional, estructural y de su relación con otras macromoléculas de la célula. De hecho, se define como el estudio del proteoma, entendido como el conjunto de proteínas que se expresan en una célula en un momento determinado y bajo unas condiciones ambientales definidas. El hecho de que las proteínas sean las moléculas biológicamente activas, con distintas actividades enzimáticas, estructurales o regulatorias convierte en indispensable su estudio directo, ya que del estudio de los genes que las codifican no puede obtenerse toda la información necesaria (Mendoza-Vargas *et al.*, 2009).

A diferencia del genoma, el proteoma es dinámico, ya que una misma información genética puede dar lugar a distintos proteomas según las condiciones de crecimiento o los procesos de diferenciación llevados a cabo por las células. Además, cada gen puede originar varias formas proteicas, según el procesamiento del ARNm y las modificaciones post-traduccionales que haya sufrido. Por lo tanto, el número de proteínas posibles de un proteoma es mucho mayor que el número de genes que contiene.

Los estudios proteómicos se basan fundamentalmente en dos tipos de técnicas: de separación y de identificación de proteínas. Dentro de las técnicas de separación de proteínas, las dos más utilizadas y con mayor poder de resolución para el estudio de mezclas proteicas complejas son la electroforesis dimensional en geles de poliacrilamida y la cromatografía multidimensional.

### 5.1. Estrategias de identificación de proteínas

La espectrometría de masas (MS), por su rapidez, sensibilidad y facilidad de automatización, ha desplazado a otras técnicas de identificación de proteínas como la secuenciación amino terminal. El primer paso para la identificación de proteínas es su digestión enzimática, habitualmente realizada con tripsina. El análisis mediante MS de

## Introducción

los péptidos obtenidos de dicha digestión permite, en la mayoría de las ocasiones, llegar a su identificación (Clockie, 2008). La identificación de proteínas separadas mediante geles, uni o bidimensionales, se suele realizar mediante la huella peptídica. Se basa en que, tras la digestión de una proteína con tripsina, se obtiene un conjunto de péptidos de tamaños determinados por su secuencia de aminoácidos, que la caracteriza como si de una huella se tratase (debido a que la tripsina corta específicamente después de los aminoácidos lisina y arginina).

La comparación del espectro de masas obtenido tras el análisis por espectrometría de los péptidos del digerido tríptico, mediante distintas herramientas bioinformáticas, con todos los espectros obtenidos de las digestiones teóricas de las secuencias proteicas depositadas en las bases de datos, permite en muchos casos la identificación proteica. Se trata de un método sencillo y fácil de automatizar, por lo que es la técnica de elección en aquellos casos en los que se trabaja con genomas secuenciados y anotados en bases de datos.

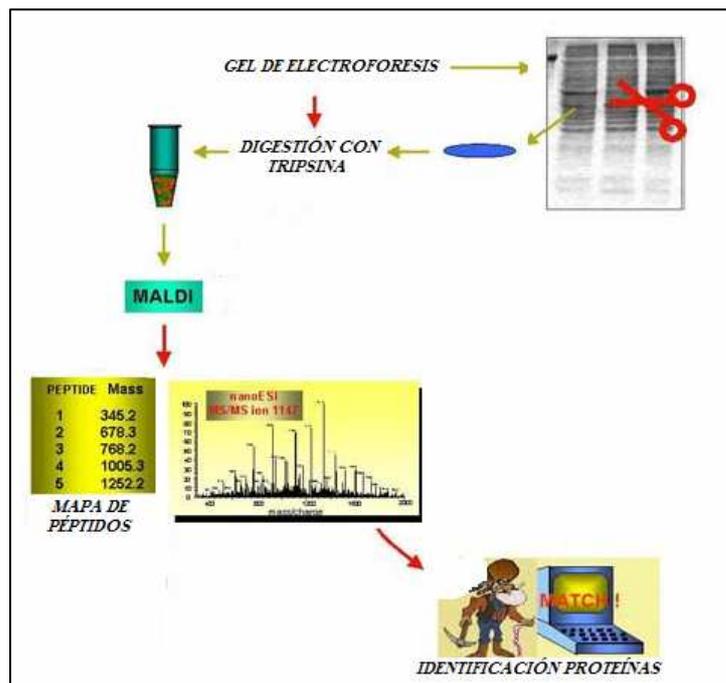


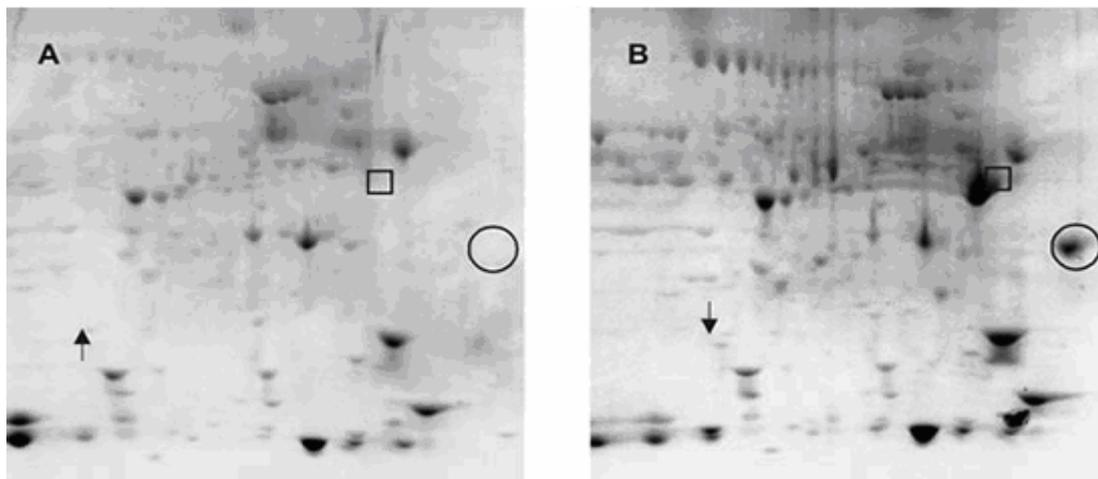
Figura 1.8. Esquema de los pasos en una identificación proteica ([www.newtechnicsproteomic](http://www.newtechnicsproteomic)).

## 5.2. Inmunoproteómica

Es un término utilizado habitualmente para describir el estudio de las proteínas involucradas en la respuesta inmune. Consiste en la identificación de aquellas proteínas que se expresan tras el desencadenamiento de una respuesta inmune inducida por un patógeno en un hospedador susceptible. En la actualidad, la inmunoproteómica esta siendo de gran utilidad para examinar la respuesta frente a las infecciones. El principal objetivo en toda esta clase de estudios ha sido el descubrimiento de nuevos marcadores o antígenos que puedan ser utilizadas como candidatos en el desarrollo potencial de vacunas y en la identificación de factores de virulencia.

La identificación de proteínas inmunógenas mediante una combinación entre geles de dos dimensiones e *immunoblotting* ha sido llevada a cabo en bacterias como *Streptococcus pyogenes* (Zhang *et al.*, 2008), *Borrelia garinii* (Teixeira-Gomes *et al.*, 1997), *Neisseria meningitidis* (Hsu *et al.*, 2008) o *Francisella tularensis* (Havlasova *et al.*, 2002).

Esta técnica se utiliza mucho con sueros de animales antes y después de las inmunizaciones o infecciones, con el fin de comparar la expresión diferencial y así poder determinar qué proteínas se expresan en determinadas condiciones.



**Figura 1.9** Ejemplo de geles de dos dimensiones sometidos a *immunoblotting* en un momento cero y después de un tratamiento particular. De esta manera podemos observar diferencias en la expresión de algunas proteínas y la aparición de otras nuevas. (Purcell *et al.*,2004).



## **II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**



En la actualidad, la enfermedad de Glässer, representa un determinante económico importante en las explotaciones porcinas. En el pasado, esta enfermedad se diagnosticaba esporádicamente y se asociaba a condiciones de estrés, pero hoy en día su prevalencia ha aumentado sustancialmente junto con la del resto de enfermedades respiratorias porcinas, integradas o independientemente del Complejo Respiratorio Porcino. En un sistema de producción intensiva, la enfermedad de Glässer se ve favorecida por las condiciones a las que son sometidos los animales: hacinamiento, transporte o manejo en circunstancias extremas, etc, lo que agrava la situación de estrés, a lo que además se suma en ocasiones un aumento en la virulencia del agente.

El control de la enfermedad causada por *H. parasuis* se lleva a cabo, principalmente, mediante el uso de bacterinas comerciales que poseen una eficacia limitada, vinculada al serotipo. La necesidad de una vacuna eficaz parece clara, sobre todo si se desea reducir el uso de antibióticos en producción animal y, por tanto, la aparición de las resistencias consecuentes a su utilización indiscriminada, entre otros inconvenientes.

Para lograr productos más eficaces en la inmunización se necesita un conocimiento mejor tanto de los factores de virulencia de *H. parasuis* como de la respuesta del hospedador. Así, por ejemplo, se sabe que las proteínas receptoras de hierro desempeñan un papel fundamental en la infección, ya que el hierro disponible en el hospedador resulta insuficiente para los requerimientos de cualquier bacteria y de ésta, en particular, con el fin de abastecer sus necesidades en funciones básicas, tales como el crecimiento o la multiplicación. Estudios previos llevados a cabo con *A. pleuropneumoniae* (Baltés *et al.*, 2003) hacen suponer que estas proteínas se encuentren estrechamente relacionadas con la patogenicidad y que representen, por tanto, dianas de interés como potenciales moléculas candidatas al desarrollo de un producto vacunal eficaz frente a la enfermedad de Glässer.

Esta Tesis Doctoral se plantea como continuación de estudios anteriores (de la Puente *et al.*, 2003; del Río *et al.*, 2004; Martín de la Fuente *et al.*, 2008), para profundizar en la caracterización de las proteínas receptoras del hierro y su posible carácter inmunógeno en el hospedador natural, así como con el propósito de contribuir al esclarecimiento de los mecanismos de la patogénesis de la enfermedad y de la respuesta inmune del cerdo frente a la infección por *H. parasuis*.

## **OBJETIVOS:**

En relación con el planteamiento anterior, se han definido los siguientes objetivos generales en esta Tesis Doctoral:

**1.** Producción de una proteína recombinante TbpA para su utilización como antígeno. Para ello es necesario llevar a cabo la determinación de la secuencia genética del gen *tbpA* que codifica la proteína TbpA del serotipo 5 de *H. parasuis*, llevar a cabo la expresión y purificación de una proteína recombinante TbpA (TbpA-r) y valorar su capacidad antigénica en una estrategia experimental con conejos, mediante la producción de anticuerpos policlonales.

**2.** Llevar a cabo una prueba experimental en el hospedador natural de la enfermedad de Glässer (cerdo), donde probar la capacidad inmunógena y protectora de varios antígenos basados en las proteínas implicadas en la captación y transporte del hierro frente al desafío con una dosis letal del agente etiológico. Dicha prueba será utilizada además, para analizar la diseminación de *H. parasuis* en el organismo y la presencia de actividad bactericida en los sueros de los animales inmunizados. El estudio incluye las siguientes determinaciones concretas:

**2.1.** Determinación de la respuesta de fase aguda tras la infección experimental y la consiguiente valoración de la influencia de la inmunización previa sobre su tendencia.

**2.2.** Estudio de la respuesta inmune humoral frente a la inmunización con diferentes preparados vacunales y el desafío posterior.

**2.3.** Identificación de las proteínas de unión a la transferrina presentes en el extracto utilizado como antígeno vacunal, para lograr su conocimiento particular y valorar su posible uso en potenciales formulaciones vacunales.

**2.4.** Estudio inmunoproteómico en algunos de los grupos experimentales de este trabajo, con el fin de determinar sobre qué proteínas se expresan anticuerpos (cantidad y calidad) a lo largo del estudio y poder identificar, por tanto, las más inmunógenas.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Cepas bacterianas

♦ *H. parasuis* serotipo 5, cepa de referencia Nagasaki, de la colección del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León.

♦ *Escherichia coli* TOP 10, del kit de clonación utilizado (*Expresión kit*, Invitrogen).

♦ *E. coli* LMG 194, para la expresión del producto clonado (*Expresión kit*, Invitrogen).

## 2. Medios de cultivo

### 2.1. Agar chocolate (BioMérieux)

Este medio sólido se utilizó en placas enriquecidas con Polyvitex<sup>®</sup>. Contiene por litro:

Biopeptona	15,00 g
Almidón de maíz	1,00 g
Fosfato dipotásico	4,00 g
Fosfato monopotásico	1,00 g
NaCl	5,00 g
Hemoglobina	10,00 g
Agar	10,00 g

### 2.2. Caldo Columbia (Difco)

Se prepara disolviendo 35 g en 1 litro de agua destilada y se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15 minutos. El medio está compuesto por:

Peptona	10,00 g
Biopeptona	10,00 g
Extracto de corazón de ternera	3,00 g
NaCl	5,00 g
Tris HCl 2M	86,00 g
Tris amino metano	0,83 g
Carbonato sódico	0,60 g
L- cisteína dihidroclorada	0,10 g
Sulfato de Magnesio	0,10 g
Sulfato ferroso	0,02 g

### 2.3. Agar sangre (BioMérieux)

Medio comercial dispensado en placas que contiene agar Columbia (caldo Columbia más 10% de agar) suplementado con un 5% de sangre de cordero.

### 2.4. Caldo de Triptona y Soja (TSB, Biolife)

Se prepara, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, disolviendo 30 g en 1 litro de agua destilada y mediante esterilización a 121°C durante 15 minutos en el autoclave. Dicho medio contiene:

Caseína pancreática	17,00 g
NaCl	5,00 g
Fosfato dipotásico	2,50 g
Glucosa monohidrato	2,50 g
Peptona de soja	2,50 g

### 2.5. Caldo y agar Luria Bertani (LB, Pronadisa)

En su forma sólida, se añade a la composición del medio 15 g de agar. El pH final se ajusta a 7,3 y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Dicho medio contiene por cada litro de agua destilada:

Triptona	10,00 g
NaCl	10,00 g
Extracto de levadura	5,00 g

### 2.6. Caldo y agar PPLO (Difco)

Para la preparación del medio sólido, se añade por cada litro de medio 15 g de agar. Se ajusta el pH a 7,6 y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

Dicho medio contiene por cada litro de agua destilada:

Extracto de corazón de ternera	5,00 g
Triptona	10,00 g
NaCl	5,00 g

## 2.7. Medio de congelación

Las cepas bacterianas se mantienen a -80°C en este medio de congelación, que se esteriliza a 110°C durante 10 minutos repartiendo luego en alícuotas de 1 ml. Para un volumen de 400 ml se añade:

Leche descremada	20,00 g
Triptona	10,00 g
Glicerol	80,00 ml

## 3. Antibióticos y suplementos

### 3.1. Ampicilina

Se prepara una solución stock, a una concentración de 100 mg/ml de ampicilina (Sigma), en agua destilada. La esterilización se lleva a cabo mediante filtración en filtros de 0,22 µm (Millipore).

### 3.2. Isovitalex

Una vez resuspendido, se esteriliza por filtración con filtros de 0,22 µm (Millipore) y se reparte en pequeños volúmenes (alícuotas). Por cada 100 ml de agua su composición es la siguiente:

Glucosa	1,00 g
NAD	0,10 g
L- cis HCl	2,60 g
L- cis dihidroclorhidrico	0,10 g
Glicina	10,00 g

### 3.3. Glucosa

Se prepara una solución stock de glucosa (Sigma) al 50% en agua destilada, se esteriliza con filtros de 0,22 µm (Millipore) y se conserva a 4°C hasta su uso.

### 3.4. NAD

Se prepara una solución stock de 20 mg/ml, que se esteriliza por filtración con filtros de 0,22 µm (Millipore), se distribuye en alícuotas y se almacena a -20°C hasta su utilización.

## 4. Productos y reactivos

### 4.1. Extracción de sobrenadantes ricos en proteínas de la membrana externa

#### 4.1.a. Solución de 2,2 dipiridilo (Sigma)

Se prepara una solución stock, a una concentración 0,1 M en etanol (Panreac), se distribuye en alícuotas y se almacena a -20°C.

#### 4.1.b. Deoxicolato sódico (Sigma)

Se prepara una solución stock a una concentración del 1% en agua destilada y se esteriliza por filtración usando filtros de 0,22 µm (Millipore).

#### 4.1.c. Tampón Tris HCl 1M, pH 8

Se disuelve 121,1 g de Trizma<sup>®</sup> base (Sigma) en 800 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 8 y se enrasa hasta llegar a un volumen final de 1 litro.

#### 4.1.d. Cloruro sódico 5M

Se disuelven 29,22 g en 100 ml de agua destilada.

### 4.2. Obtención de proteínas de fusión

#### 4.2.a. Arabinosa

Se prepara una solución stock al 20%, disolviendo 20 g en 100 ml de agua destilada.

#### 4.2.b. Tampón de lisis

Para un volumen final de 100 ml de agua destilada se preparaban:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M	0,30 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M	4,70 ml
NaCl 400 mM	2,30 g
KCl 100 mM	0,75 g
Triton X-100 al 0,5%	0,50 ml
Imidazol 10 mM	68,00 mg
Glicerol al 10%	10,00 ml
Inhibidor de proteasas	1,00 ml

A continuación, se esteriliza con filtros de 0,22 µm (Millipore).

#### 4.2.c. Tampón de unión y lavado

Para un volumen final de 100 ml de agua destilada se prepara:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06 g
NaCl	1,70 g
Imidazol	0,07 g

A continuación, se esteriliza con filtros de 0,22 µm (Millipore).

#### 4.2.d. Tampón de elución

Para un volumen final de 100 ml de agua destilada se prepara:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,60 g
NaCl	1,70 g
Imidazol	1,70 g

A continuación, se esteriliza con filtros de 0,22 µm (Millipore).

### 4.3. Obtención de proteínas de unión a la transferrina

#### 4.3.a. Tampón PBS

Para un volumen final de 1 litro de agua destilada, se ajusta a pH 7,6 y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Se conserva a 4°C. Su composición es:

NaCl	7,65 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,24 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27 g

#### 4.3.b. Tampón de unión

Su pH se ajusta a 8,3. Se filtra y conserva a 4°C hasta el momento de su uso.

Para un volumen final de 200 ml de agua destilada, se añade:

NaHCO <sub>3</sub> 0,1 M	1,68 g
NaCl 0,5 M	5,84 g

#### 4.3.c. Tampón de lavado 1

Su pH se ajusta a 4. Para un volumen final de 100 ml de agua destilada, se añade:

NaCl 0,5 M	2,92 g
CH <sub>3</sub> COONa 0,1 M	4,03 g

#### 4.3.d. Tampón de lavado 2

Su pH se ajusta a 8. Para un volumen final de 100 ml de agua destilada, se añade:

Tris HCl 0,1 M	1,57 g
NaCl 0,5 M	2,92 g

#### 4.3.e. Tampón de bloqueo

Se prepara para el bloqueo una solución Tris HCl 0,1 M, disolviendo en 100 ml de agua destilada 1,21 g de Tris HCl y ajustando su pH a 8.

#### 4.3.f. Tampón Tris HCl

Para la preparación de una solución de Tris HCl 1 M, se disuelven 7,89 g de TrisHCl en 50 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 9 y se filtra, antes de almacenar a 4°C hasta su uso.

#### 4.3.g. Tampón de elución

Consiste en una solución de guanidina hidroclicorhidrica 2M. Para su obtención, se disuelven 38,21 g en 200 ml, se filtra y se almacena a 4°C.

### 4.4. Valoración de la concentración de proteína total

Para valorar la concentración proteica se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976). El reactivo está compuesto por azul de Coomassie, metanol y ácido fosfórico (*Dye reagent concentrate*, Biorad). La reacción se basa en el principio de que el colorante se une de forma específica a las proteínas, de tal forma que en presencia de la solución ácida, su absorbancia vira de 465 a 595 nm. Para la preparación de los estándares con concentraciones conocidas se utiliza la albúmina sérica bovina (Sigma), que permite la elaboración de una recta patrón.

#### 4.5. Electroforesis en gel de agarosa

##### 4.5.a. **Tampón de carga 6X**

La composición por 100 ml de agua libre de ADNasa es la siguiente:

Azul de bromofenol al 0,25%	0,25 g
Xilencioanol al 0,25%	0,25 g
Sacarosa al 40%	40,00 g

##### 4.5.b. **Tampón Tris- Borato-EDTA 5X (TBE)**

Este tampón se prepara al 5X, pero se emplea diluido 5 veces en agua destilada (1X). Tras su preparación, se conserva a 4°C. Su composición por cada litro de agua destilada es la siguiente:

Trizma <sup>®</sup> base	54,00 g
Ácido bórico	27,50 g
EDTA 0,5M pH 8	2,00 ml

##### 4.5.c. **Tampón Tris EDTA**

Este tampón contiene por cada litro de agua destilada:

Trizma <sup>®</sup> base 10 mM	1,21 g
EDTA 1 mM pH 8	0,42 g

#### 4.6. ELISA

##### 4.6.a. **Tampón fosfato**

Se disuelven las cuatro sales que figuran a continuación en 800 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 7,2, antes de enrasar hasta 1 litro con agua destilada.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
NaCl	8,18 g
KCl	0,20 g

#### **4.6.b. Tampón carbonato**

Se disuelven las sales enumeradas en 100 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 9,6 con HCl 1M, y se enrasa hasta un volumen final de 200 ml con agua destilada.

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3,18 g
NaHCO <sub>3</sub>	5,86 g
NaN <sub>3</sub>	0,40 g

#### **4.6.c. Tampón de lavado**

Se añade lentamente Tween-20 (Sigma) al tampón fosfato hasta una concentración final del 0,05%.

#### **4.6.d. Tampón de bloqueo**

Se prepara añadiendo al tampón de lavado, suero bovino fetal hasta una concentración final del 5%.

#### **4.6.e. Tampón de dilución del conjugado**

Se prepara añadiendo al tampón de lavado, albúmina sérica bovina (Sigma), hasta una concentración final del 0,1%.

#### **4.6.f. Sustrato TMB (3,3',5,5' - tetrametilbenzidina)**

Se prepara disolviendo 100 mg de TMB (Sigma) en 10 ml de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma), hasta una concentración final 42 mM. Se conserva a temperatura ambiente, protegido de la luz.

### **4.7. SDS-PAGE. Electroforesis**

Se utilizan geles de poliacrilamida (solución al 29% de acrilamida + 1% de bisacrilamida, Sigma), a una concentración del 5% para el gel concentrador y del 12% para el gel separador. Para la preparación de los geles y el desarrollo de la electroforesis son necesarios:

**4.7.a. Gel separador**

Agua destilada	3,00 ml
Trizma <sup>®</sup> base pH 8,8; 1,5 M	2,50 ml
SDS al 10%	100 µl
Solución de acrilamida/bisacrilamida	4,00 ml
Persulfato amónico al 10%	100 µl
TEMED	4 µl

**4.7.b. Gel concentrador**

Agua destilada	1,40 ml
Trizma <sup>®</sup> base pH 6,8; 0,5 M	0,30 ml
SDS al 10%	20 µl
Solución de acrilamida/bisacrilamida	0,60 ml
Persulfato amónico al 10%	20 µl
TEMED	2 µl

**4.7.c. Tampón de electroforesis 5X**

Se añaden lentamente los diferentes compuestos, mientras se calienta suavemente hasta su disolución total. La concentración de uso es de 1X. La solución stock se conserva a 4°C. Su composición es:

Trizma <sup>®</sup> base 25 mM	15,00 g
Glicina pH 8,3; 192 mM	72,00 g
SDS al 0,1%	5,00 g

**4.7.d. Tampón de carga de proteínas**

Para un volumen final de 100 ml de agua destilada se añaden:

Trizma <sup>®</sup> base 25 mM	0,60 g
SDS	1,00 g
Azul de bromofenol	5,00 g

**4.8. Tinción de geles (azul de Coomassie)**

Se emplea una solución de tinte basada en azul de Coomassie y una solución de destinte para visualizar la aparición de las bandas.

#### 4.8.a. Solución de tñido

Para un volumen final de 500 ml se necesita:

Azul de Coomassie al 0,1%	0,50 g
Metanol al 40%	200 ml
Ácido acético glacial al 10%	50 ml
Agua destilada	250 ml

#### 4.8.b. Solución de desteñido

Para un volumen final de 1 litro de se incorpora:

Metanol al 40%	400 ml
Ácido acético glacial al 10%	100 ml
Agua destilada	500 ml

### 4.9. Immunoblotting

#### 4.9.a. Tampón de transferencia

Se prepara concentrado 10X y se utiliza diluido 1/10 en agua destilada con un 70% de metanol. Para un volumen final de 1 litro de agua destilada se añaden:

Tris HCl	30,30 g
Glicina	144,40 g

#### 4.9.b. Tampón TBS

Se prepara concentrado 10X y se utiliza diluido 1/10 en agua destilada. Se ajusta el pH a 8. Cuando se prepara el tampón 10X, debido a la gran concentración de los componentes, debe agitarse la solución y calentarse suavemente. Para un volumen final de 1 litro de agua destilada se añaden:

Tris HCl	30,00 g
NaCl	80,00 g
KCl	2,00 g

#### 4.9.c. Tampón de bloqueo

Se utiliza para el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa. Para un volumen final de 100 ml se añaden 10 g de leche descremada (Pronadisa) (concentración final del 10%).

#### **4.9.d. Tampón TBS-Tween 20 (TTBS)**

Se añade al tampón TBS 1X una concentración de Tween 20 al 0,05%.

#### **4.9.e. Revelado de bandas**

Para visualizar las bandas de las distintas proteínas de la muestra, en la membrana de nitrocelulosa se utilizó la tinción de rojo Ponceau (Bjellquist *et al.*, 1993). Brevemente, se prepara una solución que contiene 0,5 g de rojo Ponceau en 1 ml de ácido acético glacial y después se enrasa hasta 100ml con agua destilada. Para eliminar el exceso de colorante de la membrana de nitrocelulosa, se practican sucesivos lavados con solución salina estéril (0,9 g NaCl/litro de agua destilada).

### 4.10. Identificación de proteínas

#### **4.10.a. Tinción por Coomassie coloidal**

El gel se fija con un 50% de etanol y un 2% de ácido fosfórico durante 3 horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se efectúa tres lavados de 10 minutos con agua milli Q y se añade la solución de tinte compuesta por 33 ml de agua, 8,5 g de sulfato de amonio, 1,5 ml de ácido fosfórico y 16,5 ml de metanol. Una vez que el gel se ha incubado, al menos durante una hora en esta solución, se añade el azul de Coomassie (0,033 g en 2 ml de metanol). La tinción se mantiene toda la noche a 4°C y al día siguiente se efectúa los lavados oportunos con agua hasta que se aprecian bien las bandas proteicas de la muestra (Bjellquist *et al.*, 1993).

### 4.11. Inmunoproteómica

#### **4.11.a. Precipitación tricloroacético/acetona**

Para un volumen de 3 ml de muestra se añade un 15% de ácido tricloroacético y se mantiene en hielo durante 1 hora. Se centrifuga 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C y se elimina el sobrenadante. El pellet se resuspende en 1,5 ml de acetona y se mantiene toda la noche a -20°C. Transcurrido este tiempo, se centrifuga 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C y se elimina el sobrenadante. El pellet se resuspende en tampón de rehidratación específico para geles de electroforesis de dos dimensiones (Bjellquist *et al.*, 1993).

#### 4.11.b. Tampón de hidratación

Se compone de tampón de lisis (7 M de urea + 2 M tiourea + 2% CHAPS), anfolitos y DTT 1 M.

#### 4.11.c. Método “RC DC” de medida de la concentración proteica

Inicialmente, se traza una recta patrón con albúmina sérica bovina. Se prepara las muestras hasta 5 µl con 20 µl de agua y a cada muestra se añaden 125 µl del reactivo comercial I, se agita y se incuba 1 minuto. Se añaden 125 µl del reactivo II, se agita y se centrifuga a 13.000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante, el pellet se seca al aire y se añaden 125 µl del reactivo I, se agita y se incuba 1 minuto. Se añaden 40 µl del reactivo II, se agita y se centrifuga a 13.000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos y se deja secar. A lo anterior se le añaden 127 µl de buffer A y se incuba unos 5 minutos, hasta su completa disolución. Se añade 1 ml de reactivo B y se incuba a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se mide la absorbancia a 750 nm y se conoce la concentración de la muestra problema mediante la recta patrón con albúmina sérica bovina (*kit RC DC*, Invitrogen).

#### 4.11.d. Preparación de geles de dos dimensiones (para dos geles)

Acrilamida/bis- acrilamida	104,16 ml
Tris 1,5 M, pH 8,8	62,50 ml
Agua milli Q	77,91 ml
SDS al 10%	5,00 ml
TEMED	34,58 µl
PSA al 10%	2,50 ml

Esta mezcla se añade en el polimerizador, se incorpora isopropanol al 30% para que el frente de los geles quede lo más recto posible y se mantiene 1 hora a temperatura ambiente para comprobar la correcta polimerización. Transcurrido este tiempo, se elimina el isopropanol, se añade agua milli Q y se mantiene toda la noche a 4°C (Bjellquist *et al.*, 1993).

#### 4.11.e. Tampón de equilibrado

Urea	72,00 g
Tris HCl 0,5 M, pH 6,5	20,00 ml
Glicerol	60,00 ml
SDS	4,00 g
Agua milli Q	120,00 ml

#### 4.11.f. Tampón de electroforesis 10X

Tris	30,28 g
Glicina	144,00 g
SDS	10,00 g
Agua milli Q	1000 ml

Para su uso se prepara al 1X.

## 5. Laboratorios e instalaciones utilizadas

La mayoría de los trabajos experimentales se realizaron en la Unidad de Microbiología e Inmunología, del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León.

Sin embargo, el diseño de la proteína recombinante TbpA se realizó en el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad Complutense de Madrid, mientras que la producción de anticuerpos policlonales en conejos frente a las proteínas recombinantes TbpA y TbpB fue llevada a cabo en las instalaciones del Animalario de la Universidad de León, al igual que el cuidado y mantenimiento de los cerdos privados de calostro, en los primeros días de vida.

Las pruebas de inmunización e infección de los cerdos privados de calostro se llevaron a cabo en una granja experimental amablemente cedida por Laboratorios SYVA S.A. El estudio anatomopatológico se realizó en la Unidad de Anatomía Patológica, del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León. El estudio de las proteínas de respuesta de fase aguda se efectuó en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, mientras que el estudio de identificación de proteínas e inmunoproteómica se llevo a cabo en la Unidad de Proteómica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.



## 6. Obtención de la proteína TbpA recombinante

### 6.1. Cepas y medios de cultivo

La cepa empleada fue la cepa Nagasaki, de referencia del serotipo 5 de *H. parasuis*. De *E. coli* empleamos la cepa *E. coli* TOP10 (dentro del kit de clonación de células competentes), que sirvió para los primeros procesos de clonación, y *E. coli* LMG 194, para la expresión del producto clonado. Como plásmido se empleó el pBAD/Thio Fusion Expresión Kit (Invitrogen).

*H. parasuis* se siembra en placas de agar chocolate (Oxoid) e incuba durante 24 horas a 37°C; *E. coli* TOP10 y LMG194, en medio LB (Luria Bertani, Difco) suplementado con ampicilina (100 µg/ml, Sigma). Para producir la actividad quelante del hierro se utiliza 2,2 dipiridilo 100 µM (Sigma), que se añade al 0,025% en un medio PPLO (Difco) suplementado con NAD (del Río *et al.*, 2005).

### 6.2. Extracción del ADN y amplificación mediante PCR

Para la extracción del ADN, el crecimiento de *H. parasuis* se centrifuga a 3.000 g durante 10 minutos a 4°C y el pellet obtenido se lava dos veces con tampón TE (10 mM Tris- HCl [pH 8,0], 1mM EDTA) y se lisa en un nuevo tampón (0,5 M EDTA [pH 8.,0], 20% SDS y 50 mg/ml de proteínasa K), incubándose durante 1 hora a 55°C. Se añade ADNasa y ARNasa (100 µg/ml, Roche) y se incuba durante 20 minutos a 37°C. Las proteínas se eliminan mediante la adición de fenol al 0,25% equilibrado en tampón TE (pH 7,8) y el ADN se purifica mediante repetidas series de adiciones de cloroformo-isoamílico (24:1) y se precipita con la adición de 0,1 volumen de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y de 1 volumen de isopropanol. El ADN se lava dos veces en etanol al 70% y, tras secar perfectamente, se resuspende en agua destilada y se conserva a -20°C hasta el momento de uso (del Río *et al.*, 2005).

Para el análisis cuantitativo y cualitativo del ADN se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa horizontal. En todos los casos se empleó agarosa comercial (Pronadisa) como matriz separadora, a concentraciones que oscilaron entre el 0,8 y el 2%. Las concentraciones menores de agarosa permiten la separación de fragmentos grandes de ADN, mientras que las mayores facilitan la separación de fragmentos pequeños. Para la realización de la electroforesis, los geles sumergidos en el

tampón de electroforesis TBE 0,5X se introducen en las cubetas de electroforesis (Biorad), suministrando una corriente continua de 100 voltios. El marcador de peso molecular utilizado fue el 1 Kb *ladder* (Biotools), a una concentración de 0,2 mg/ml, mientras que la tinción de los ácidos nucleicos se realizó mediante el agente intercalante bromuro de etidio (Sigma), añadido a los geles de agarosa a una concentración de 0,5 µg/ml. Los geles se fotografiaron mediante un sistema de vídeo (Biorad).

Con el ADN extraído se realizó una PCR para la amplificación del gen *tbpA*, utilizando los cebadores TbpAF (5´ TGGTGGCTTCTATGGTCCAA 3´), diseñado para esta Tesis Doctoral, y RTC 33 (5´ AAGCTTGAAACTAAGGTACTCTAA 3´) (de la Puente Redondo *et al.*, 2003). La mezcla para la reacción de la PCR consiste en: 3 µl de ADN genómico extraído, 1 U de *Taq* polimerasa (Roche Diagnostic), 5 µl de 10X tampón PCR de amplificación, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de cada uno de los cebadores (20 µM), 0,5 µl de dNTPs (25 mM cada uno) y agua destilada hasta un volumen final de 50 µl. La reacción se lleva a cabo en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), con un programa de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C, 3 minutos a 72°C y, por último, 10 minutos a 72°C.

### 6.3. Extracción de ADN a partir de geles de agarosa. Elección del fragmento antigénico.

La extracción del ADN de los geles de agarosa se llevó a cabo mediante el kit “*Wizard® SV Gel and PCR Clean- Up System*” (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema está indicado para la purificación rápida de cantidades de fragmentos de ADN superiores a 10 µg a partir de geles de agarosa. Se basa en el paso por columnas específicas que disponen de una membrana de fibra de vidrio con propiedades de unión selectiva al ADN. El ADN se cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa por comparación frente a un marcador de peso molecular de concentración conocida y mediante la medición de la absorbancia de la muestra a 260 nm, en un espectrofotómetro modelo BioPhotometer.

Una vez obtenido el producto de PCR amplificado, fue secuenciado en Sacugen S.L. (Madrid), que utilizaba un capilar “*Abi- prism*” para estudiar la secuencia nucleotídica del gen *tbpA*, poder seleccionar un fragmento muy conservado en las especies relacionadas y estudiar, a su vez, otras características como la hidrofobicidad.

La secuencia obtenida se analizó mediante el programa BLAST (del NCBI) para comprobar la homología de las secuencias con las especies relacionadas y con otras secuenciaciones del gen *tbpA*. También se estudió la secuencia del gen *tbpA* con programas informáticos (DNAMAN y PLOSTRUCTURE) que proporcionan modelos de predicción de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas.

Con todo ello, se decidió emplear un fragmento nucleotídico, comprendido entre las posiciones 301 y 901 de la secuencia del gen, es decir, 600 nucleótidos o, lo que es lo mismo, 200 aminoácidos intermedios. A partir de esta elección se diseñaron los cebadores que amplificaron este fragmento: GJM-F (5´GGCTTGGCATTGGATGGG TTG3´) y GJM-R (5´ AACCAACCAAGAATCAGATTT 3´). Para la PCR se adoptó un protocolo normal, pero alargando el tiempo de extensión a treinta minutos. Se preparó un gel de agarosa para comprobar la existencia de la banda en cuestión a su tamaño adecuado, se purificó el producto de la PCR y se secuenció con diferentes combinaciones de cebadores, para comprobar la calidad del inserto y su colocación en la dirección correcta.

#### 6.4. Clonaje, expresión y solubilización del fragmento proteico.

Una vez obtenido el fragmento amplificado con los cebadores GJM-F y GJM-R, se llevó a cabo la clonación. Se eligió el pBAD/TOPO *Thiofusion Expression Kit* (Invitrogen), que utiliza la actividad topoisomerasa I del propio vector. En la PCR, la enzima *Taq*-polimerasa añade adenina a los extremos 5´ y 3´ del producto de la PCR al final de cada ciclo, en la fase de extensión. La adenina se unía a la timina del vector TOPO en el sitio de clonaje múltiple. Este vector contiene en su extremo N-terminal la proteína tiorredoxina, que facilita la solubilización y posee además en su extremo C-terminal un sitio de reconocimiento para el anticuerpo monoclonal anti-V5, que sirve para la identificación de los clones bacterianos transformados con el vector de expresión, y seis residuos de histidinas necesarios para la purificación de la proteína recombinante a través de columnas de afinidad de níquel (del Río *et al.*, 2005).

A continuación, se realizó la ligación en el vector TOPO con el ADN y se llevó a cabo la transformación de *E. coli* TOP 10. Para la ligación del ADN con el TOPO, se realizó la mezcla siguiente: 3 µl del producto de PCR purificado, 1 µl de la solución

## Material y Métodos

SALT del kit, 1  $\mu$ l de agua estéril y 1  $\mu$ l del vector TOPO. Esta mezcla se agitó vigorosamente durante 5 minutos a temperatura ambiente (del Río *et al.*, 2005).

Para la transformación química se añadió 2  $\mu$ l de la clonación anterior a un vial de células competentes y comerciales TOP 10 y se agitó. Todo el proceso debe trascurrir en hielo para evitar el desarrollo de las *E. coli* TOP 10. A continuación, se incubó en hielo 20 minutos, se introduce en un baño a una temperatura de 42°C para provocar el choque térmico e inmediatamente se transfirió de nuevo al hielo, se añadieron 250  $\mu$ l de solución SOC (medio para el crecimiento bacteriano) y se agita durante 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, se siembra en placas de agar LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml. Tras la incubación toda la noche a 37°C, únicamente se desarrollaban las colonias que poseían la construcción p-BAD-Thio-TbpA-V5-His (del Río *et al.*, 2005).

Para la comprobación de la inserción del fragmento en la posición y dirección adecuadas, se llevó a cabo una PCR con el primer *forward* del vector (Trx Seq) y con el primer *reverse* del fragmento (GJM-R). Así se obtiene una banda de alrededor de 600 pares de bases de aquellos clones que contiene la construcción dentro y bien orientada.

Para la expresión de la proteína se introdujo el plásmido con la construcción en *E. coli* LMG 194. En primer lugar fue necesario inducir competencia para la transformación a las bacterias y luego transformarlas con el plásmido elegido. Para la preparación de las células competentes se siguió el siguiente protocolo: se incubó un precultivo de *E. coli* LMG 194 en 5 ml de BHI. Al día siguiente, se añadieron 300  $\mu$ l del precultivo a 300 ml de BHI y se esperó hasta a que el cultivo alcanzara una densidad óptica a 600 nm de 0,6. Se enfrió en hielo durante 10 minutos y a continuación, se centrifugó a 4°C y 6.000 rpm durante 10 minutos, para después resuspender el pellet obtenido en 15 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones, se añadieron 1,5 ml de CaCl<sub>2</sub> y se incubó durante 3 horas en hielo. Finalizado ese tiempo, se distribuyeron alícuotas de 200  $\mu$ l y a las que no iban a ser utilizadas de forma inmediata se les añadieron 480  $\mu$ l de glicerol, para su conservación a -80°C.

Para la transformación de las bacterias que iban a utilizarse, se mezclaron 200  $\mu$ l de células competentes con 20  $\mu$ l de ADN y la mezcla se incubó 30 minutos en hielo. Se produjo a continuación un choque térmico de 2 minutos a 42°C y se volvió a colocar

en hielo. Se añadió 1 ml de BHI atemperado y se incubó a 37°C durante 1 hora, en agitación vigorosa. Se sembró en agar LB con ampicilina (100 µg/ml), las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas, al cabo de las cuales se comprobó de nuevo mediante PCR, secuenciación y digestión que la construcción permanecía estable.

Con el fin de mejorar la expresión y solubilización de la proteína TbpA-r, se cultivaron las células de *E. coli* LMG 194 con la construcción bien orientada, en caldo LB con ampicilina (100 µg/ml) y después de incubar toda la noche a 37°C en agitación, se transfirieron 1/100 volúmenes de este cultivo a un nuevo caldo LB con ampicilina, dejando crecer hasta una densidad óptica, medida a 600 nm, de 0,6. A partir de este cultivo en crecimiento se prepararon varios subcultivos con concentraciones distintas de arabinosa, (0,02%, 0,05%, 0,075%, 0,09%, 0,15% y 0,2%), el inductor de nuestro vector, variando los tiempos de incubación desde 30 minutos a 2 horas y manteniendo los subcultivos a 37°C en agitación. Con las muestras obtenidas se realizaron varias pruebas (comprobaciones):

1-- Comprobación de que la proteína construida no formaba cuerpos de inclusión y que, por tanto, no se excretaba, sino que permanecía en el interior de la célula bacteriana. Con este propósito, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos, se midió la concentración proteica del sobrenadante y se realizó un gel de acrilamida para proteínas con tinción de Coomassie.

2-- Cálculo de la concentración proteica. A tal fin se procedió a centrifugar las muestras a 13.000 rpm durante 15 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en tampón de lisis (apartado 4.2.b), a razón de 500 µl de tampón por cada 10 ml de cultivo. La suspensión fue sonicada en 3 ciclos de 20 segundos, a una potencia máxima del 40%, seguido de la centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y sobre los sobrenadantes se calculó la concentración proteica y llevando a cabo después geles de acrilamida.

Para medir la concentración proteica se utilizó el método “Bio-Rad Protein Assay”, basado en el método Bradford. Para ello fue necesario construir primero una curva patrón con albúmina sérica bovina (Sigma) a diferentes concentraciones conocidas, utilizando azul de Coomassie brillante. La lectura se efectuó a una longitud de onda de 595 nm y, comparando las absorbancias obtenidas de las muestras, se pudo

extrapolar el valor en la recta patrón, obteniendo la concentración proteica (apartado 4.4).

Para la realización de los **geles de acrilamida** (del Río *et al.*, 2005), se prepararon geles (Sigma) a una concentración del 12% para el gel separador y de un 5% para el gel concentrador, aplicando una corriente constante de 100 voltios durante 2 horas (ver apartado 4.7 de materiales). Las muestras proteicas se cargaron en el gel mezcladas con tampón de carga. La tinción se realizó con azul de Coomassie con ácido acético glacial y metanol, para la conservación de los geles durante aproximadamente 1 hora; a continuación se decoloró (apartado 4.8 de materiales) para comprobar el resultado. Para verificar que la banda que se apreciaba en el gel y que se inducía con arabinosa era la proteína buscada, se realizó un *immunoblotting*, usando el anticuerpo monoclonal anti-V5 que reconoce el epítipo localizado en el extremo C-terminal de la proteína de fusión.

Para la realización del *immunoblotting*, se procedió de acuerdo con el protocolo descrito por Horejci y Hilgert (1983) y Pyle-Schill (1985). Una vez realizada la electroforesis, se desmontó la cubeta para obtener el gel, se equilibró éste empapándolo con tampón de transferencia, lo mismo que la membrana de nitrocelulosa (0,45 µm de diámetro de poro, Biorad) a la que previamente se había humedecido en agua. Posteriormente, se realizó el *sandwich* con las distintas capas de papel Whatman nº3, gel, membrana de nitrocelulosa y de nuevo papel Whatman nº3. Finalmente se ponía a correr en la cubeta con tampón de transferencia, a 100 miliamperios durante 90 minutos (ver apartado 4.9 de materiales).

Una vez realizada la transferencia, se procedió al bloqueo de la membrana de nitrocelulosa con leche descremada al 5%, disuelta en tampón TBS de pH 8,0. En esta solución se podía mantener toda la noche a 4°C o bien 2 horas a 37°C, en agitación. Posteriormente, se lavó la membrana con TTBS y se añadió el anticuerpo comercial anti-V5 (1:5000), que reconoce el epítipo localizado en el extremo C-terminal de la proteína de fusión. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente, en agitación, y se lavó de nuevo con TTBS. El revelado se basó en la detección de la actividad peroxidasa mediante un sustrato quimioluminiscente, según la técnica descrita por Bronstein *et al.* (1992), utilizando el producto *ECL- plus Western blotting detection system* de Amersham. El revelado se realizó en un cuarto oscuro destinado al revelado fotográfico.

### 6.5. Purificación del fragmento antigénico

Una vez conseguidas las mejores condiciones de expresión del fragmento proteico, se procedió a su purificación utilizando microbolitas de níquel siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen), a razón de 50  $\mu$ l de microbolitas por cada 300  $\mu$ l de lisado crudo (debido a que el vector utilizado en la clonación es el TOPO 10, con colas de histidina que poseen afinidad por las microbolitas de níquel).

En su utilización se siguieron las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Previamente, se lavaron para su equilibrado con tampón de unión (ver apartado 4.2.c) y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 minuto, para eliminar el exceso de PBS. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y se añadió la muestra que contenía la proteína de fusión pBAD-Thio-TbpA-V5-His. Posteriormente, se procedió a centrifugar a 13.000 rpm durante un minuto y se volvió a eliminar con cuidado el sobrenadante. Las microbolitas se lavaron como mínimo dos veces con 500  $\mu$ l de tampón de unión. Para eliminar cualquier otra proteína que se pudiera co-purificar, se utilizó un método de purificación basado en lavados con concentraciones crecientes de KCl: 0,5 M, 1 M y 2 M (Cerdá- Cuellar, 2010). Por último, las microbolitas se resuspendieron en 75  $\mu$ l de tampón de elución (apartado 4.2.c). En el tampón de unión había que variar las concentraciones de imidazol con el fin de encontrar la concentración en la que se obtuviera la mejor purificación de la proteína.

Finalizada la obtención de la proteína recombinante purificada con el fin de comprobar la eficacia del proceso de purificación, se realizó una electroforesis en gel de acrilamida y un *immunoblotting* (ambos explicados en el apartado anterior), igualmente se procedió a la medida de la concentración proteica.

## **7. Inmunización de los conejos. Obtención de anticuerpos policlonales frente a las TbpA y TbpB recombinantes.**

Para su ejecución se utilizaron conejos blancos de raza *New Zealand* adultos, de aproximadamente 1,5 kg de peso, alojados de acuerdo con la normativa de la Unión Europea en lo que a bienestar animal se refiere. Se ubicaron en las dependencias del Animalario de la Universidad de León y se alimentaron cumpliendo las normas convencionales, con alimento normalizado *ad libitum* (del Río *et al.*, 2005). Se respetaron en todo momento las directrices del Comité de Ética de la Universidad de León y del Gobierno de España. Tanto los directores de este trabajo de investigación como la propia doctoranda se encuentran en posesión de la homologación como personal competente para trabajar con animales de experimentación, expedida por la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León.

Para la preparación de los antígenos, en lo que se refiere a la extracción del fragmento proteico recombinante antigénico, se procedió de diferentes modos:

1-- A partir de las condiciones de crecimiento e inducción señaladas en el apartado anterior, se realizó una electroforesis en gel de acrilamida y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, que fue teñida con rojo Ponceau para identificar la banda del fragmento de interés. La banda seleccionada fue aislada y extraída asépticamente con bisturí estéril y pinzas y se dispuso en un tubo estéril, hidratándose con 1 ml de solución salina estéril. Posteriormente se procedió a un triturado con un politrón, para obtener fragmentos de pequeño tamaño, capaces de atravesar la luz de una aguja de infección que permitiera la inmunización de los conejos.

2-- Una segunda modalidad para la obtención del antígeno, consistió en una vez aislada la banda de interés, someterlo a un tratamiento con DMSO que no desestabiliza la proteína pero que gelatiniza la nitrocelulosa permitiendo la inoculación de los conejos.

3-- La tercera forma de preparación del antígeno consistió en la utilización directa del gel de acrilamida sin modificaciones, una vez realizada la electroforesis e identificada la banda de interés. Para ello, una vez teñido con azul de Coomassie, se

cortó la banda correspondiente con el fragmento proteico y se inyectó directamente en el animal. En esta opción, el gel de acrilamida actúa como un buen adyuvante.

4-- El cuarto procedimiento consistió en el uso directo del extracto de la proteína purificada.

Como antígeno se utilizó la TbpA recombinante (TbpA-r) y también, en un experimento en paralelo, la TbpB-r, producida en nuestro laboratorio con anterioridad (del Río *et al.*, 2005). En ambos casos, se utilizaron las proteínas recombinantes purificadas en una concentración de 50 µg. Para cada inoculación se preparó una emulsión a razón de 8 partes de adyuvante por cada 2 partes de antígeno. Como adyuvante se utilizó Montanide IMS 2215 VG PR (Seppic), diluido en tampón acetato.

Se trabajó con 10 animales por cada proteína recombinante distribuidas del modo siguiente: dos controles a los que solo se les inculó PBS, dos a los que se les inculó el antígeno extraído a partir de la nitrocelulosa triturada en el politrón, dos inoculados con antígeno extraído a partir de la nitrocelulosa tratada con DMSO, dos con antígeno obtenido a partir del gel de acrilamida y finalmente, otros dos a los que se les inculó el extracto proteico, una vez purificado.

El protocolo de inmunización se basó en cuatro inoculaciones separadas entre sí 21 días. En cada inoculación se inyectó 1 ml de la emulsión repartida del siguiente modo: 400 µl en cada uno de los cuádriceps (intramuscular) y 100 µl en cada una de las zonas intraescapulares (intradérmica). Antes de proceder a las inoculaciones, se realizó una extracción de sangre a todos los animales para poder disponer de sueros a lo largo del tiempo y estudiar la producción de anticuerpos frente a las proteínas de fusión y, en su caso, su título correspondiente.

## 7.1. Estudio de la producción anticuerpos policlonales

### **7.1.a. ELISA**

El estudio de la respuesta inmune humoral de los conejos se llevó a cabo mediante un método ELISA indirecto (Martín de la Fuente *et al.*, 2009). Las placas de ELISA (Polysorp, Nunc) se tapizaron con las proteínas recombinantes purificadas, ajustando la concentración proteica a 10 µg/ml en tampón carbonato (ver apartado 4.6.b de materiales) con un volumen final de 100 µl por pocillo, manteniendo las placas toda

la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con 250 µl de tampón de bloqueo (ver apartado 4.6.d de materiales) incubando durante 2 horas a 37°C. Tras este tiempo, se añadieron 50 µl de los sueros de los conejos previamente adsorbidos (incubándolos en dos series de 24 horas a 37°C con 10<sup>7</sup> UFC de *E. coli* LMG 194 sin el inserto) y diluidos 1:100 en tampón de dilución, incubando durante 1 hora a 37°C. Terminada esta, se eliminaron los sueros y se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20, de 5 minutos cada uno. A continuación, se incubaron 50 µl de conjugado de cabra anti-IgG de conejo (Sigma) por pocillo, diluido en el tampón de dilución del conjugado, y se volvió a incubar 1 hora a 37°C, realizando después un nuevo lavado y llevando a cabo el revelado de la reacción (ver apartado 4.6.f de materiales) mediante la adición de 50 µl de sustrato a cada pocillo. La placa se mantuvo a temperatura ambiente en oscuridad durante 10 minutos, aproximadamente, y se frenó la reacción con 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M por pocillo. La lectura de las placas se llevó a cabo a una D.O de 450 nm, en un lector de ELISA, modelo Dynex Technologies. Para el estudio estadístico de los resultados obtenidos, se utilizó el programa informático SPSS (versión 17.0) comparando los diferentes tratamientos. Se realizó un test de comparación de medias ANOVA mediante el test de Tukey.

#### **7.1.b. Acción bactericida del suero**

Para esta prueba fue necesario trabajar con sueros adsorbidos y descomplementados. Para llevar a cabo la descomplementación, los sueros se sometieron a un tratamiento térmico a 56°C durante 30 minutos.

La acción bactericida del suero se determinó siguiendo la técnica descrita por Danve *et al.* (1993), con algunas modificaciones. Brevemente, en una microplaca de 96 pocillos se dispuso el suero de los conejos en diluciones dobles, añadiendo a cada pocillo 50 µl; a continuación, se incorporaron 25 µl de la suspensión del crecimiento de *H. parasuis* en condiciones restrictivas de hierro, ajustada a una concentración de 2 x 10<sup>4</sup> UFC/ml y después se añadieron a cada pocillo 25 µl de complemento comercial de conejo (Sigma). La microplaca se incubó 1 hora a 37°C y de cada pocillo se realizaron diluciones para sembrar en placas de agar chocolate. Tras incubar durante 48 horas a 37°C con un 5% CO<sub>2</sub> se procedió al recuento de colonias, con el fin de comprobar si se producía actividad bactericida. Se dispuso además de un control negativo para la interpretación de los resultados. Se consideró que un suero poseía actividad bactericida

cuando al menos el 50% de las bacterias morían con respecto al control negativo (Rokbi *et al.*, 1996). Para comprobar si las diferencias eran estadísticamente significativas, se recurrió al programa informático SPSS, utilizando un ANOVA para la comparación de medias y un test Tukey para verificar la significación entre ellas.

### **7.1.c. Immunoblotting para el estudio de la especificidad de los anticuerpos policlonales**

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron tres especies bacterianas: la cepa Nagasaki de *H. parasuis*; la cepa WF83 de *A. pleuropneumoniae* y la cepa CIP 5710 de *S. aureus*. Las tres especies fueron cultivadas en condiciones de restricción de hierro (como se ha descrito anteriormente).

Las muestras de crecimiento obtenidas se analizaron por SDS-PAGE y la membrana de nitrocelulosa se incubó con los anticuerpos policlonales obtenidos de las inmunizaciones de los conejos, diluidos 1:100 en TBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizó una anti IgG de conejo producida en cabra (Sigma), diluida 1:5.000 en TBS. El revelado se llevó a cabo mediante la adición de reactivos quimioluminiscentes (Amersham).

## **8. Prueba experimental con cerdos privados de calostro**

### **8.1. Animales y mantenimiento**

Se respetaron en todo momento las directrices del Comité de Ética de la Universidad de León y del Gobierno de España. Tanto los directores de este trabajo de investigación como la propia doctoranda se encuentran en posesión de la homologación como personal competente para trabajar con animales de experimentación, expedida por la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León.

Se dispuso de 43 lechones Large White x Pietrain, privados de calostro, obtenidos de 10 cerdas procedentes de una explotación con buen estatus sanitario, libre de *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* y circovirus, situada en Palazuelo de Vedija (Valladolid). Los animales fueron recogidos directamente del canal del parto, en condiciones asépticas, evitando el contacto con la madre. Se lavaron inmediatamente con etanol al 70% para evitar posibles contagios por coronavirus y rotavirus. Los partos de las cerdas se indujeron mediante la administración de prostaglandinas (Planare,

Schering-Plough) y, una vez nacido el primer lechón, se administró oxitocina (Hipofisina, Schering-Plough) para controlar la velocidad del parto.

Los animales fueron trasladados inmediatamente a las instalaciones del Animalario de la Universidad de León y se les administraron 4 mg/kg de gentamicina (Gentayet, SYVA) durante una semana y una única dosis de hierro dextrano por vía intramuscular (Calidex 200<sup>®</sup>, Calier) (Oliveira *et al.*, 2003).

Los animales permanecieron en lechoneras de plástico de 50 x 50 x 100 cm, con rejilla, de PVC, de fácil lavado. La temperatura ambiental se mantuvo a unos 30°C mediante lámparas de incubación durante los primeros días de vida, disminuyéndose progresivamente hasta el día 20, en que la temperatura se ajustó a 18-20°C hasta el final del experimento. Todo el manejo de los animales se realizó en condiciones de higiene y limpieza extremas. El número de personas encargadas de la alimentación estuvo limitado en todo momento (Martín de la Fuente *et al.*, 2007).

Durante los cinco primeros días, los cerdos fueron alimentados con calostro bovino *ad-libitum*, cada 3 horas, por medio de biberón y en cada toma se les administró por vía oral, además, un rehidratante (Biodiet, Pfizer). Algunos animales sufrieron diarreas leves y se trataron mediante la administración de enrofloxacin (Baytril 5%-Bayer) y flumequina (Flumesyva, SYVA), de acuerdo con los resultados de los antibiogramas correspondientes. Además, a los animales que sufrían estas diarreas (debidas seguramente al calostro bovino) se les proporcionó Glucosal (Divasa, Farmavic) para evitar su deshidratación.

Con el paso del tiempo las tomas se fueron distanciando, hasta llegar a eliminar la toma nocturna, para empezar a mantener a los animales en un biorritmo adecuado día-noche. Cuando los animales alcanzaron los 10 días de vida, su alimentación se suplementó con una papilla (Kwickstart, SCA Ibérica) preparada con calostro reemplazando progresivamente el calostro por agua. Con el cambio de alimentación, algunos animales sufrieron una brusca pérdida de peso, que hizo necesario administrar un complejo vitamínico (Duphalyte-Fort Dodge) por vía intramuscular. Pese a todo, algunos animales no fueron capaces de adaptarse al cambio y la desnutrición resultó letal. En total, se produjeron cuatro bajas, que fueron objeto de necropsia reglada con el

consiguiente estudio microbiológico y serológico para descartar etiologías bacterianas o víricas.

A partir de los 16 días de vida, a los animales se les comenzó a suministrar el primer pienso (Startrite 100, SCA Ibérica) y, en cuanto la alimentación fue completamente sólida, los 36 animales supervivientes fueron trasladados con 20 días de edad, a una granja situada en la población de Navafría (León), cedida por Laboratorios SYVA S.A, donde las salas, comederos, bebederos y demás instalaciones habían sido previamente desinfectados. Para la desinfección, se utilizó Virkon<sup>®</sup>S (Bayer) para las superficies de contacto y Terminex<sup>®</sup>, para el ambiente. En estas salas, la temperatura se mantuvo a temperatura constante, entre 18-20°C, mediante calefactores eléctricos.

Progresivamente, se fue incorporando un pienso para animales en crecimiento tratado con antibióticos (amoxicilina 4 mg/kg) (INZA, España), hasta el momento en el que los animales alcanzaron los 25-35 kg de peso, momento en el que se decidió el comienzo de la prueba experimental. Se modificó la alimentación a pienso sin antibiótico diez días antes del momento de la infección experimental, para llevar a cabo el blanqueo del antimicrobiano.

En la granja experimental se produjo la pérdida de 3 animales más, dos de ellos después de llevar a cabo la extracción de sangre, como consecuencia de un colapso debido al estrés, y el tercero por causas ajenas al experimento (comenzó con una ligera anorexia y apatía que se fue agravando, hasta concluir en caquexia; el animal fue eutanasiado mediante una inyección de pentobarbital (T61<sup>®</sup>, Intervet), vía intracardiaca previa sedación con azaperona (Stressnil<sup>®</sup>, Lab. Doctor Esteve S.A.) En la necropsia se encontró un fragmento de madera insertada horizontalmente en el esófago.

Durante todo el proceso de crecimiento de los animales, se recogieron hisopos nasales y sangre para determinar su carácter negativo a *H. parasuis* mediante PCR (Oliveira *et al.*, 2001; Angen, 2007) y ELISA (Solano-Aguilar *et al.*, 1999). Además, se llevó a cabo un seguimiento periódico para comprobar su situación respecto a PRRS mediante ELISA y respecto a *A. pleuropneumoniae* y circovirus porcino mediante PCR.



Figura 3.1. Distintos momentos de la crianza de los animales, previa a los experimentos.

## 8.2. Inmunización de los animales

De los 37 animales disponibles, cuatro fueron utilizados para ajustar la dosis de infección en el desafío. Los 33 restantes fueron utilizados en los experimentos de inmunización. Se distribuyeron en 6 lotes o grupos, según se detalla a continuación (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Distribución de los seis lotes experimentales de cerdos privados de calostro en inmunizaciones con distintos antígenos.

Grupo	Número de animales	Antígeno	Adyuvante	Vía de inoculación
I	6	Proteína recombinante TbpA de <i>H. parasuis</i> serotipo 5, cepa Nagasaki.	Montanide IMS 2215 VG PR	Intramuscular
II	5	Proteína recombinante TbpB de <i>H. parasuis</i> serotipo 5, cepa Nagasaki.	Montanide IMS 2215 VG PR	Intramuscular
III	4	Control. PBS	Montanide IMS 2215 VG PR	Intramuscular
IV	6	Bacterina comercial. Porcilis Glässer® (Intervet)	Montanide IMS 2215 VG PR	Intramuscular
V	6	Proteínas de unión a la transferrina, nativas, de <i>H. parasuis</i> serotipo 5, cepa Nagasaki.	Montanide IMS 2215 VG PR	Intramuscular
VI	6	Proteínas de unión a la transferrina, nativas, de <i>H. parasuis</i> serotipo 5, cepa Nagasaki.	Neuraminidasa tipo VI® (Sigma) de <i>Clostridium perfringens</i> .	Intratraqueal

Se estableció una dosis vacunal de 2 ml. En el caso de los grupos control e inmunizados con la TbpA-r, TbpB-r y proteínas nativas de unión a la transferrina (Tbp-nat) se utilizó la vía intramuscular (im), con 200 µl de antígeno que contenía 400 µg de proteína + 1,8 ml de adyuvante Montanide IMS 2215 VG PR (Seppic Inc., Paris, Francia), es decir, una formulación 1:4 a favor del adyuvante para un volumen final de 2 ml. Para las inmunizaciones del grupo de proteínas nativas de unión a la transferrina por vía intratraqueal (it), el volumen final fue de 1 ml y el adyuvante anterior fue sustituido por neuraminidasa tipo VI<sup>®</sup> (Sigma) de *C. perfringens*. Las inmunizaciones con la vacuna comercial se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la dilución de los antígenos fue necesario utilizar tampón acetato de pH 6, ya que el fabricante del adyuvante recomienda emplear dicho tampón (en lugar de PBS) en el caso de que los antígenos sean proteínas.

#### **8.2.a. Obtención de las proteínas nativas de unión a la transferrina y purificadas**

Se procedió primero a la obtención de las proteínas de membrana a partir de un crecimiento líquido de *H. parasuis* en condiciones restrictivas de hierro, utilizando un 0,2% de desoxicolato sódico (DOC). Tras el tratamiento con este detergente, se procedió a recoger el sobrenadante y a dializarlo mediante el tampón de diálisis (apartado 4.3 de materiales), empleando Amicon<sup>®</sup> Ultra 30 K (Millipore).

Para la purificación de las proteínas con afinidad por la transferrina porcina, utilizó una cromatografía líquida de alta presión (FPLC), para lo que fue necesario empaquetar la sefarosa unida a la transferrina porcina. Con este propósito, se preparó la sefarosa siguiendo las instrucciones de la CNBr- *activated Sepharose*<sup>™</sup> 4B (GE Healthcare). Tras rehidratar la sefarosa liofilizada y lavarla con HCl 1 mM, se preparan 20 mg de transferrina porcina (*First Link U.K Ltd*) en tampón de unión (apartado 4.3 de materiales), se incubaron en agitación rotatoria el ligando con la matriz durante 2 horas a temperatura ambiente y se eliminó el exceso de ligando con 5 volúmenes de tampón de unión. Los grupos activos de la matriz se bloquearon con el tampón de bloqueo durante 2 horas y finalmente se lavó la unión de la sefarosa con la transferrina con tres ciclos, alternando el pH con los tampones de lavado (apartado 4.3 de materiales).

Hubo que ajustar la concentración de proteínas de membrana obtenidas a 60 mg por gramo de sacarosa en un volumen de 20 ml, con el fin de dializar las proteínas de interés. La columna empaquetada se acopló al aparato FLPC ÄKTAFPLC™ (GE Healthcare) y se ajustó la bomba inyectora a un flujo de 0,2 ml/min. Después de pasar la muestra por la columna, se procedió a su lavado con 50 ml del mismo tampón sin proteínas (flujo 0,5 ml/min) eluyendo las proteínas unidas con guanidina-HCl 2M, monitorizando el pico de elución a 280 nm. Las proteínas eluidas se recogieron en tubos con Tris pH 9,0 e inmediatamente se dializaron frente a PBS-Sarcosyl 0,1% pH 7,5, para finalmente alicuotar el volumen obtenido y almacenarlo a -20°C hasta la preparación de las vacunas.

### **8.2.b. Control de esterilidad**

A partir de 1 ml de la emulsión vacunal (adyuvante + antígeno + tampón acetato) se inoculó en caldo TSB y en FTM (medio líquido de tioglicolato). Dichos medios se incubaron a 25°C y a 37°C, respectivamente, durante 14 días, comprobando la ausencia de crecimiento.

### **8.2.c. Protocolo de inmunización**

Los 33 animales fueron inmunizados una primera vez a los 28 días de vida, cuando habían alcanzado el peso adecuado, y se revacunaron 21 días después (excepto en el caso de la vacuna comercial, que el fabricante recomienda la revacunación a los quince días de la primera). En el caso del grupo control, se inoculó PBS en estos dos mismos momentos. Antes de cada inoculación se realizaron extracciones de sangre mediante vacutainer, de la vena yugular. El suero se obtuvo después de dejar reposar la sangre obtenida y separar por decantación y centrifugación. Las muestras de suero se identificaron y almacenaron a -20°C hasta su uso.

## **8.3. Infección de los animales (desafío)**

Antes de llevar a cabo la infección experimental, se realizó una prueba previa con los cuatro animales de reserva (con el fin de comprobar la dosis bacteriana más adecuada para llevar a cabo el desafío). Sobre estimaciones de anteriores experimentos, se probaron dos dosis:  $1 \times 10^7$  y  $5 \times 10^8$  UFC inoculadas vía intratraqueal (Blanco *et al.*, 2008; Martín de la Fuente *et al.*, 2008). Los animales infectados con  $1 \times 10^7$  UFC padecieron los síntomas clínicos de la enfermedad y al cabo de los 7 días los síntomas

fueron tan graves que se decidió su sacrificio (mediante eutanasia). Los animales infectados con la dosis de  $5 \times 10^8$  UFC desarrollaron rápidamente los síntomas clínicos de la enfermedad y murieron al cabo de 2 días.

En función de los resultados obtenidos en el experimento de ajuste, se decidió utilizar como dosis letal de prueba  $3 \times 10^8$  UFC de *H. parasuis* serotipo 5, cepa Nagasaki, obtenidas directamente (frescas) después del cultivo en placas de agar chocolate (bioMérieux, Barcelona), incubando 48 horas a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Este crecimiento se ajustó al número señalado de UFC con RPMI 1640 (Invitrogen) y se almacenó a 4°C hasta el momento del desafío. La dosis inoculada fue confirmada posteriormente en el laboratorio.

El desafío se llevó a cabo 14 días después de la segunda inmunización, mediante inoculación intratraqueal (Takahashi *et al.*, 2000) de  $3 \times 10^8$  UFC de *H. parasuis* serotipo 5, cepa Nagasaki, como se ha señalado, suspendidas en un volumen de 2 ml de RPMI. A partir de este momento, se llevó a cabo un seguimiento diario, anotando las temperaturas rectales y los síntomas clínicos que se observaban. Algunos animales fallecieron algunos días después del desafío y los que sobrevivieron fueron eutanasiados humanitariamente a los 15 días del desafío. Los cerdos fueron sedados previamente con azaperona (Stresnil®, Lab Doctor Esteve S.A) y eutanasiados con pentobarbital (T61®, Intervet) mediante inyección intracardiaca.

#### 8.4. Signos clínicos, necropsia y aislamiento bacteriano

La temperatura rectal de los animales se tomó cada 12 horas desde el desafío hasta su muerte o eutanasia. En todos los lechones se observó y anotó cualquier signo clínico: dificultad respiratoria, cojera o ligero postramiento, inapetencia...

Tanto los animales que murieron debido a la infección, como los eutanasiados al final del experimento, fueron objeto de una necropsia reglada en un periodo no superior a 2 a 6 horas desde el fallecimiento.

Las necropsias se llevaron a cabo en la Unidad de Anatomía Patológica de la Universidad de León. Con carácter general, se anotó el estado de las mucosas, la coloración del músculo y las articulaciones, la presencia o ausencia de líquido en la cavidad abdominal y la presencia o ausencia de fibrina. Al tiempo, se recogió el aspecto

de los diferentes órganos y tejidos y se tomaron muestras para el estudio histopatológico de tonsilas, cerebro, ganglios mandibulares, preescapulares, traqueobronquiales, mediastínicos, pulmón, bazo, riñón e hígado.

Mediante hisopos y en las mejores condiciones asépticas posibles, se recogieron muestras de las articulaciones (tarso y carpo), líquido abdominal, bazo, hígado, pulmones, corazón y cerebro, con el fin de verificar la presencia de *H. parasuis* mediante los pertinentes cultivos bacteriológicos y otras determinaciones.

## **9. Detección y aislamiento de *H. parasuis***

Inmediatamente, los hisopos recogidos se sembraron en placas de agar chocolate y de agar sangre (Oxoid) con una estría de *S. aureus*, y se incubaron a 37°C durante 42 horas, como en estudios anteriores (Blanco *et al.*, 2008; Turni y Blackall, 2007). A las 24-42 horas, se observaba el crecimiento de las placas y aquellas que presentaban diferentes tipos de colonias (algunas de ellas sospechosas de *H. parasuis*) se resemebraban para obtener cultivos puros.

A partir de los cultivos puros se realizó la extracción del ADN. Para ello, las colonias se resuspendieron en 100 µl de solución salina estéril y se mantuvieron durante 10 minutos a 100°C; a continuación, se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante, que fue conservado a -20 °C hasta el momento de realizar la PCR.

Para llevar a cabo esta técnica (Oliveira *et al.*, 2001), se utilizaron siempre controles (positivos y negativos), además de adoptar las precauciones pertinentes con el fin de evitar falsos positivos y negativos. Las muestras problema se separaron en un gel de agarosa para estudiar las bandas y confirmar la presencia o ausencia de *H. parasuis*.

Se calculó la relación existente entre las muestras que presentaban *H. parasuis* con respecto a las muestras totales del estudio en cada uno de los animales. Igualmente, se estableció la relación entre los diferentes grupos de animales.

## 10. Acción bactericida del suero

Para llevar a cabo la determinación de la acción bactericida del suero se adoptaron los protocolos de Diallo y Frost (2000) y Cerdá-Cuellar *et al.* (2008), con ligeras modificaciones.

Tras sembrar *H. parasuis* en placas de agar chocolate (Oxoid) e incubar a 37°C durante 42 horas, se inoculó caldo PPLO (Difco) con NAD (20 mg/ml), glucosa (Sigma) 50% e isovitalex. A este medio líquido se añadió crecimiento obtenido de la placa hasta que la densidad óptica inicial a 600 nm fuera de 0,1. A partir de este momento, se incubó a 37°C en agitación lenta, midiendo la densidad óptica cada cierto tiempo para comprobar el crecimiento bacteriano. En cada medición, se tomó una muestra para el recuento en placas de agar chocolate (UFC/ml, a las 42 horas, a 37°C y en condiciones restrictivas de oxígeno). El cultivo obtenido se resuspendía en medio RPMI hasta alcanzar  $10^7$ – $10^8$  UFC/ml.

Se utilizaron placas de ELISA (Polysorp, Nunc). En cada pocillo se añadieron 180 µl de cada suero y 20 µl de una suspensión bacteriana anterior. La placa se incubó a 37°C durante 1 hora, en agitación, a 100 rpm. Después, se realizaron diluciones decimales seriadas de cada uno de los sueros, se inocularon placas con 100 µl del contenido de cada uno de los pocillos y se incubaban a 37°C con un 5% CO<sub>2</sub> durante 42 horas. Por último, se contaban las colonias y se comprobó el posible efecto bactericida.

Antes de comenzar la prueba con los sueros problema se confirmó que no existía variación en el número de UFC/ml por efecto de la incubación (24 horas a 4°C).

Se mezclaron los sueros procedentes de los animales de cada grupo y con ellos se evaluó la actividad bactericida, en los términos siguientes:

- 1) Actividad bactericida del suero tras la primera o segunda inmunización.
- 2) Valoración en paralelo de sueros completos y descomplementados, a fin de comprobar la actividad del complemento.
- 3) En relación con lo anterior y una vez comprobada la necesidad del complemento, se añadía 50 µl de complemento (comercial de cobaya (Serotec)) para verificar la recuperación de la actividad bactericida.

Una reducción de al menos 3 unidades logarítmicas, se consideraba suficiente para determinar que existía acción bactericida del suero. Dentro de cada grupo, en las diferentes pruebas se llevó a cabo un estudio estadístico mediante el programa informático SPSS (versión 17.0), con una T de variables relacionadas.

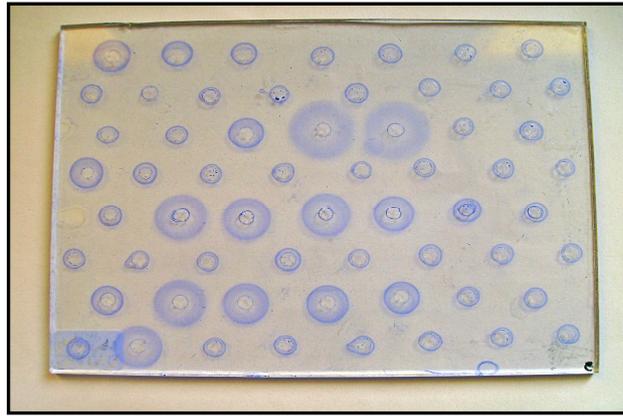
## **11. Estudio de la respuesta de fase aguda**

Después de la infección con *H. parasuis* se llevó a cabo el estudio de la respuesta de fase aguda, valorando cuantitativamente y de forma individual cuatro proteínas: la proteína C- reactiva (CRP), haptoglobina (HPT), pig MAP y apolipoproteína I (Apo I), mediante inmunodifusión radial (Mancini *et al.*, 1965). Se estudiaron las muestras de suero antes de la infección y en los días posteriores, hasta la muerte de los animales (Martín de la Fuente *et al.*, 2008; Scougaard *et al.*, 2009).

En el estudio de cada una de las proteínas se emplearon geles de agarosa de 1,5 mm de espesor, al 1% en tampón barbiturato sódico 0,025 M de pH 8,2, que contenía anticuerpos específicos obtenidos mediante la inmunización de conejos de estas cuatro proteínas purificadas (proporcionados por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza). En los geles se practicaban pocillos de 3 mm de diámetro, separados entre sí 2 cm, que se rellenaban con los sueros problema. Se utilizaban diluciones decimales, dependiendo de la concentración más o menos esperada de la proteína. Junto con los sueros problema se añadían estándares, previamente calibrados con distintas concentraciones de cada proteína, con el fin de trazar la recta estándar.

Las placas se incubaban a temperatura ambiente durante 2-3 días en una cámara húmeda. Posteriormente, el gel se lavaba, secaba y teñía con azul de Coomassie durante 1 día y los restos de colorante se eliminaban mediante un lavado de 30 minutos con una solución de desteñido. Después se medían los diámetros de los halos de difusión con ayuda de una lupa.

Con los sueros estándar y sus concentraciones proteicas se construye una recta patrón y se obtiene una ecuación lineal que relaciona ambas variables. Con las ecuaciones obtenidas para cada una de las proteínas se calcula la concentración proteica de los distintos sueros.



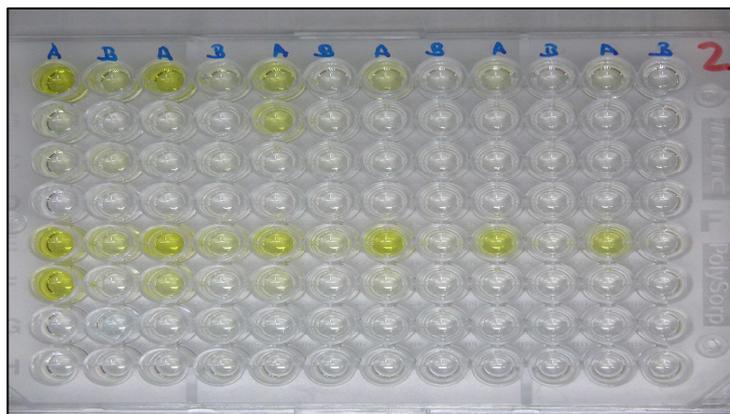
**Figura 3.2.** Ejemplo de un gel de inmunodifusión radial para la cuantificación de las diferentes concentraciones de las proteínas de fase aguda.

Los resultados obtenidos se estudiaron mediante el programa informático SPSS (versión 17.0) para comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en cada una de las proteínas de fase aguda estudiadas, en cada uno de los grupos y entre sí.

## **12. Estudio de la respuesta inmune humoral (ELISA)**

Se tomaron muestras de sangre (para la obtención de suero) cada siete días, desde el día anterior a la primera inoculación hasta el día del desafío. Después de la infección, las muestras se tomaron todos los días.

Se utilizaron tres tipos de reacciones ELISA indirecto. El primero utilizaba como antígeno la bacteria (*H. parasuis*) inactivada; un segundo tipo de ELISA recurrió a sobrenadantes proteicos enriquecidos en proteínas de la membrana (OMP) y, finalmente, el tercer tipo de ELISA, utilizó como antígeno las proteínas nativas de unión a transferrina (Tbp-nat) (la composición de una de las formulaciones vacunales del experimento). En todos los casos, se valoró la presencia y la concentración en el suero de los animales de los siguientes isotipos de inmunoglobulinas: IgM, IgGt (totales), IgG1, IgG2 e IgA.



**Figura 3.3.** Ejemplo de un ELISA tapizado con proteínas de membrana (OMP), utilizando como anticuerpo secundario sueros de los animales experimentales en diferentes momentos del estudio.

### 12.1. ELISA con cuerpos bacterianos completos, inactivados

Se siguió el protocolo descrito por Solano *et al.* (1999), modificado, y puesto a punto en nuestro laboratorio (Martín de la Fuente *et al.*, 2009).

#### 12.1.a. Antígeno y tapizado de las placas

En una placa de agar chocolate, se siembra la cepa de referencia de *H. parasuis* serotipo 5 y se incuba en una atmósfera microaerófila a 37°C durante 42 horas. Se recoge todo el crecimiento de la placa y se inocula un caldo PPLO (Pronadisa) con glucosa al 50%, isovitalex y NAD, ajustando a una densidad óptica de 0,1 a 600 nm. A partir de ese momento se inicia la incubación en agitación a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,9. Se centrifuga el crecimiento y el pellet se resuspende en 20 ml de solución salina estéril. Se procede a la inactivación añadiendo timerosal al 0,1%, incubando primero a 37°C durante 2 horas y luego a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se ajusta la concentración de proteína a 13 µg/ml en tampón carbonato y se tapizan los pocillos de las placas de ELISA (Polysorp, Nunc) con un volumen de 100 µl, para lo que se incuban las placas 2 horas a 37°C y posteriormente, a 4°C durante la noche. Después, se añaden 300 µl de tampón de bloqueo y se incuba durante 2 horas a 37°C, finalizando con un lavado de las placas con PBST (PBS + Tween 20), que se almacenan a -80°C, hasta su uso.

#### 12.1.b. Desarrollo de la técnica

Como fuente de anticuerpo primario se utilizan 100 µl de los sueros problema procedentes de los cerdos del experimento a una dilución 1:100, excepto en el caso de la

determinación de las IgG1 e IgG2 que, como su concentración sería presumiblemente menor, se decidió utilizar la dilución 1:50. Después de incubar el suero en la placa tapizada 1 hora a 37°C, se lavan al menos tres veces con PBST durante 5 minutos y tras el último lavado se añade, respectivamente (a la concentración recomendada por el fabricante), los anticuerpos anti-isotipo marcados con peroxidasa, frente a IgG (*anti-pig IgG whole molecule peroxidase conjugated*) e IgM (*goat anti-porcine IgM- HRP*) y los anticuerpos murinos sin marcar frente a IgG1 e IgG2 (*mouse anti-porcine IgG1* y *mouse anti-porcine IgG2*) (Sigma).

Las placas se vuelven a incubar otra hora y se lavaban con PBST. En el caso de las IgG1 e IgG2, es necesario añadir otro anticuerpo marcado con peroxidada frente a las inmunoglobulinas de ratón (*policlonal goat anti-mouse immunoglobulins: HRP*) e incubar las placas durante otra hora más a 37°C, antes de llevar a cabo el revelado de la reacción.

Para el revelado, se utilizó TMB (Sigma) con peróxido de hidrógeno al 0,002% y esta reacción se bloqueó añadiendo 25 µl de ácido sulfúrico 2 M. Las placas se leyeron en un lector de ELISA, a una densidad óptica de 450 nm. En todas las placas se introdujo siempre un control negativo (suero de un animal sin contacto con *H. parasuis*) y un control positivo (suero de un cerdo infectado).

### **12.1.c. Interpretación de los resultados y análisis estadístico**

De cada uno de los animales de los diferentes grupos, se estudiaron las variaciones en sus niveles de inmunoglobulinas. Se estableció un punto de corte equivalente al doble del valor medio de las DO al inicio del estudio, más la desviación estándar.

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa informático SPSS (versión 17.0). Se realizó la prueba no paramétrica Kolmogorov-Smirnov sig, para determinar los datos que seguían una distribución normal. Para observar si existían diferencias significativas entre los diferentes momentos de estudio en cada uno de los grupos tratados, se utilizó la prueba T para muestras repetidas: T pareada sig (1 sola cola), ya que se consideraba que los niveles de anticuerpos desde el día 0 aumentarían o se mantendrían, pero en ningún caso disminuirían. Para comprobar si ocurrían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se utilizó la prueba de

Tukey. Se consideró que existían diferencias significativas cuando el valor de *p* era inferior a 0,005.

## **12.2. ELISA con las proteínas de la membrana externa**

Se empleó el protocolo descrito por Goethe *et al.* (2000) para *A. pleuropneumoniae*, con algunas modificaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio (Martín de la Fuente *et al.*, 2009).

### **12.2.a. Antígeno y tapizado de placas**

Se cultivó la cepa Nagasaki de *H. parasuis* en caldo PPLO (Pronadisa) enriquecido con glucosa al 50%, NAD e isovitalex, hasta alcanzar una densidad óptica inicial de 0,01 a 600 nm. Se incubó a 37°C en agitación, hasta que la densidad óptica alcanzara un valor de 0,3 y, en ese momento, se añadió dipiridilo (2,2- dipiridyl, Sigma), un quelante de hierro, a una concentración final de 100 µM, con el fin de restringir la cantidad de hierro en el medio, manteniéndose la mezcla en agitación a 37°C hasta que la densidad óptica a 600 nm fue superior a 1 (Goethe *et.al.*, 2001). En ese momento se añadió desoxicolato sódico al 0,075% y TrisHCl y NaCl, un detergente que permite la solubilización máxima de las proteínas de la membrana externa sin alterar su estabilidad.

Se tapizaron placas de 96 pocillos con 100 µl del sobrenadante diluido en tampón carbonato (pH 9,6), a una concentración de 13 µg/ml de antígeno por pocillo. Después de 12 horas de incubación a 4°C, las placas se lavan con PBST y se bloquean con leche descremada al 5% en PBST (200 µl por pocillo). Posteriormente, se incuban durante 2 horas a 37°C en agitación, se vuelven a lavar con PBST y se almacenan a -80°C hasta su uso.

### **12.2.b. Desarrollo de la técnica**

Para la realización de este tipo de ELISA se utilizaron los mismos sueros, reactivos y concentraciones que en el ELISA anterior.

### **12.2.c. Interpretación de los resultados y análisis estadístico**

Se adoptó el mismo criterio para la interpretación que en el ELISA anterior.

### 12.3. ELISA con las proteínas nativas de unión a la transferrina

#### **12.3.a. Antígenos y tapizado de placas**

La purificación de las proteínas nativas de unión a la transferrina se recoge en el apartado 3.2.a. de Métodos. Con este extracto proteico purificado se ajusta la concentración proteica en tampón carbonato, para tapizar las placas con 100 µg por pocillo y se incuba 2 horas a 37°C, o toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, se añade el tampón de bloqueo y se incuba de nuevo 2 horas a 37°C. Por último, se lavan las placas con PBS-Twen 20 y se almacenan a -80°C hasta su utilización.

#### **12.3.b. Desarrollo de la técnica**

Se utilizaron los mismos sueros, reactivos y concentraciones que en los ELISA anteriores.

#### **12.3.c. Interpretación de los resultados y análisis estadístico**

Se siguió el mismo criterio que en los ELISA anteriores.

### 12.4. ELISA IgA

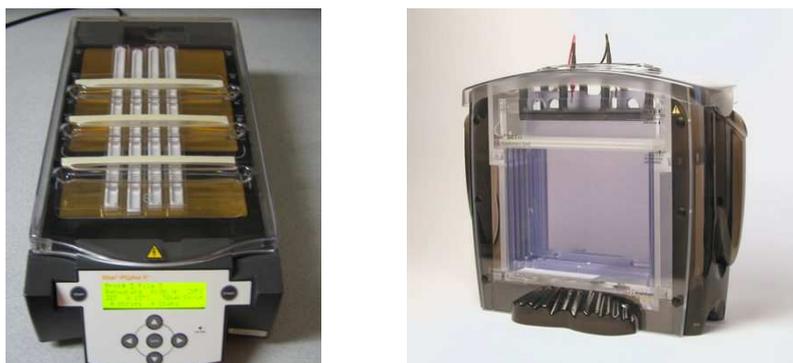
Tras el estudio de las inmunoglobulinas IgG totales, IgM, IgG1 e IgG2 con tres tipos de tapizados de ELISA distintos, parecía interesante realizar un ELISA en el que valorar las IgA en todos los animales y a lo largo de todo el estudio. Esta información nos podía proporcionar, al menos, una idea de la situación de la inmunidad de las mucosas, considerando que la concentración de esta inmunoglobulina en el suero es mínima (de Arriba, 2002). Las placas se tapizaron con los tres tipos de antígenos utilizados en la valoración de las otras inmunoglobulinas y se llevó a cabo con la misma metodología.

### 13. Identificación de las proteínas de unión a la transferrina

Finalizado el proceso de purificación, se consideró de interés conocer la identidad de las proteínas y con que función se encontraban relacionadas.

Inicialmente, se preparó un gel de una dimensión, en el que se separaba la muestra con las proteínas de unión a la transferrina (apartado 4.7 de materiales). Se tuvo que medir con exactitud la concentración proteica total que se colocaba en el gel, para poder utilizar posteriormente sistemas de identificación o secuenciación de proteínas. La tinción se realizó con azul Coomassie coloidal (apartado 4.10).

Para la identificación de las bandas obtenidas fue necesario su corte e inmersión en un pequeño volumen de agua milli Q, donde se mantenían a 4°C hasta su digestión. En el proceso de identificación, se consideró que la aparición de una sola banda proteica en el gel, no suponía la presencia de una única proteína.



**Figura 3.4.** Aparatos utilizados para llevar a cabo la primera y segunda dimensión en los geles de acrilamida 2D.

#### 13.1. Digestión de las muestras

Para llevar a cabo la digestión de las muestras, se comienza por su deshidratación. Para ello, se añade acetonitrilo hasta cubrir cada una de las bandas de gel, dejando actuar unos 5 minutos para que el gel se vaya deshidratando y liberando el colorante. La operación se repite un par de veces y las muestras se secan al vacío mediante un sistema Speed-vac durante alrededor de 15 minutos. Para la reducción y alquilación, se cubren las bandas con DTT 10 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM y se mantiene a 56°C durante 30 minutos. Tras este tiempo, se mantienen las muestras a temperatura ambiente, se elimina el DTT y se añade acetonitrilo que se deja actuar durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se incuban con iodoacetamida 55 mM en

$\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM durante 15 minutos en oscuridad y sin agitar. El papel de la iodoacetamida consiste en la adición de grupos carboamidometilos.

El siguiente paso consiste en la incubación con acetonitrilo durante 5 minutos, seguido de la adición de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM, incubando 5 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales y sin retirar el sobrenadante, se añade el mismo volumen de acetonitrilo, incubando 15 minutos. Se retira el sobrenadante y se secan las muestras al vacío en un sistema Speed- vac durante 30 minutos. Para la digestión de las muestras, se añade tripsina (Roche) en una concentración de 12,5 ng/ $\mu\text{l}$  en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM, hasta que se cubre la banda deshidratada y se incuba en hielo unos 45 minutos, para que la tripsina se absorba sin que llegue a actuar. Se retira el sobrenadante, se añade el tampón sin tripsina hasta cubrir completamente las bandas y se incuba toda la noche a 37°C. Al día siguiente se centrifugan las muestras y el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo en el que se añadía  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM. Por último, se tomaba 1  $\mu\text{l}$  para la identificación (Sechi *et.al.*, 1998).

### 13.2. Identificación de las muestras

Las muestras se identificaron por MALDI-TOF, sistema apropiado cuando la muestra no contiene muchos péptidos. Este sistema se basa en situar la muestra sobre una matriz, el láser toca la muestra y la evapora, la matriz cede un protón y, una vez ionizada, discurre por los campos magnéticos del equipo y se puede calcular la masa por la velocidad con la que recorre un espacio, y se van recogiendo los diferentes tiempos de vuelo. Se va obteniendo así la huella peptídica de cada una de las muestras disparadas en el MALDI-TOF, que serán comparadas en las bases de datos hasta proceder a su identificación (Martínez-López R., *et.al.*, 2008).

Para la identificación se utiliza un analizador de espectrometría de masas de proteínas 4700 MALDI- TOF/TOF (Applied Biosystems). Todos los espectros de masas son calibrados internamente, usando péptidos de la autodigestión de la tripsina. La placa se introduce en el MALDI-TOF, que dispara cada una de las muestras, y los resultados son recogidos en el GPS Explorer <sup>TM</sup> 3.6 que filtra, selecciona y efectúa la búsqueda con programas específicos y bases de datos. Para la identificación de las proteínas, los espectros de masas son buscados utilizando una licencia local de MASCOT 1.9 de Matriz Science. La base de datos de secuencias proteicas es la del NCBI de *H. parasuis*.

## **14. Inmunoproteómica**

Una vez identificadas las proteínas de unión a la transferrina, se valoró la presencia de proteínas inmunógenas y la evolución de los niveles de anticuerpos frente a ellas a lo largo del experimento, sobre todo en aquellos grupos de animales que sobrevivieron a la infección. Se estudiaron estas diferencias en el grupo de animales inmunizado con la vacuna comercial y en los dos grupos inmunizados por vía intramuscular o intratraqueal con el extracto proteico de unión a transferrina.

Para llevar a cabo los estudios de inmunoproteómica, se preparó un gel de electroforesis bidimensional, en el que la muestra se separa primero por punto isoeléctrico y después por su masa molecular.

### **14.1. Realización de geles 2 DE**

El extracto proteico de unión a la transferrina se encuentra disuelto en un tampón con muchas sales, que no resulta compatible con el gel de dos dimensiones, por lo que es necesario proceder a su precipitación con ácido tricloroacético/acetona (apartado 4.11.a) y disolver en tampón de hidratación (apartado 4.11.b de materiales). Por último, se mide la concentración proteica de la muestra precipitada por el método “RC y DC” (apartado 4.11.c de materiales), ya que el tampón de hidratación no es compatible con el método Bradford para la cuantificación de proteínas.

#### **14.1.a. Hidratación de la muestra**

Una vez mezclada la muestra con el tampón de hidratación, se le añadía 2 mg de azul de bromofenol y se preparaba un volumen final de 350  $\mu$ l, con una concentración final de 250  $\mu$ g de las proteínas de prueba. Se añadían anfolitos y DTT y se dejaba actuar 30 minutos, transcurridos los cuales se centrifugaba a 13.000 rpm 10 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante obtenido se utilizaba para hidratar las tiras que deberían ser separadas por punto isoeléctrico (Tiras Immobiline<sup>TM</sup> Dry Strip pH 3-11, 18 cm, GE Healthcare). Estas tiras se situaban en su propio sarcófago y se sellaban con un aceite de cobertura, se dejaban hidratando 20 horas a 15°C y sin voltaje en Ettan IPG phor (Amersham), donde después se separaban en función del punto isoeléctrico.

#### **14.1.b. Primera dimensión. Separación por punto isoeléctrico**

Una vez hidratadas las muestras se cortaban pequeños fragmentos de papel de filtro que, humedecidos en agua milli Q, se colocaban en el ánodo y en el cátodo del sarcófago, para recoger el exceso de colorante. El programa de separación utilizado fue el siguiente: 500V, 3 horas; gradiente 1.000V, 6 horas; gradiente 8.000V, 3 horas y 8.000V, 10 horas y media. Cuando el programa finalizaba y la muestra se había separado en la tira por su punto isoeléctrico, las tiras se almacenaban a -80°C hasta el momento de su procedimiento en una segunda dimensión.

#### **14.1.c. Segunda dimensión. Separación por peso molecular**

Los cristales en los que se preparaban los geles deben ser lavados con SDS al 10% y agua milli Q. Se preparaba el polimerizador de geles donde se añadían las cantidades oportunas para la realización de 2 geles de acrilamida (apartado 4.11.d).

Para colocar las tiras en la segunda dimensión en los geles era imprescindible llevar a cabo su equilibrado previo, mediante el tampón del mismo nombre (apartado 4.11.e de materiales). Para ello, la tira se incubaba 12 minutos en 20 ml de tampón de equilibrado + 0,4 g DTE y, transcurrido este tiempo, 5 minutos más en 20 ml de tampón de equilibrado + 0,5 g de iodoacetamida + 2 mg de azul de bromofenol, que nos permitía comprobar como se iba produciendo la separación de la muestra.

Equilibradas las tiras, se disponían entre los geles de acrilamida y se sellaban con una solución de agarosa del 0,5%. Los geles se introducían en el equipo *electrophoresis ETAM system DALT* (Amersham) con tampón de electroforesis (apartado 4.11.f), durante toda la noche. La primera hora se sometía a 0,5 W cada gel y posteriormente a 1 W durante toda la noche, de manera refrigerada para mantener la temperatura constante de 15°C.

Terminando este proceso, uno de los geles se teñía con azul de Coomassie coloidal (para observar el patrón de *spots* obtenido) y se almacenaba a 4°C, con el fin de poder seleccionar posteriormente alguna proteína y poder proceder a su identificación. Con el otro gel, se llevaba a cabo el *immunoblotting*.

### 14.2. Immunoblotting

El gel se transfería a una membrana de nitrocelulosa para enfrentar ésta a los diferentes sueros del experimento y comprobar si se apreciaban diferencias. Para llevar a cabo la transferencia, se realizaba todo el procedimiento en las mismas condiciones que para la transferencia de los geles de una dimensión, pero con las cubetas y las “sandwicheras” de mayor tamaño (apartado 4.9). Se transfería durante 3 horas a 4°C, con un amperaje constante de 250 mA. Posteriormente, se teñía la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau durante 2 minutos, con agua milli Q, se eliminaba el exceso de colorante y se escaneaba la membrana para confirmar que la transferencia se realizaba correctamente. Para eliminar completamente el colorante se añadía TBS 1X.

La membrana se bloqueaba con TBS 1X con un 5% de leche durante 2 horas, a temperatura ambiente y ligera agitación. Tras el bloqueo, se lavaba la membrana con TTBS haciendo 3 lavados de 15 minutos, se enfrentaba al anticuerpo primario (el seleccionado dentro de los sueros de nuestro experimento en un momento concreto) a una dilución 1:100 en TTBS con un 1% de leche y se dejaba toda la noche a 4°C en agitación lenta. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavaban las membranas abundantemente (5 lavados de 20 minutos con TTBS) y se incubaban con el anticuerpo secundario, anti IgG de cerdo marcados con peroxidada (Sigma), a la concentración especificada por el fabricante, en TTBS con un 1% de leche. Esta incubación se llevaba a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación. Posteriormente, se repetía como mínimo los mismos lavados que tras la incubación con el anticuerpo primario y, a continuación, se llevó a cabo el revelado por quimioluminiscencia.

Para volver a utilizar la membrana (hasta 3 veces), debía ser deshidratada para eliminar los anticuerpos, ya que es importante utilizar siempre la misma membrana con sueros desde el momento 0 del experimento hasta su finalización. Para deshibridar la membrana se utilizaba un tampón con  $\beta$ -mercaptoetanol, SDS y Tris-HCl a 56°C durante 30 minutos en agitación y se efectuaban lavados hasta la eliminación completa de los anticuerpos. Los mejores momentos del estudio en los que comparar los *blotting* eran: antes de las inmunizaciones, tras la 1ª inmunización, tras la 2ª inmunización (que coincidía con el momento justo antes de la infección) y días después de la infección.

## **IV. RESULTADOS**



## 1. Obtención de la proteína TbpA recombinante

### 1.1. Determinación de la secuencia del gen *tbpA* en el serotipo 5 de *H. parasuis*

El primer paso fue amplificar el gen *tbpA* del serotipo 5 de *H. parasuis*. Basándonos en la secuencia nucleotídica de la cepa Nagasaki depositada en la base de datos del Gene Bank, se diseñaron los cebadores nuevos TbpAF y RTC33R, que amplificaban completos los 1,9 kb que comprenden el gen *tbpA*.

En primer lugar, se extrajo el ADN genómico de *H. parasuis* mediante el procedimiento del fenol-cloroformo. Para su amplificación, se utilizaron los cebadores TbpAF y RTC33R y se llevó a cabo un protocolo de PCR normal utilizando una *Taq* "high fidelity" (en sucesivas pruebas se pudo comprobar que la tasa de error de ésta era prácticamente nula). Tras la amplificación y migración en un gel de agarosa, se comprobó que la banda obtenida era de 1,9 kb. Este producto de PCR se purificó y fue enviado a secuenciar al "Servicio de Secuenciación Genómica" de la Universidad de Valencia, para comprobar que la cepa de trabajo elegida era la correcta y que, por lo tanto, la secuencia del gen *tbpA* también lo era.

### 1.2. Estudio de las regiones conservadas de la proteína TbpA en el serotipo 5 de *H. parasuis*

Tomando como referencia la base de datos del Gene Bank y el programa Clustal W, se realizaron alineamientos del gen *tbpA* de *H. parasuis* de varios serotipos y de la secuencia del mismo gen en especies relacionadas, con el fin de conocer las regiones más conservadas filogenéticamente.

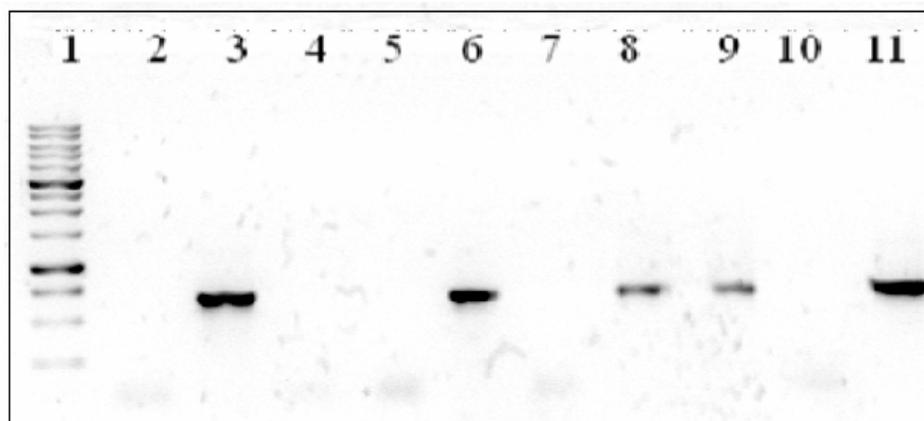
La proteína TbpA es una proteína integral de membrana con 22 láminas  $\beta$  antiparalelas y transmembrana que forman un canal en la membrana externa por el que penetra el hierro. Estas láminas se conectan entre sí mediante un conjunto de 11 bucles o lazos extracelulares y 10 más periplásmicos. Aunque en un primer momento la intención era utilizar el extremo amino terminal, en estudios anteriores se había demostrado que dicho extremo es muy hidrofóbico (probablemente por encontrarse anclado en la membrana), por lo que fue elegido un fragmento que comprendiera un lazo extracelular, para asegurar la exposición de esta proteína.

## Resultados

Siguiendo este criterio, se decidió utilizar un fragmento nucleotídico desde el nucleótido 301 al 901, es decir, 600 nucleótidos o, lo que es lo mismo, 200 aminoácidos intermedios. A partir de él se diseñaron los cebadores, GJM-F y GJM-R, que amplificaron este fragmento. Se realizó la PCR con un protocolo normal pero alargando el tiempo de extensión a 30 minutos. Se preparó un gel de agarosa para comprobar la existencia de esta banda a su tamaño adecuado, se purificó el producto de la PCR y se envió a secuenciar para su comprobación.

### 1.3. Clonación

Para llevar a cabo la clonación, se siguieron los protocolos detallados en el apartado 6.4 de "Material y Métodos". Obtenidas las colonias que poseían la construcción p-BAD-Thio-TbpA-V5-his, se procedió a comprobar que el inserto se había colocado correctamente y en la orientación adecuada. Con este propósito se llevó a cabo una PCR con el cebador *forward* del vector Trx Seq y con el cebador *reverse* del fragmento GJM-R, obteniéndose una banda de 600 pb en aquellos clones que tenían la construcción dentro y bien orientada, como se puede observar en el gel de agarosa de la Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Gel de agarosa. **Carril 1:** marcador de peso molecular de 10 a 0,25kb (Biotools). **Carriles 2, 4, 5, 7 y 10:** clones negativos. **Carriles 3, 6, 8, 9 y 11:** clones positivos, con la banda de 600 pb.

Con el fin de confirmar el resultado anterior, se procedió a secuenciar el ADN plasmídico extraído de los clones con la construcción bien orientada (con el cebador *forward* y el *reverse* del vector). La secuenciación demostró que la inserción era correcta, sin haberse producido ningún cambio de nucleótido.

#### 1.4. Expresión y solubilización

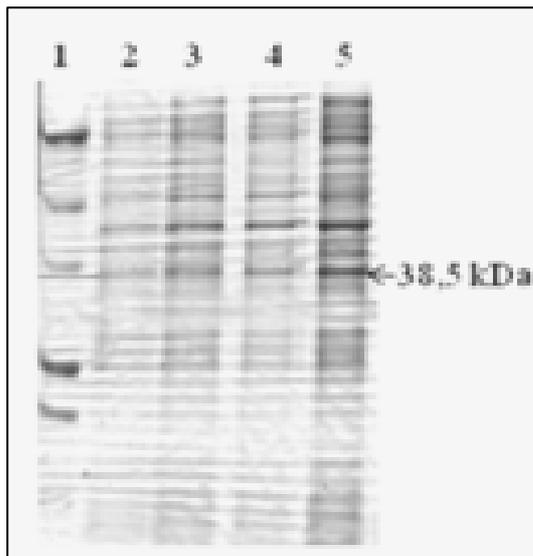
Para comprobar que la expresión y solubilización, llevadas a cabo según los protocolos recogidos en el apartado 6.4 (Material y Métodos), habían sido realizadas correctamente, se midieron las concentraciones proteicas obtenidas con los diferentes porcentajes del inductor, en este caso arabinosa, a distintos tiempos. Se probaron concentraciones del 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,15 y 0,2% de arabinosa y tiempos de 30, 60, 90 y 120 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.1.

Aunque en las incubaciones más cortas la mayor concentración de proteína recombinante se obtuvo con la concentración de arabinosa más alta de las probadas, al prolongar la incubación se redujo la concentración de inductor necesaria para producir los mejores resultados. De modo particular, las condiciones óptimas de expresión se alcanzaron al incubar durante 2 horas en presencia de un 0,075% de arabinosa, obteniéndose 2400 µg/ml de proteína recombinante.

**Tabla 4.1.** Resultados de concentración de proteína recombinante en µg/ml, obtenidos a partir de diferentes coconcentraciones y tiempos del inductor arabinosa.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>0,02%</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,075%</b>	<b>0,09%</b>	<b>0,15%</b>	<b>0,2%</b>
<b>30</b>	500	520	520	520	550	550
<b>60</b>	1100	1110	1200	1190	1189	1201
<b>90</b>	1500	1540	1580	1530	1508	1576
<b>120</b>	1980	2000	2400	2100	2100	2000

Con el fin de comprobar que el fragmento del gen *tbpA* contenía los 600 nucleótidos previstos, a los que se debían sumar los pesos de la tiorredoxina, del sitio de reconocimiento para el anticuerpo monoclonal anti-V5 y los 6 residuos de histidinas, se llevó a cabo un SDS- PAGE (Figura 4.2) en el que las bandas correspondientes a un resultado positivo debían estar próximos a los 40 kDa.



**Figura 4.2.** SDS-PAGE. Expresión de la proteína de fusión TbpA tras 120 minutos de incubación a 37°C con diferentes concentraciones de arabinosa. **Carril 1:** marcador de peso molecular de 250 a 10 kDa (Biorad). **Carril 2:** *E. coli* LMG194 transformada con nuestra construcción pero sin inducir. **Carril 3:** *E. coli* LMG194 transformada con nuestra construcción e inducida con un 0,02% de arabinosa. **Carril 4:** *E. coli* LMG194 transformada con nuestra construcción e inducida con un 0,05% de arabinosa. **Carril 5:** *E. coli* LMG194 transformada con nuestra construcción e inducida con un 0,075% de arabinosa.

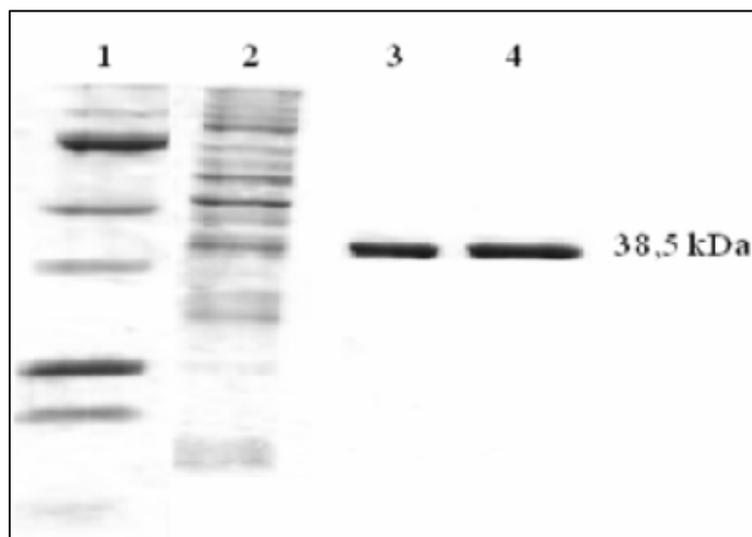
Para comprobar que la banda que se apreciaba en el gel y que se inducía con arabinosa era el fragmento proteico de prueba, se llevó a cabo un *immunoblotting* con el anticuerpo monoclonal anti-V5, que reconoce el epítipo localizado en el extremo C-terminal de la proteína de fusión. Se introdujeron como controles una muestra de *E. coli* sin la construcción y otra muestra con ella, pero sin inducción del fragmento proteico, al no haberse añadido arabinosa. Como muestras en las que se esperaba el fragmento proteico, se estudiaron las inducidas con un 0,075% y con un 2% de arabinosa, en las que tuvo lugar la unión del anticuerpo monoclonal, como se aprecia en la Figura 4.3.



**Figura 4.3.** *Immunoblotting*. **Carril 1:** marcador de peso molecular de 250 a 10 kDa (Biorad). **Carril 2:** *E. coli* LMG194 no transformada. **Carril 3:** *E. coli* LMG194 transformada con nuestra construcción pero sin inducir con arabinosa. **Carril 4:** *E. coli* LMG194 transformada e inducida con un 0,075% de arabinosa. **Carril 5:** *E. coli* LMG194 transformada e inducida con un 2% de arabinosa.

### 1.5. Purificación

Siguiendo los protocolos anteriormente detallados en el apartado de "Material y Métodos" se procedió a la purificación de la TbpA-r. Con el fin de confirmar que solamente se obtenía el fragmento proteico esperado, se prepararon geles de acrilamida en los que se obtuvo la banda correspondiente a 38,5 kDa (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** SDS-PAGE con la purificación de la proteína de fusión TbpA. **Carril 1:** marcador de peso molecular de 250 a 10 kDa (Biorad). **Carril 2:** extracto proteico antes de purificar. **Carriles 3 y 4:** proteína de fusión TbpA tras la purificación.



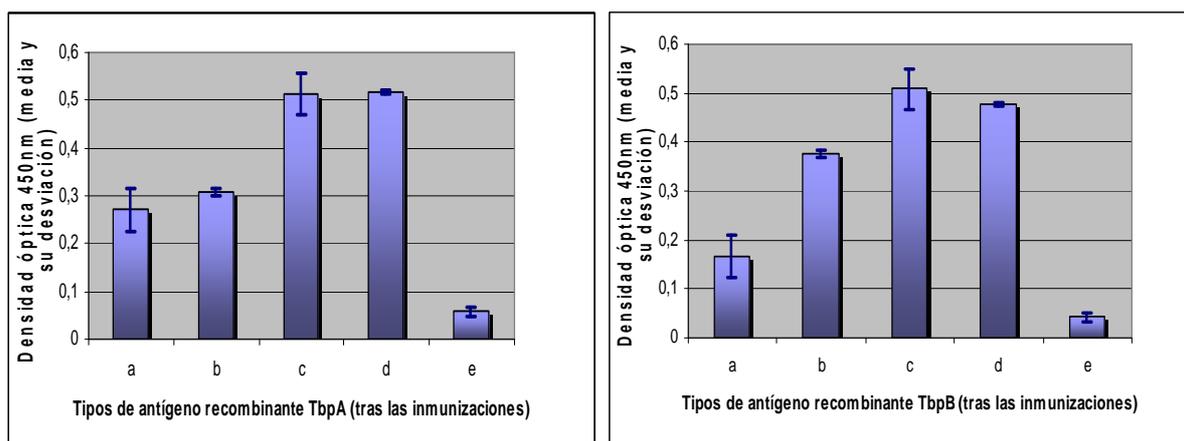
## 2. Inmunización de conejos. Obtención de anticuerpos policlonales frente a las TbpA y TbpB recombinantes

### 2.1. ELISA

Los resultados del proceso de inmunización demostraron que los niveles de anticuerpos detectados mediante ELISA (densidad óptica de los sueros) correlacionaban directamente con el procedimiento de preparación de las distintas emulsiones.

Los sueros de los conejos inmunizados con las proteínas recombinantes purificadas a partir del gel de acrilamida (antígeno "c"), presentaron niveles 11 y 15 veces superiores a los correspondientes al periodo previo a la inmunización (día 0). Por su parte, los correspondientes a las inmunizaciones llevadas a cabo con las emulsiones proteicas obtenidas a partir de la banda de nitrocelulosa resuspendida en PBS (antígeno "a") o en dimetilsulfóxido (DMSO) (antígeno "b") presentaron niveles de anticuerpos 5 veces superiores a los obtenidos antes de la inmunización (día 0). Los controles correspondientes a los sueros de los conejos inoculados con PBS no mostraron anticuerpos. Estos datos se ilustran en la Figura 4.5.

Cada uno de los sueros se analizó por triplicado y se observaron las variaciones en la densidad óptica como señal de la producción de anticuerpos.



**Figura 4.5.** Densidades ópticas mediante ELISA después de las diferentes inmunizaciones. **a:** fragmentos de nitrocelulosa con la proteína recombinante purificada. **b:** el mismo antígeno anterior, pero tratado con DMSO. **c:** fragmentos de gel de acrilamida con la proteína recombinante purificada. **d:** extracto proteico purificado. **e:** PBS.

## Resultados

Se aplicó el programa informático SPSS (versión 17.0) para comprobar si las diferencias que se apreciaban entre los diversos tratamientos eran estadísticamente significativas. En el caso de las inmunizaciones con la TbpA-r, el grupo control mostró diferencias significativas con el resto de tratamientos utilizados y, en el caso de las inmunizaciones con fragmentos de nitrocelulosa, no existieron diferencias al ser tratada con DMSO, como tampoco se encontraron en el caso de la inmunización con el gel o con el extracto purificado.

En el caso de la TbpB-r, los únicos resultados que no presentaban diferencias estadísticas entre ellos correspondieron a los animales inoculados con el gel y con el extracto purificado, según se observa en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Estudio estadístico entre los diferentes tratamientos

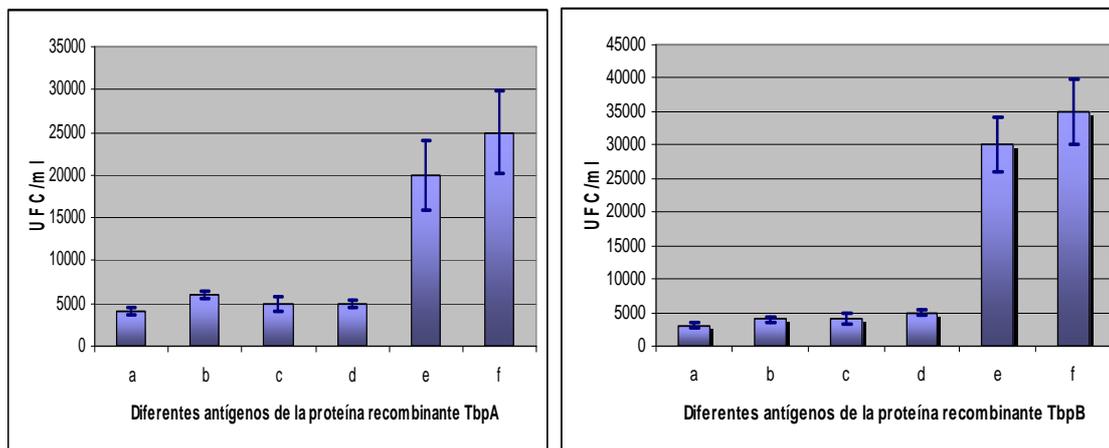
Comparación entre diferentes grupos	TbpA-r	TbpB-r
a vs b	NS	S (0,0043)
a vs c	S (0,0043)	S (0,0043)
a vs d	S (0,0037)	S (0,0021)
a vs e	S (0,0005)	S (0,0016)
b vs c	S (0,0049)	S (0,0031)
b vs d	S (0,0043)	S (0,0037)
b vs e	S (0,0006)	S (0,0029)
c vs d	NS	NS
c vs e	S (0,0031)	S (0,0029)
d vs e	S (0,0028)	S (0,0017)

a: fragmentos de nitrocelulosa con la proteína recombinante purificada. b: el mismo antígeno anterior, pero tratado con DMSO. c: fragmentos de gel de acrilamida con la proteína recombinante purificada. d: extracto proteico purificado. e: PBS. vs: versus. S: significativo ( $p < 0,005$ ). NS: no significativo.

### 2.2. Actividad bactericida del suero

Se valoró la disminución de un número determinado de UFC/ml de *H. parasuis* expuestas a sueros de animales inmunizados mediante las distintas preparaciones antigénicas a las que se ha hecho referencia.

En la Figura 4.6 se muestran las diferencias observadas respecto a la actividad bactericida. Tanto cuando se utilizaba el fragmento proteico TbpA-r como antígeno, (Ag), como cuando se empleaba el TbpB-r, se observaba que todos los sueros de los grupos inmunizados producían una reducción muy marcada del número de UFC/ml cuando se comparaban con los controles del estudio (ni el grupo inoculado con PBS ni el control correspondiente al complemento comercial produjeron reducción en el número de UFC/ml).



**Figura 4.6.** Actividad bactericida del suero dependiendo de las diferentes preparaciones de las proteínas recombinantes TbpA o TbpB; **a:** fragmentos de nitrocelulosa con la proteína recombinante purificada. **b:** el mismo antígeno anterior, pero tratado con DMSO. **c:** fragmentos de gel de acrilamida con la proteína recombinante purificada. **d:** extracto proteico purificado. **e:** PBS. **f:** control de complemento basado en la mezcla de *H. parasuis* y complemento comercial "baby-rabbit".

Para comprobar si las diferencias que se apreciaban en las gráficas eran significativas, se llevó a cabo el análisis de los datos con el programa informático SPSS, utilizando un ANOVA para comparación de medias con el factor de Tukey. Todos los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas con los grupos control, pero no se apreciaron entre las diversas inmunizaciones experimentales. Esto sucedió tanto en el estudio con la TbpA-r como con la TbpB-r (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Estudio estadístico entre los diferentes tratamientos

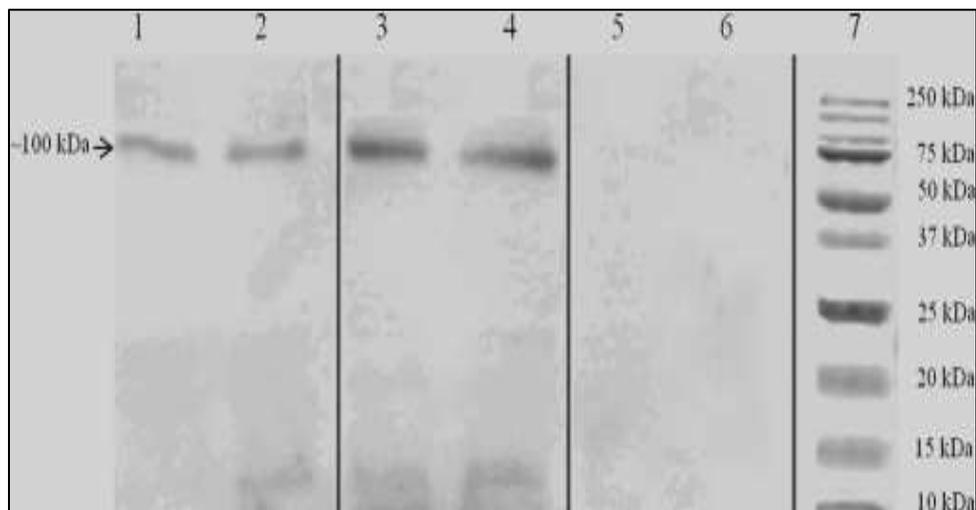
Comparación entre diferentes grupos	TbpA-r	TbpB-r
<b>a vs b</b>	NS	NS
<b>a vs c</b>	NS	NS
<b>a vs d</b>	NS	NS
<b>a vs e</b>	S (0,0024)	S (0,0023)
<b>a vs f</b>	S (0,0033)	S (0,0036)
<b>b vs c</b>	NS	NS
<b>b vs d</b>	NS	NS
<b>b vs e</b>	S (0,0027)	S (0,0024)
<b>b vs f</b>	S (0,0042)	S (0,0033)
<b>c vs d</b>	NS	NS
<b>c vs e</b>	S (0,0019)	S (0,0026)
<b>c vs f</b>	S (0,0031)	S (0,0012)
<b>d vs e</b>	S (0,0026)	S (0,0047)
<b>d vs f</b>	S (0,0032)	S (0,0038)
<b>e vs f</b>	NS	NS

**a:** fragmentos de nitrocelulosa con la proteína recombinante purificada. **b:** el mismo antígeno anterior, pero tratado con DMSO. **c:** fragmentos de gel de acrilamida con la proteína recombinante purificada. **d:** extracto proteico purificado. **e:** PBS. **f:** control de complemento basado en la mezcla de *H. parasuis* y complemento comercial "baby-rabbit". **vs:** versus. **S:** significativo ( $p < 0,005$ ). **NS:** no significativo.

### 2.3. Verificación de la especificidad de los anticuerpos policlonales mediante *immunoblotting*

Para demostrar la especificidad de los anticuerpos policlonales obtenidos en las inmunizaciones, se realizó un *immunoblotting* utilizando extractos de la cepa Nagasaki de *H. parasuis*, la cepa WF83 de *A. pleuropneumoniae* y la cepa CIP 5710 de *S. aureus*. Los sueros policlonales de prueba fueron los correspondientes al grupo de animales inmunizados con el fragmento proteico obtenido a partir del gel de acrilamida.

Se produjo reconocimiento en *H. parasuis* y *A. pleuropneumoniae* pero no en *S. aureus* ni en el control (*H. parasuis* sin suero como anticuerpo primario) (Figura 4.7). Lo mismo ocurrió cuando los sueros analizados eran los correspondientes al fragmento proteico TbpB-r inoculados a partir del gel.



**Figura 4.7.** *Immunoblotting* utilizando como anticuerpo primario suero frente a la TbpA. **Líneas 1 y 2:** extracto de la cepa Nagasaki de *H. parasuis*, serotipo 5. **Líneas 3 y 4:** extracto de *A. pleuropneumoniae* WF83. **Línea 5:** Extracto de *S. aureus* CIP 5710. **Línea 6:** Extracto de *H. parasuis* pero sin anticuerpo primario. **Línea 7:** marcador de peso molecular (BioRad).

### **3. Prueba experimental con cerdos privados de calostro**

#### **3.1. Monitorización de la temperatura**

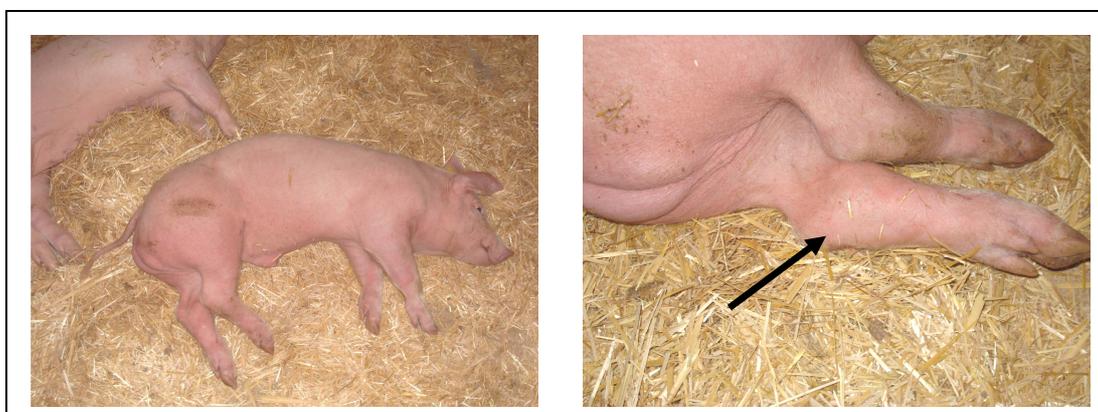
Desde el momento de la infección, en todos los animales se midió la temperatura rectal (Tabla 4.4, anexo). Los pertenecientes al grupo control (no inmunizados), inoculados con PBS, presentaron un incremento en la temperatura corporal ( $3^{\circ}\text{C}$  por encima del valor normal) durante todo el periodo posterior al desafío, mientras que las temperaturas de los animales de los grupos inmunizados con las TbpA-r y TbpB-r sólo aumentaron ligeramente su temperatura ( $1-1,5^{\circ}\text{C}$  por encima del valor normal durante las 48 horas posteriores al desafío). Los grupos inmunizados con la vacuna comercial o con las proteínas de unión a la transferrina (Tbp-nat) no presentaron cambios apreciables en sus temperaturas rectales durante todo el experimento.

Los resultados obtenidos se estudiaron mediante el programa informático SPSS (versión 17.0) para comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los grupos y comparando los grupos entre sí en cuatro momentos del experimento (a las 24, 48, 72 y 144 horas post-infección). Dentro de cada grupo se apreciaron diferencias estadísticamente significativas a las 24 y 48 horas en los grupos control ( $p=0,0021$ ;  $p=0,0032$ , respectivamente) y en los inmunizados con las TbpA-r ( $p=0,0017$ ;  $p=0,0033$ , respectivamente) y TbpB-r ( $p=0,0022$ ;  $p=0,0043$ , respectivamente). En los grupos inmunizados en los que todos los animales sobrevivieron a la infección no se apreciaron diferencias significativas en ningún momento del estudio.

Cuando se comparaban entre sí los grupos en los diferentes momentos del experimento, se observó que no existían diferencias significativas entre los grupos a las 0 horas (como era de esperar), a las 72 y a las 144 horas, mientras que a las 24 y 72 horas se podían dividir los grupos en dos bloques entre los que sí se producían éstas: por un lado, el grupo control y los inmunizados con la TbpA-r o la TbpB-r y, por otro, el grupo comercial y los inmunizados con las proteínas nativas de unión a la transferrina.

### 3.2. Signos clínicos y lesiones anatomopatológicas

Después del desafío, en función de los síntomas clínicos observados, los seis grupos fueron reducidos a tres: un grupo que se consideró **protegido totalmente** (compuesto por el inmunizado con la vacuna comercial, con las proteínas de unión a la transferrina por vía intramuscular y con este mismo antígeno por vía intratraqueal), un grupo **parcialmente protegido** (integrado por los cerdos inmunizados con las TbpA-r TbpB-r) y un grupo **no protegido** (el grupo inoculado con PBS). Estos últimos animales presentaron de forma muy evidente síntomas de depresión, debilidad, incoordinación motora, inflamación de las articulaciones (Figura 4.8), anorexia, disnea grave y tos.



**Figura 4.8.** Evolución del cuadro clínico agudo (36 horas después del desafío) de los animales no protegidos. Postración e inflamación de la articulación tibio-tarsiana.

Los animales parcialmente protegidos presentaron la misma evolución, pero debido a la protección inducida por las formulaciones, los síntomas fueron más leves. Dos integrantes del grupo inmunizado con la TbpA-r y uno del inmunizado con la TbpB-r manifestaron debilidad, pérdida de apetito y ligera hipertermia en los tres primeros días después del desafío, recuperándose totalmente al cabo de la primera semana y sobreviviendo hasta el final de la prueba. Los animales totalmente protegidos no presentaron ninguno de los síntomas descritos y todos sobrevivieron hasta la conclusión del estudio.

Todos los cerdos pertenecientes al grupo control (PBS) murieron entre las 24 y 48 horas después del desafío (0% de supervivencia). El grupo inmunizado con la TbpA-r presentó un 33% de supervivencia y las muertes se produjeron entre las 24 y 72 horas posteriores al desafío. En el grupo inmunizado con la TbpB-r, un 80% de los

animales murieron entre las 48 y 72 horas siguientes a la infección (20% de supervivencia). Por el contrario, los grupos inmunizados con la vacuna comercial o con las proteínas de unión a transferrina, presentaron un 100% de supervivencia hasta el final del estudio (15° día después del desafío).

### 3.3. Estudio anatomopatológico

Todos los animales del grupo control, inoculados con PBS, y la mayoría de los inmunizados con las TbpA-r (4/6) o TbpB-r (5/6) que murieron tras la infección, mostraron alteraciones inflamatorias características de una infección causada por *H. parasuis*. En estos animales se observaron signos de poliserositis fibrinosas graves en pericardio, pleura y cavidad abdominal, con hebras de fibrina sobre la superficie de las serosas (Figura 4.9, A,B y C). En algunos cerdos se pudo apreciar una moderada poliartritis fibrinosa localizada, sobre todo en tarso y carpo (Figura 4.9, D). También se observó un exudado de fibrina en la articulación atlanto-occipital de uno de los animales del grupo inmunizado con la TbpB-r. Otra de las lesiones inflamatorias observada consistió en una meningitis grave (Figura 4.9, E y F).

Respecto de las lesiones vasculares, los animales que murieron tras la infección presentaron edema, congestión, hemorragias, coagulación intravascular diseminada y trombosis vascular (Figura 4.10). El bazo de estos animales presentó apariencia macroscópica normal pero microscópicamente se observaron depósitos de fibrina en la zona marginal de las pulpas blanca y roja, así como una gran depleción de linfocitos, debido a la linfolisis en desarrollo (Figura 4.11, A, B, y C). Tanto las lesiones esplénicas como las alteraciones vasculares resultaron compatibles con un proceso septicémico, que justificaría la muerte de los animales.

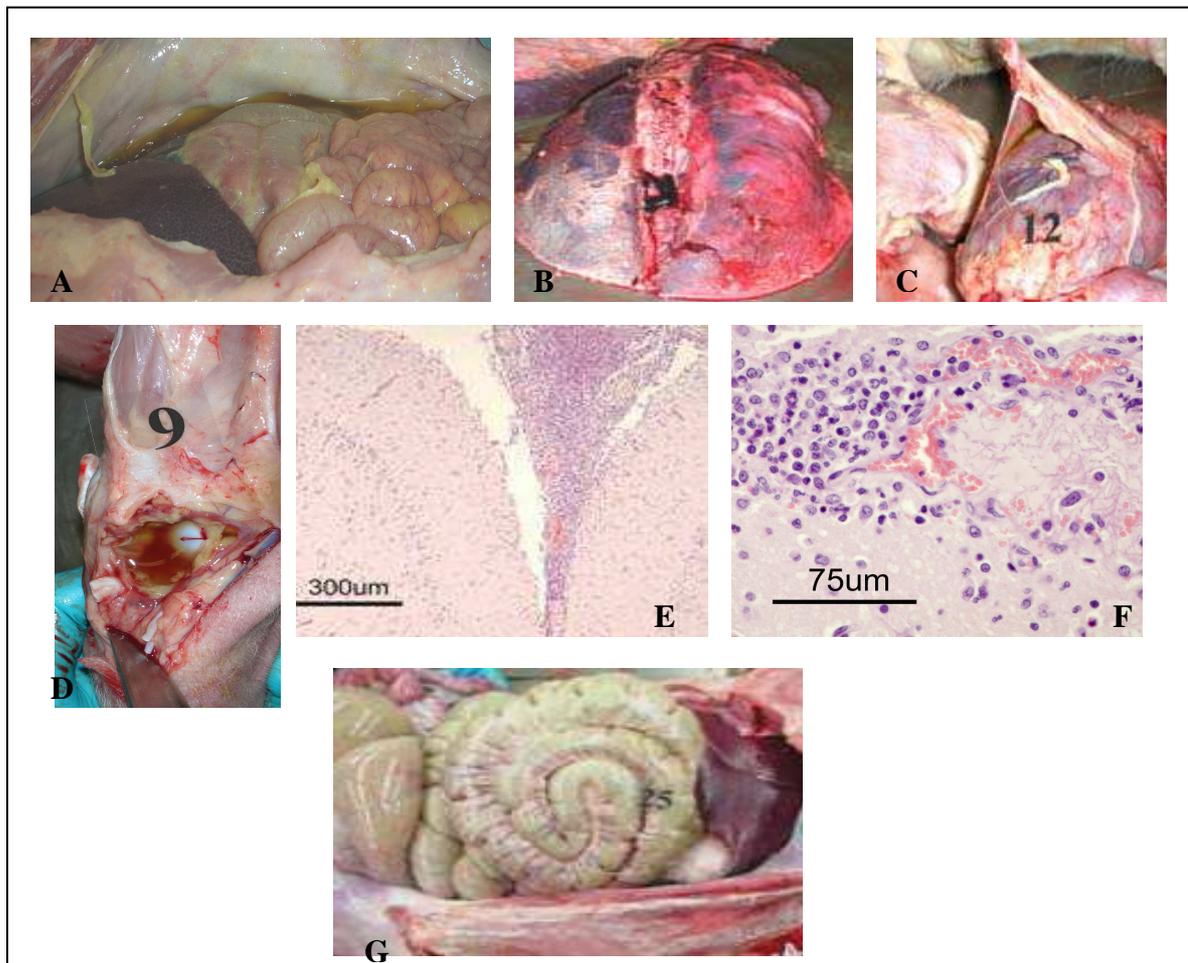
Los animales que sobrevivieron a la infección, que fueron inmunizados con la vacuna comercial o con las proteínas de unión a transferrina por cualquiera de las dos vías, presentaron una considerable reducción de las lesiones. Sólo se pudo observar una moderada peritonitis fibrinosa en la mayoría de los individuos pertenecientes a los grupos inmunizados con las proteínas de unión a transferrina que, en el caso del grupo inmunizado con la vacuna comercial, resultó mucho más leve (Figura 4.9, G). Microscópicamente, la mayoría de estos animales presentaron congestión leve y hemorragias escasas. En el grupo de animales inmunizados con la vacuna comercial se

## Resultados

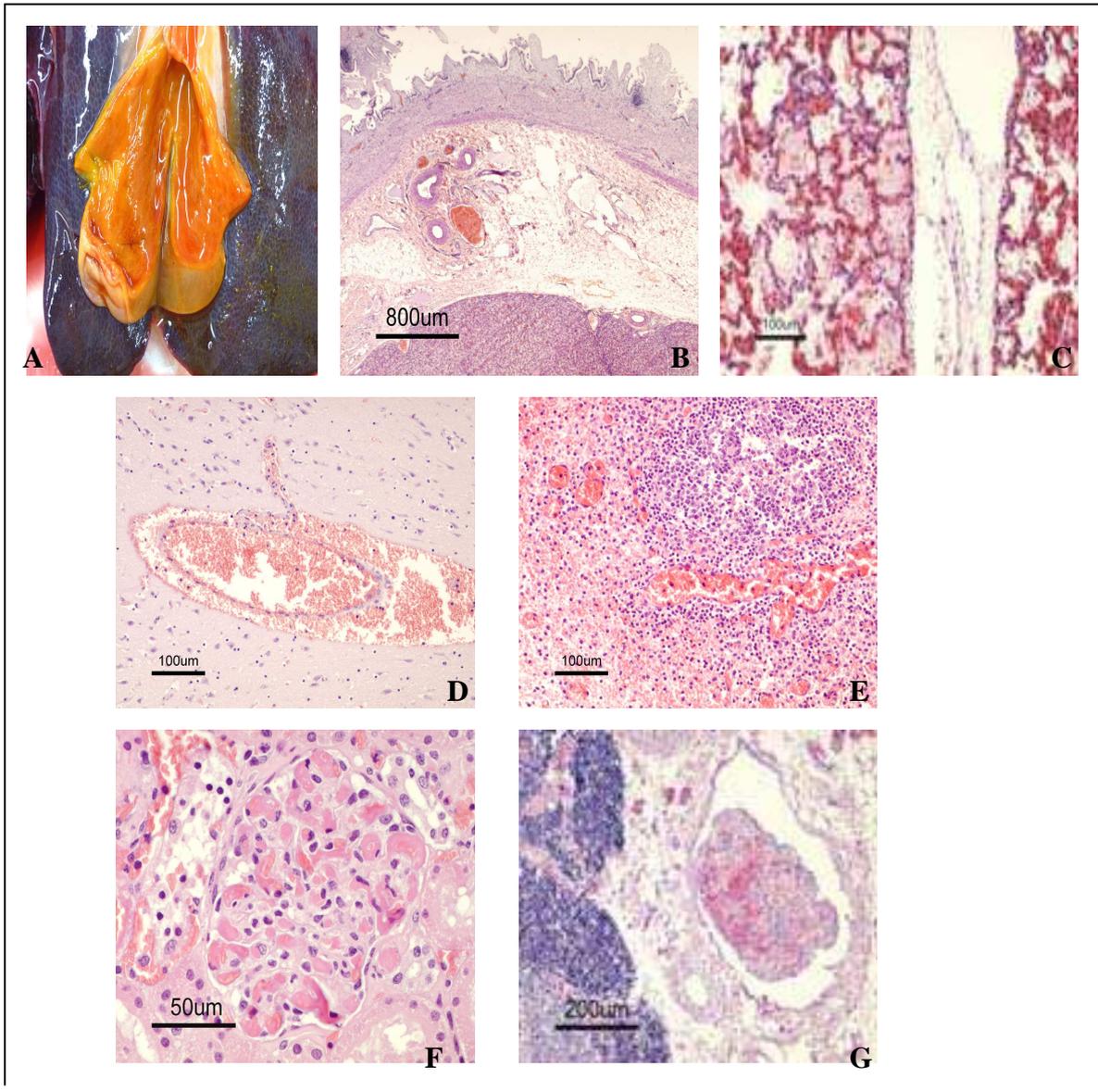
pudo observar trombosis vascular moderada. En estos tres grupos de animales, que sobrevivieron hasta el sacrificio, se observó hiperplasia de la pulpa blanca del bazo (Figura 4.11, D y E).

En la mayoría de los animales de los diferentes grupos se describieron así mismo, otras alteraciones sin aparente relación con la infección por *H. parasuis*, como es el caso de la presencia de hiperqueratosis y en algunos casos de úlceras de estómago, así como aclaración de masas musculares, en algunas zonas.

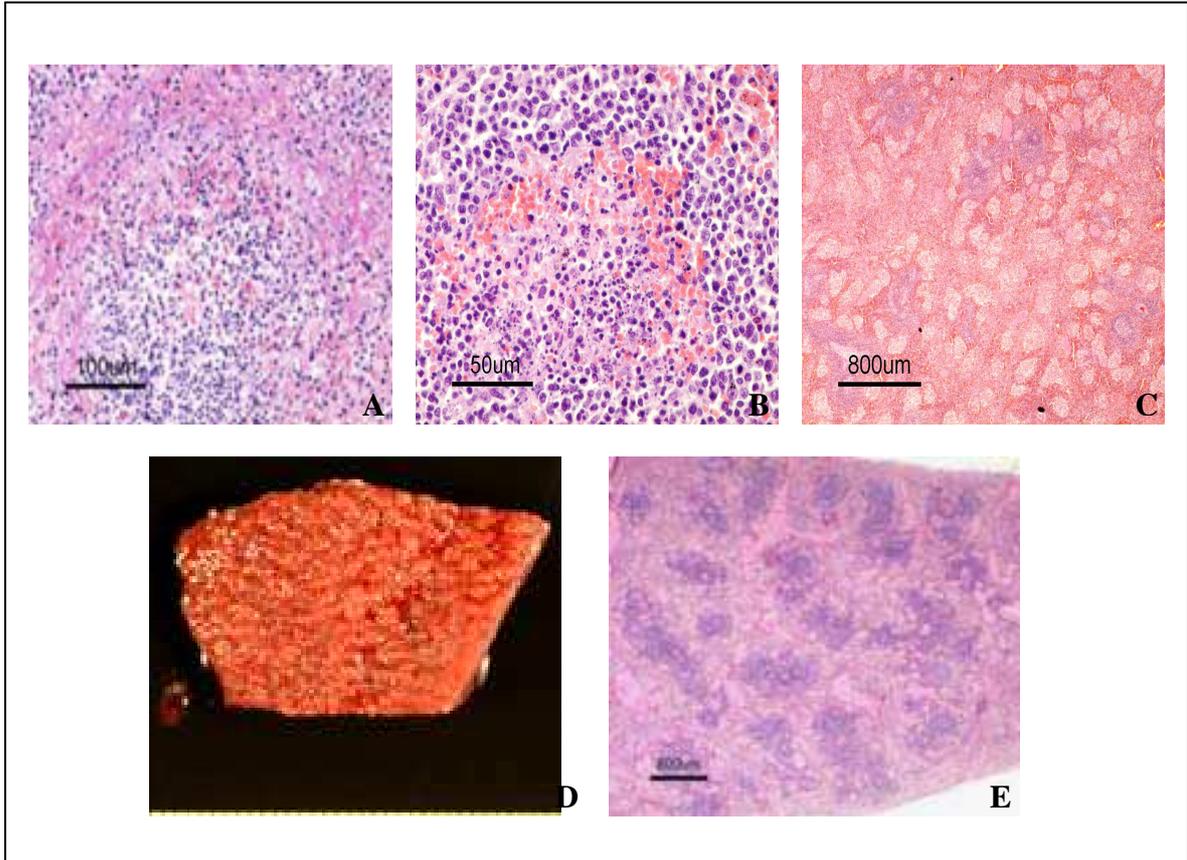
Las principales lesiones macroscópicas y microscópicas observadas en los diferentes grupos experimentales se resumen en la Tabla 4.5.



**Figura 4.9.** Lesiones inflamatorias. **Grupos de animales que no sobrevivieron a la infección:** **A:** peritonitis intensa. **B:** pleuritis fibrinosa intensa. **C:** hidropericardio con flóculos de fibrina. **D:** poliartritis en tarso. **E:** meningitis (H.E.). **F:** exudado inflamatorio de las meninges (H.E.). **Grupos de animales que sobrevivieron a la infección:** **G:** leve peritonitis. (H. E.: tinción por hematoxilina-eosina).



**Figura 4.10.** Lesiones vasculares. **A:** edema de la vesícula biliar. **B:** corte microscópico de la vesícula biliar: mostrando la presencia de edema (H.E.). **C:** edema alveolar de pulmón y hemorragias (H.E.). **D:** congestión y hemorragias perivasculares en encéfalo (H.E.). **E:** congestión y hemorragias en un ganglio linfático (H.E.). **F:** coagulación intravascular diseminada en riñón (H.E.). **G:** trombosis vascular (H.E.). (H. E.: tinción por hematoxilina-eosina).



**Figura 4.11.** Lesiones esplénicas. **Animales que murieron tras la infección:** **A:** necrosis de linfocitos y extravasación de proteínas plasmáticas (H.E.). **B:** bazo, necrosis de linfocitos en el centro del folículo esplénico con presencia de restos nucleares. (H.E.). **C:** bazo, necrosis de linfocitos esplénicos (H.E.). **Animales que sobrevivieron a la infección:** **D:** hiperplasia de pulpa blanca en el bazo. **E:** hiperplasia de pulpa blanca en el bazo, microscópicamente (H. E.). (H. E.: tinción por hematoxilina-eosina).

**Tabla 4.5.** Resumen de las principales lesiones macroscópicas y microscópicas en los diferentes grupos experimentales de los cerdos privados de calostro.

LESIONES	GRUPO EXPERIMENTAL					
	Control n=4	TbpB-r n=5	TbpA-r n=6	Vacuna Comercial n=6	Tbp-nat (im) n=6	Tbp-nat (it) n=6
<b>LESIONES VASCULARES:</b>						
<b>Congestión</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Edema:</b>						
Cerebro	++	±	±	-	-	-
Pulmón	++	+	+	±	±	-
Vesícula biliar	++	++	++	±	-	-
<b>Hemorragias</b>	++	++	++	±	±	±
<b>Coagulación intravascular diseminada</b>	+	+	+	-	-	-
<b>Trombosis vasculares</b>	++	++	++	±	-	-
<b>LESIONES INFLAMATORIAS:</b>						
<b>Meningitis</b>	++	++	+	-	-	-
<b>Poliserositis fibrinosa:</b>						
Pleuritis	++	++	++	-	-	-
Pericarditis	++	++	++	-	-	-
Peritonitis	++	++	++	±	+	+
<b>Poliartritis fibrinosa</b>	+	+	+	±	-	-
<b>LESIONES ESPLÉNICAS:</b>						
<b>Necrosis de linfocitos</b>	±	±	±	-	-	-
<b>Depósitos de fibrina</b>	±	±	±	-	-	-
<b>Hiperplasia linfoide</b>	-	±	±	++	++	++

Intensidad de las alteraciones: inapreciables (-), leves (±), moderadas (+) o graves (++).

TbpA-r: proteína de unión a la transferrina A recombinante

TbpB-r: proteína de unión a la transferrina B recombinante

Tbp-nat (im): proteínas nativas de unión a la transferrina inoculadas por vía intramuscular

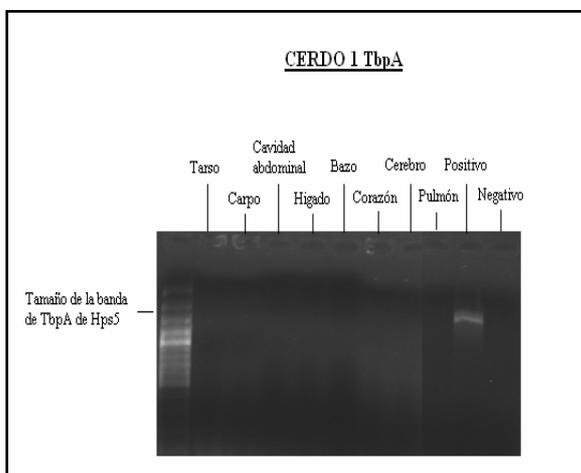
Tbp-nat (it): proteínas nativas de unión a la transferrina inoculadas por vía intratraqueal



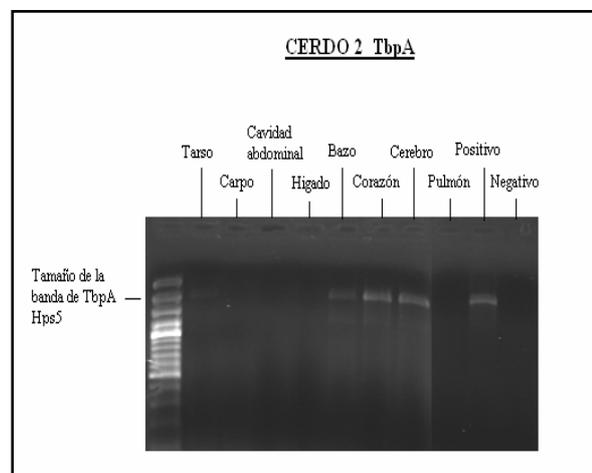
## 4. Detección y aislamiento de *H. parasuis*

Una vez realizadas las determinaciones mediante la PCR de las diferentes muestras de los animales, se procedió a estudiar e interpretar cada uno de los geles de agarosa, investigando la presencia de diferencias entre los grupos. En todas las PCR realizadas se consideró positivo un resultado cuando aparecía una banda del tamaño de 1,9 kb, el esperado en la amplificación de la proteína TbpA de la cepa Nagasaki del serotipo 5 de *H. parasuis*.

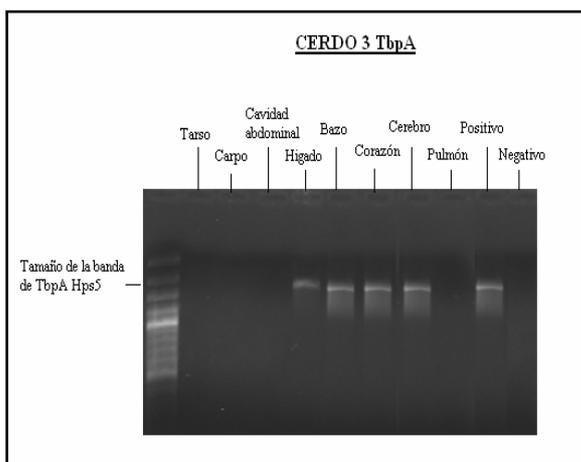
### 4.1. Cerdos inmunizados con la TbpA recombinante



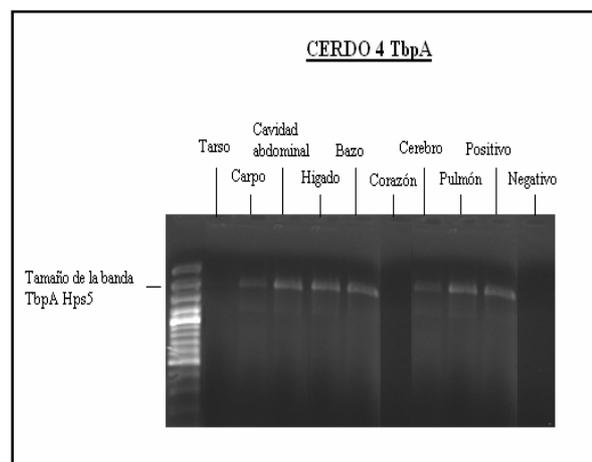
**Figura 4.12.** Resultado de las PCR del cerdo n°1



**Figura 4.13.** Resultado de las PCR del cerdo n°2



**Figura 4.14.** Resultado de las PCR del cerdo n°3



**Figura 4.15.** Resultado de las PCR del cerdo n°4

## Resultados

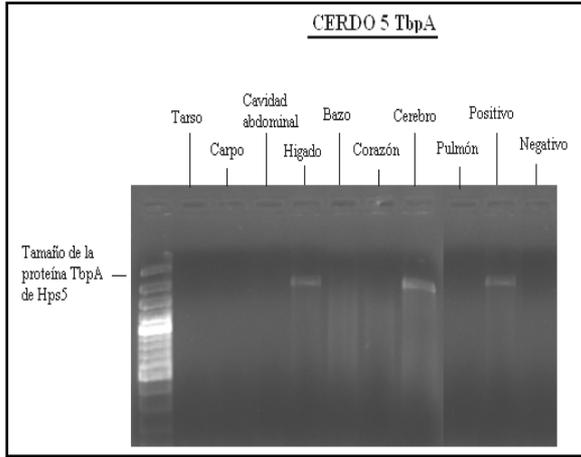


Figura 4.16. Resultado de las PCR del cerdo n°5

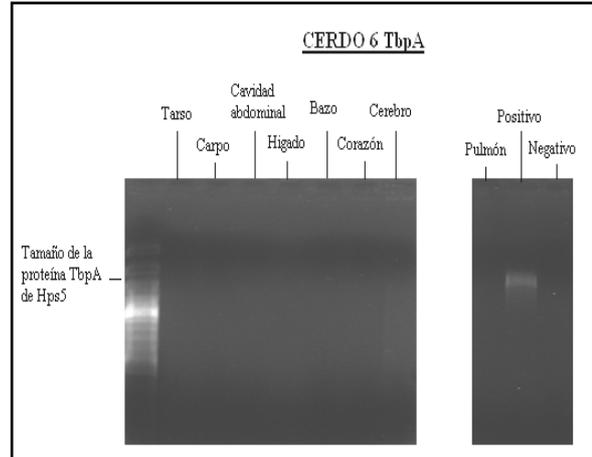


Figura 4.17. Resultado de las PCR del cerdo n°6

Los resultados individuales de este grupo mostraron los siguientes cambios detectables: en el cerdo n° 1, que vivió hasta el momento de la eutanasia, no se pudo detectar *H. parasuis* en ninguno de los órganos o secreciones analizados (Figura 4.12). En el cerdo n° 2, que murió 24 horas post-infección, la PCR fue positiva en cuatro de los ocho puntos de recogida de muestras (tarso, bazo, corazón y cerebro) (Figura 4.13). El cerdo n° 3, que murió a las 48 horas post-infección, también resultó positivo en cuatro localizaciones (hígado, bazo, corazón y cerebro) (Figura 4.14). El n° 4, que murió a las 96 horas post-infección, amplificó la TbpA en seis de los ocho puntos (carpo, cavidad abdominal, hígado, bazo, cerebro y pulmón) (Figura 4.15). En el n° 5, que murió a las 24 horas tras la infección, sólo se detectó en dos de las ocho muestras (hígado y cerebro) (Figura 4.16). Finalmente, en el n° 6, que sobrevivió hasta el momento del sacrificio, no se detectó ninguna muestra positiva a partir de la necropsia (Figura 4.17).

### 4.2. Cerdos inmunizados con la TbpB recombinante

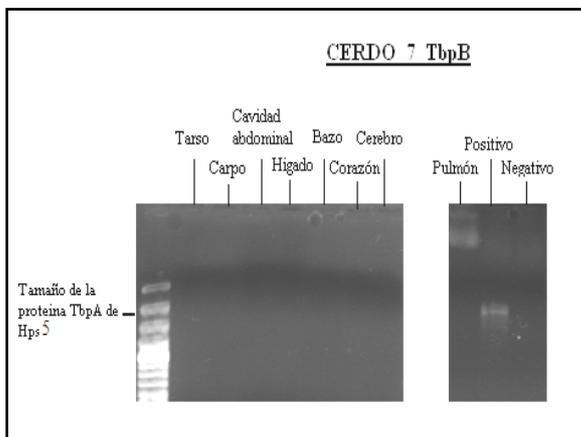


Figura 4.18. Resultado de las PCR del cerdo n°7

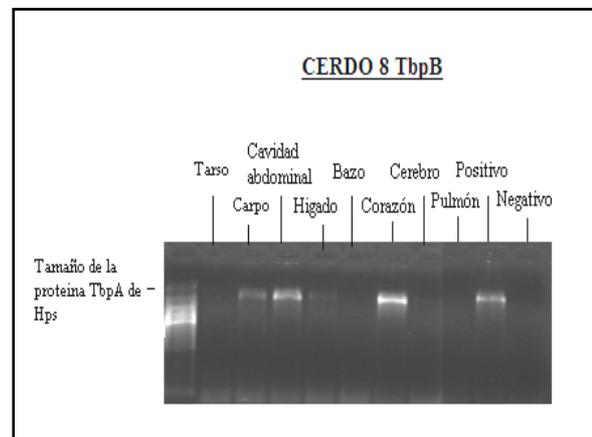


Figura 4.19. Resultado de las PCR del cerdo n°8

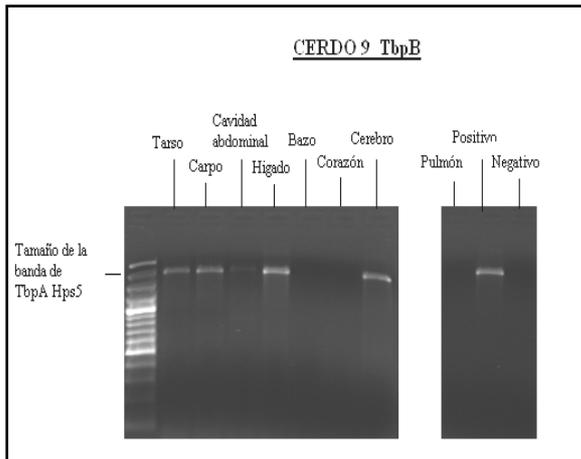


Figura 4.20. Resultado de las PCR del cerdo n°9

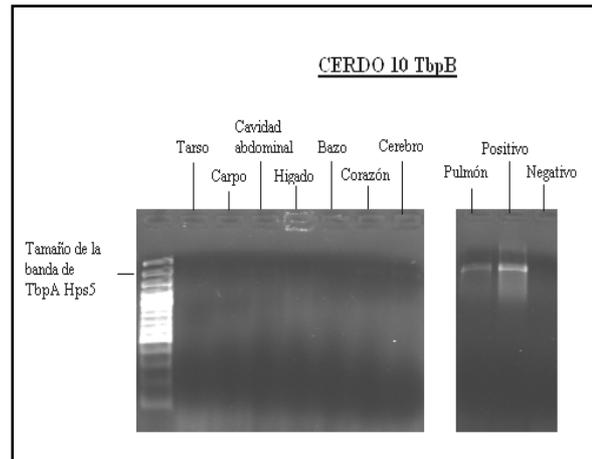


Figura 4.21. Resultado de las PCR del cerdo n°10

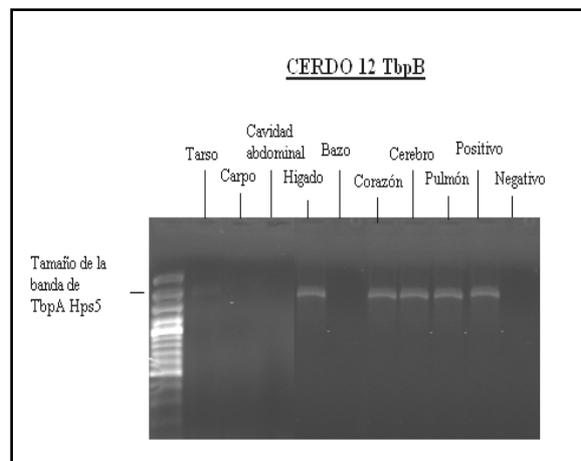
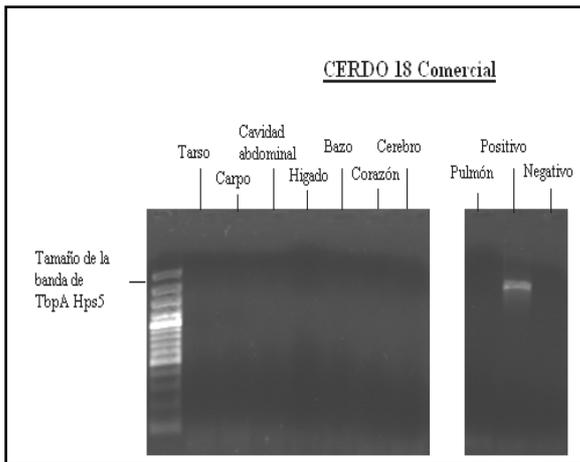


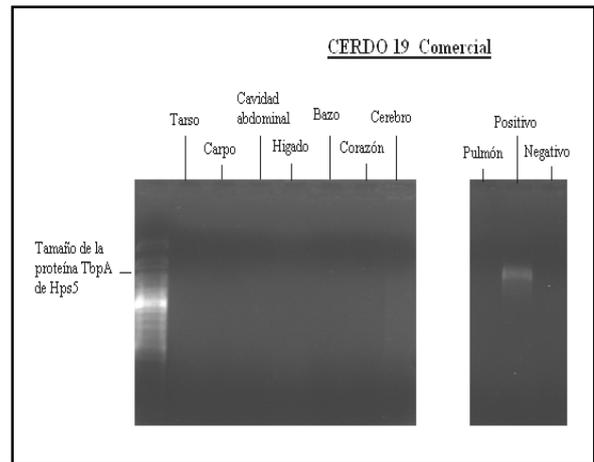
Figura 4.22. Resultado de las PCR del cerdo n°12

Los resultados obtenidos en relación con este grupo de animales (cerdos n° 7 a 12) se resumen del modo siguiente: en el cerdo n° 7, que sobrevivió hasta el sacrificio, no se pudo detectar *H. parasuis* en ninguno de los puntos de muestreados durante la necropsia (Figura 4.18). El cerdo n° 8, que murió a las 48 horas post-infección, amplificó esta proteína en 4 de los 8 puntos analizados (carpo, cavidad abdominal, hígado y corazón) (Figura 4.19). El cerdo n° 9, que murió también a las 48 horas post-infección, resultó positivo en 5 de las 8 muestras (tarso, carpo, cavidad abdominal, hígado y cerebro) (Figura 4.20). En el n° 10, que murió a las 48 horas post-infección, sólo se detectó *H. parasuis* en el pulmón (Figura 4.21). Por último, en el cerdo n° 12 se amplificó la TbpA de *H. parasuis* en 4 muestras (hígado, corazón, cerebro y pulmón) (Figura 4.22).

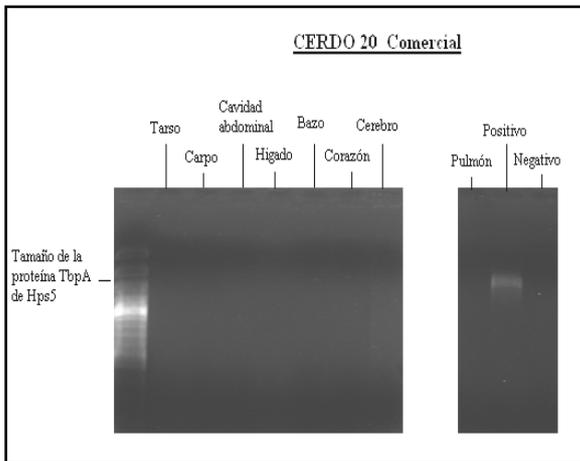
### 4.3. Cerdos inmunizados con la vacuna comercial



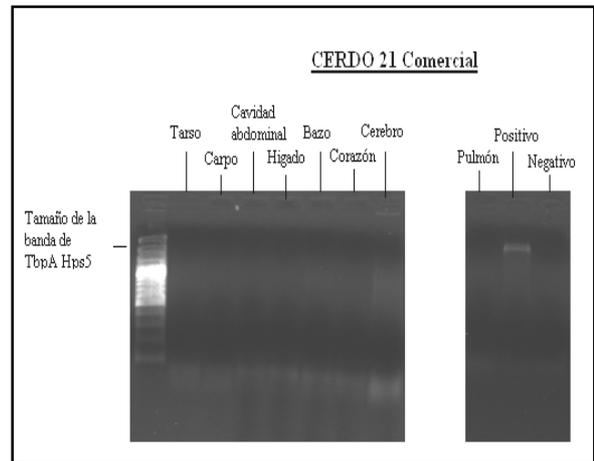
**Figura 4.23.** Resultado de las PCR del cerdo n°18



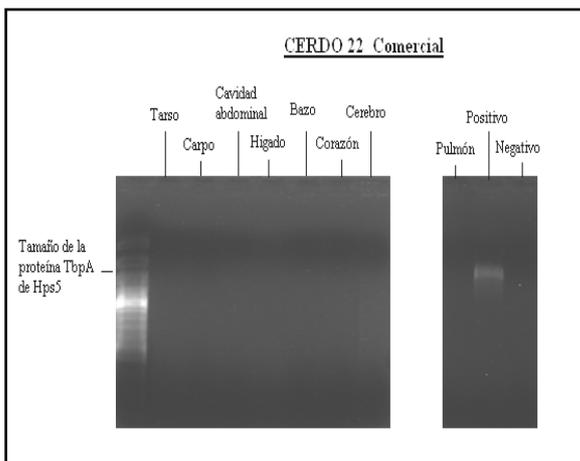
**Figura 4.24.** Resultado de las PCR del cerdo n°19



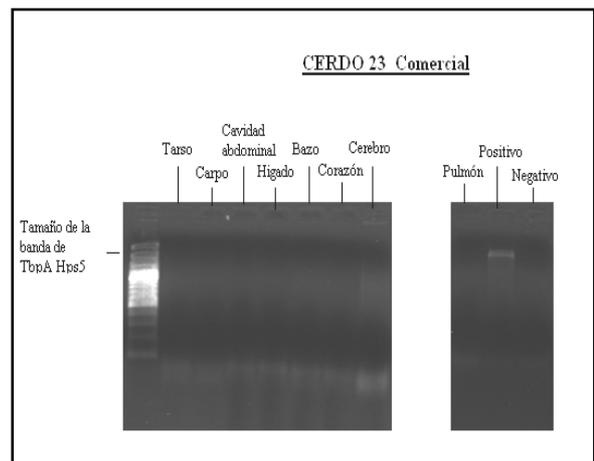
**Figura 4.25.** Resultado de las PCR del cerdo n°20



**Figura 4.36.** Resultado de las PCR del cerdo n°21



**Figura 4.27.** Resultado de las PCR del cerdo n°22



**Figura 4.28.** Resultado de las PCR del cerdo n°23

Todos los animales de este grupo sobrevivieron, por lo que fueron sacrificados a los 15 días post-infección. En ninguno de ellos se pudo detectar *H. parasuis* mediante PCR, en ninguna de las 8 muestras, recogidas durante la necropsia (Figuras 4.23 a 4.28).

#### 4.4. Cerdos inmunizados con las proteínas nativas de unión a la transferrina por vía intramuscular

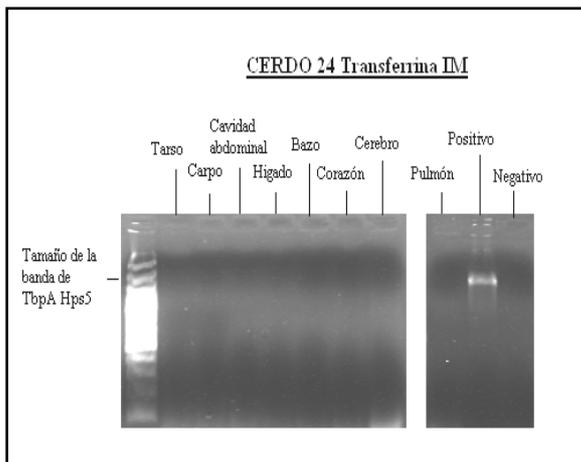


Figura 4.29. Resultado de las PCR del cerdo n°24

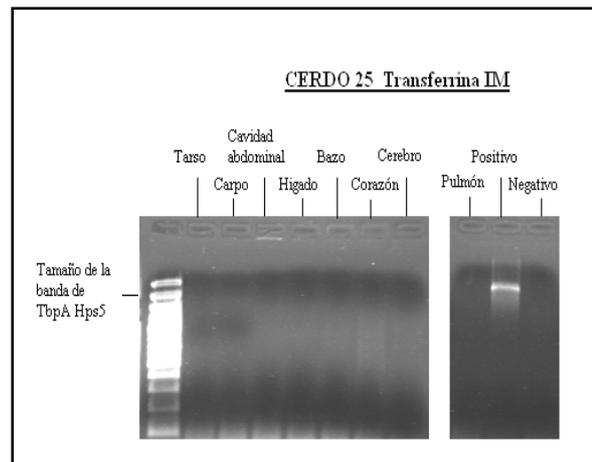


Figura 4.30. Resultado de las PCR del cerdo n°25

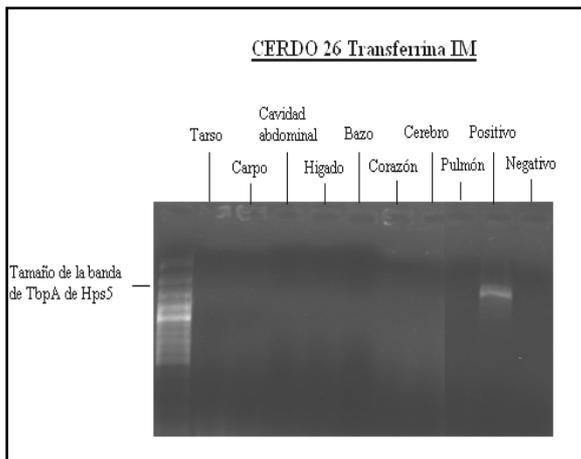


Figura 4.31. Resultado de las PCR del cerdo n°26

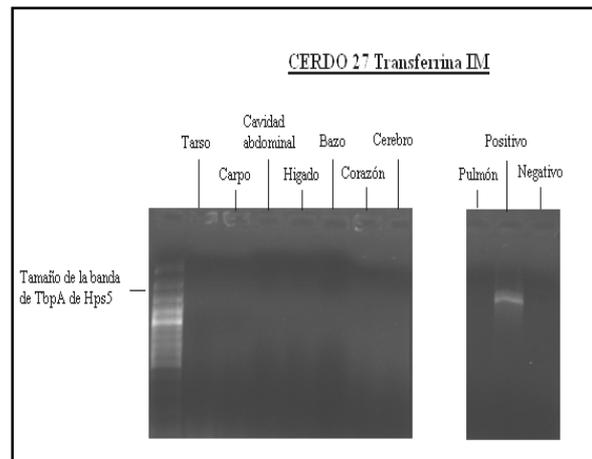


Figura 4.32. Resultado de las PCR del cerdo n°27

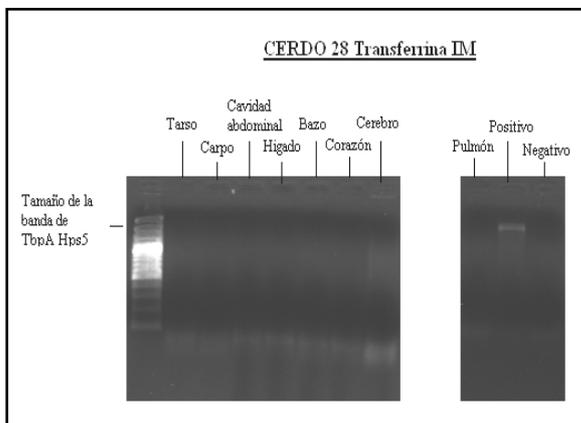


Figura 4.33. Resultado de las PCR del cerdo n°28

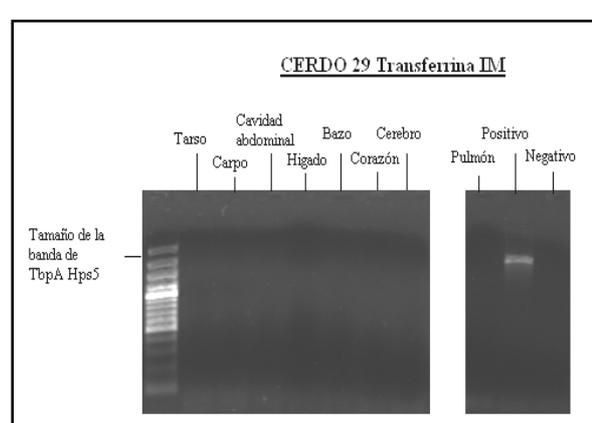


Figura 4.34. Resultado de las PCR del cerdo n°29

## Resultados

Como en el caso anterior, todos los animales de este grupo sobrevivieron a la infección bacteriana, por lo que fueron sacrificados 15 días después del desafío. En ninguno de los puntos muestreados en la necropsia se pudo detectar *H. parasuis*, por lo que el resultado coincidió con el observado en el grupo inmunizado con la vacuna comercial (Figuras 4.29 a 4.34).

### 4.5. Cerdos inmunizados con las proteínas nativas de unión a la transferrina por vía intratraqueal

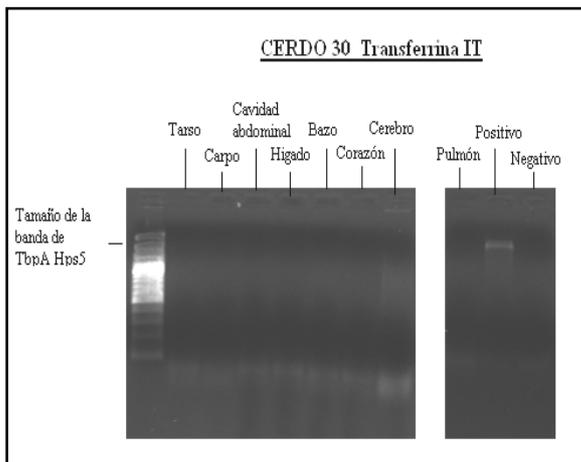


Figura 4.35. Resultado de las PCR del cerdo n°30

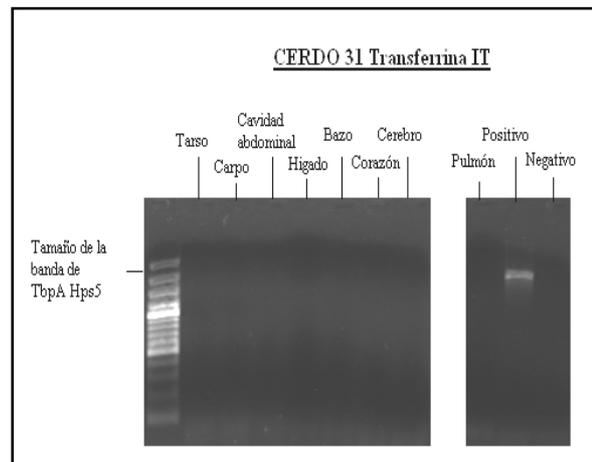


Figura 4.36. Resultado de las PCR del cerdo n°31

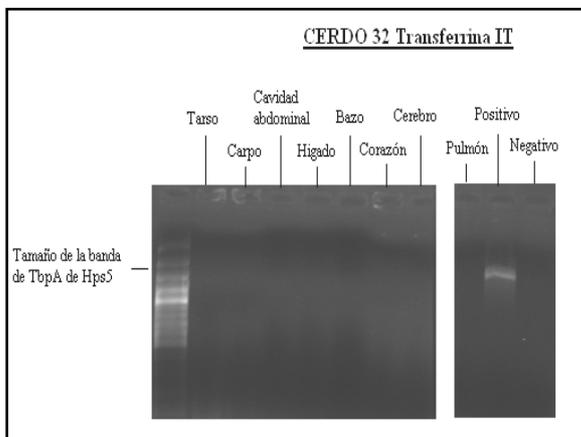


Figura 4.37. Resultado de las PCR del cerdo n°32

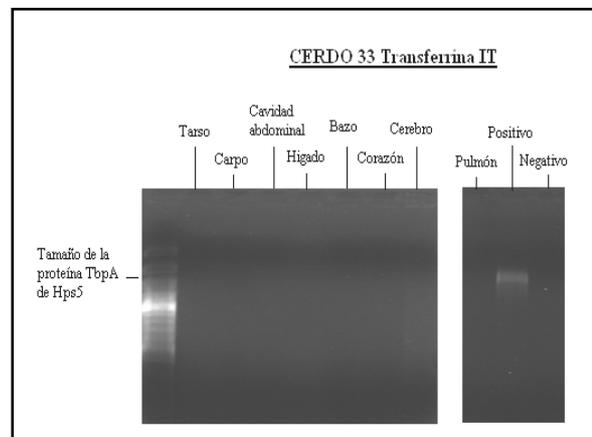


Figura 4.38. Resultado de las PCR del cerdo n°33

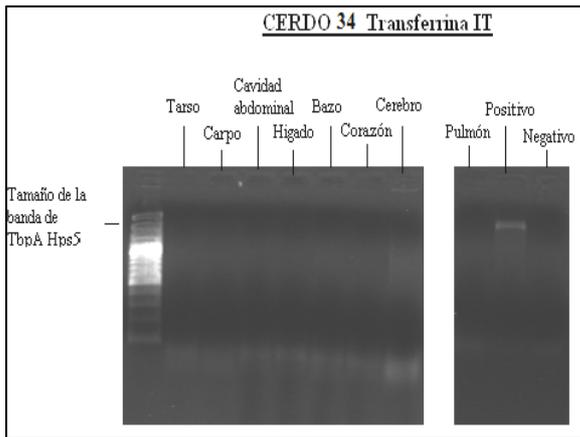


Figura 4.39. Resultado de las PCR del cerdo n°34

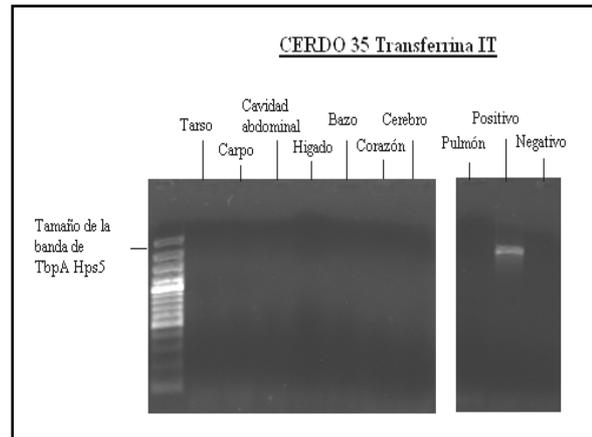


Figura 4.40. Resultado de las PCR del cerdo n°35

En este grupo de animales se observó el mismo resultado que en el grupo anterior: todos los animales sobrevivieron a la infección y todos los puntos muestreados resultaron negativos mediante PCR (Figuras 4.35 a 4.40).

#### 4.6. Cerdos control: inoculados con PBS

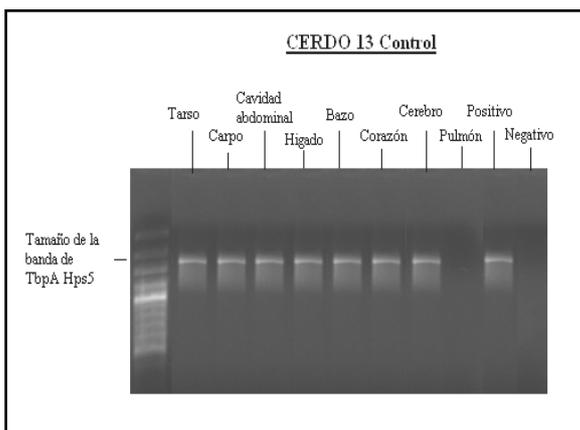


Figura 4.41. Resultado de las PCR del cerdo n°13

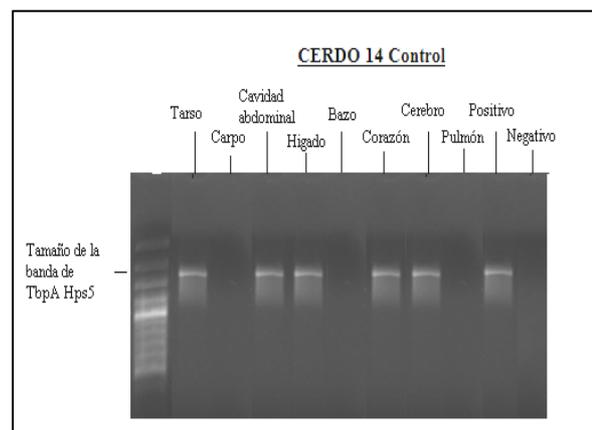


Figura 4.42. Resultado de las PCR del cerdo n°14

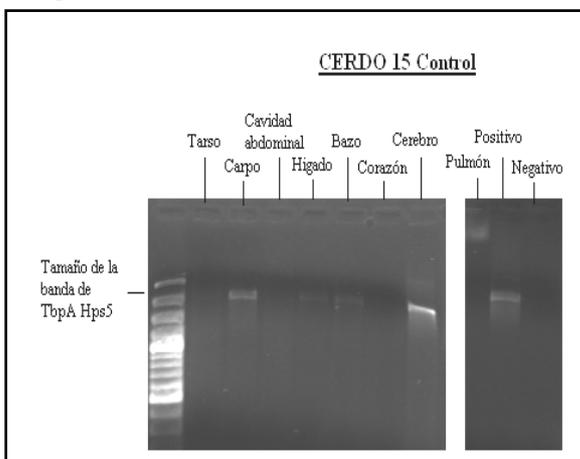


Figura 4.43. Resultado de las PCR del cerdo n°15

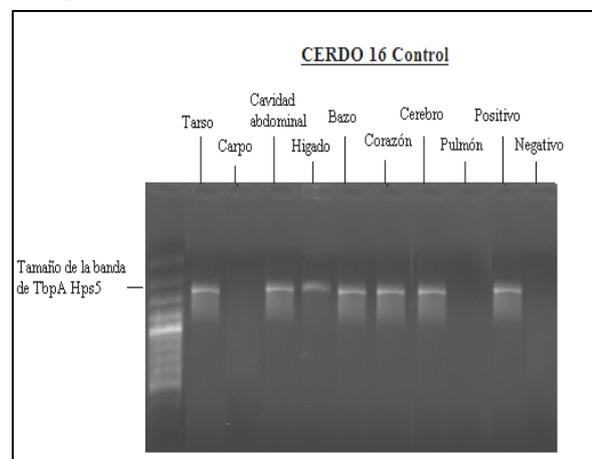


Figura 4.44. Resultado de las PCR del cerdo n°16

## Resultados

En este grupo, el cerdo nº 13, que murió a las 72 horas post-infección, presentó resultados positivos en 7 de las 8 muestras recogidas (todas excepto el pulmón) (Figura 4.41). En el cerdo nº 14, que murió a las 48 horas post-infección, se obtuvieron resultados positivos en 5 muestras (tarso, cavidad abdominal, hígado, corazón y cerebro) (Figura 4.42). El cerdo nº 15, que murió a las 24 horas post-infección, resultó positivo en 4 muestras (carpo, hígado, bazo y cerebro) (Figura 4.43). Finalmente, en el cerdo nº 16 se detectó la TbpA de *H. parasuis* en 6 de los 8 puntos muestreados (tarso, cavidad abdominal, hígado, bazo, corazón y cerebro) (Figura 4.44).

### 4.7. Resumen de los resultados

La Tabla 4.6 resume los resultados de detección de *H. parasuis* por PCR.

**Tabla 4.6.** Resultados de la PCR para la detección de la TbpA de *H. parasuis* desglosados por cada tipo de muestra recogida en la necropsia, en los diferentes lotes experimentales.

Muestras	Número de muestras positivas					
	TbpA-r (n=6)	TbpB-r (n=5)	Vacuna comercial (n=6)	Tbp-nat (im) (n=6)	Tbp-nat (it) (n=6)	Control (n=4)
Cerebro	4	2	0	0	0	4
Pulmón	1	2	0	0	0	3
Corazón	2	2	0	0	0	3
Bazo	3	0	0	0	0	4
Hígado	3	3	0	0	0	3
Cavidad abdominal	1	2	0	0	0	4
Tarso	1	2	0	0	0	2
Carpo	1	2	0	0	0	2
Positivos/total	<b>16/48</b>	<b>15/40</b>	<b>0/48</b>	<b>0/48</b>	<b>0/48</b>	<b>25/32</b>

TbpA-r: proteína de unión a la transferrina A recombinante

TbpB-r: proteína de unión a la transferrina B recombinante

Tbp-nat (im): proteínas nativas de unión a la transferrina inoculadas por vía intramuscular

Tbp-nat (it): proteínas nativas de unión a la transferrina inoculadas por vía intratraqueal

n = número de cerdos en el grupo correspondiente

El grupo de animales que más resultados positivos proporcionó y en mayor número de muestras fue el grupo control, con un total de 25 positivos sobre 32 posibles, lo que supone el 78,13%. En el caso de los animales inmunizados con la TbpA-r, se obtuvieron un total de 16 positivos sobre 48 posibles, lo que representa el 33,33%. Para la TbpB-r, este valor fue del 37,5%. En estos grupos inmunizados con la TbpA-r o con la TbpB-r, la amplificación se relacionó siempre con los animales que murieron, mientras que las muestras de los supervivientes resultaron negativas. En los tres grupos restantes (inmunizados con la vacuna comercial y con las Tbp-nat) no se detectaron positivos.

En el grupo control, utilizado como referencia, la amplificación más frecuente de la TbpA de *H. parasuis* obtenida mediante PCR, se observó en el cerebro, bazo y cavidad abdominal (100% de los casos), seguida por el pulmón, corazón e hígado (75%) y, en último lugar, por las serosas del carpo y tarso (50%). En el caso de la TbpA-r, la localización más común fue el cerebro (66,67%), por delante de bazo e hígado (50%). Para la TbpB-r, el mayor porcentaje de amplificación se detectó en el hígado (60%).



## 5. Actividad bactericida del suero en los grupos experimentales

Previamente a los ensayos de la actividad bactericida del suero, se realizaron varias determinaciones para comprobar la estabilidad de la suspensión bacteriana así como la validez de los controles no inmunizados.

### 5.1. Determinaciones preliminares

#### 5.1.a. Estabilidad de la suspensión bacteriana

Con este estudio se procedió a comprobar la estabilidad y concentración de una suspensión de  $5 \times 10^7$  UFC/ml de *H. parasuis* en el medio RPMI. Se mantuvo dicha suspensión a 4°C durante 24 horas y tras ese tiempo, se incubó la suspensión bacteriana con el resto de los componentes de la prueba (menos el suero) a 37°C durante 1 hora, comprobándose que el número de UFC/ml no variaba (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7.** Ensayo preliminar de estabilidad de la concentración bacteriana.

Contenido de los pocillos	UFC/ml
Suspensión bacteriana fresca (hora 0)	$5 \times 10^7$
Suspensión bacteriana a las 24h de mantenimiento a 4°C	$5 \times 10^7$
Suspensión bacteriana incubada 1h a 37°C	$5 \times 10^7$

#### 5.1.b. Comprobación de los controles

Se llevó a cabo un ensayo con los sueros de los controles de la prueba experimental antes de la infección, con el fin de confirmar que los cerdos privados de calostro no presentaban anticuerpos frente a *H. parasuis*. Los sueros con los que se llevó a cabo la prueba se utilizaron directamente (sin modificar) y descomplementados. El mantenimiento de la concentración inicial ( $5 \times 10^7$ ) de *H. parasuis* puso de manifiesto que el suero procedente de los cerdos control carecía de anticuerpos específicos frente a *H. parasuis* y que el complemento no presentaba acción bactericida en ausencia de aquéllos (Tabla 4.8).

**Tabla 4.8.** Ausencia de anticuerpos fijadores del complemento en los animales control.

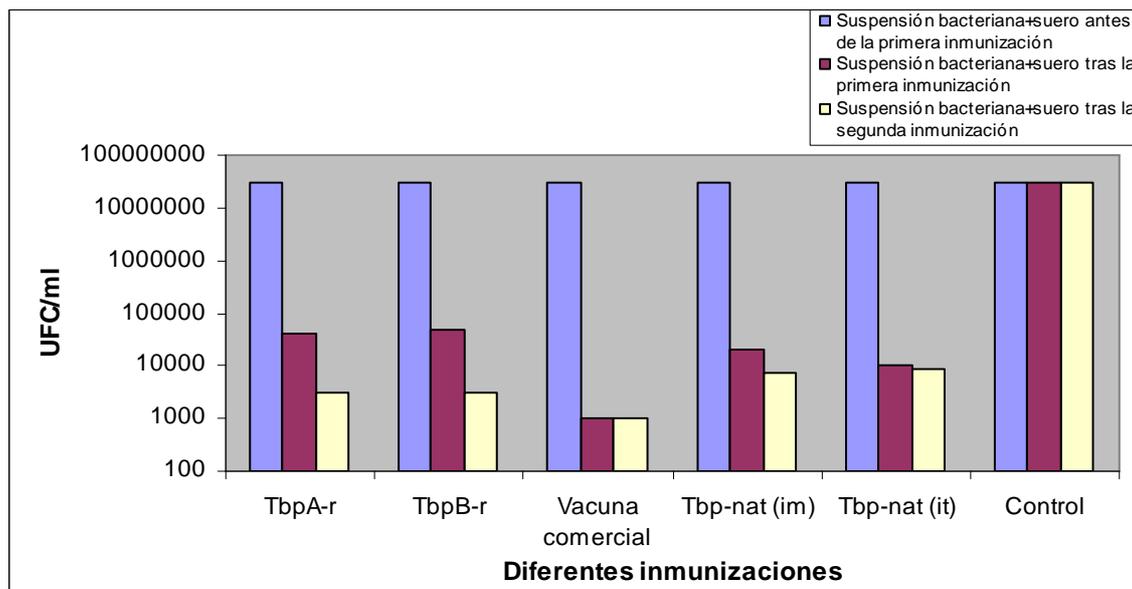
Contenido de los pocillos	UFC/ml
Suspensión bacteriana + suero cerdo control	$5 \times 10^7$
Suspensión bacteriana + suero cerdo control <b>descomplementado</b>	$5 \times 10^7$

## 5.2. Resultados del ensayo de actividad bactericida de los sueros de la prueba en los grupos experimentales

Se prepararon mezclas homogéneas (1:1) de sueros de cada uno de los lotes de los animales de la prueba, después de la primera y segunda inmunización, estudiando la evolución de su actividad bactericida (reducción del número de UFC/ml) sobre una suspensión de  $5 \times 10^7$  de *H. parasuis*. En la Tabla 4.9 se exponen los resultados y en la Figura 4.45 se representan gráficamente.

**Tabla 4.9.** Acción bactericida del suero de los cerdos de los distintos lotes de prueba, tras las inmunizaciones.

Grupos de inmunización	Recuento de UFC/ml (1h 37°C)	
	Sueros 1ª inmunización	Sueros 2ª inmunización
<b>TbpA-r</b>	$4 \times 10^4$	$3 \times 10^3$
<b>TbpB-r</b>	$5 \times 10^4$	$3 \times 10^3$
<b>Vacuna comercial</b>	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$
<b>Tbp-nat (im)</b>	$2 \times 10^4$	$7 \times 10^3$
<b>Tbp-nat (it)</b>	$1 \times 10^4$	$9 \times 10^3$
<b>Control</b>	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^7$



**Figura 4.45.** Resultado de la actividad bactericida del suero en los diferentes grupos experimentales.

Se comprobó claramente que la mezcla de sueros procedentes de los cerdos de los diferentes grupos inmunizados presentaban anticuerpos fijadores del complemento después de la primera inmunización, lo que se traducía en la acción bactericida frente a la suspensión de *H. parasuis*. Se observó una diferencia de una unidad logarítmica entre el grupo inmunizado con la bacterina comercial y el resto, aunque la reducción fue de 2 a 5 veces mayor en el grupo inmunizado con las Tbp-nat, especialmente cuando se utilizó la vía intratraqueal.

Después de la segunda inmunización, excepto en el grupo inoculado con la vacuna comercial, en que la concentración de la suspensión bacteriana se mantuvo estable, en el resto de los grupos se produjo un descenso mayor, más evidente en los grupos vacunados con las proteínas recombinantes. En el grupo control, la concentración bacteriana se mantuvo estable.

Los datos anteriores fueron sometidos al estudio estadístico correspondiente entre los diferentes grupos (Tabla 4.10). Según se observa, excepto en el caso del lote control, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los resultados antes y después de la primera inmunización, pero no entre ésta y la segunda.

## Resultados

**Tabla 4.10.** Estudio estadístico de la acción bactericida del suero en los diferentes tratamientos experimentales.

Lotes	Significación estadística entre diferentes momentos de la prueba experimental	
	I	II
TbpA-r	S (0,0031)	NS
TbpB-r	S (0,0042)	NS
Comercial	S (0,0021)	NS
Tbp-nat (im)	S (0,0046)	NS
Tbp-nat (it)	S (0,0036)	NS
Control	NS	NS

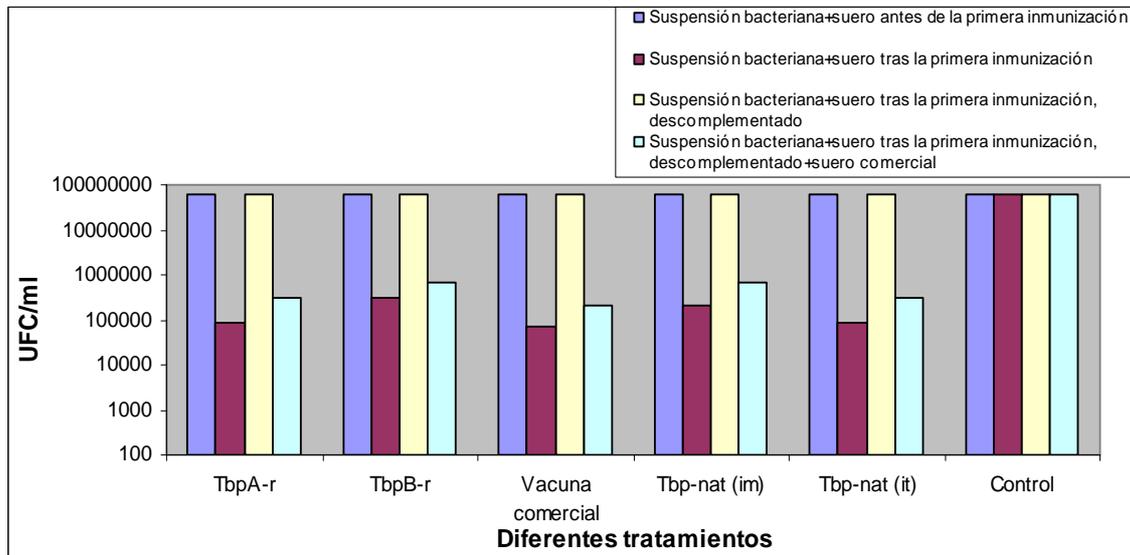
I: Antes de la 1ª inmunización- después 1ª inmunización. II: antes de la 2ª inmunización- después de la 2ª inmunización. S= significativo ( $p < 0,005$ ). NS= no significativo

### 5.3. Ensayo de confirmación de la actividad bactericida del suero

Para verificar la importancia del complemento en el complejo antígeno-anticuerpo-complemento para llevar a cabo la actividad bactericida, se realizó una prueba con los sueros de los diferentes lotes, descomplementados (tratamiento a 56°C durante 30 minutos), comprobándose que después del tratamiento térmico, perdían su capacidad bactericida. De modo inverso, cuando a la mezcla anterior se le suministraba complemento (suero de cobaya, comercial) el suero recuperaba dicha actividad. Los datos se presentan en la Tabla 4.11 y en la Figura 4.46.

**Tabla4.11.** Necesidad del complemento para la acción bactericida del suero.

Grupos de inmunización	Actividad bactericida. Recuentos		
	Sueros 1ª inmunización	Sueros 1ª inmunización descomplementado	Adición de complemento
TbpA-r	$7 \times 10^4$ UFC	$5 \times 10^7$ UFC	$3 \times 10^5$ UFC
TbpB-r	$4 \times 10^4$ UFC	$6 \times 10^7$ UFC	$7 \times 10^5$ UFC
Vacuna comercial	$3 \times 10^4$ UFC	$6 \times 10^7$ UFC	$7 \times 10^5$ UFC
Tbp-nat (im)	$2 \times 10^4$ UFC	$4 \times 10^7$ UFC	$7 \times 10^5$ UFC
Tbp-nat (it)	$6 \times 10^4$ UFC	$5 \times 10^7$ UFC	$7 \times 10^5$ UFC
Control	$6 \times 10^7$ UFC	$6 \times 10^7$ UFC	$6 \times 10^7$ UFC



**Figura 4.46.** Necesidad del complemento para la actividad bactericida del suero.

El estudio estadístico de los resultados mostró diferencias significativas en el caso del suero normal (sin tratamiento) y el descomplementado ( $p=0,0014$ ;  $p=0,0034$ ;  $p=0,0021$ ;  $p=0,0046$ ;  $p=0,0027$ ;  $p=0,0032$ ) en todos los lotes de animales estudiados, excepto en el control. Comparando el del suero descomplementado con el suero al que se la había añadido complemento, comercial, también se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,0021$ ;  $p=0,0046$ ;  $p=0,0044$ ;  $p=0,0021$ ;  $p=0,0032$ ;  $p=0,0028$ ) en todos los grupos, excepto en el lote control.



## 6. Estudio de la respuesta de fase aguda

En el estudio de las proteínas de fase aguda (PFA), se caracterizaron un total de cuatro: pig MAP, haptoglobina, proteína C reactiva (CRP) y apolipoproteína I (Apo I). En los apartados que siguen, se estudia la evolución individual y por grupos de estas proteínas, desde el momento anterior a la infección (desafío) hasta la muerte o sacrificio de los animales (15 días después de la infección).

### 6.1. Cerdos inmunizados con la proteína TbpA recombinante

#### 6.1.a. Pig MAP

Antes de la infección, todos los animales presentaban valores bajos de esta proteína (entre 0,31 y 0,42 mg/ml). Después de la infección, los animales que murieron (cerdos nº 2, 3, 4 y 5) presentaron un aumento progresivo de su cantidad, alcanzando el máximo valor antes de la muerte (desde 0,56 a 3,57 mg/ml). Los animales que sobrevivieron a la infección (cerdos nº 1 y 6) apenas sufrieron un incremento mínimo en la concentración de la proteína en los días posteriores al desafío y dichos valores se mantuvieron constantes hasta el momento del sacrificio (0,44 y 0,56 mg/ml). El análisis estadístico, diferenciado en función de la supervivencia o no al desafío, puso de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,0025$ ), en los días post-infección en los animales que no superaron la infección. En la Tabla 4.12 se puede observar la evolución en la concentración de esta proteína en cada uno de los animales, desde el momento de la infección. En las Figuras 4.47 y 4.48 se representan dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

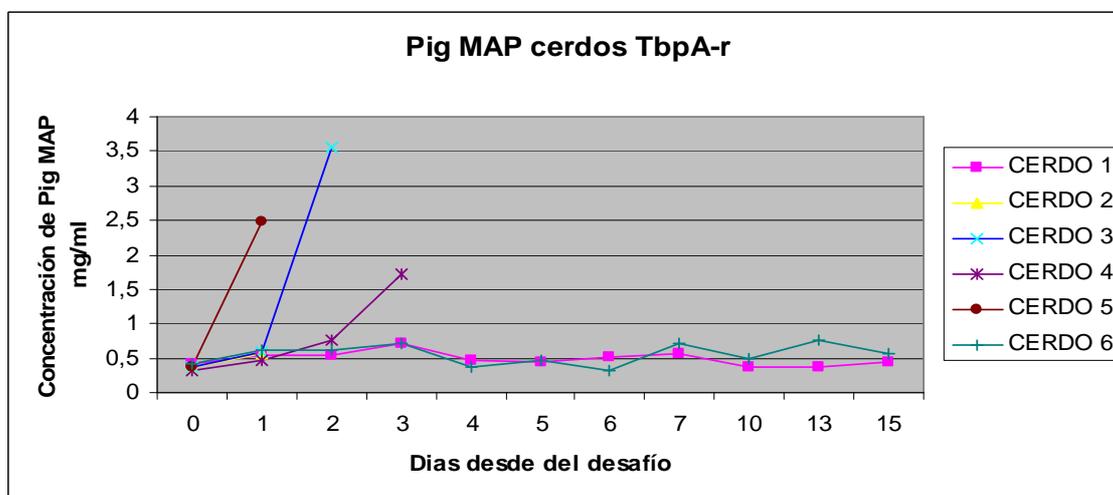


Figura 4.47. Evolución de los niveles de pig MAP.

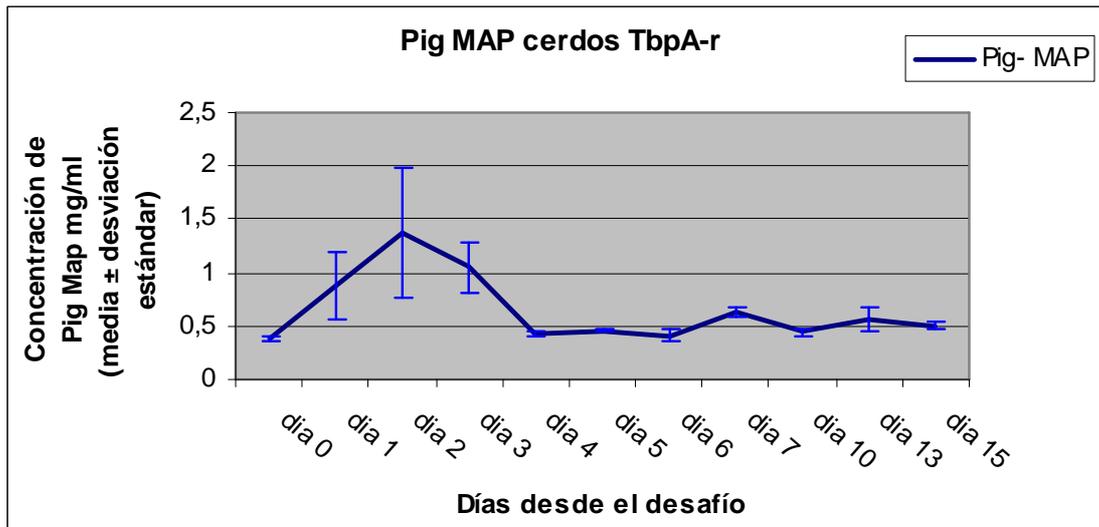


Figura 4.48. Media de la concentración de pig MAP en el grupo.

### 6.1.b. Haptoglobina

Antes de la infección todos los animales presentaban una concentración inferior a 0,5 mg/ml (entre 0,28 y 0,31 mg/ml), pero después del desafío su nivel se incrementó considerablemente en los cerdos que murieron en los días posteriores (cerdos n° 2, 3, 4 y 5), llegando a cuadruplicar los niveles basales, anteriores al desafío (entre 0,59 y 1,63 mg/ml). Todos los animales (incluso los que sobrevivieron hasta el sacrificio) presentaron una elevación en la concentración en las primeras 24-48 horas, transcurridas las cuales, los valores se estabilizaron en los supervivientes, volviendo a los niveles iniciales. En el estudio estadístico de los resultados ninguno de los subgrupos (los que sobrevivieron y los que murieron tras la infección) presenta diferencias estadísticamente significativas. En la Tabla 4.12 se puede apreciar la evolución en la concentración de esta proteína de forma individual, desde el momento de la infección. En las Figuras 4.49 y 4.50 se representan dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

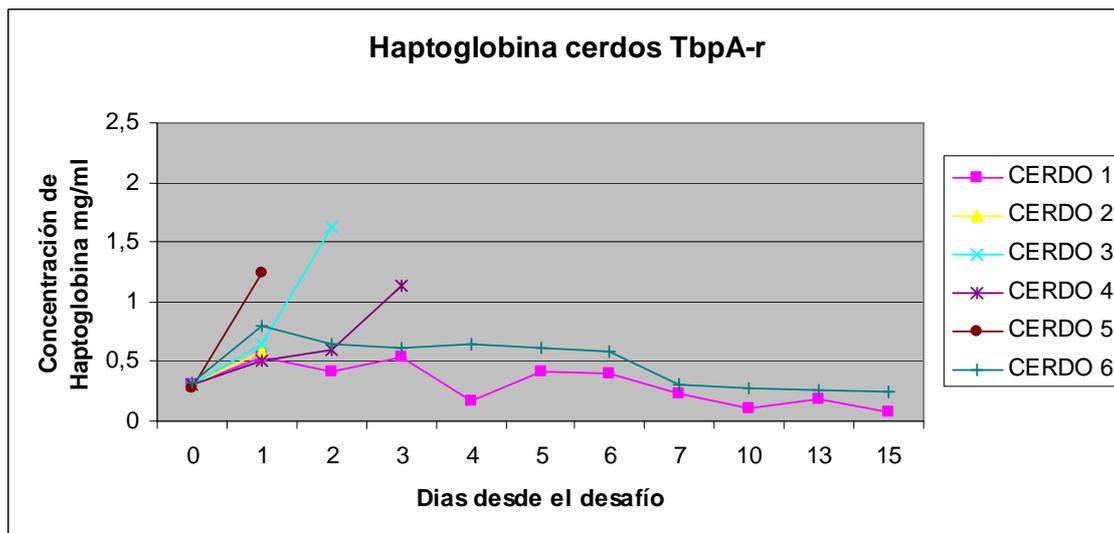


Figura 4.49. Evolución de los niveles de haptoglobina.

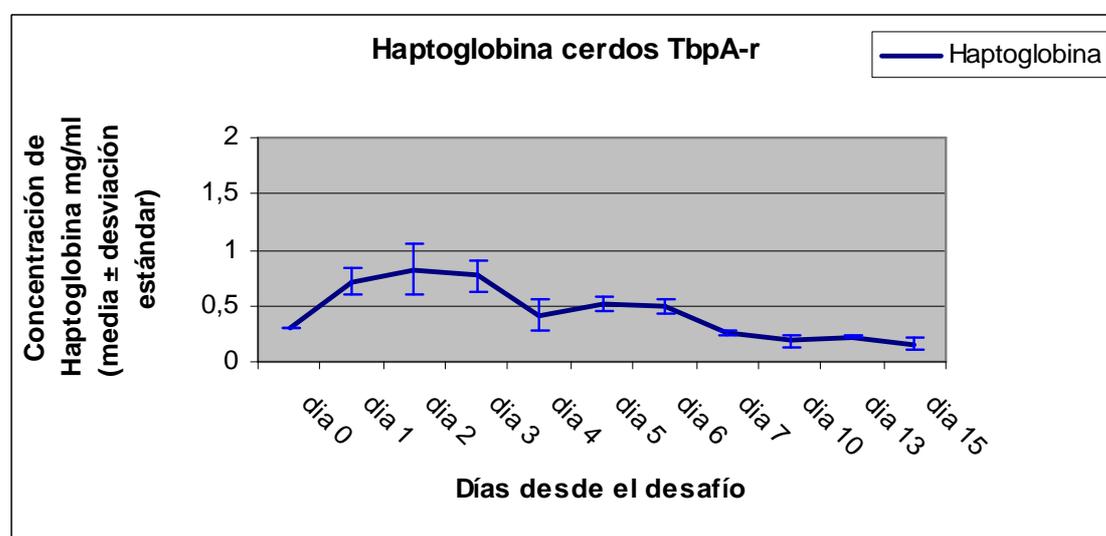


Figura 4.50. Media de la concentración de haptoglobina en el grupo.

### 6.1.c. Apolipoproteína I

La apolipoproteína I es una PFA negativa, es decir, que lo normal es que su concentración disminuya tras la infección. En este grupo de animales, cuya concentración media basal oscilaba entre 3,04 y 3,84 mg/ml, todos ellos presentaron, efectivamente, una disminución brusca en la concentración de la Apo I en los tres primeros días. Los valores más bajos se observaron en 3 de los 4 cerdos que murieron tras la infección (cerdos nº 3, 4 y 5), siendo el caso más extremo el correspondiente al animal nº 3, cuya concentración de Apo I antes de la muerte descendió hasta valores de 0,47 desde los 3,84 mg/ml medidos antes del desafío.

Los animales que sobrevivieron, sin embargo, recuperaron paulatinamente sus niveles basales hasta el día del sacrificio, aunque en el caso del animal nº 6 se

## Resultados

observaron fluctuaciones sin tendencia. Estadísticamente, sólo se encontraron diferencias significativas en los animales que murieron tras la infección ( $p=0,0021$ ). En la Tabla 4.12 se puede observar la evolución de la concentración de esta proteína de forma individual desde el momento de la infección. En las Figuras 4.51 y 4.52 se representan dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

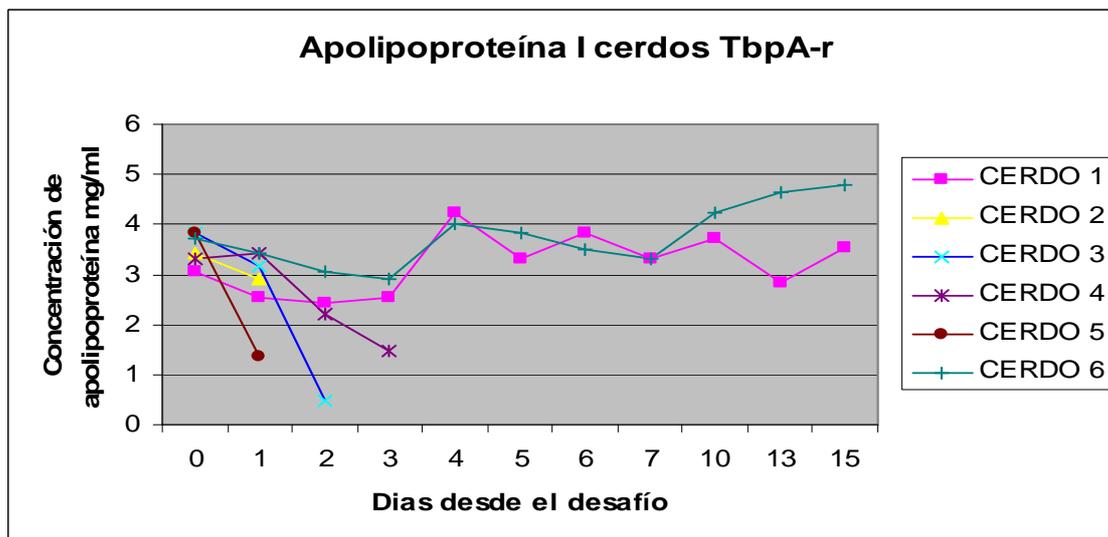


Figura 4.51. Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I.

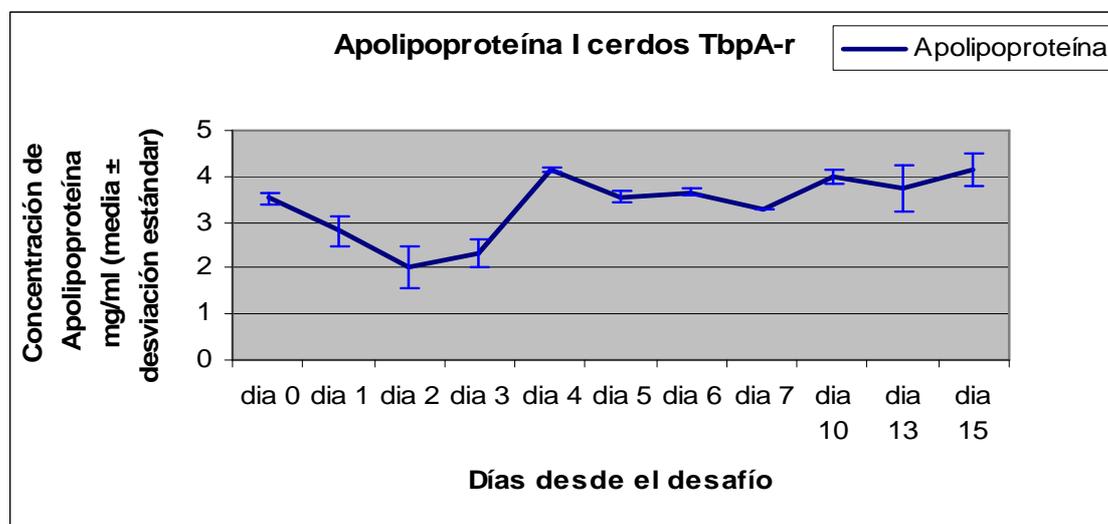


Figura 4.52. Media de la concentración de apolipoproteína I en el grupo.

### 6.1.d. Proteína C reactiva

Antes de la infección, los niveles basales medios de esta proteína fueron, aproximadamente, de 0,008 mg/ml. El primer día después de ella se produjo una elevación en todos los animales que, en algunos casos, llegó a mutiplicar por ocho la cifra anterior. Los cerdos que murieron después de la infección presentaron los valores más altos, particularmente antes de la muerte (entre 0,039 y 0,096 mg/ml). En el estudio

estadístico se observaron diferencias significativas en los primeros momentos tras el desafío, en el subgrupo de animales que no sobrevivió a la infección.

En la Tabla 4.12 se observa la evolución en la concentración de esta proteína en cada uno de los animales, desde el momento de la infección. En las Figuras 4.53 y 4.54 se representan dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

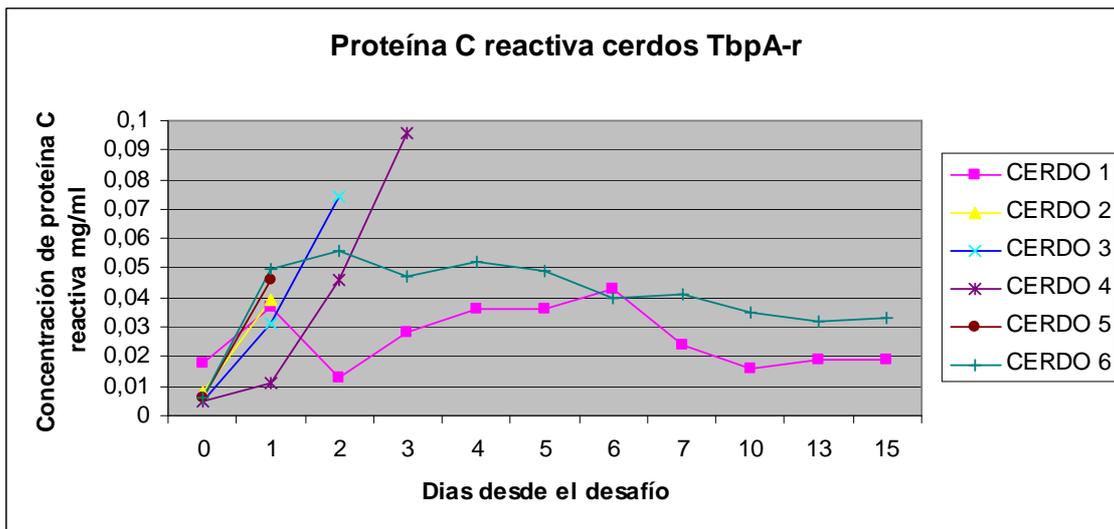


Figura 4.53. Evolución de los niveles de proteína C reactiva.

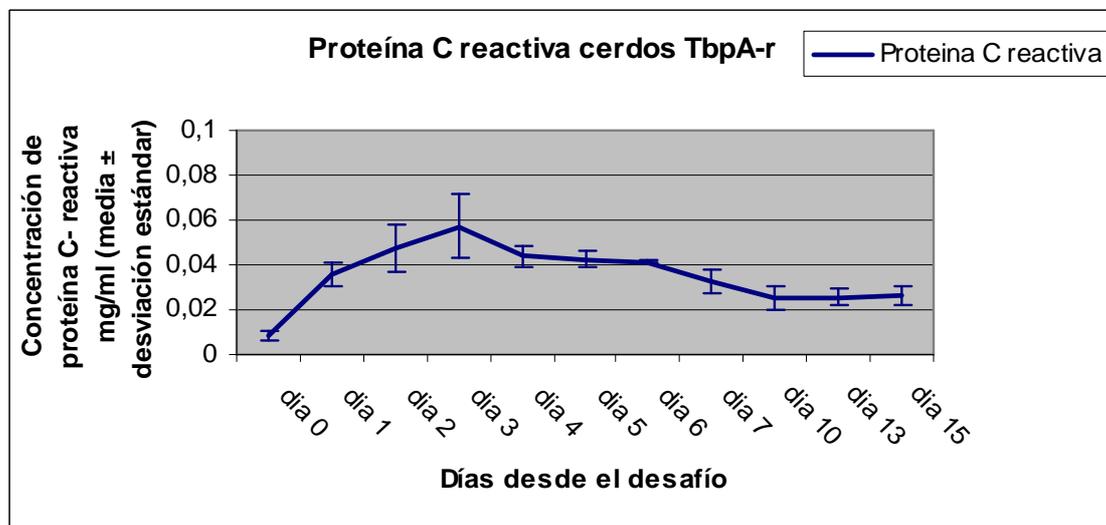


Figura 4.54. Media de la concentración de proteína C reactiva en el grupo.

### 6.1.e. Resultados individuales de la concentración de las PFA en el grupo inmunizado con la TbpA recombinante

Tabla 4.12. Resultados de las cuatro proteínas de fase aguda en cada uno de los animales del grupo inmunizado con la proteína TbpA-r.

<b>Concentración de pig-MAP (mg/ml)</b>											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
1	0,42	0,54	0,55	0,72	0,47	0,44	0,51	0,56	0,38	0,36	0,44
2	0,38	0,56									
3	0,36	0,59	3,57								
4	0,31	0,47	0,76	1,72							
5	0,38	2,47									
6	0,42	0,61	0,62	0,72	0,38	0,47	0,31	0,72	0,5	0,75	0,56
<b>Concentración de haptoglobina (mg/ml)</b>											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
1	0,31	0,53	0,41	0,54	0,17	0,41	0,40	0,23	0,10	0,19	0,07
2	0,31	0,59									
3	0,30	0,65	1,63								
4	0,30	0,50	0,60	1,14							
5	0,28	1,24									
6	0,32	0,79	0,65	0,62	0,65	0,62	0,59	0,30	0,27	0,26	0,25
<b>Concentración de apolipoproteína I (mg/ml)</b>											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
1	3,04	2,55	2,43	2,55	4,85	3,30	3,82	3,30	3,71	2,84	3,54
2	3,43	2,92									
3	3,84	3,17	0,47								
4	3,30	3,43	2,20	1,46							
5	3,84	1,36									
6	3,7	3,43	3,04	2,92	4,03	3,82	3,50	3,30	4,25	4,62	4,78
<b>Concentración de proteína C reactiva (mg/ml)</b>											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
1	0,018	0,037	0,013	0,028	0,036	0,036	0,043	0,024	0,016	0,019	0,0189
2	0,008	0,039									
3	0,005	0,031	0,074								
4	0,005	0,011	0,046	0,096							
5	0,006	0,046									
6	0,006	0,050	0,056	0,047	0,052	0,049	0,040	0,041	0,035	0,032	0,033

## 6.2. Cerdos inmunizados con la proteína TbpB recombinante

### 6.2.a Pig-MAP

En los animales que murieron tras la infección (cerdos nº 8, 9, 10 y 12) se produjo una elevación en la concentración de la proteína (desde 0,59 a 7,38 mg/ml) con respecto a los niveles basales (entre 0,16 y 0,36 mg/ml), antes del desafío. Resultó revelador que el único animal que sobrevivió a la infección (cerdo nº 7), mantuvo la concentración de pig-MAP prácticamente constante durante todo el muestreo, hasta el momento del sacrificio. Como ocurría en el caso de los cerdos inmunizados con la TbpA-r, los valores más altos se alcanzaron antes de la muerte de los animales que no superaron la infección. La diferencia en la concentración de esta proteína entre el momento anterior a la infección y dos días después, en los animales que fallecieron, fue estadísticamente significativa ( $p=0,043$ ).

En la Tabla 4.13 se recoge la evolución individual en la concentración de esta proteína en los animales de este grupo desde el momento de la infección hasta el final del experimento. En las Figuras 4.55 y 4.56 se representan estos resultados y la media del grupo, respectivamente.

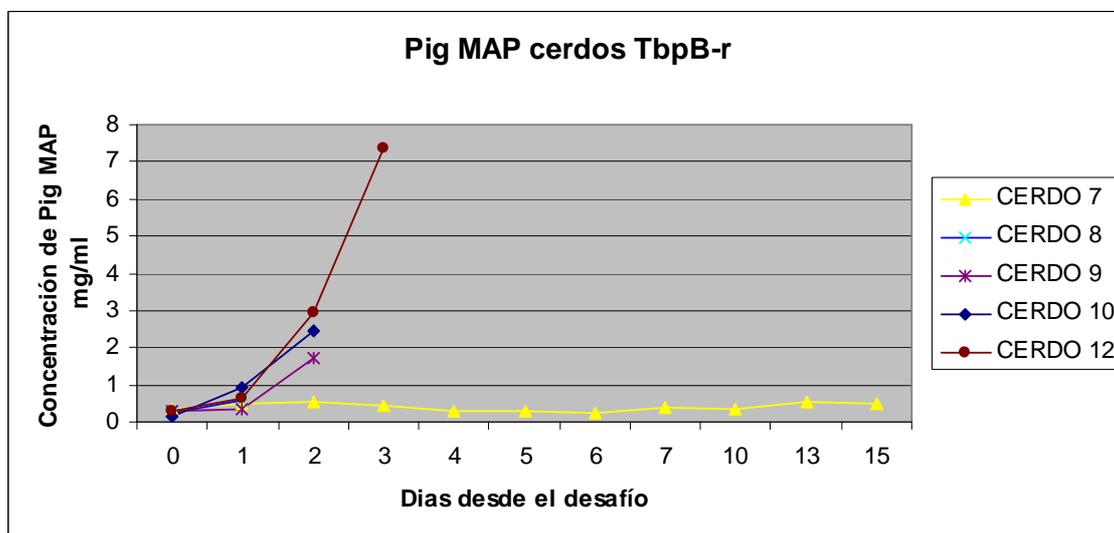


Figura 4.55. Evolución de los niveles de pig- MAP.

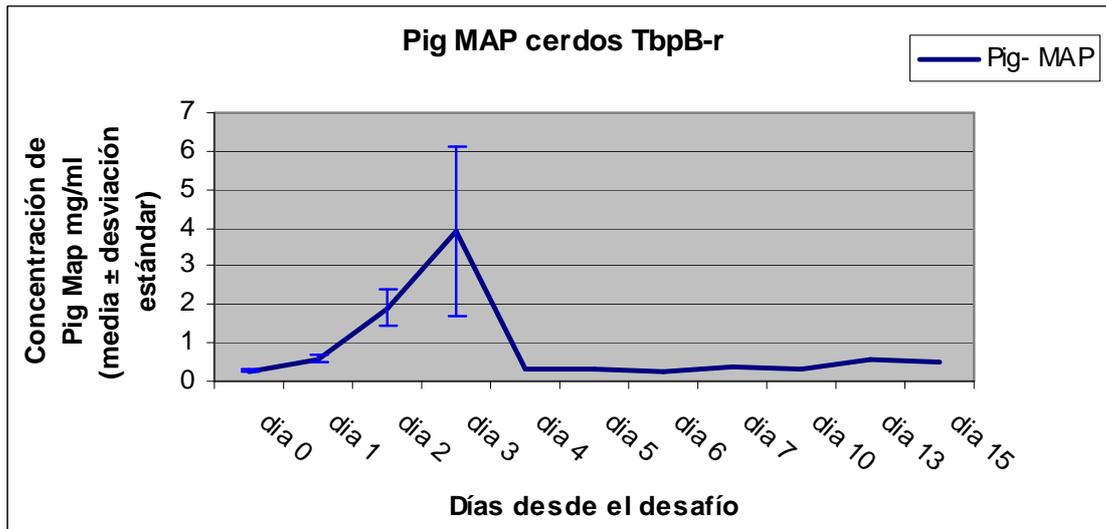


Figura 4.56. Media de la concentración de pig- MAP en el grupo.

### 6.2.b. Haptoglobina

Respecto de esta proteína de fase aguda, los animales presentaron una elevación en su concentración en las primeras 24 horas post-infección. En los cerdos que murieron en los días siguientes (cerdos nº 8, 9, 10 y 12), la concentración de haptoglobina aumentó progresivamente hasta el momento de la muerte, cuando se obtuvieron los valores máximos (0,59-1,65 mg/ml frente a los 0,27-0,30 mg/ml iniciales), que en el caso concreto de los animales 9 y 10, llegaron casi a cuaduplicar los niveles basales. En el único animal superviviente, se apreció una elevación inicial de la concentración proteica y luego oscilaciones, hasta que a partir del día 10 se volvió a estabilizar en los valores basales. El estudio estadístico reveló diferencias significativas entre los primeros días tras la infección y los valores previos ( $p= 0,016$ ). En la Tabla 4.13 se representa la evolución individual en la concentración de haptoglobina, desde el momento de la infección. En las Figuras 4.57 y 4.58 se representan dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

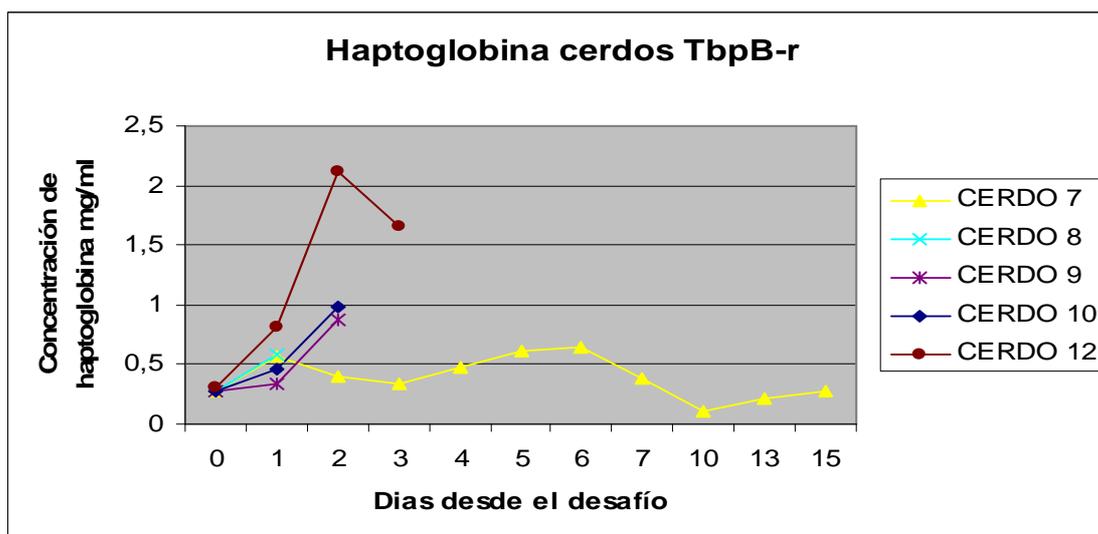


Figura 4.57. Evolución de los niveles de haptoglobina.

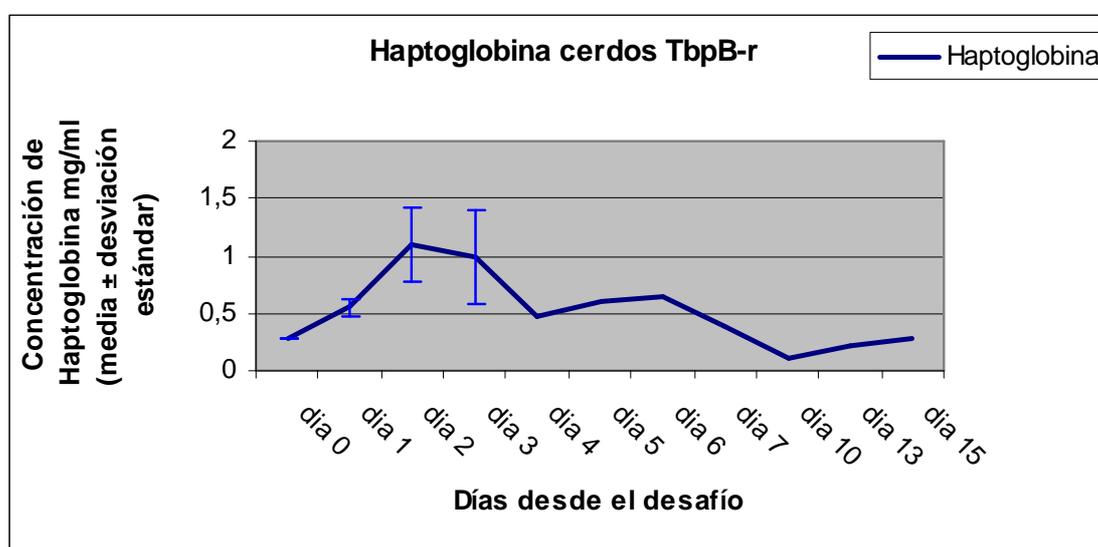


Figura 4.58. Media de la concentración de haptoglobina en el grupo.

### 6.2.c. Apolipoproteína I

La concentración de apolipoproteína I disminuyó ligeramente en todos los animales en las primeras 24 horas (descenso medio desde 3,38 a 3,14 mg/ml), excepto en el cerdo n° 8, en el que se produjo un leve aumento. El resto de animales que murieron (cerdos n° 9, 10 y 12) sufrieron un descenso muy brusco a las 48 horas posteriores a la infección, coincidiendo con el momento de su muerte, pasando de una media de 3,40 a 0,92 mg/ml, lo que representó una caída del 73%. El cerdo n° 7, que sobrevivió hasta el sacrificio, experimentó una ligera disminución en la concentración de Apo I el primer día después de la infección, pero se fue recuperando posteriormente, aunque con oscilaciones. En ningún animal se apreciaron diferencias significativas.

## Resultados

En la Tabla 4.13 se representa la evolución en la concentración de esta proteína en cada animal, desde el momento de la infección. En las Figuras 4.59 y 4.60 se representan dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

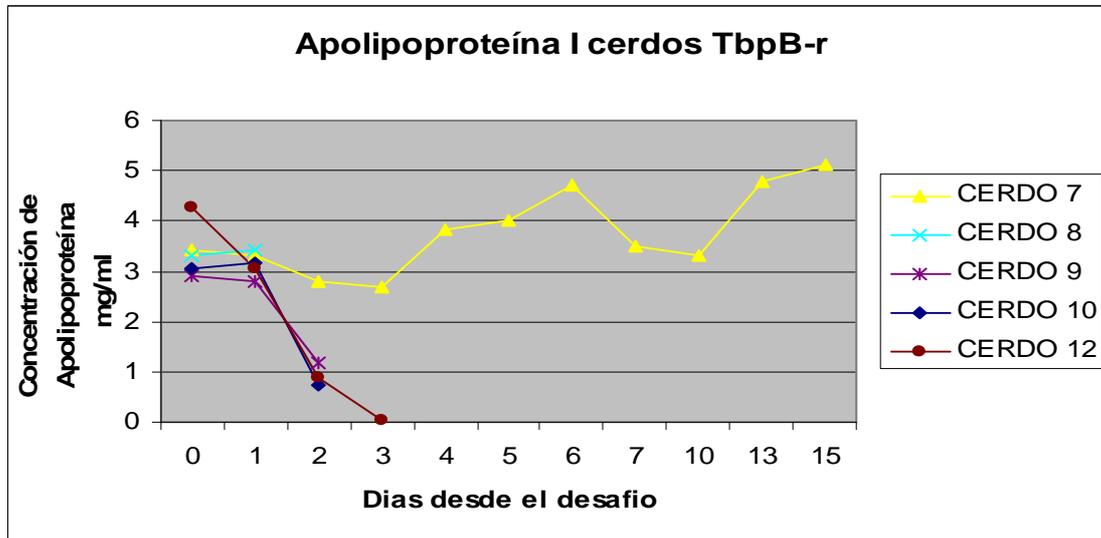


Figura 4.59. Evolución de los niveles de apolipoproteína I.

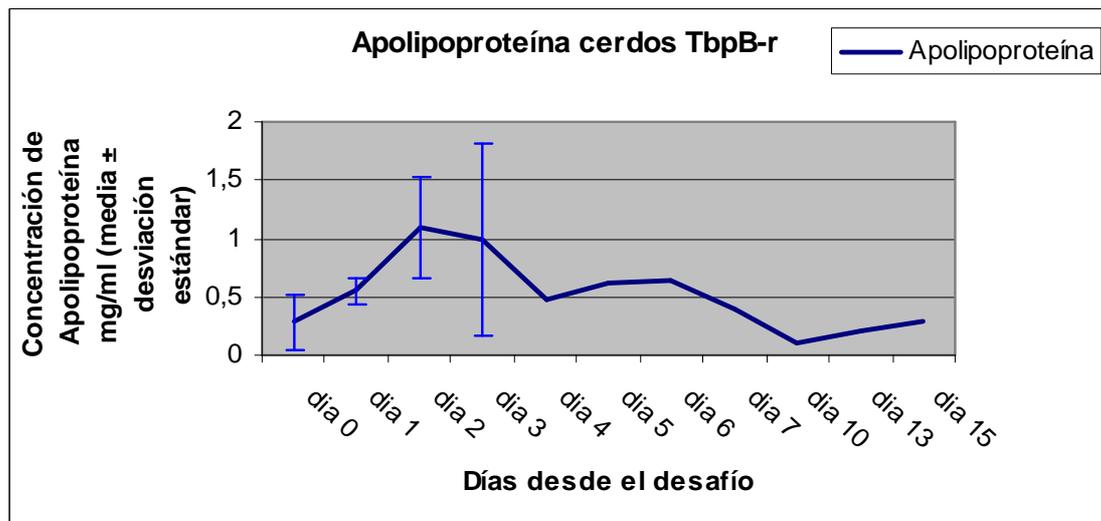


Figura 4.60. Media de la concentración de apolipoproteína I en el grupo.

### 6.2.d. Proteína C reactiva

Al igual que en los casos anteriores, la variación más destacable en la concentración de esta proteína ocurrió en los dos primeros días; en el caso de los cerdos que murieron tras la infección, esta concentración no dejó de aumentar hasta ese momento, llegando a elevarse hasta 15 veces por encima del valor inicial, pasando de una media de 0,006 a 0,05 mg/ml, que representa un incremento del 88%. En el caso del cerdo n° 7, que sobrevivió, el aumento inicial no resultó tan apreciable como en los

otros animales (pasó de 0,087 a 0,083 mg/ml en las primeras 24 horas post-infección) y la concentración de esta proteína se mantuvo con pequeñas oscilaciones hasta el momento del sacrificio. Las diferencias entre estos primeros días resultaron estadísticamente significativas en los animales que murieron tras el desafío ( $p= 0,036$ ). En la Tabla 4.13 se representa la evolución individual en la concentración de esta proteína, desde el momento de la infección. En las Figuras 4.61 y 4.62 se representan dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

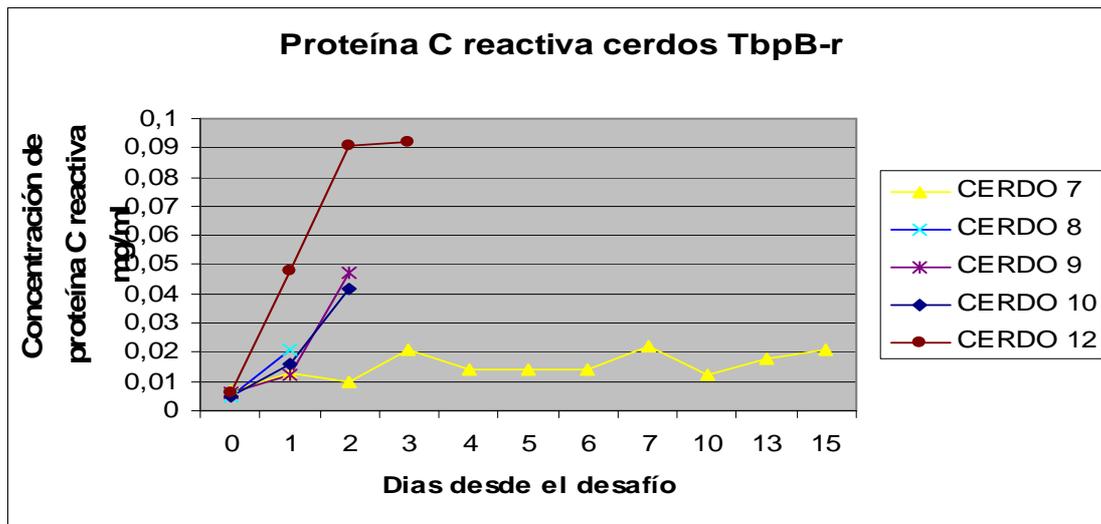


Figura 4.61. Evolución de los niveles de proteína C reactiva.

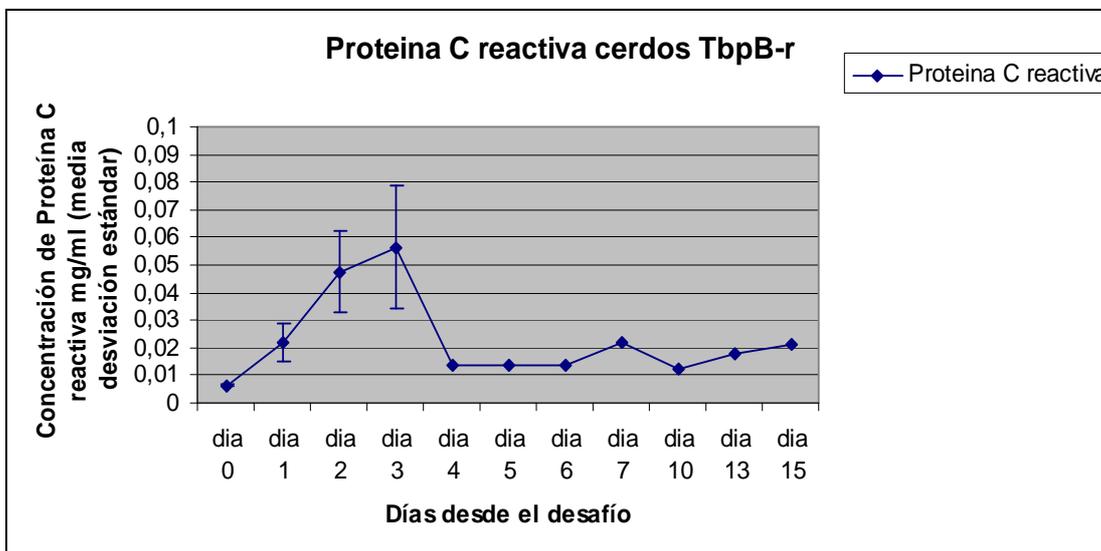


Figura 4.62. Media de la concentración de proteína C reactiva en el grupo.

### 6.2.e. Resultados individuales de la concentración de las PFA en el grupo inmunizado con la TbpB recombinante

Tabla 4.13. Resultados de las cuatro proteínas de fase aguda en cada uno de los animales del grupo inmunizado con la proteína TbpB-r.

Concentración de pig-MAP (mg/ml)											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
7	0,36	0,49	0,55	0,46	0,30	0,30	0,23	0,38	0,32	0,54	0,50
8	0,23	0,59									
9	0,31	0,33	1,72								
10	0,16	0,92	2,45								
12	0,31	0,64	2,95	7,38							
Concentración de haptoglobina (mg/ml)											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
7	0,28	0,56	0,40	0,33	0,48	0,61	0,64	0,39	0,10	0,21	0,28
8	0,27	0,59									
9	0,28	0,34	0,88								
10	0,27	0,46	0,98								
12	0,30	0,81	2,12	1,65							
Concentración de apolipoproteína I (mg/ml)											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
7	3,43	3,30	2,79	2,67	3,82	4,03	4,72	3,50	3,30	4,78	5,11
8	3,30	3,43									
9	2,92	2,79	1,16								
10	3,04	3,17	0,72								
12	4,26	3,04	0,89	0,04							
Concentración de proteína C reactiva (mg/ml)											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
7	0,007	0,013	0,01	0,021	0,014	0,014	0,014	0,022	0,012	0,018	0,021
8	0,005	0,021									
9	0,006	0,012	0,047								
10	0,007	0,016	0,042								
12	0,006	0,048	0,091	0,092							

### 6.3. Cerdos inmunizados con la vacuna comercial

#### 6.3.a. Pig MAP

En este grupo experimental, la concentración de esta proteína se mantuvo prácticamente constante desde el principio hasta el final de la prueba. Sus valores fueron muy bajos con respecto a los grupos anteriormente estudiados, ya que nunca sobrepasaron 1 mg/ml. Estudiados estadísticamente, no se observaron diferencias significativas a lo largo del experimento. En la Tabla 4.14 se indica la evolución en la concentración de esta proteína en cada animal, desde el momento de la infección. En las Figuras 4.63 y 4.64 se representan dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

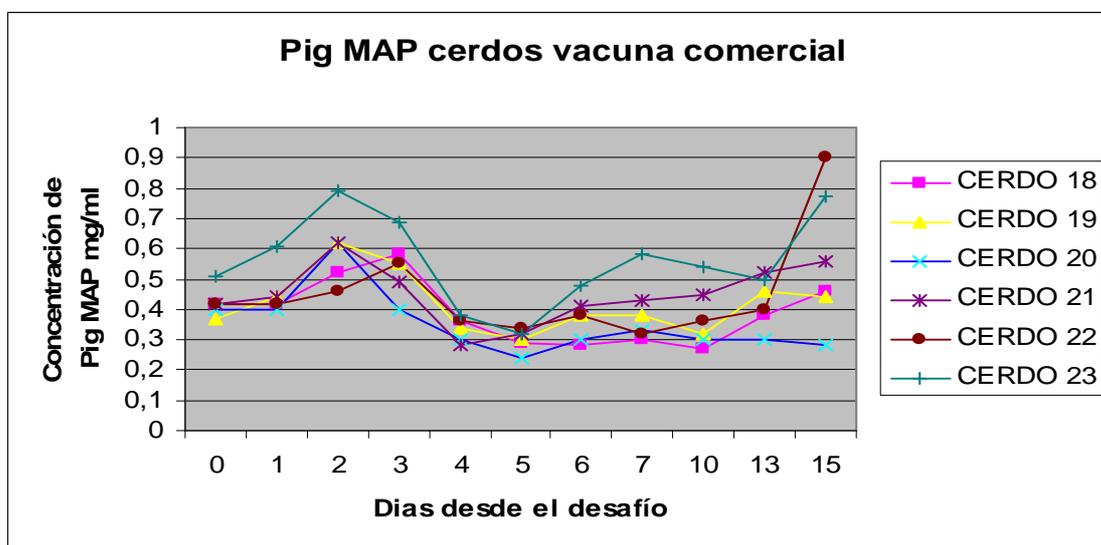


Figura 4.63. Evolución de los niveles de pig MAP.

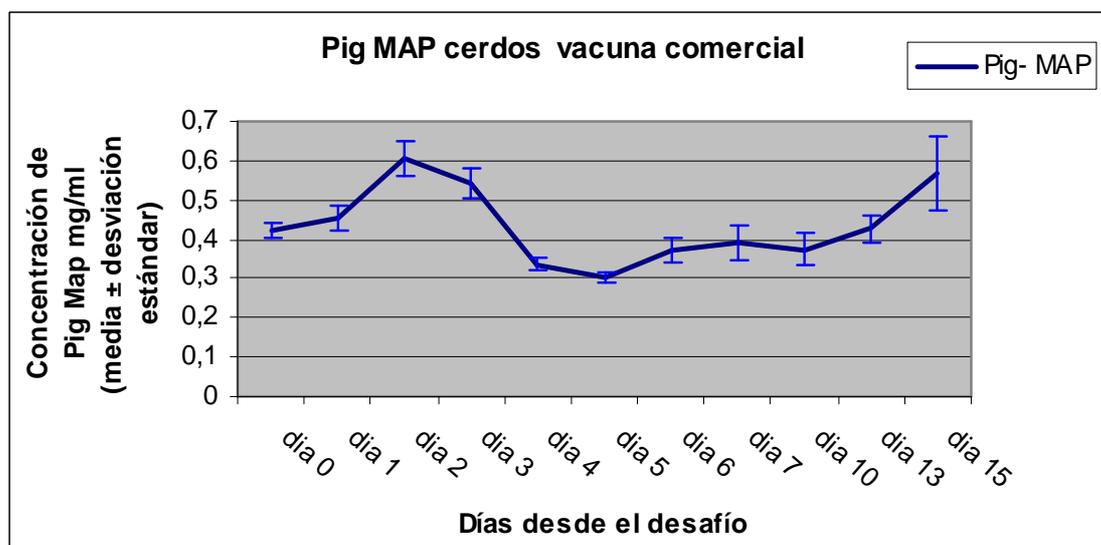


Figura 4.64. Media de la concentración de pig MAP en el grupo.

### 6.3.b. Haptoglobina

En ningún caso se observó una elevación marcada de su concentración tras la infección, pues todos los cerdos permanecieron con valores casi constantes desde el principio hasta el final de la prueba, con fluctuaciones entre niveles de cerca de 0 mg/ml hasta 0,5 mg/ml, que no produjeron diferencias estadísticamente significativas. En la Tabla 4.14 se representa la evolución individual en la concentración de esta proteína, desde el momento de la infección y en las Figuras 4.65 y 4.66, dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

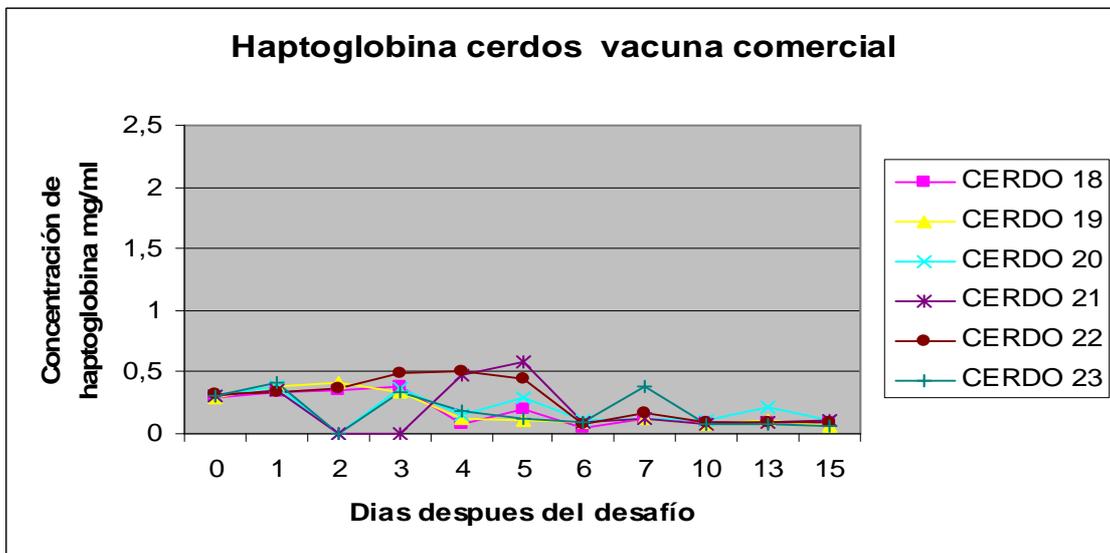


Figura 4.65. Evolución de los niveles de haptoglobina.

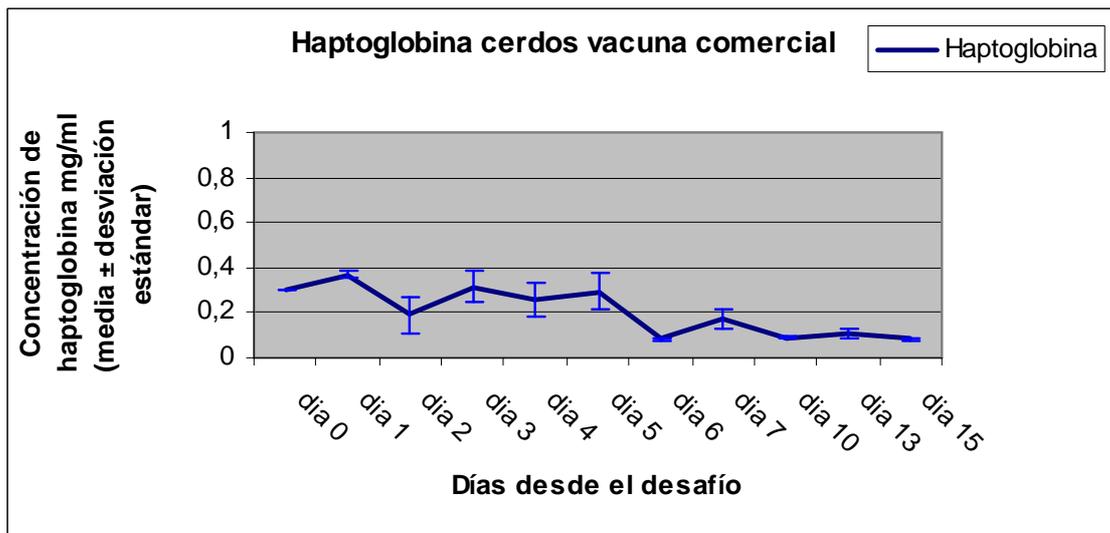


Figura 4.66. Media de la concentración de haptoglobina en el grupo.

### 6.3.c. Apolipoproteína I

En las primeras 24 horas se pudo apreciar un ligero descenso del 6,57% sobre la media, que se recuperó a las 48 horas y se mantuvo fluctuando hasta el final. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en ningún momento del estudio. En la Tabla 4.14 se observa la evolución en la concentración de esta proteína en cada animal, desde el momento de la infección y en las Figuras 4.67 y 4.68 se representan gráficamente dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

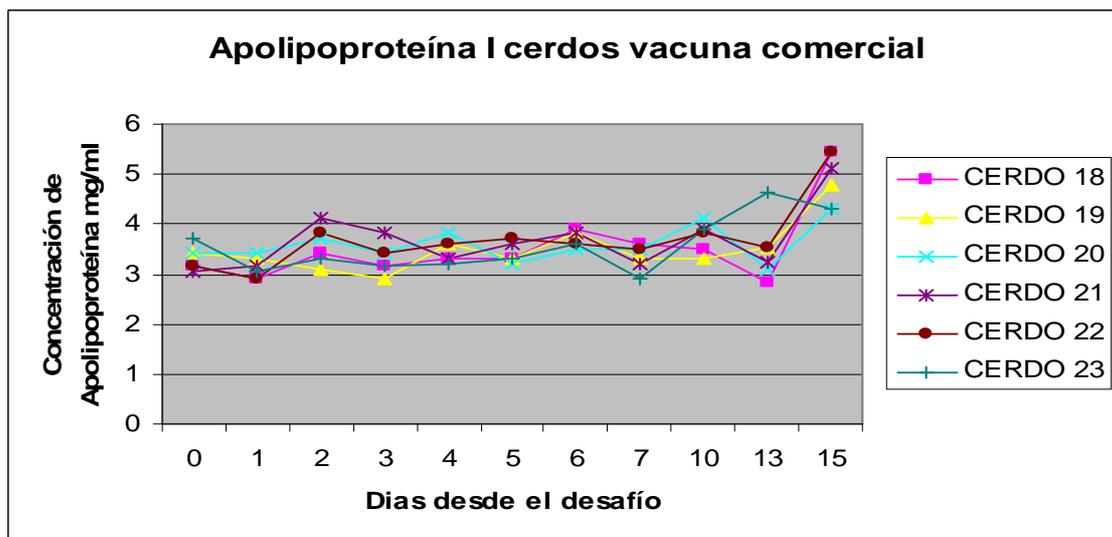


Figura 4.67. Evolución de los niveles de Apolipoproteína I.

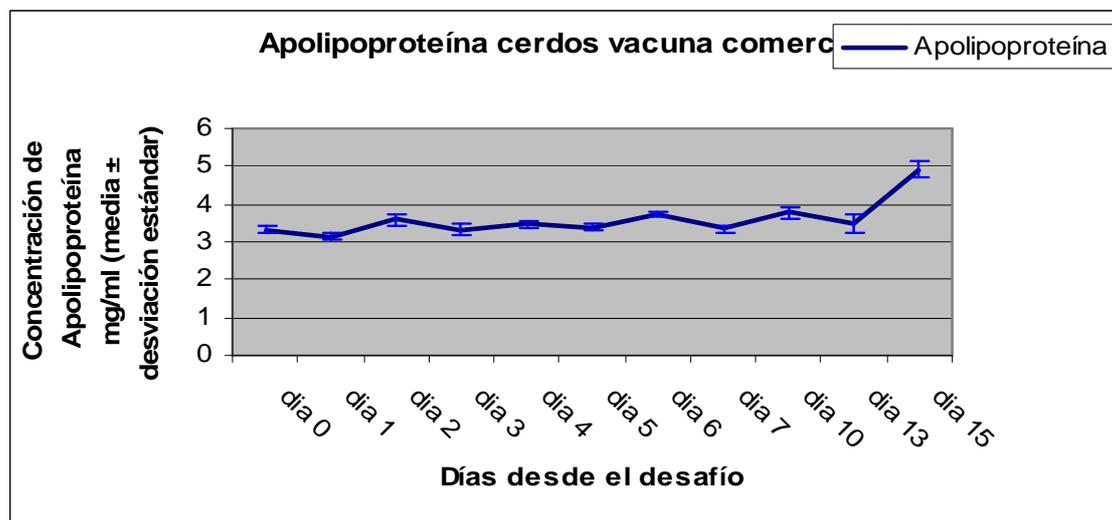


Figura 4.68. Media de la concentración de Apolipoproteína I en el grupo.

### 6.3.d. Proteína C reactiva

Por último, en el estudio de la proteína C-reactiva cabe destacar lo ocurrido con el animal nº 18, que experimentó una elevación en su concentración mucho más acusada

## Resultados

que sus compañeros de grupo, en los primeros tres días después de la infección. El cerdo nº 19 presentó su máximo de concentración el día 5º posterior a la infección y en el resto se obtuvieron niveles más o menos constantes, por lo que estos animales presentaron unos valores similares al final del experimento y en el momento previo a la infección. Estadísticamente, no se apreciaron diferencias significativas. En la Tabla 4.14 se recoge la evolución individual en la concentración de esta proteína, desde el momento de la infección y en las Figuras 4.69 y 4.70 se representan gráficamente dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

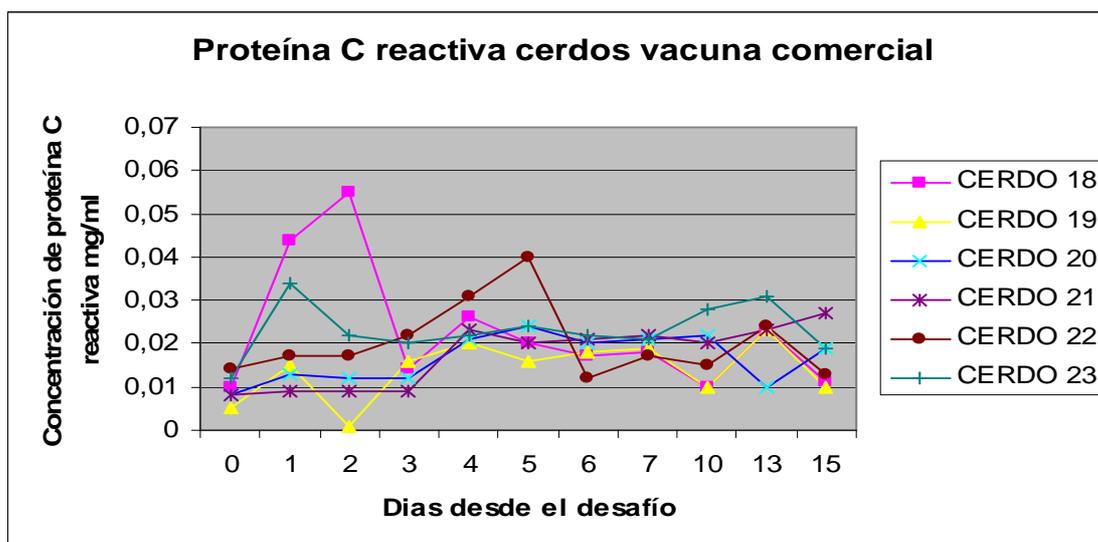


Figura 4.69. Evolución de los niveles de proteína C reactiva.

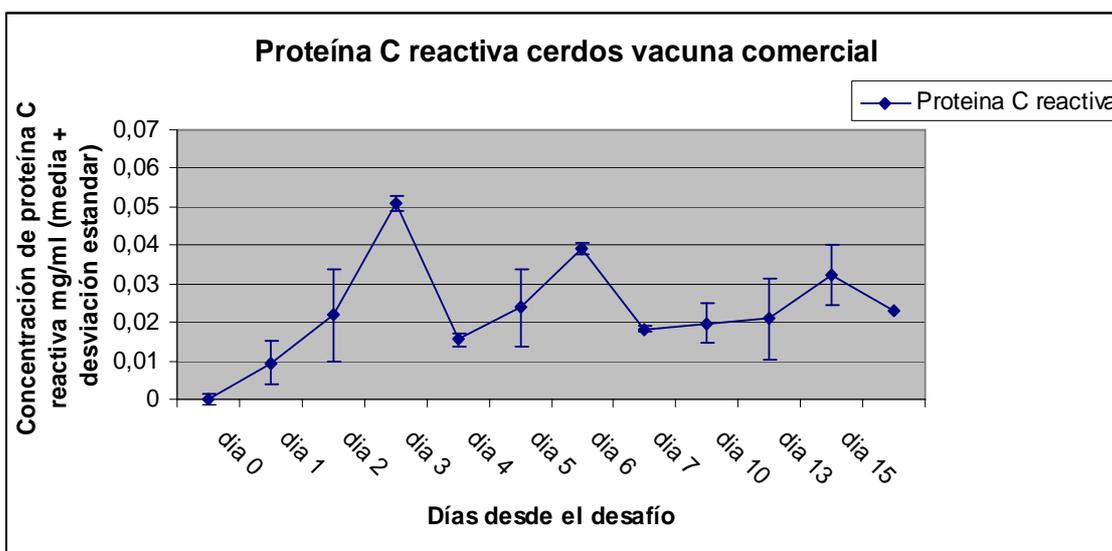


Figura 4.70. Media de la concentración de proteína C reactiva en el grupo.

### 6.3.e. Resultados individuales de la concentración de las PFA en el grupo inmunizado con la vacuna comercial

Tabla 4.14. Resultados de las cuatro proteínas de fase aguda en cada uno de los animales del grupo inmunizado con la vacuna comercial.

Concentración de pig-MAP (mg/ml)											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
18	0,42	0,42	0,52	0,58	0,36	0,29	0,28	0,3	0,27	0,38	0,46
19	0,37	0,44	0,62	0,55	0,34	0,30	0,38	0,38	0,32	0,46	0,44
20	0,40	0,40	0,62	0,40	0,30	0,24	0,30	0,33	0,30	0,30	0,28
21	0,42	0,44	0,62	0,49	0,28	0,32	0,41	0,43	0,45	0,52	0,56
22	0,42	0,42	0,46	0,55	0,36	0,34	0,38	0,32	0,36	0,40	0,9
23	0,51	0,61	0,79	0,69	0,38	0,32	0,48	0,58	0,54	0,50	0,77
Concentración de haptoglobina (mg/ml)											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
18	0,29	0,34	0,35	0,38	0,08	0,20	0,05	0,13	0,09	0,09	0,09
19	0,29	0,38	0,41	0,33	0,13	0,10	0,09	0,12	0,07	0,10	0,06
20	0,31	0,38	0	0,37	0,16	0,29	0,10	0,12	0,11	0,21	0,10
21	0,30	0,36	0	0	0,48	0,59	0,09	0,13	0,08	0,09	0,10
22	0,32	0,34	0,37	0,49	0,50	0,45	0,08	0,17	0,09	0,09	0,09
23	0,30	0,42	0	0,33	0,19	0,13	0,09	0,39	0,08	0,08	0,06
Concentración de apolipoproteína I (mg/ml)											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
18	3,17	2,92	3,43	3,17	3,30	3,30	3,92	3,61	3,50	2,84	5,46
19	3,43	3,30	3,10	2,92	3,61	3,30	3,82	3,30	3,30	3,54	4,78
20	3,43	3,43	3,70	3,45	3,82	3,20	3,50	3,50	4,14	3,11	4,30
21	3,06	3,17	4,12	3,84	3,30	3,61	3,82	3,20	3,92	3,25	5,11
22	3,17	2,92	3,84	3,43	3,61	3,71	3,62	3,50	3,82	3,54	5,46
23	3,70	3,04	3,30	3,17	3,20	3,20	3,61	2,92	3,92	4,62	4,30
Concentración de proteína C reactiva (mg/ml)											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
18	0,010	0,044	0,055	0,014	0,026	0,020	0,017	0,018	0,010	0,023	0,011
19	0,005	0,015	0,001	0,016	0,020	0,016	0,018	0,019	0,010	0,023	0,01
20	0,008	0,013	0,012	0,012	0,021	0,024	0,020	0,021	0,022	0,010	0,019
21	0,008	0,009	0,009	0,009	0,023	0,020	0,021	0,022	0,02	0,023	0,027
22	0,014	0,017	0,017	0,022	0,031	0,040	0,012	0,017	0,015	0,024	0,013
23	0,012	0,034	0,022	0,02	0,022	0,024	0,022	0,021	0,028	0,031	0,019

6.4. Cerdos inmunizados con las proteínas nativas de unión a la transferrina por vía intramuscular

6.4.a. **Pig MAP**

En este grupo experimental, la concentración de pig-MAP se mantuvo prácticamente constante durante toda la prueba. Los valores nunca llegaron a alcanzar 1mg/ml y no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas. En la Tabla 4.15 se presenta la evolución en la concentración de esta proteína en cada animal, desde el momento de la infección y en las Figuras 4.71 y 4.72 se representan gráficamente dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

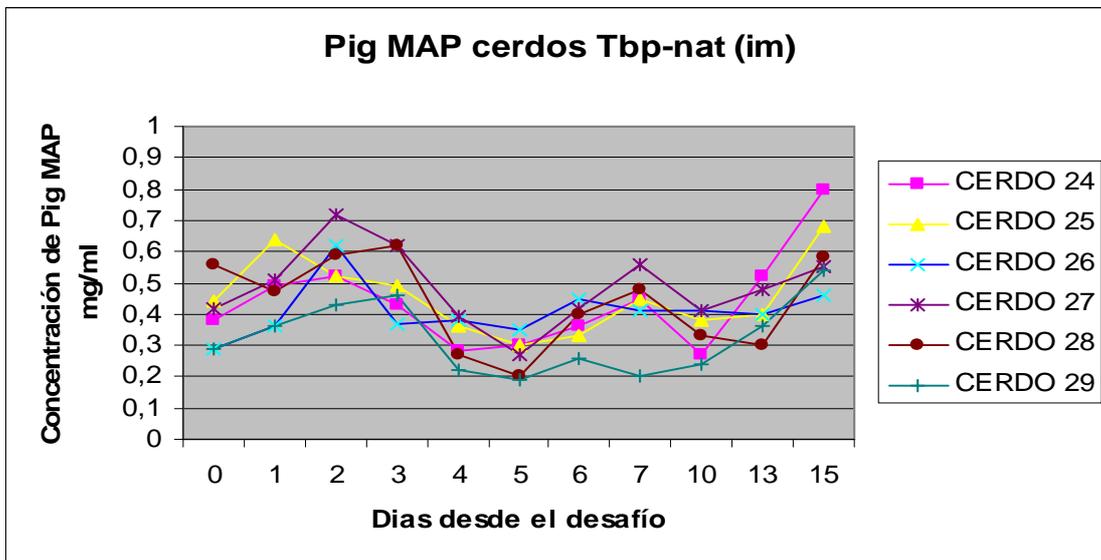


Figura 4.71. Evolución de los niveles de pig MAP.

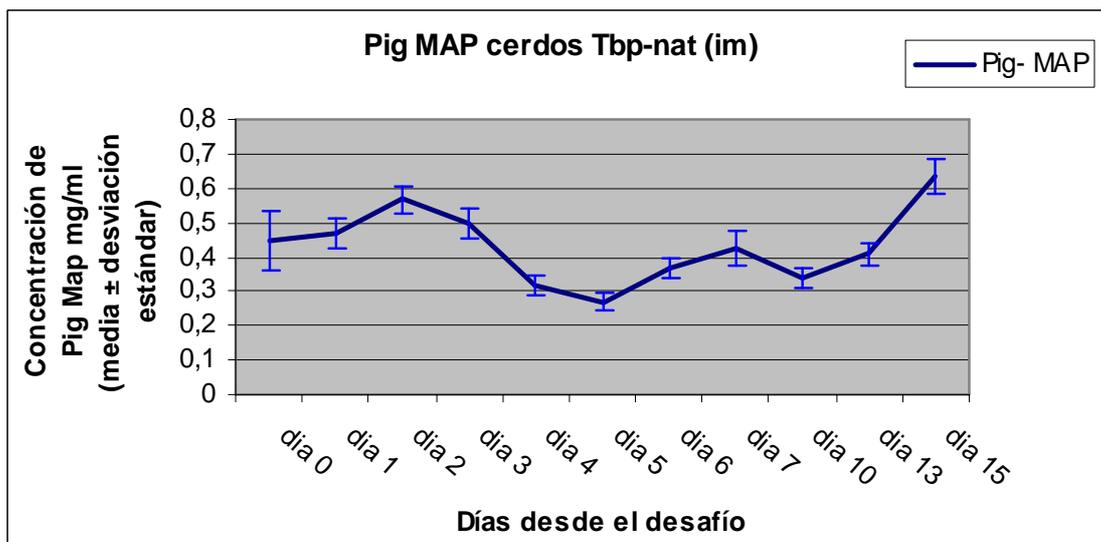


Figura 4.72. Media de la concentración de pig MAP en el grupo.

### 6.4.b. Haptoglobina

No se apreció un aumento destacado en los primeros días tras la infección y sólo se observó una elevación el día 5° posterior al desafío en el cerdo n° 26, pero al día siguiente los niveles volvieron a ser basales. Estadísticamente, no se apreciaron diferencias significativas en ningún momento. En la Tabla 4.15 se observa la evolución individual en la concentración de esta proteína, desde el momento de la infección y en las Figuras 4.73 y 4.74 se representan gráficamente dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

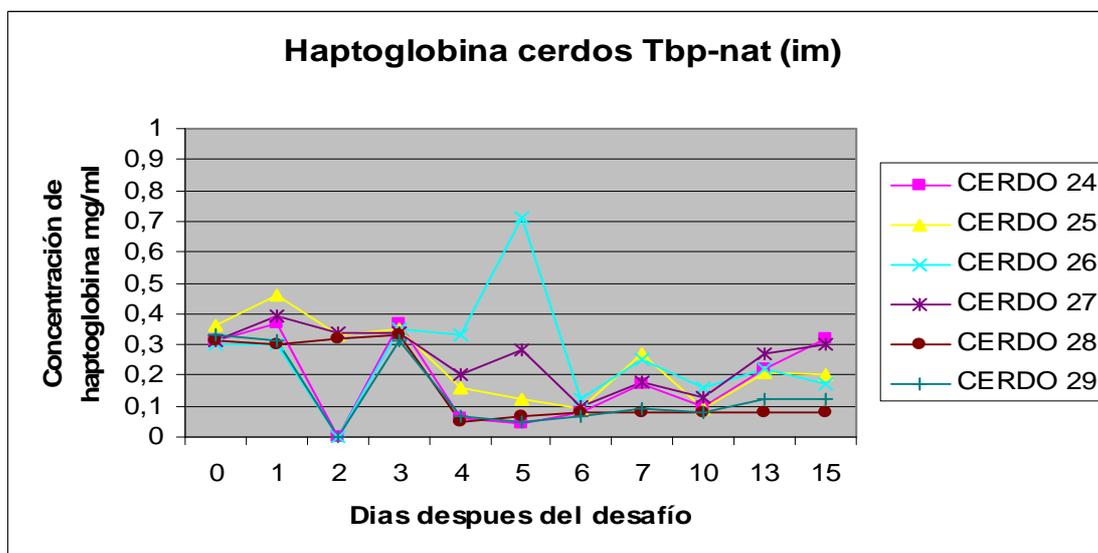


Figura 4.73. Evolución de los niveles de haptoglobina.

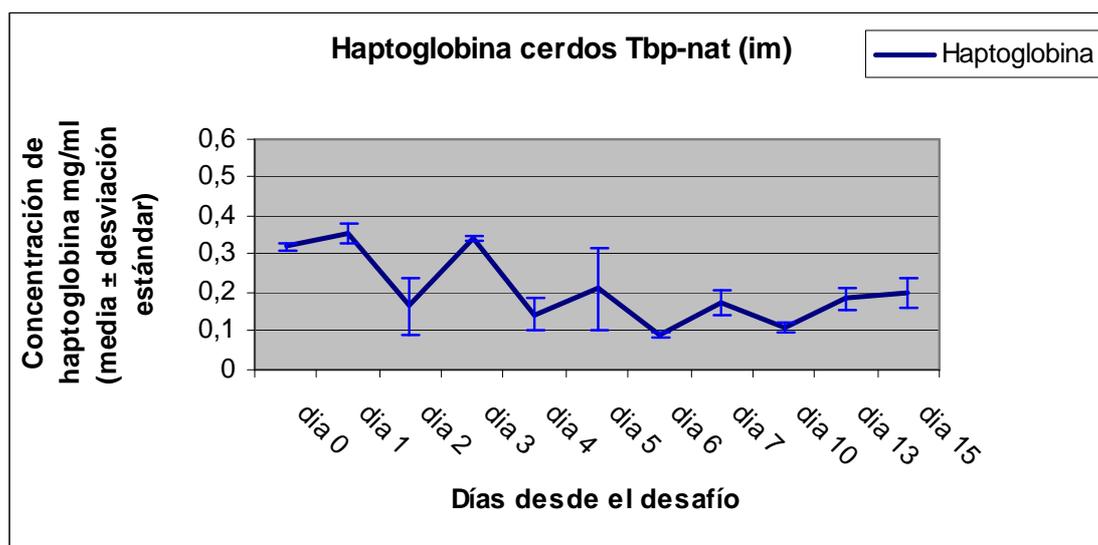


Figura 4.74. Media de la concentración de haptoglobina en el grupo.

### 6.4.c. Apolipoproteína I

En la mayoría de los animales se produjo una ligera disminución en la concentración en los primeros días tras la infección, que se recuperó poco después, sobrepasando incluso al final del experimento los valores iniciales (no debe olvidarse que se trata de animales sometidos a estrés). Aún con estas variaciones en el tiempo, no se apreciaron diferencias significativas. En la Tabla 4.15 se representa la evolución individual en la concentración de esta proteína, desde el momento de la infección y en las Figuras 4.75 y 4.76 se representan gráficamente dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

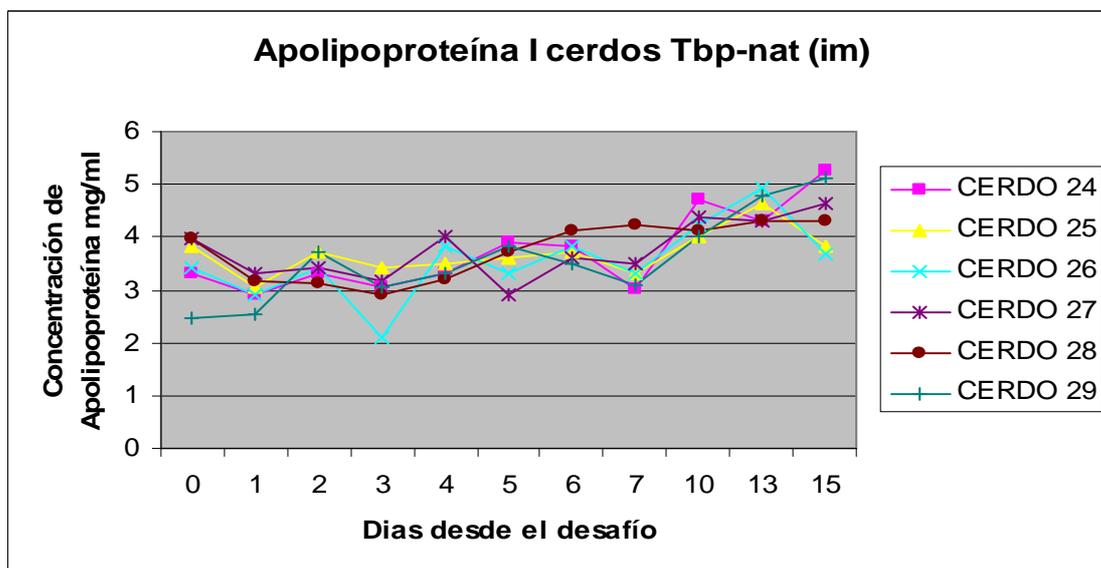


Figura 4.75. Evolución de los niveles de apolipoproteína I.

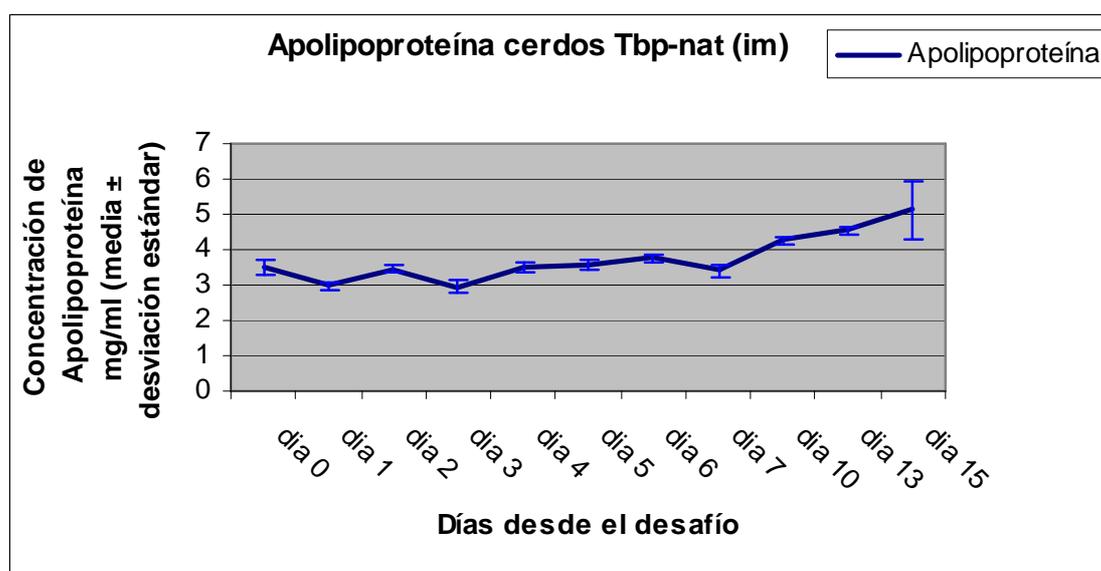


Figura 4.76. Media de la concentración de apolipoproteína I en el grupo.

#### 6.4.d. Proteína C reactiva

En este grupo, la concentración nunca sobrepasó valores de 0,02 mg/ml, manteniéndose constante hasta el final del experimento. El único animal en el que aumentó ligeramente fue el cerdo nº 26, en los días 5, 6 y 10, pero ninguna de estas variaciones llegó a ser estadísticamente significativa. En la Tabla 4.15 se presenta la evolución en la concentración de esta proteína en cada animal, desde el momento de la infección. En las Figuras 4.77 y 4.78 se representan gráficamente dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

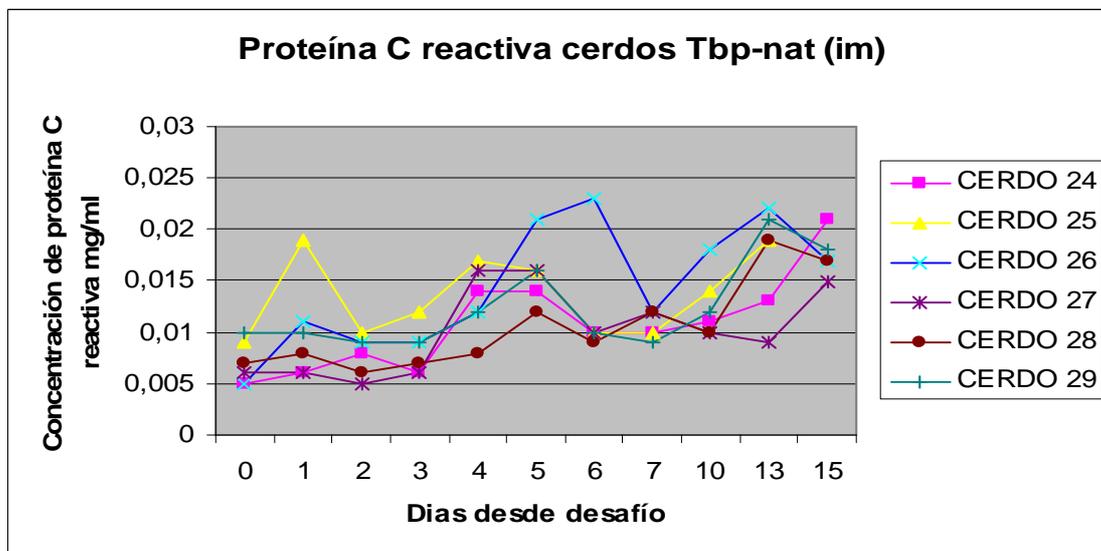


Figura 4.77. Evolución de los niveles de proteína C reactiva.

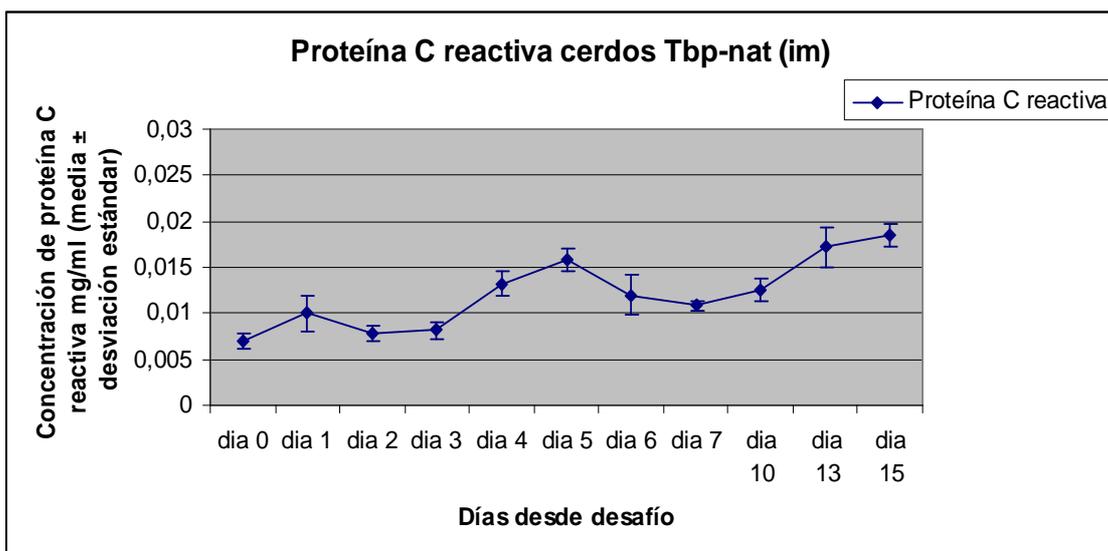


Figura 4.78. Media de la concentración de proteína C reactiva en el grupo.

#### 6.4.e. Resultados individuales de la concentración de las PFA en el grupo inmunizado con las proteínas nativas de unión a la transferrina por vía intramuscular

Tabla 4.15. Resultados de las cuatro proteínas de fase aguda en cada uno de los animales del grupo inmunizado con las Tbp-im.

Concentración de pig-MAP (mg/ml)											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
24	0,38	0,49	0,52	0,43	0,28	0,30	0,36	0,45	0,27	0,52	0,80
25	0,44	0,64	0,52	0,49	0,36	0,30	0,33	0,45	0,38	0,40	0,68
26	0,29	0,36	0,62	0,37	0,38	0,35	0,45	0,41	0,41	0,40	0,46
27	0,42	0,51	0,72	0,62	0,39	0,27	0,42	0,56	0,41	0,48	0,65
28	0,86	0,47	0,59	0,62	0,27	0,20	0,40	0,48	0,33	0,30	0,68
29	0,29	0,36	0,43	0,46	0,22	0,19	0,26	0,20	0,24	0,36	0,54
Concentración de haptoglobina (mg/ml)											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
24	0,31	0,37	0	0,37	0,06	0,04	0,08	0,17	0,10	0,22	0,32
25	0,36	0,46	0,33	0,35	0,16	0,12	0,09	0,27	0,09	0,21	0,20
26	0,30	0,30	0	0,35	0,33	0,71	0,12	0,25	0,16	0,22	0,17
27	0,31	0,39	0,34	0,34	0,20	0,28	0,10	0,18	0,13	0,27	0,30
28	0,31	0,30	0,32	0,33	0,05	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
29	0,33	0,31	0	0,31	0,07	0,05	0,07	0,09	0,08	0,12	0,12
Concentración de apolipoproteína I (mg/ml)											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
24	3,30	2,92	3,30	3,04	3,30	3,92	3,82	3,01	4,72	4,30	5,28
25	3,84	3,04	3,7	3,43	3,50	3,61	3,71	3,30	4,03	4,62	3,84
26	3,43	2,92	3,43	2,09	3,82	3,30	3,82	3,30	4,25	4,95	3,69
27	3,98	3,30	3,43	3,17	4,03	2,92	3,61	3,50	4,37	4,30	4,62
28	3,97	3,17	3,12	2,92	3,20	3,71	4,14	4,25	4,14	4,30	4,30
29	2,45	2,55	3,70	3,04	3,30	3,82	3,50	3,11	4,03	4,78	8,95
Concentración de proteína C reactiva (mg/ml)											
Número del animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
24	0,005	0,006	0,008	0,006	0,014	0,014	0,010	0,010	0,011	0,013	0,021
25	0,009	0,019	0,010	0,012	0,017	0,016	0,010	0,010	0,014	0,019	0,023
26	0,005	0,011	0,009	0,009	0,012	0,021	0,023	0,012	0,018	0,022	0,017
27	0,006	0,006	0,005	0,006	0,016	0,016	0,010	0,012	0,010	0,009	0,015
28	0,007	0,008	0,006	0,007	0,008	0,012	0,009	0,012	0,010	0,019	0,017
29	0,010	0,010	0,009	0,009	0,012	0,016	0,010	0,009	0,012	0,021	0,018

## 6.5. Cerdos inmunizados con las proteínas nativas de unión a la transferrina administradas por vía intratraqueal

### 6.5.a. Pig MAP

La concentración de esta proteína en todos los animales no varió sustancialmente a lo largo del experimento. El animal que presentaba un nivel ligeramente elevado al principio del experimento lo mantenía hasta el final, mientras que los que comenzaban con concentraciones reducidas tampoco las variaban durante todo el tiempo de observación. Por ello, no existieron diferencias estadísticamente significativas. En la Tabla 4.16 se observa la evolución en la concentración individual de esta proteína, desde el momento de la infección y en las Figuras 4.79 y 4.80 se representan gráficamente dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

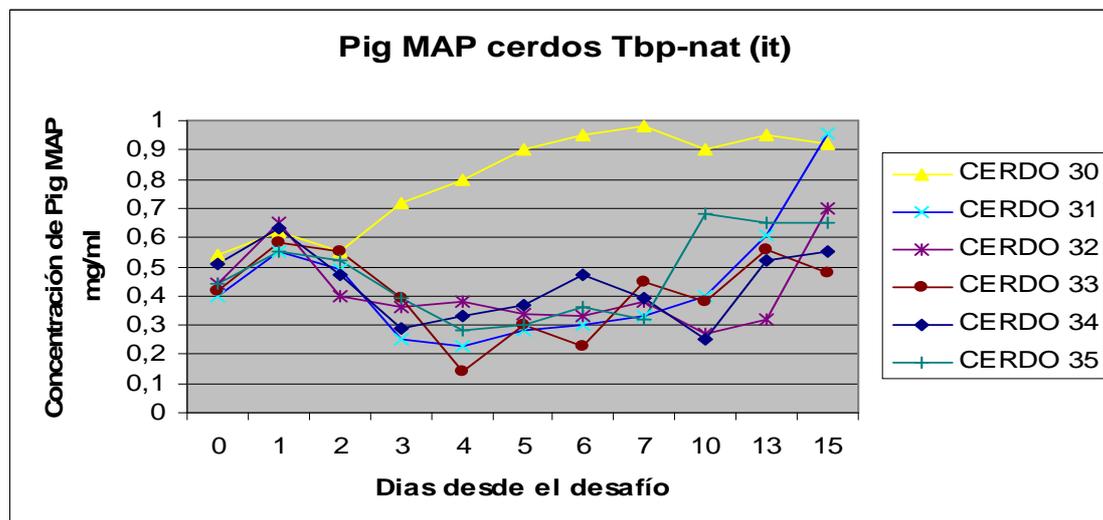


Figura 4.79. Evolución de los niveles de pig MAP.

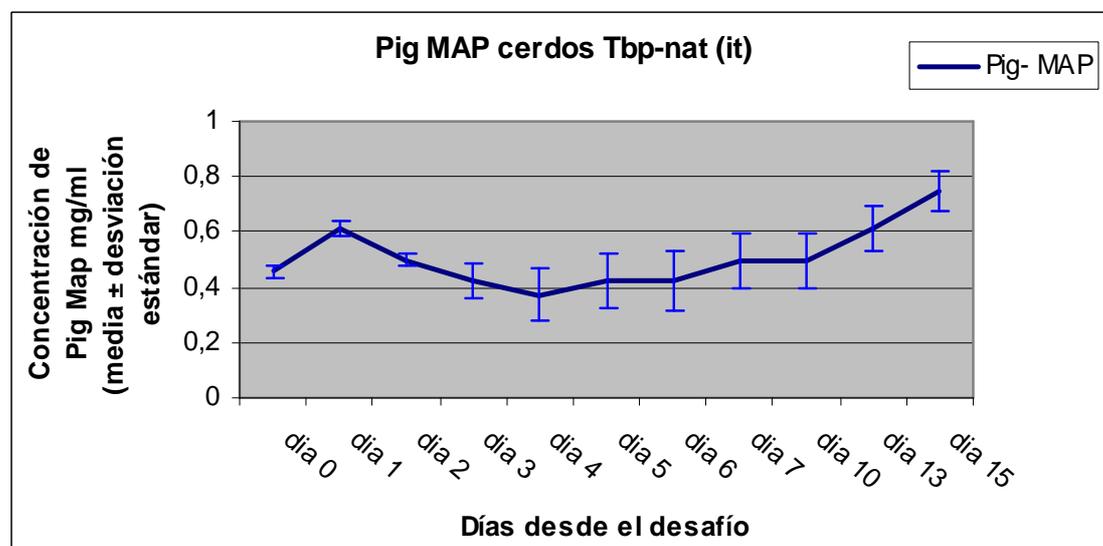


Figura 4.80. Media de la concentración de pig MAP en el grupo.

### 6.5.b. Haptoglobina

Aunque se produjeron escasas variaciones en la concentración de esta proteína, el cerdo n°30 presentó dos picos: el primero al tercer día posterior a la infección y el segundo, el 5° día. Pese a estas pequeñas oscilaciones, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas durante el estudio. La Tabla 4.16 presenta la evolución en la concentración de esta proteína en cada animal, desde el momento de la infección y en las Figuras 4.81 y 4.82 se analizan gráficamente dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

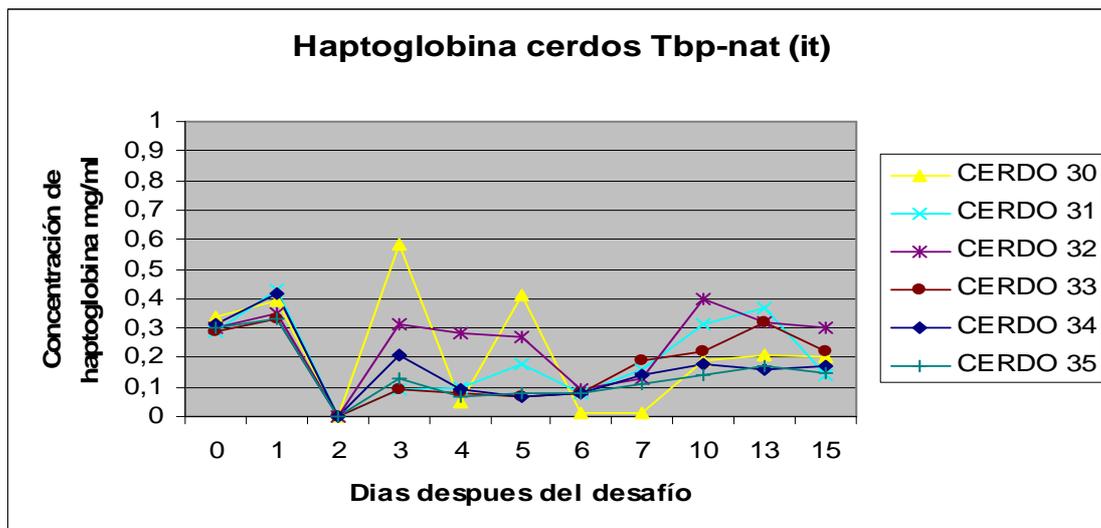


Figura 4.81. Evolución de los niveles de haptoglobina.

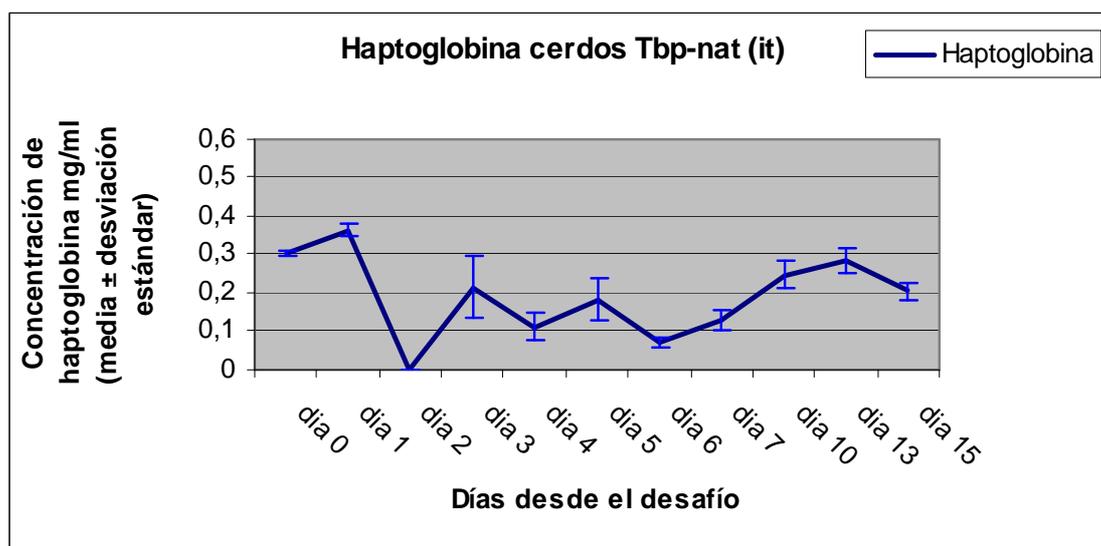


Figura 4.82. Media de la concentración de haptoglobina en el grupo.

### 6.5.c. Apolipoproteína I

La concentración al principio de la prueba no sufrió apenas alteración como respuesta ante la infección y prácticamente no experimentó variaciones a lo largo del estudio; sin embargo, en los últimos días, los cerdos nº 32, 33 y 35 sufrieron oscilaciones notables. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas. En la Tabla 4.16 se observa la evolución en la concentración individual de esta proteína, desde el momento de la infección y en las Figuras 4.83 y 4.84 se representan dichos resultados gráficamente y la media del grupo, respectivamente.

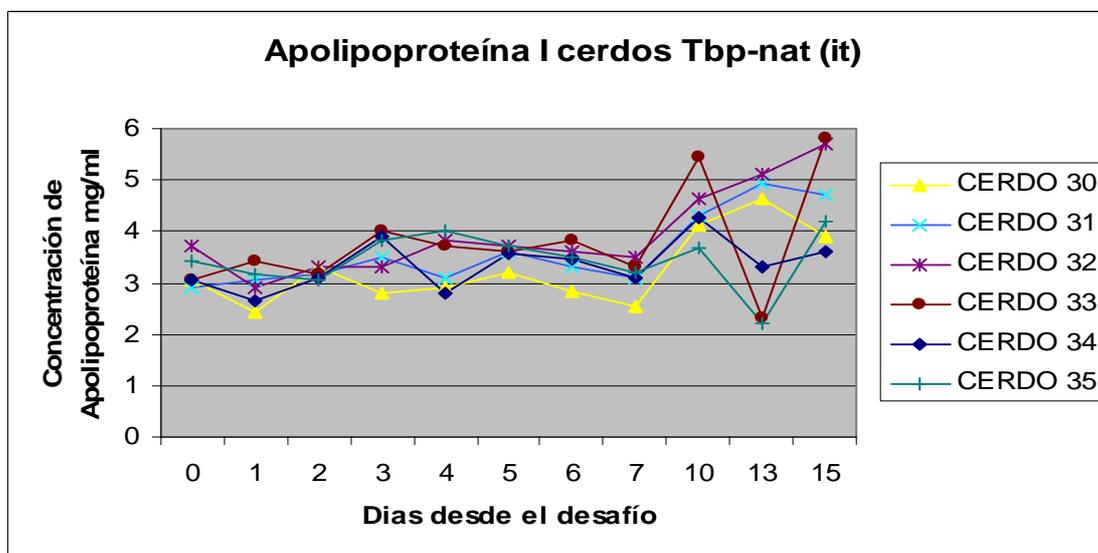


Figura 4.83. Evolución de los niveles de apolipoproteína I.

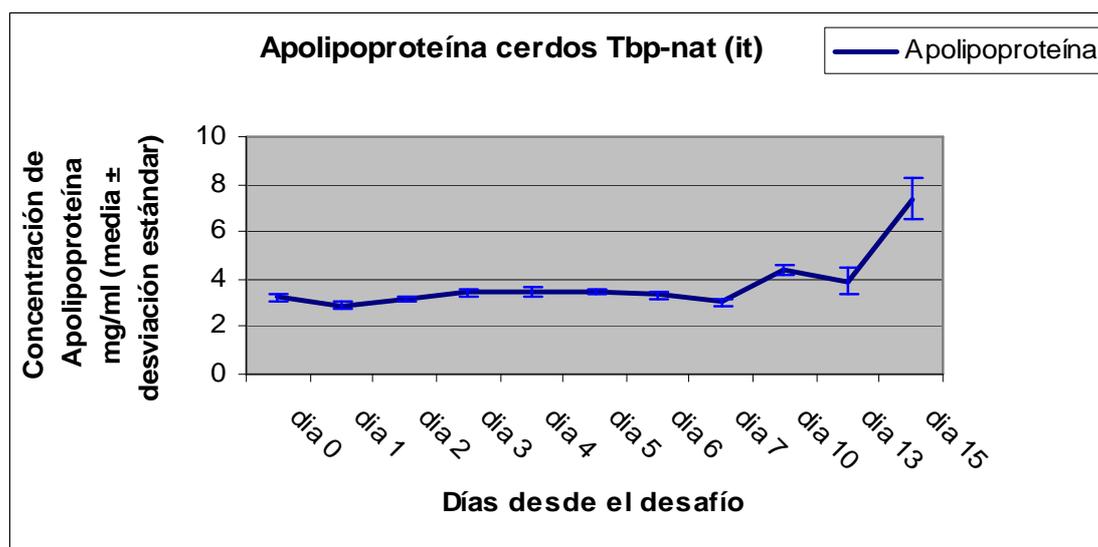


Figura 4.84. Media de la concentración de apolipoproteína I en el grupo.

### 6.5.d. Proteína C reactiva

La concentración de esta proteína en este grupo experimental se mantuvo constante desde el momento de la infección hasta el final de la prueba. Como único hecho destacable, en el animal nº30 se observó una elevación progresiva en sus niveles desde el día 6 posterior a la infección, hasta el final del estudio. A pesar de ello, en el grupo, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas. En la Tabla 4.16 se indica la evolución en la concentración inicial de esta proteína, desde el momento de la infección y en las Figuras 4.85 y 4.86 se representan gráficamente dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

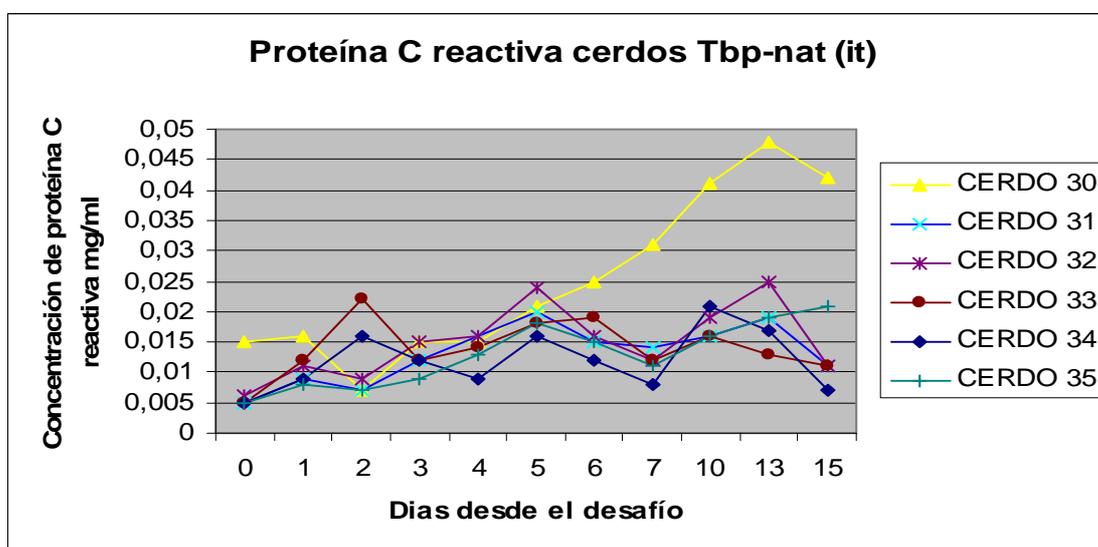


Figura 4.85. Evolución de los niveles de proteína C reactiva.

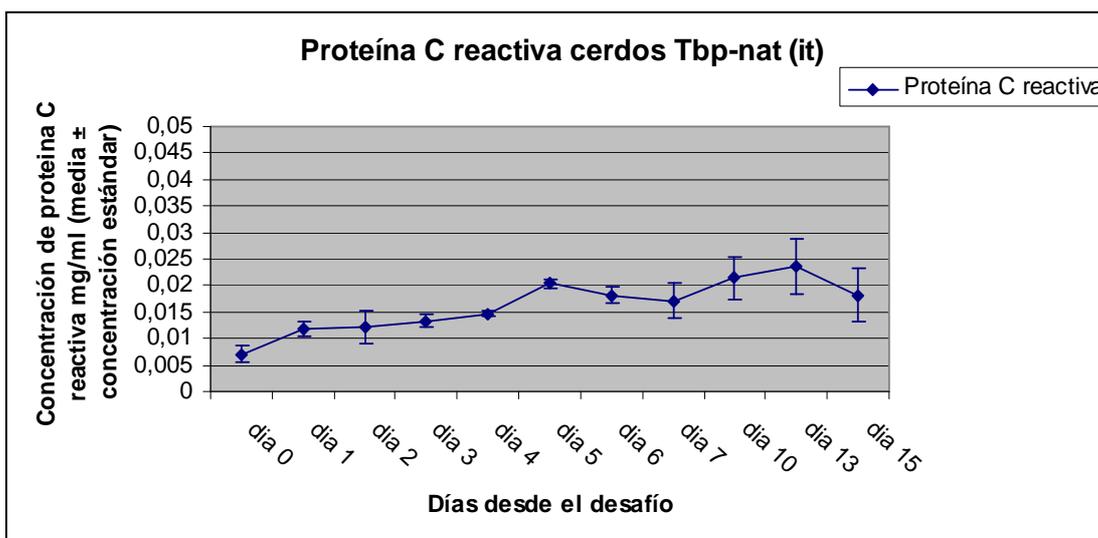


Figura 4.86. Media de la concentración de proteína C reactiva en el grupo.

### 6.5.e. Resultados individuales de la concentración de las PFA en el grupo inmunizado con las proteínas nativas de unión a la transferrina administradas por vía intratraqueal

Tabla 4.16. Resultados de las cuatro proteínas de fase aguda en cada uno de los animales del grupo inmunizado con las Tbp-it.

<b>Concentración de pig-MAP (mg/ml)</b>											
Número de animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
30	0,54	0,62	0,55	0,72	0,80	0,90	0,95	0,98	0,90	0,95	0,92
31	0,40	0,55	0,49	0,25	0,23	0,28	0,30	0,33	0,40	0,61	0,96
32	0,44	0,65	0,40	0,36	0,38	0,34	0,33	0,38	0,27	0,32	0,70
33	0,42	0,58	0,55	0,39	0,14	0,30	0,23	0,45	0,38	0,56	0,48
34	0,51	0,73	0,48	0,43	0,41	0,42	0,37	0,51	0,35	0,60	0,78
35	0,44	0,55	0,52	0,39	0,28	0,30	0,36	0,32	0,68	0,65	0,65
<b>Concentración de haptoglobina (mg/ml)</b>											
Número de animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
30	0,34	0,39	0	0,58	0,05	0,41	0,01	0,01	0,19	0,21	0,20
31	0,29	0,43	0	0,09	0,11	0,18	0,08	0,16	0,31	0,37	0,14
32	0,30	0,35	0	0,31	0,28	0,27	0,09	0,13	0,40	0,32	0,30
33	0,29	0,33	0	0,09	0,08	0,07	0,08	0,19	0,22	0,32	0,22
34	0,31	0,35	0	0,09	0,08	0,08	0,09	0,18	0,23	0,33	0,22
35	0,30	0,33	0	0,13	0,07	0,08	0,08	0,11	0,14	0,17	0,15
<b>Concentración de apolipoproteína I (mg/ml)</b>											
Número de animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
30	3,04	2,43	3,3	2,79	2,92	3,20	2,82	2,55	4,14	4,62	3,90
31	2,92	3,04	3,17	3,50	3,11	3,61	3,30	3,11	4,30	4,95	9,38
32	3,70	2,92	3,30	3,30	3,82	3,71	3,61	3,50	4,62	5,11	8,73
33	3,04	3,43	3,17	4,03	3,71	3,61	3,82	3,3	5,46	2,32	5,99
34	3,20	2,41	3,00	3,20	3,10	2,98	2,87	2,63	4,11	4,35	8,01
35	3,43	3,17	3,04	3,82	4,03	3,70	3,50	3,20	3,69	2,20	8,31
<b>Concentración de proteína C reactiva (mg/ml)</b>											
Número de animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
30	0,015	0,016	0,007	0,015	0,015	0,021	0,025	0,031	0,041	0,048	0,042
31	0,005	0,009	0,007	0,012	0,016	0,020	0,015	0,014	0,016	0,019	0,011
32	0,006	0,011	0,009	0,015	0,016	0,024	0,016	0,012	0,019	0,025	0,011
33	0,005	0,012	0,022	0,012	0,014	0,018	0,019	0,012	0,016	0,013	0,011
34	0,006	0,015	0,210	0,017	0,014	0,021	0,019	0,023	0,021	0,018	0,013
35	0,005	0,008	0,007	0,009	0,013	0,018	0,015	0,011	0,016	0,019	0,0210

6.6. Cerdos control (animales inoculados con PBS)

6.6.a Pig MAP

En este grupo, los cerdos presentaron una elevación en la concentración de pig-MAP de hasta seis veces con respecto a los niveles basales en el 2º día post-infección, después de lo cual se produjo su muerte. Las diferencias entre el día del desafío y los días siguientes resultaron estadísticamente significativas ( $p= 0,023$ ).

En la Tabla 4.17 se presenta la evolución en la concentración individual de esta proteína, desde el momento de la infección. En las Figuras 4.87 y 4.88 se representan dichos resultados gráficamente y la media del grupo, respectivamente.

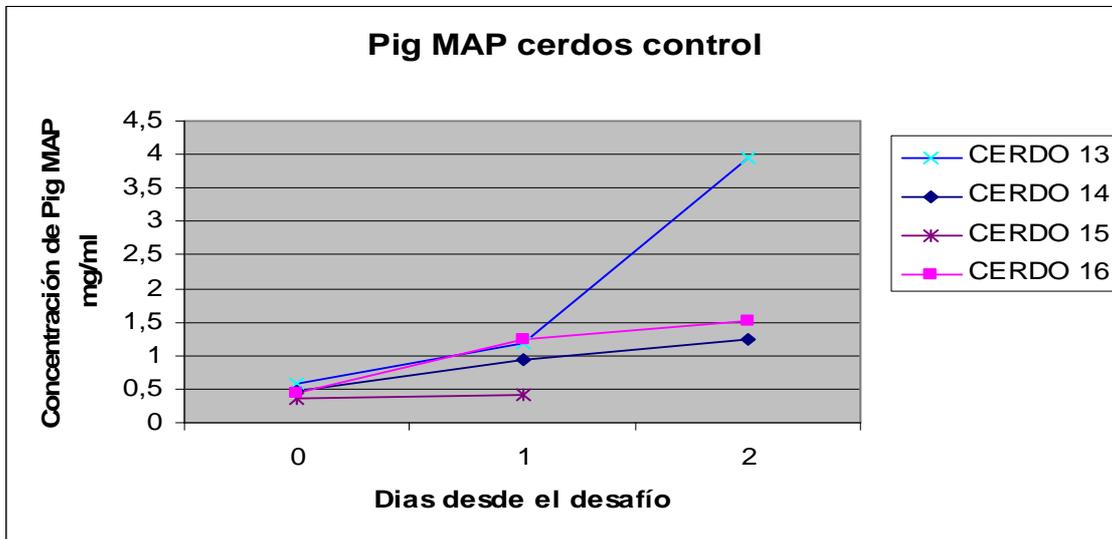


Figura 4.87. Evolución de los niveles de pig MAP.

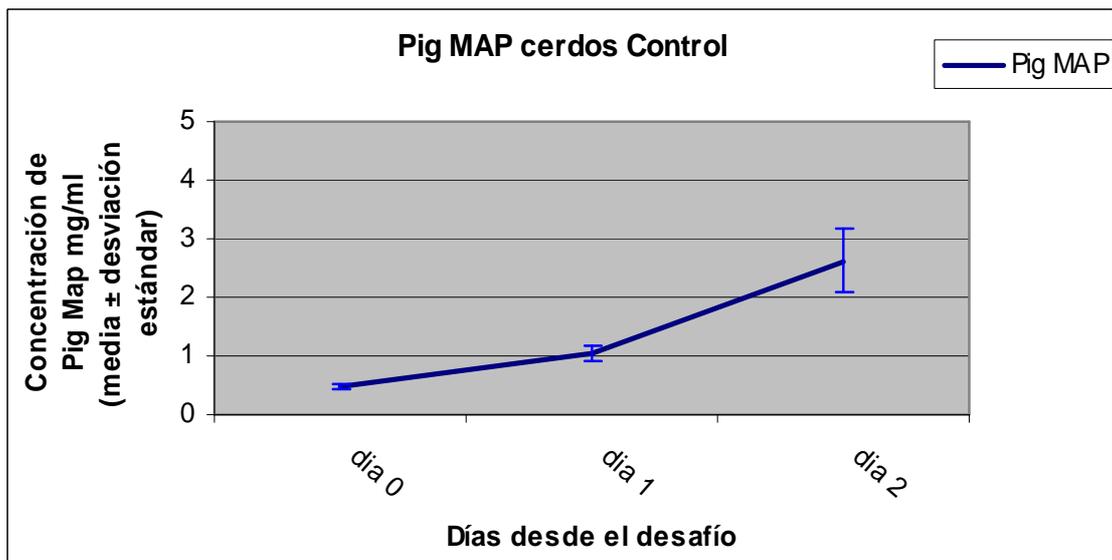


Figura 4.88. Media de la concentración de pig MAP en el grupo.

### 6.6.b. Haptoglobina

En el caso de la haptoglobina, la concentración aumentó mucho durante las primeras 48 horas posteriores a la infección, hasta 3,3 veces los niveles medios basales previos a ella, antes de la muerte de los animales. Las diferencias resultaron estadísticamente significativas ( $p= 0,0041$ ).

En la Tabla 4.17 se recoge la evolución en la concentración de esta proteína en cada animal, desde el momento de la infección. En las Figuras 4.89 y 4.90 se representan gráficamente dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

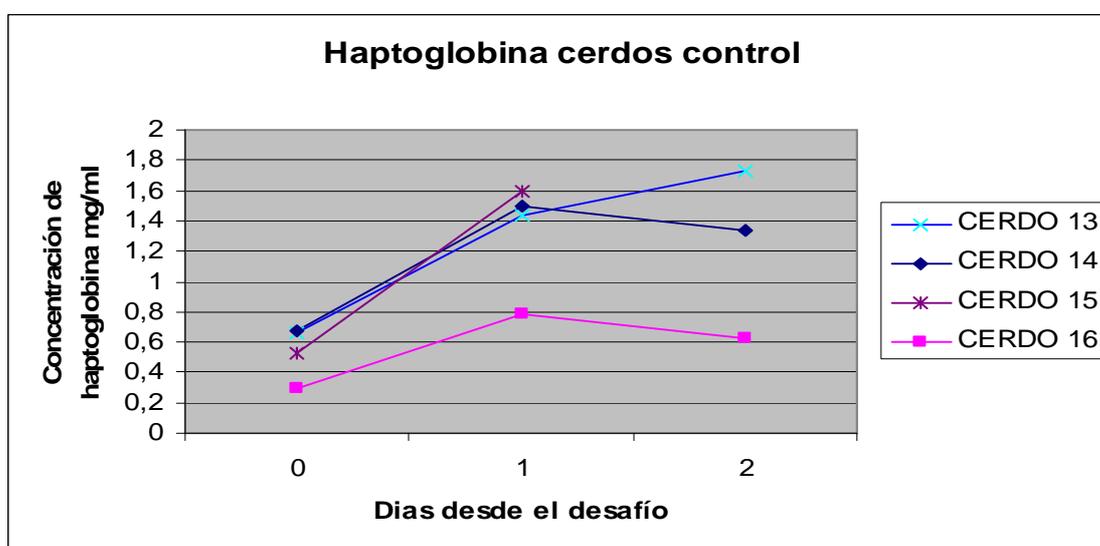


Figura 4.89. Evolución de los niveles de haptoglobina.

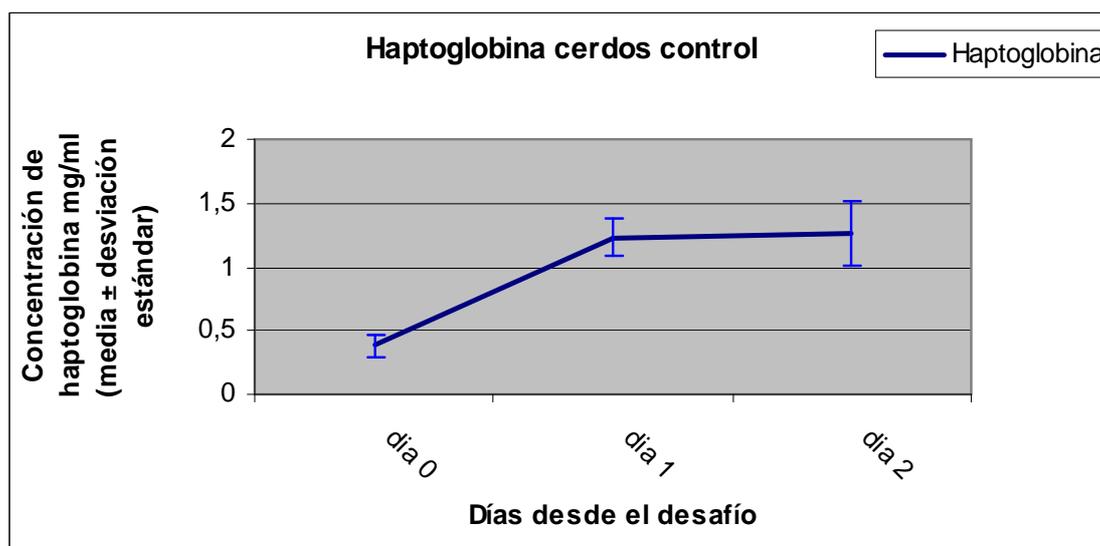


Figura 4.90. Media de la concentración de haptoglobina en el grupo.

### 6.6.c. Apolipoproteína I

En este caso, su concentración llegó a disminuir hasta un valor medio de 2,34 mg/ml justo antes de la muerte. En este caso, sí se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tras el desafío ( $p= 0,0017$ ).

En la Tabla 4.17 se observa la evolución individual en la concentración de esta proteína, desde el momento de la infección. En las Figuras 4.91 y 4.92 se representan gráficamente dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

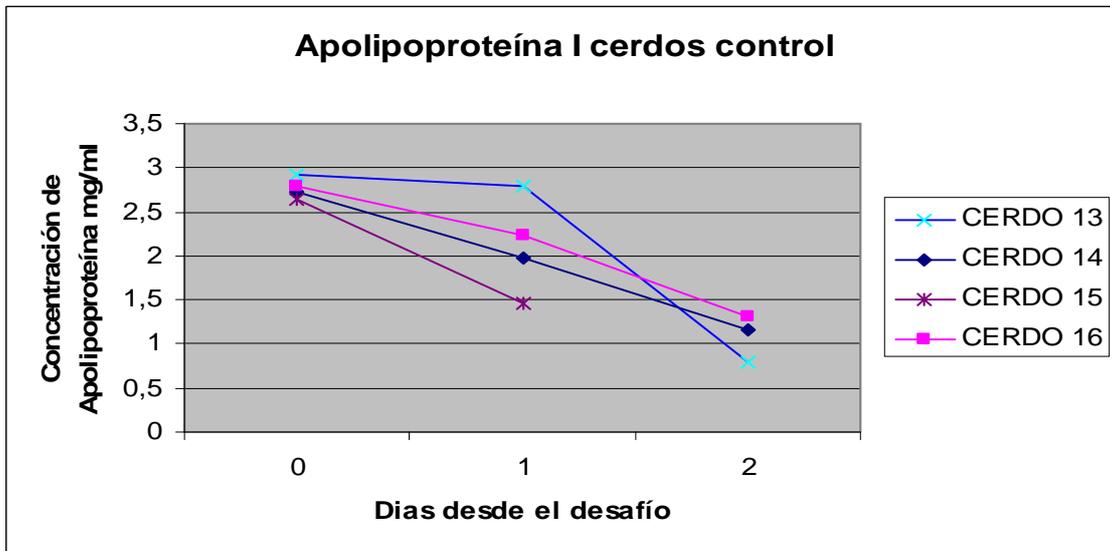


Figura 4.91. Evolución de los niveles de apolipoproteína I.

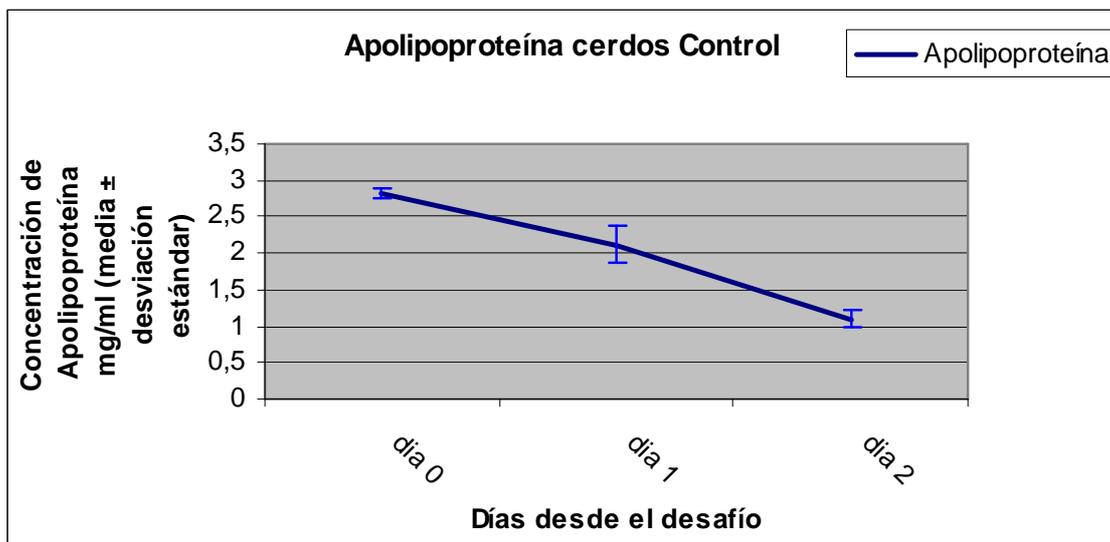


Figura 4.92. Media de la concentración de apolipoproteína I en el grupo.

#### 6.6.d. Proteína C reactiva

La concentración de esta proteína osciló entre unos valores casi inapreciables hasta casi 0,1 mg/ml en alguno de los animales en el día 2 después del desafío. Esta variación resultó estadísticamente significativa ( $p=0,0033$ ).

En la Tabla 4.17 se presenta la evolución individual en su concentración, desde el momento de la infección. En las Figuras 4.93 y 4.94 se representan gráficamente dichos resultados y la media del grupo, respectivamente.

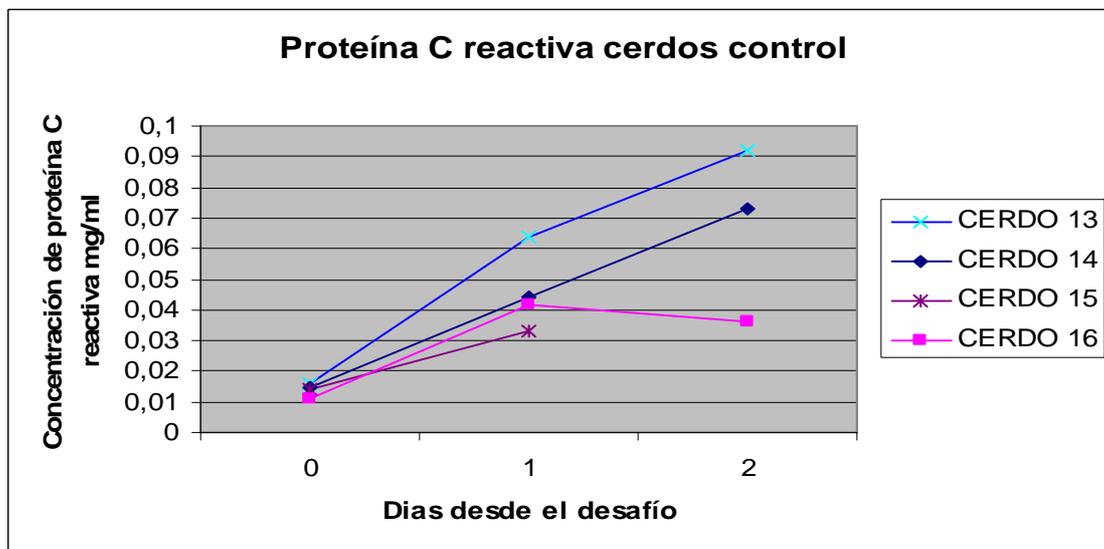


Figura 4.93. Evolución de los niveles de proteína C reactiva.

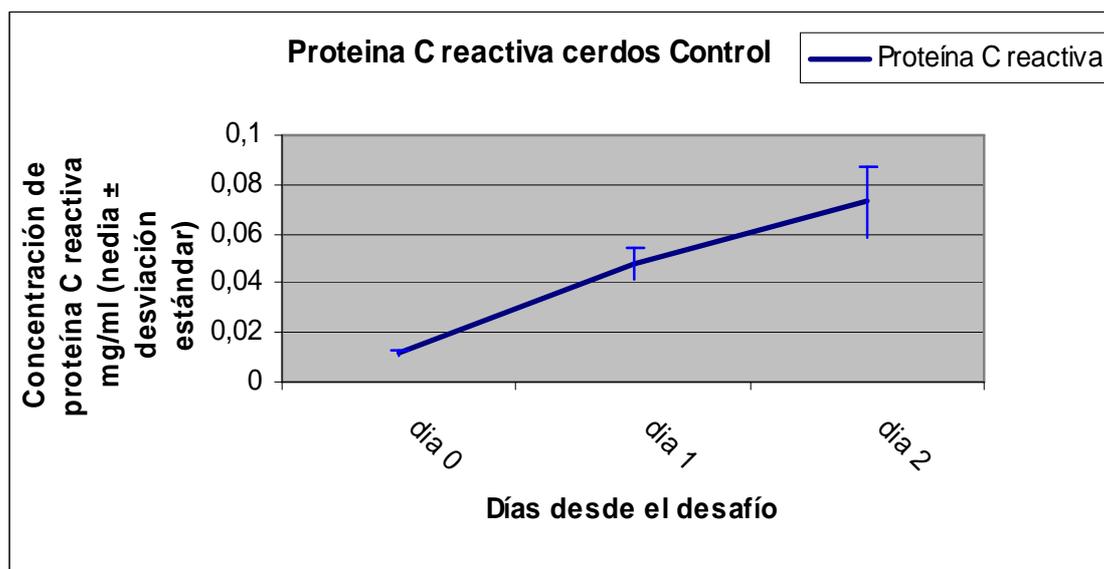


Figura 4.94. Media de la concentración de proteína C reactiva en el grupo.

### 6.6.e. Resultados individuales de la concentración de las PFA en el grupo control

**Tabla 4.17.** Resultados de las cuatro proteínas de fase aguda en cada uno de los animales del grupo inoculado con PBS.

<b>Concentración de Pig-MAP (mg/ml)</b>											
Número de animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
13	0,59	1,18	3,94								
14	0,45	1,10	2,40								
15	0,44	0,67									
16	0,44	1,25	1,52								
<b>Concentración de haptoglobina (mg/ml)</b>											
Número de animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
13	0,66	1,43	1,73								
14	0,30	1,23	1,44								
15	0,28	1,48									
16	0,29	0,79	0,62								
<b>Concentración de apolipoproteína I (mg/ml)</b>											
Número de animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
13	2,92	2,79	0,80								
14	2,72	1,97	1,15								
15	2,65	1,47									
16	2,79	2,24	1,32								
<b>Concentración de proteína C reactiva (mg/ml)</b>											
Número de animal	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 13	Día 15
13	0,016	0,064	0,092								
14	0,010	0,053	0,091								
15	0,009	0,032									
16	0,011	0,042	0,036								

## 6.7. Estadística global

El estudio estadístico de las diferencias entre grupos puso de manifiesto los siguientes hechos:

1º- El grupo control presentó una respuesta de fase aguda tras la infección muy evidente, con grandes cambios en la concentración de las proteínas analizadas desde el momento del desafío.

2º- Dentro de los grupos TbpA-r y TbpB-r se pudo diferenciar claramente la evolución, en lo que a las proteínas de fase aguda se refiere, en los animales que murieron (más parecido a lo que sucede con el grupo control) y en los que sobrevivieron a la infección (similar a lo observado en el resto de los grupos).

3º- El grupo vacunado con la formulación comercial y los inmunizados con las proteínas nativas de unión a la transferrina (independientemente de la vía) se comportaron de manera muy similar, con una escasa respuesta de fase aguda.

Para estudiar las diferencias entre grupos, se utilizó el programa informático SPSS, con el que se compararon los valores obtenidos en los distintos grupos en los días 2, 4, 6, 10 y 15 posteriores al desafío. Como en todos los animales no se partía del mismo valor, se trabajó con la variable “diferencia”, que fue calculada restando a cada uno de los valores el del día 0 (día del desafío). Aplicada esta variable, se observó si existían o no diferencias entre grupos, como se muestra en la Tabla 4.18. A partir del día 4, en los animales que sobrevivieron, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que la tabla recoge datos referidos a los primeros momentos posteriores a la infección.

## Resultados

**Tabla 4.18.** Diferencias estadísticamente significativas entre grupos, en cada una de las proteínas de fase aguda estudiadas.

PIG- MAP			HAPTOGLOBINA		
Grupo	Grupos con los que presenta diferencias significativas		Grupo	Grupos con los que presenta diferencias significativas	
<b>TbpA-r</b>	Con grupo control. Con grupo comercial. Con grupo Tbp-nat (im)	p= 0,0023 p= 0,0038 p= 0,0010	<b>TbpA-r</b>	Con grupo control.	p= 0,0034
<b>TbpB-r</b>	Con grupo control. Con grupo comercial. Con grupo Tbp-nat (it)	p= 0,0036 p= 0,0043 p= 0,0028	<b>TbpB-r</b>	Con grupo control. Con grupo comercial.	p= 0,0049 p= 0,0043
<b>Comercial</b>	Con grupo TbpA-r Con grupo TbpB-r Con grupo control.	p= 0,0038 p= 0,0043 p= 0,0044	<b>Comercial</b>	Con grupo TbpB-r. Con grupo control.	p= 0,0044 p= 0,0009
<b>Tbp-nat (im)</b>	Con grupo control.	p= 0,0019	<b>Tbp-nat (im)</b>	Con grupo control.	p= 0,0024
<b>Tbp-nat (it)</b>	Con grupo TbpA-r Con grupo TbpB-r Con grupo control.	p= 0,0010 p= 0,0028 p= 0,0020	<b>Tbp-nat (it)</b>	Con grupo control.	p= 0,0027
<b>Control</b>	Con grupo TbpA-r Con grupo TbpB-r Con grupo comercial. Con grupo Tbp-nat (im) Con grupo Tbp-nat (it)	p= 0,0023 p= 0,0036 p= 0,0044 p= 0,0019 p= 0,0020	<b>Control</b>	Con grupo TbpA-r Con grupo TbpB-r Con grupo comercial. Con grupo Tbp-nat (im) Con grupo Tbp-nat (it)	p= 0,0034 p= 0,0049 p= 0,0009 p= 0,0017 p= 0,0027
APOLIPOPROTEÍNA I			PROTEÍNA C REACTIVA		
Grupo	Grupos con los que presenta diferencias significativas		Grupo	Grupos con los que presenta diferencias significativas	
<b>TbpA-r</b>	Con grupo control. Con grupo comercial. Con grupo Tbp-nat (it)	p= 0,0048 p= 0,0047 p= 0,0039	<b>TbpA-r</b>	Con grupo control.	p= 0,0023
<b>TbpB-r</b>	Con grupo control. Con grupo comercial. Con grupo Tbp-nat (it)	p= 0,0023 p= 0,0028 p= 0,0033	<b>TbpB-r</b>	Con grupo control.	p= 0,0043
<b>Comercial</b>	Con grupo TbpA-r Con grupo TbpB-r Con grupo control.	p= 0,0041 p= 0,0028 p= 0,0028	<b>Comercial</b>	Con grupo control.	p= 0,0015
<b>Tbp-nat (im)</b>	Con grupo control.	p= 0,0042	<b>Tbp-nat (im)</b>	Con grupo control.	p= 0,0024
<b>Tbp-nat (it)</b>	Con grupo TbpA-r Con grupo TbpB-r Con grupo control.	p= 0,0037 p= 0,0033 p= 0,0021	<b>Tbp-nat (it)</b>	Con grupo control.	p= 0,0027
<b>Control</b>	Con grupo TbpA-r Con grupo TbpB-r Con grupo comercial. Con grupo Tbp-nat (im) Con grupo Tbp-nat (it)	p= 0,0048 p= 0,0023 p= 0,0032 p= 0,0042 p= 0,0021	<b>Control</b>	Con grupo TbpA-r Con grupo TbpB-r Con grupo comercial. Con grupo Tbp-nat (im) Con grupo Tbp-nat (it)	p= 0,0023 p= 0,0043 p= 0,0015 p= 0,0033 p= 0,0027

TbpA-r: proteína de unión a la transferrina A recombinante

TbpB-r: proteína de unión a la transferrina B recombinante

Tbp-nat (im): proteínas nativas de unión a la transferrina inoculadas por vía intramuscular

Tbp-nat (it): proteínas nativas de unión a la transferrina inoculadas por vía intratraqueal

## 7. Estudio de la respuesta inmune humoral (ELISA).

Se llevó a cabo la caracterización de la respuesta inmune humoral frente a *H. parasuis* y sus antígenos, a partir de las muestras de suero recogidas a lo largo de la prueba experimental.

Se utilizó un ELISA indirecto con tres tipos de antígenos fijados a las placas, con el fin de valorar la presencia de inmunoglobulinas (Ig) frente a la cepa Nagasaki del serotipo 5 de *H. parasuis*: el 1º de ellos consistió en una suspensión de *H. parasuis* inactivado con thimerosal (0,1%); el 2º, en un preparado antigénico a base de sobrenadantes de cultivo de *H. parasuis* enriquecidos en proteínas de la membrana externa (OMP), obtenidos a partir de esta misma cepa, y el 3º en un extracto crudo de proteínas nativas de unión a la transferrina (Tbp-nat) de la misma cepa.

Los datos se estudiaron primero de forma individual (Figura 4.132, anexos) y posteriormente de forma conjunta, estableciendo para cada grupo de animales un valor umbral que equivalía al doble de la medida de la densidad óptica al inicio del estudio, más la desviación estándar.

### 7.1. Cerdos inmunizados con la TbpA recombinante

#### 7.1.a. IgG totales (IgGt)

En los ELISAs en los que las placas fueron tapizadas con bacterias inactivadas y con OMP, se observó un aumento destacable en la densidad óptica antes de la segunda inoculación. En el ELISA tapizado con las Tbp-nat, este importante aumento en el valor de la densidad óptica ocurría después de la segunda inmunización. A partir de esos momentos, la producción de anticuerpos (Ac) se mantuvo con ligeras oscilaciones hasta la muerte o sacrificio de los animales, siendo el valor máximo alcanzado de 0,373 de densidad óptica (desde un valor inicial de 0,104). Debemos recordar que en este grupo sólo sobrevivieron dos cerdos hasta el final del experimento. La existencia de diferencias significativas entre los diferentes momentos del estudio se presenta en la Tabla 4.19, en la que puede observarse que entre la 1ª y la 2ª inmunización no se produjeron diferencias significativas, independientemente del antígeno utilizado para tapizar. En la Figura 4.95 se presenta la evolución de las IgGt en este grupo.

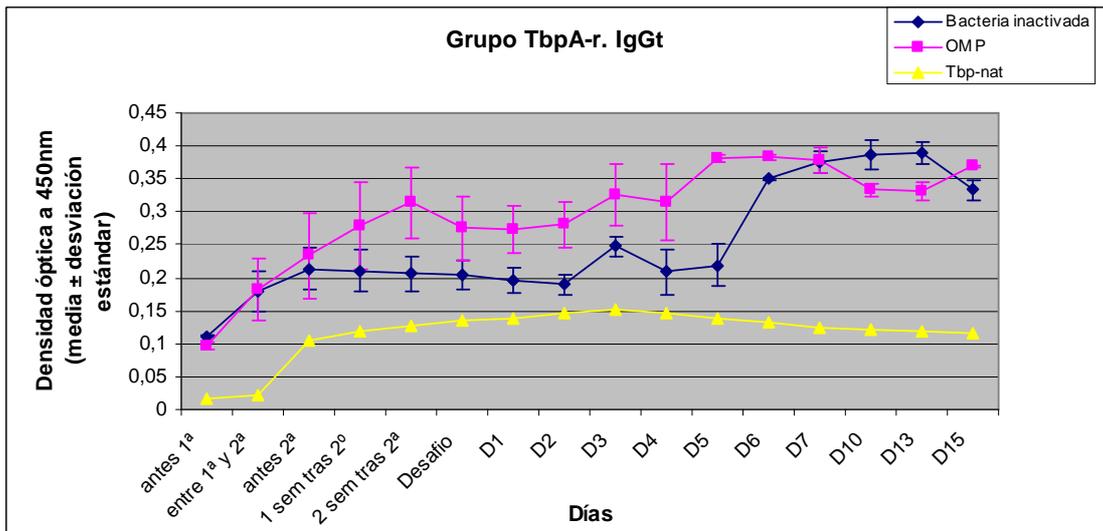


Figura 4.95. Evolución de las IgGt en el grupo TbpA-r.

### 7.1.b. IgM

Con las tres variantes de ELISA se observó un incremento superior al doble del valor inicial a partir de la 1ª inoculación, que se mantuvo hasta el final del experimento, con unos niveles máximos de 0,320 desde los iniciales de 0,063. En el caso del ELISA con proteínas nativas de unión a la transferrina como Ag en el tapizado de las placas, la producción de anticuerpos resultó menor, siendo el valor máximo alcanzado de 0,126, desde uno inicial de 0,023. En este último caso, se apreciaron diferencias significativas entre los distintos momentos del estudio (Tabla 4.19). En la Figura 4.96 se observa la evolución de las IgM en este grupo.

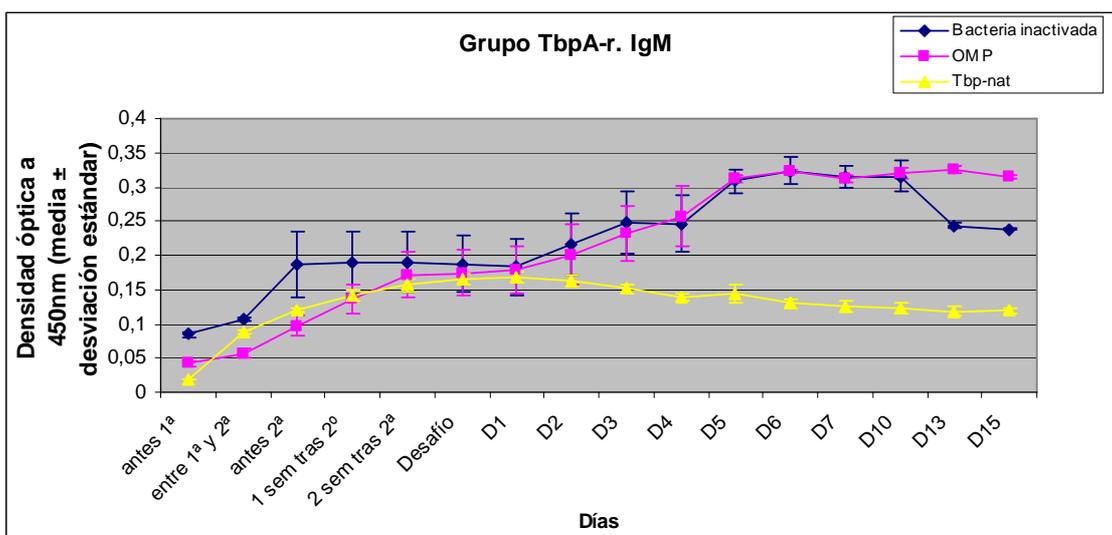


Figura 4.96. Evolución de las IgM en el grupo TbpA-r.

### 7.1.c. IgG1

En lo que se refiere a este isotipo, se observó un importante aumento en el valor de densidad óptica tras la primera inoculación. A diferencia de los casos anteriores, los niveles más elevados al principio de la prueba se observaron en el ELISA tapizado con proteínas nativas de unión a la transferrina, con una densidad óptica de 0,233 desde un valor inicial de 0,012. A partir del desafío, con el antígeno de bacteria inactivada, se observó un aumento considerable en la producción de Ac, llegando a valores de densidad óptica de 0,267 desde uno inicial de 0,054. En esta subclase también se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre distintos momentos del estudio (Tabla 4.19), en particular entre la 1ª y la 2ª inmunización. En la Figura 4.97 se presenta la evolución de esta subclase en este grupo.

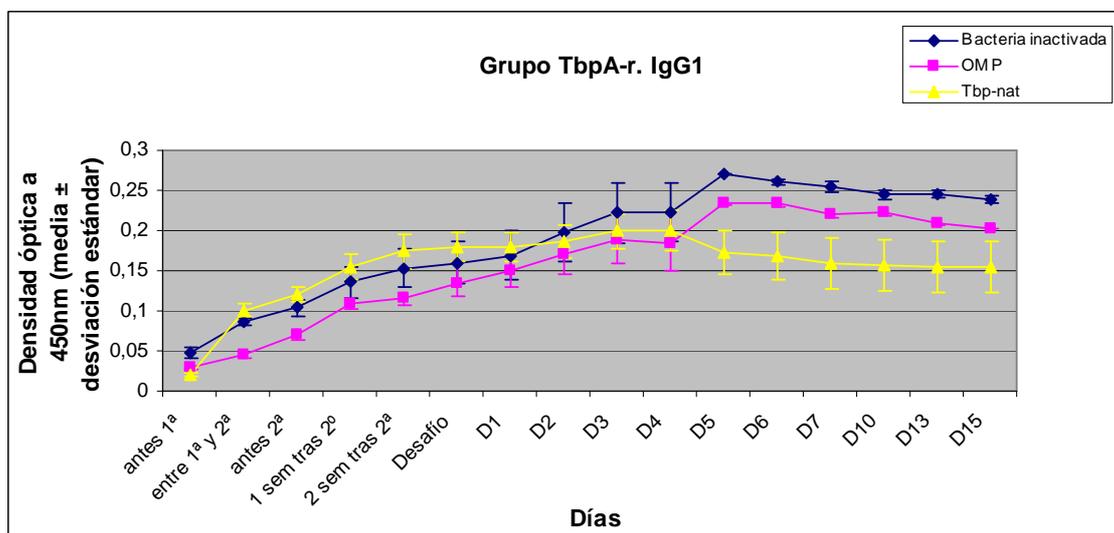


Figura 4.97. Evolución de las IgG1 en el grupo TbpA-r.

### 7.1d. IgG2

Los tres antígenos mostraron resultados similares, con el mayor aumento en los valores de densidad óptica entre la 1ª y la 2ª inmunización (todos los sueros mostraron una densidad óptica de al menos el doble de la que presentaban antes de las inmunizaciones). Se volvieron a apreciar diferencias significativas entre la 1ª y 2ª inmunización, siendo las que se aprecian entre otros momentos distintos del estudio no significativas (Tabla 4.19). En la Figura 4.98 se observa la evolución de esta subclase de inmunoglobulina en este grupo.

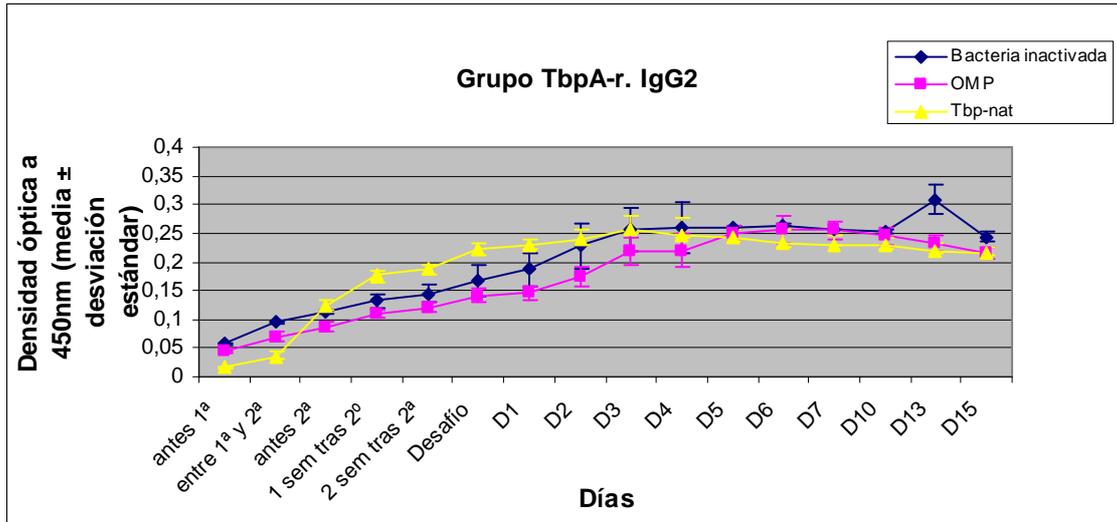


Figura 4.98. Evolución de las IgG2 en el grupo TbpA-r.

### 7.1.e. Estudio estadístico del grupo TbpA recombinante en diferentes momentos del experimento

Tabla 4.19. Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (clases y subclases de Ig) medidas por distintos tipos de ELISA en tres momentos de la prueba experimental.

IgGt			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0021. S	0,0011. S	0,0031. S
II	0,2470. NS	0,0960. NS	0,0105. NS
III	0,0610. NS	0,1120. NS	0,0290. NS
IgM			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0031. S	0,0010. S	0,0013. S
II	0,4040. NS	0,0204. NS	0,0910. NS
III	0,0750. NS	0,2400. NS	0,0960. NS
IgG1			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0010. S	0,0023. S	0,0009. S
II	0,0203. NS	0,0060. NS	0,0190. NS
III	0,4360. NS	0,3130. NS	0,0400. NS
IgG2			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0003. S	0,0041. S	0,0008. S
II	0,0081. NS	0,0090. NS	0,0310. NS
III	0,4010. NS	0,2300. NS	0,0900. NS

I: Antes de la 1ª inmunización- antes de la 2ª. II: antes de la 2ª inmunización- antes del desafío. III: antes del desafío- antes del sacrificio. S= significativo (p< 0,005). NS= no significativo.

## 7.2. Cerdos inmunizados con la TbpB recombinante

### 7.2.a. IgG totales (IgGt)

Los resultados completos se refieren al único animal que sobrevivió a la infección. En todo el grupo antes de la segunda inmunización, el valor de densidad óptica se había incrementado sustancialmente y en el momento de la infección todos los sueros presentaban valores elevados de anticuerpos. El máximo valor correspondiente al animal superviviente resultó ligeramente más elevado en el caso del ELISA tapizado con las OMP (densidad óptica de 0,374), mientras que los obtenidos cuando se utilizaba como antígeno las proteínas nativas de unión a transferrina, resultaron los más bajos (densidad óptica de 0,158). Se obtuvieron diferencias significativas entre la 1ª y la 2ª inmunización en todos los ELISAs (Tabla 4.20). En la Figura 4.99 se presenta la evolución de las IgGt en el grupo.

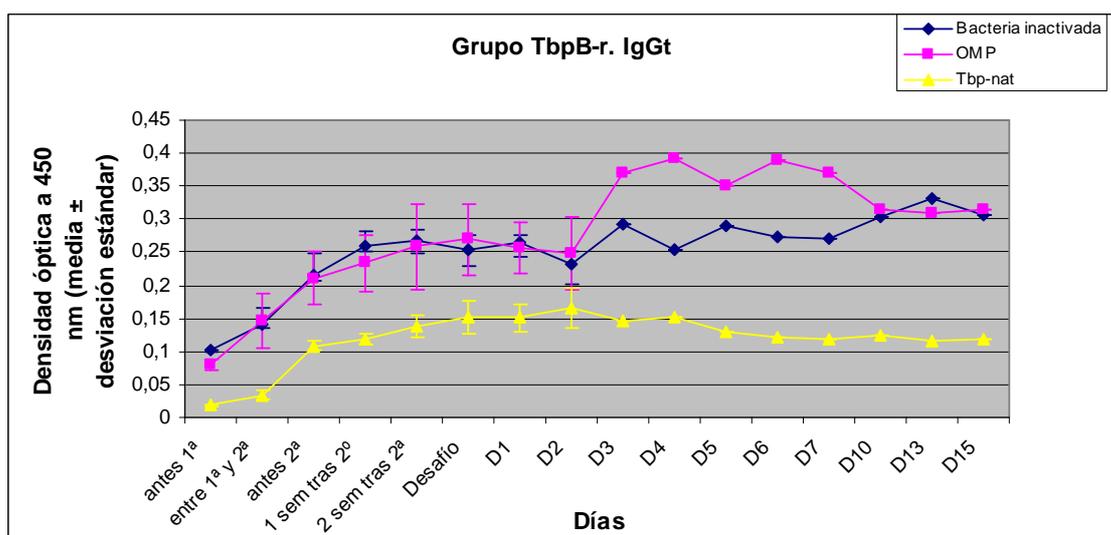


Figura 4.99. Evolución de las IgGt en el grupo TbpB-r.

### 7.2.b. IgM

Todos los sueros aumentaron su densidad óptica considerablemente con los tres tipos de ELISA, antes de la 2ª inoculación y estos valores se mantuvieron constantes hasta el desafío. El cerdo superviviente presentó valores más altos en todos los tipos de ELISA y, como en el caso de las IgGt, fueron las proteínas nativas de unión a la transferrina las que indujeron a los menores valores (0,167). Las diferencias significativas se reflejan en la Tabla 4.20. Sólo se produjeron diferencias entre la 1ª y la 2ª inmunización en los tres tipos de antígenos utilizados. En la Figura 4.100 se describe la evolución de IgM en el grupo.

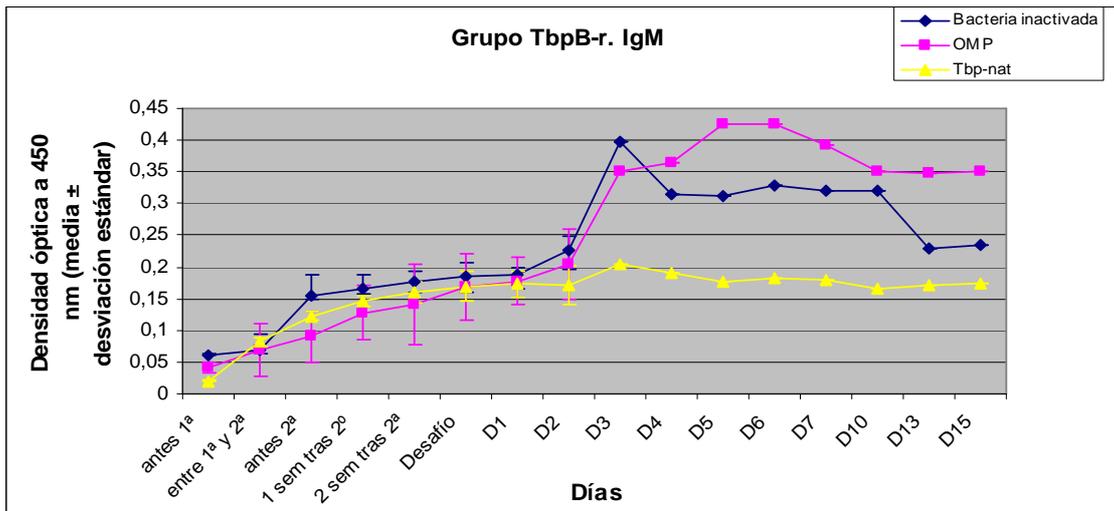


Figura 4.100. Evolución de las IgM en el grupo TbpB-r.

### 7.2.c. IgG1

Después de la 1ª inmunización ya se detectó un incremento acusado en los valores de densidad óptica. Los más elevados se obtuvieron con las Tbp-nat y los más bajos, con las OMP, aunque la tendencia resultó muy similar para los tres antígenos. Las diferencias significativas (Tabla 4.20) se observaron de nuevo entre la 1ª y la 2ª inmunización. En la Figura 4.101 se presenta la evolución de las IgG1 en el grupo.

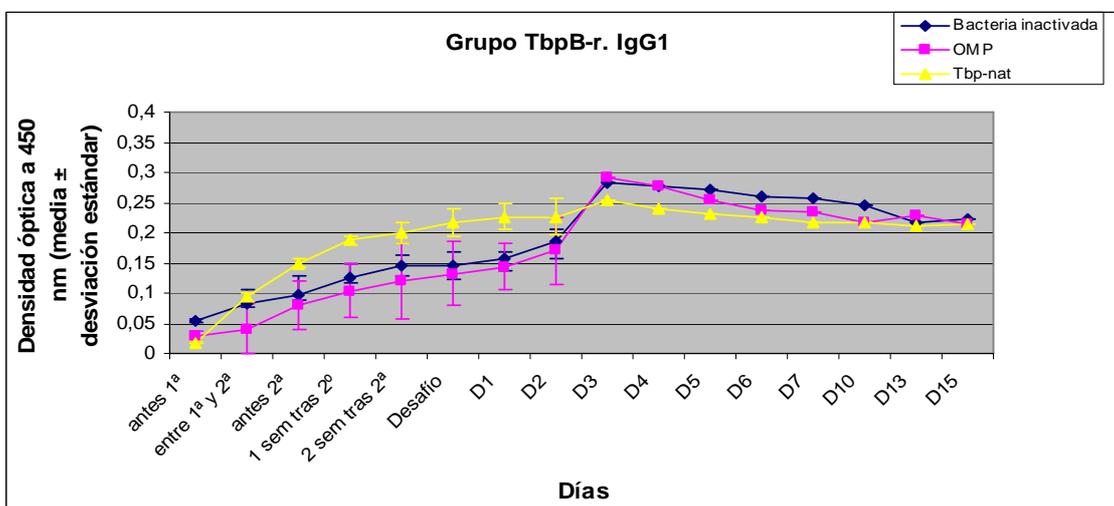


Figura 4.101. Evolución de las IgG1 en el grupo TbpB-r.

### 7.2.d. IgG2

El comportamiento en la producción de anticuerpos de esta subclase resultó muy parecido al anterior. Se obtuvo el mayor aumento en la densidad óptica antes de la 2ª inmunización en todos los animales y el que sobrevivió presentó valores más elevados en el ELISA con la bacteria inactivada, con una de densidad óptica máximo de 0,376

desde un valor inicial de 0,051. Como se indica en la Tabla 4.20, sólo se obtuvieron diferencias significativas entre la 1ª y la 2ª inmunización. En la Figura 4.102 se presenta la evolución de IgG2 en el grupo.

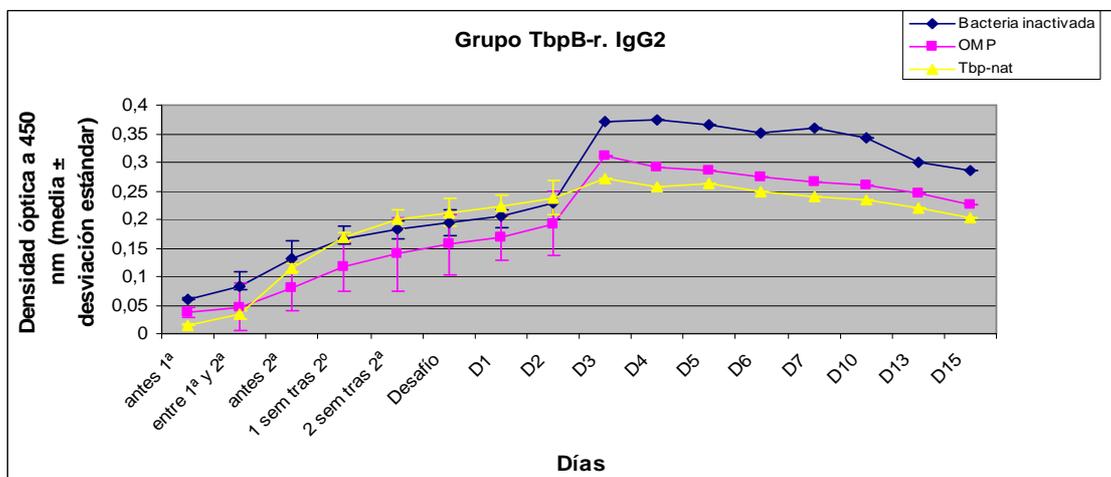


Figura 4.102. Evolución de las IgG2 en el grupo TbpB-r.

### 7.2.e. Estudio estadístico del grupo TbpB recombinante en diferentes momentos del experimento

Tabla 4.20. Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (clases y subclases de Ig) medidas por distintos tipos de ELISA en tres momentos de la prueba experimental.

IgGt			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0038. S	0,0011. S	0,0015. S
II	0,2330. NS	0,0840. NS	0,0173. NS
IgM			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0045. S	0,0002. S	0,0002. S
II	0,0230. NS	0,0684. NS	0,0621. NS
IgG1			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0010. S	0,0023. S	0,0009. S
II	0,0203. NS	0,0060. NS	0,0190. NS
IgG2			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0005. S	0,0012. S	0,0041. S
II	0,0086. NS	0,0074. NS	0,0010. S

I: Antes de la 1ª inmunización- antes de la 2ª. II: antes de la 2ª inmunización- antes del desafío. S= significativo ( $p < 0,005$ ). NS= no significativo.

### 7.3. Cerdos inmunizados con la vacuna comercial

#### 7.3.a. IgG totales (IgGt)

En este grupo, todos los animales sobrevivieron hasta el momento del sacrificio. En las tres variantes de ELISA utilizadas para el estudio de la inmunidad humoral se apreció el mayor aumento de densidad óptica antes de la 2ª inmunización. Los resultados de los tres métodos evolucionaron de modo similar, elevándose la producción de anticuerpos hasta el 3º día después del desafío, manteniéndose así hasta el final del experimento, con un nivel máximo de densidad óptica de 0,623. Se apreciaron diferencias significativas (Tabla 4.21) entre la 1ª y la 2ª inmunización. En la Figura 4.103 se presenta la evolución de IgGt en este grupo.

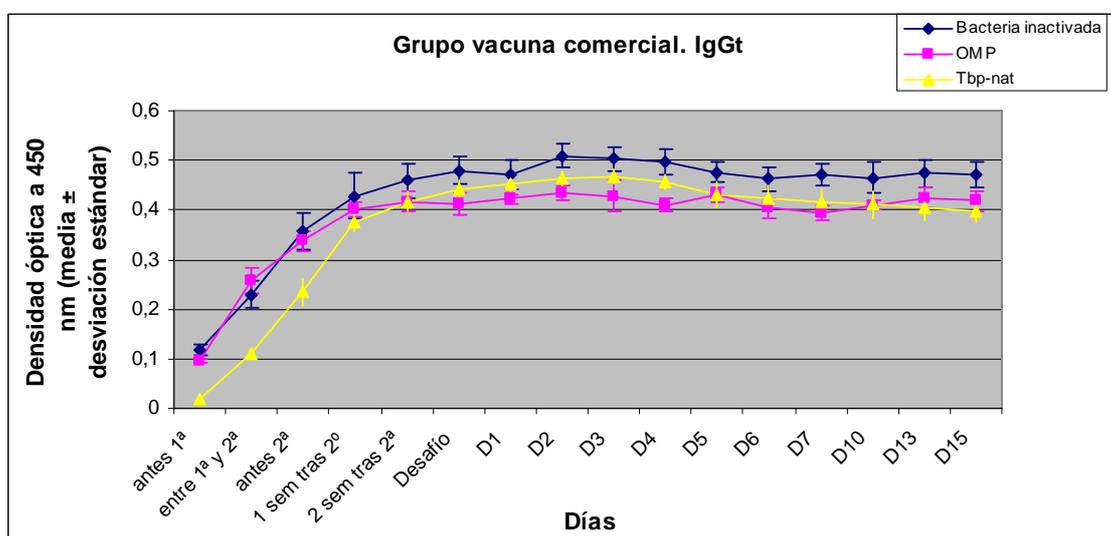


Figura 4.103. Evolución de las IgGt en el grupo comercial.

#### 7.3.b. IgM

En relación con la IgM se observó la misma evolución que en las IgGt pero la densidad óptica en el ELISA tapizado con la bacteria inactivada fue más elevada en todos los puntos de estudio, siendo el valor máximo de 0,607 (día 4º tras la infección). También se produjo el mayor aumento en la producción de anticuerpos antes de la 2ª inmunización, por lo que se volvieron a obtener diferencias significativas en este momento del experimento, aunque en esta ocasión también se observaron entre la 2ª inmunización y el desafío (Tabla 4.21). En la Figura 4.104 se refleja la evolución de las IgM en este grupo.

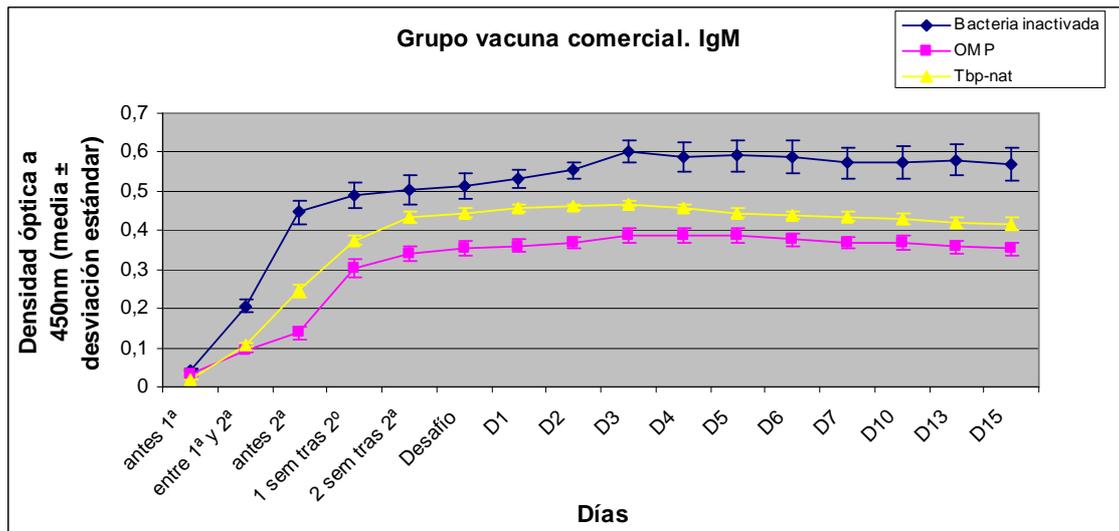


Figura 4.104. Evolución de las IgM en el grupo comercial.

### 7.3.c. IgG1

La IgG1 adoptó un comportamiento muy similar con los tres tipos de antígenos. El mayor aumento en los valores de densidad óptica se produjo antes de la 2ª inmunización y el título de anticuerpos aumentó hasta el tercer día post-infección, manteniéndose constante hasta el sacrificio. Los valores máximos de densidad óptica, de 0,609, se obtuvieron con la bacteria inactivada. Se detectaron diferencias significativas entre la 1ª y la 2ª inmunización y, como en el caso anterior, también entre la 2ª inmunización y el desafío (Tabla 4.21). En la Figura 4.105 se observa la evolución de las IgG1 en este grupo.

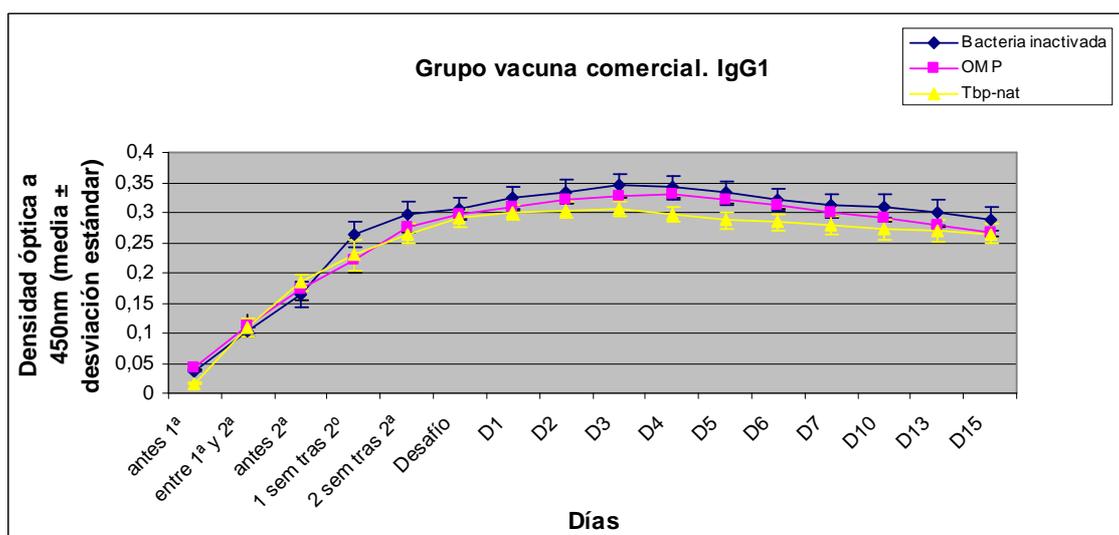


Figura 4.105. Evolución de las IgG1 en el grupo comercial.

### 7.3.d. IgG2

La evolución de los resultados fue muy parecida a la de la subclase anterior. Se volvió a producir el aumento más significativo en los valores de densidad óptica después de la 1ª inmunización, con diferencias significativas entre ambas inmunizaciones y entre la 2ª inmunización y el desafío, como se observó en el caso de las dos últimas inmunoglobulinas estudiadas en este grupo (Tabla 4.21). En la Figura 4.106 se presenta la evolución de la IgG2 en este grupo inmunizado con la vacuna comercial.

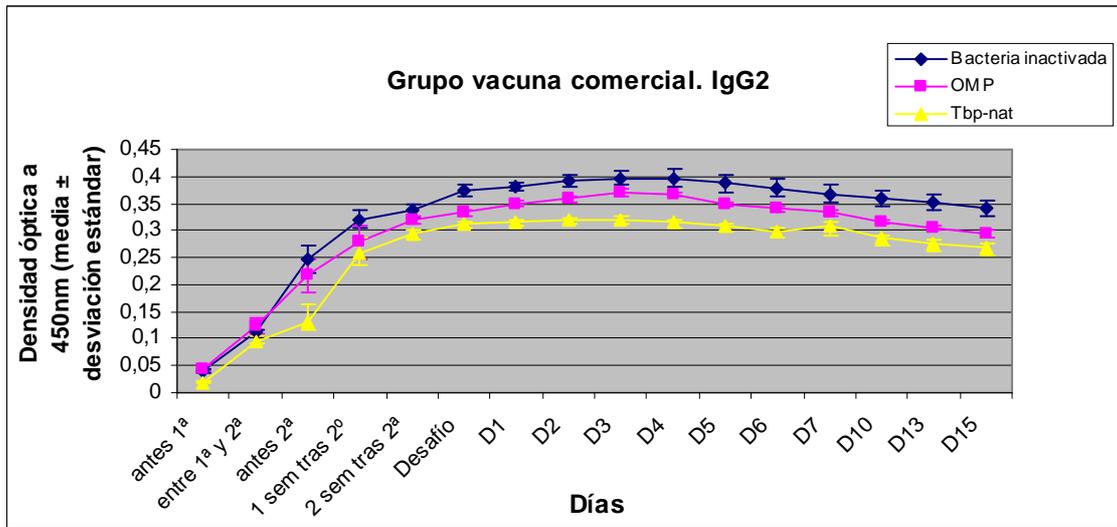


Figura 4.106. Evolución de las IgG2 en el grupo comercial.

### 7.3.e. Estudio estadístico del grupo comercial en diferentes momentos del experimento

**Tabla 4.21.** Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (clases y subclases de Ig) medidas por distintos tipos de ELISA en tres momentos de la prueba experimental.

<b>IgGt</b>			
	<b>Bact. inactivada</b>	<b>OMP</b>	<b>Tbp-nat</b>
<b>I</b>	0,0043. <b>S</b>	0,0006. <b>S</b>	0,0012. <b>S</b>
<b>II</b>	0,0750. <b>NS</b>	0,0390. <b>NS</b>	0,0005. <b>S</b>
<b>III</b>	0,0510. <b>NS</b>	0,0370. <b>NS</b>	0,0273. <b>NS</b>
<b>IgM</b>			
	<b>Bact. inactivada</b>	<b>OMP</b>	<b>Tbp-nat</b>
<b>I</b>	0,0043. <b>S</b>	0,0015. <b>S</b>	0,0013. <b>S</b>
<b>II</b>	0,0021. <b>S</b>	0,0014. <b>S</b>	0,0010. <b>S</b>
<b>III</b>	0,0670. <b>NS</b>	0,0480. <b>NS</b>	0,0830. <b>NS</b>
<b>IgG1</b>			
	<b>Bact. inactivada</b>	<b>OMP</b>	<b>Tbp-nat</b>
<b>I</b>	0,0010. <b>S</b>	0,0023. <b>S</b>	0,0009. <b>S</b>
<b>II</b>	0,0030. <b>S</b>	0,0042. <b>S</b>	0,0026. <b>S</b>
<b>III</b>	0,0873. <b>NS</b>	0,0485. <b>NS</b>	0,1235. <b>NS</b>
<b>IgG2</b>			
	<b>Bact. inactivada</b>	<b>OMP</b>	<b>Tbp-nat</b>
<b>I</b>	0,0041. <b>S</b>	0,0010. <b>S</b>	0,0038. <b>S</b>
<b>II</b>	0,0021. <b>S</b>	0,0030. <b>S</b>	0,0042. <b>S</b>
<b>III</b>	0,0912. <b>NS</b>	0,1209. <b>NS</b>	0,0987. <b>NS</b>

**I:** Antes de la 1ª inmunización- antes de la 2ª. **II:** antes de la 2ª inmunización- antes del desafío. **III:** antes del desafío- antes del sacrificio. **S**= significativo ( $p < 0,005$ ). **NS**= no significativo.

## 7.4. Cerdos inmunizados con las proteínas nativas de unión a la transferrina administradas por vía intramuscular

### 7.4.a. IgG totales (IgGt)

Como se ha señalado, todos los animales sobrevivieron hasta el momento del sacrificio. Entre la 1ª y la 2ª inmunización los animales revelaron el máximo incremento en la densidad óptica, que continuó aumentando en los tres ELISAs hasta el 2º día post-desafío, estabilizándose después hasta el sacrificio. Los valores más elevados se obtuvieron empleando el ELISA tapizado con las Tbp-nat. Se obtuvieron diferencias significativas entre la 1ª y la 2ª inmunización y también entre la 2ª y el desafío (Tabla 4.22). En la Figura 4.107 se presenta la evolución de las IgGt en este grupo.

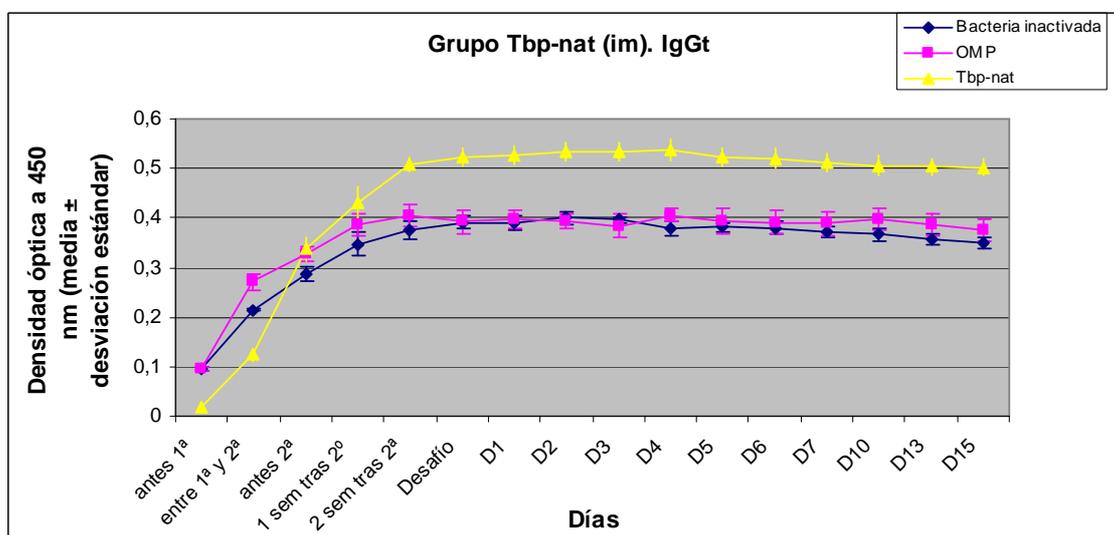


Figura 4.107. Evolución de las IgGt en el grupo de Tbp-im.

### 7.4.b. IgM

En este caso, el antígeno que reconoció los valores más elevados de anticuerpos fue la bacteria inactivada, con una densidad óptica máxima de 0,507 desde los 0,043 iniciales. Aún así, los tres antígenos utilizados produjeron resultados bastante similares, hasta el momento del sacrificio. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la 1ª y la 2ª inmunización y entre la 2ª y el desafío, como aparece reflejado en la Tabla 4.22. En la Figura 4.108 se presenta la evolución de las IgM en este grupo.

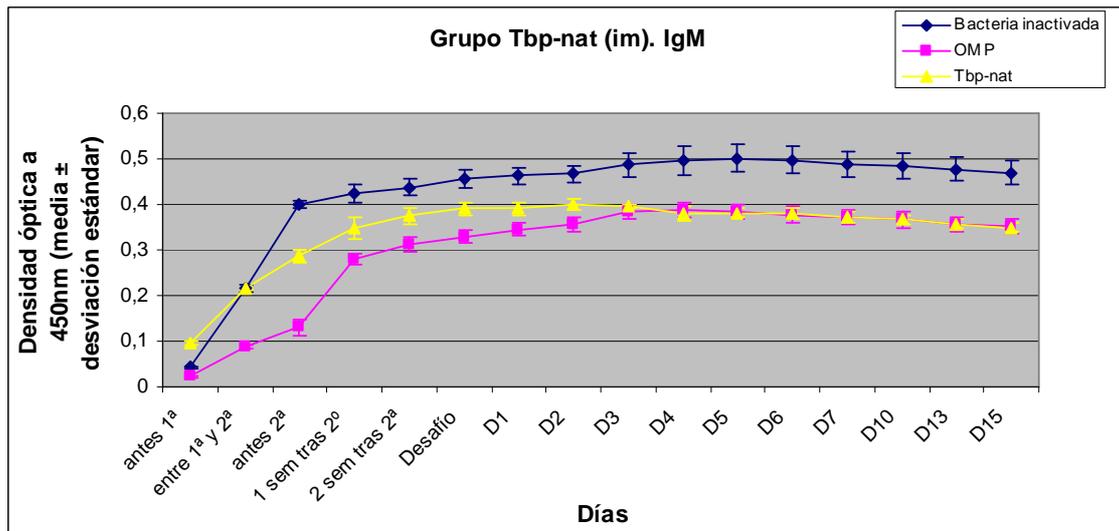


Figura 4.108. Evolución de las IgM en el grupo de Tbp-im.

#### 7.4.c. IgG1

Los resultados obtenidos, en relación con esta subclase de Ig, ratificaron que los valores de densidad óptica más altos se obtenían con las Tbp-nat. Los anticuerpos aumentaron hasta el 2º día post-infección, manteniéndose luego hasta el momento del sacrificio. El máximo valor de densidad óptica fue de 0,356. Las diferencias estadísticamente significativas pueden observarse en la Tabla 4.22. En la Figura 4.109 se presenta la evolución de las IgG1 en este grupo.

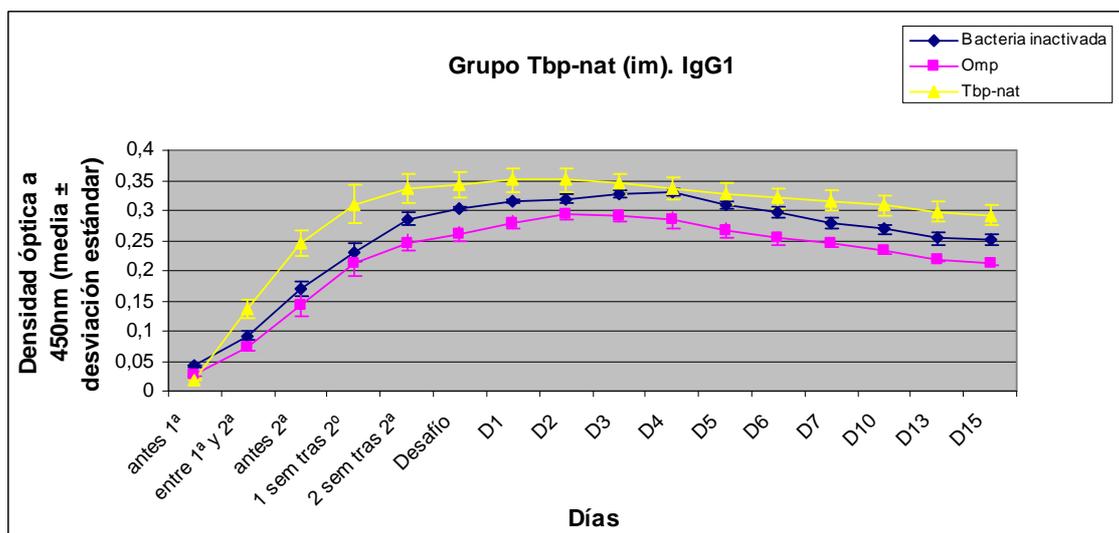


Figura 4.109. Evolución de las IgG1 en el grupo de Tbp-im.

### 7.4.d. IgG2

Los resultados coincidieron prácticamente con los anteriores. El aumento más destacable en los valores de densidad óptica se produjo entre la 1ª y la 2ª inmunización y en ese momento se apreciaron diferencias significativas. También se observaron estas diferencias entre la 2ª inmunización y el desafío y, en el caso de las proteínas de la membrana externa, entre el desafío y el momento previo al sacrificio de los animales (Tabla 4.22). En la Figura 4.110 se presenta la evolución de las IgG2 en este grupo.

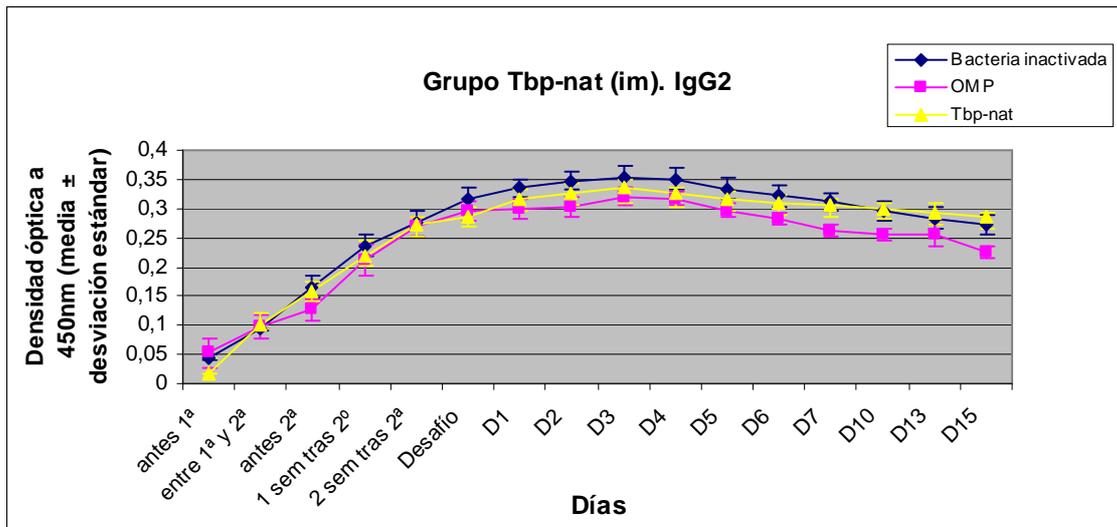


Figura 4.110. Evolución de las IgG2 en el grupo de Tbp-im.

#### 7.4.e. Estudio estadístico del grupo inmunizado con las proteínas nativas de unión a la transferrina administradas por vía intramuscular, en diferentes momentos del experimento

**Tabla 4.22.** Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (clases y subclases de Ig) medidas por distintos tipos de ELISA en tres momentos de la prueba experimental.

<b>IgGt</b>			
	<b>Bact. inactivada</b>	<b>OMP</b>	<b>Tbp-nat</b>
<b>I</b>	0,0027. <b>S</b>	0,0006. <b>S</b>	0,0042. <b>S</b>
<b>II</b>	0,0010. <b>S</b>	0,0030. <b>S</b>	0,0017. <b>S</b>
<b>III</b>	0,1230. <b>NS</b>	0,0974. <b>NS</b>	0,0773. <b>NS</b>
<b>IgM</b>			
	<b>Bact. inactivada</b>	<b>OMP</b>	<b>Tbp-nat</b>
<b>I</b>	0,0026. <b>S</b>	0,0025. <b>S</b>	0,0013. <b>S</b>
<b>II</b>	0,0010. <b>S</b>	0,0004. <b>S</b>	0,0008. <b>S</b>
<b>III</b>	0,0670. <b>NS</b>	0,0780. <b>NS</b>	0,0887. <b>NS</b>
<b>IgG1</b>			
	<b>Bact. inactivada</b>	<b>OMP</b>	<b>Tbp-nat</b>
<b>I</b>	0,0016. <b>S</b>	0,0015. <b>S</b>	0,0009. <b>S</b>
<b>II</b>	0,0043. <b>S</b>	0,0035. <b>S</b>	0,0006. <b>S</b>
<b>III</b>	0,0657. <b>NS</b>	0,0892. <b>NS</b>	0,1985. <b>NS</b>
<b>IgG2</b>			
	<b>Bact. inactivada</b>	<b>OMP</b>	<b>Tbp-nat</b>
<b>I</b>	0,0035. <b>S</b>	0,0025. <b>S</b>	0,0038. <b>S</b>
<b>II</b>	0,0037. <b>S</b>	0,0031. <b>S</b>	0,0023. <b>S</b>
<b>III</b>	0,0984. <b>NS</b>	0,0879. <b>NS</b>	0,1095. <b>NS</b>

**I:** Antes de la 1ª inmunización- antes de la 2ª. **II:** antes de la 2ª inmunización- antes del desafío. **III:** antes del desafío- antes del sacrificio. **S**= significativo ( $p < 0,005$ ). **NS**= no significativo.

## 7.5. Cerdos inmunizados con las proteínas nativas de unión a la transferrina administradas por vía intratraqueal

### 7.5.a. IgG totales (IgGt)

Como se ha señalado, todos los animales de este grupo sobrevivieron hasta el sacrificio. Los valores de densidad óptica más altos se observaron con las Tbp-nat, con niveles máximos de 0,473 desde valores iniciales de 0,027. Los mayores incrementos aparecieron antes de la 2ª inmunización y tras el día del desafío, dichos valores se mantuvieron constantes. Se apreciaron diferencias significativas entre la 1ª y la 2ª inmunización y entre la 2ª y el desafío (Tabla 4.23). En la Figura 4.111 se analiza la evolución de las IgGt en este grupo.

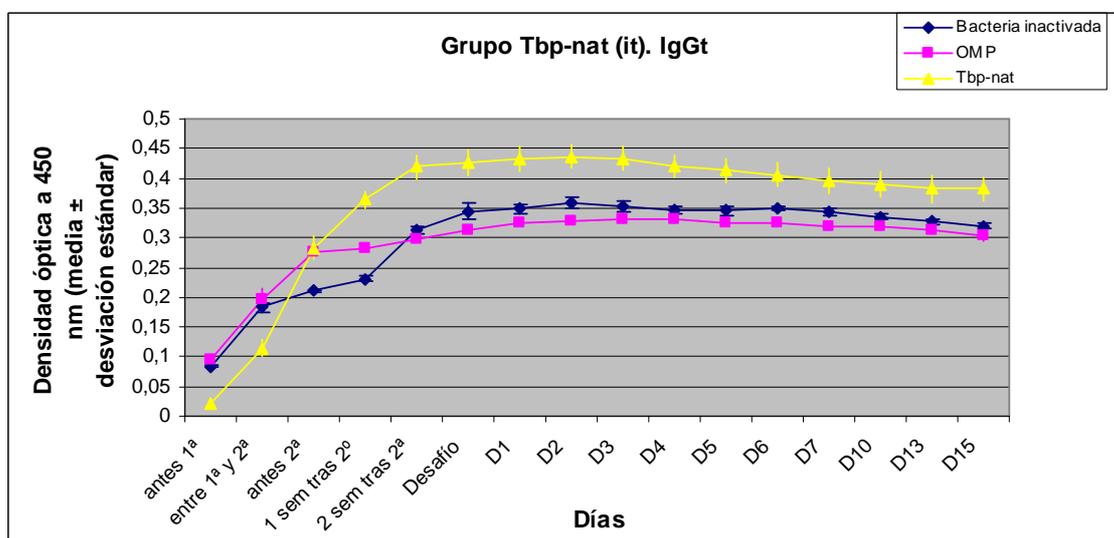


Figura 4.111. Evolución de las IgGt en el grupo de Tbp-it.

### 7.5.b. IgM

Los valores más elevados de densidad óptica se obtuvieron con el ELISA tapizado con la bacteria inactivada. Se apreció un aumento rápido de la producción de anticuerpos, como era de esperar, que se estabilizaron a partir del 2º día post-infección, manteniéndose después constante hasta el sacrificio. Los valores máximos se alcanzaron con la bacteria inactivada. Las diferencias significativas se observaron entre la 1ª y la 2ª inmunización y entre la 2ª y el desafío (Tabla 4.23). En la Figura 4.112 se presenta la evolución de las IgM en este grupo.

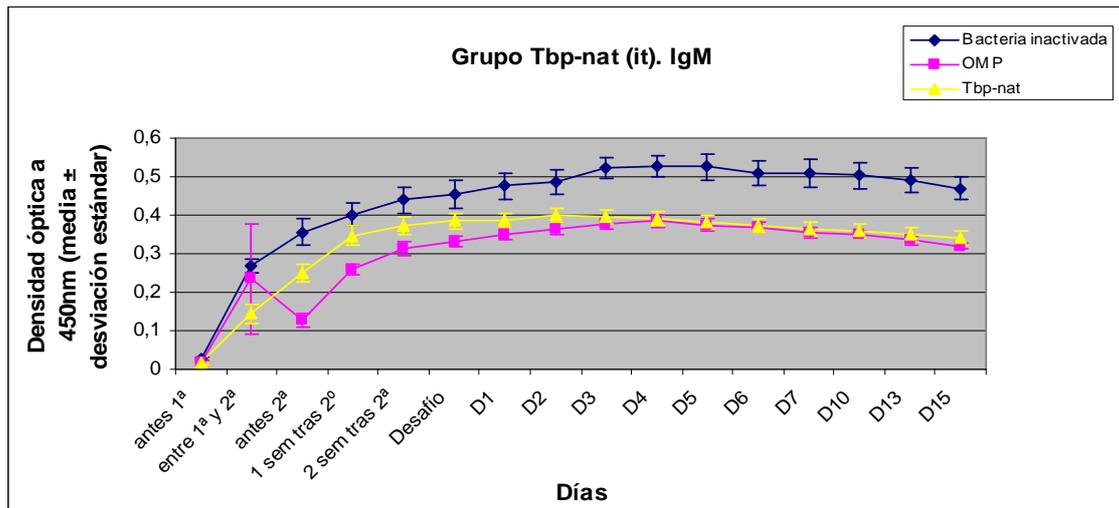


Figura 4.112. Evolución de las IgM en el grupo de Tbp-it.

### 7.5.c. IgG1

Los valores de densidad óptica más elevados se obtuvieron con las proteínas nativas de unión a la transferrina. El mayor aumento se observó antes de la 2ª inmunización, donde se apreciaron diferencias significativas (Tabla 4.23).

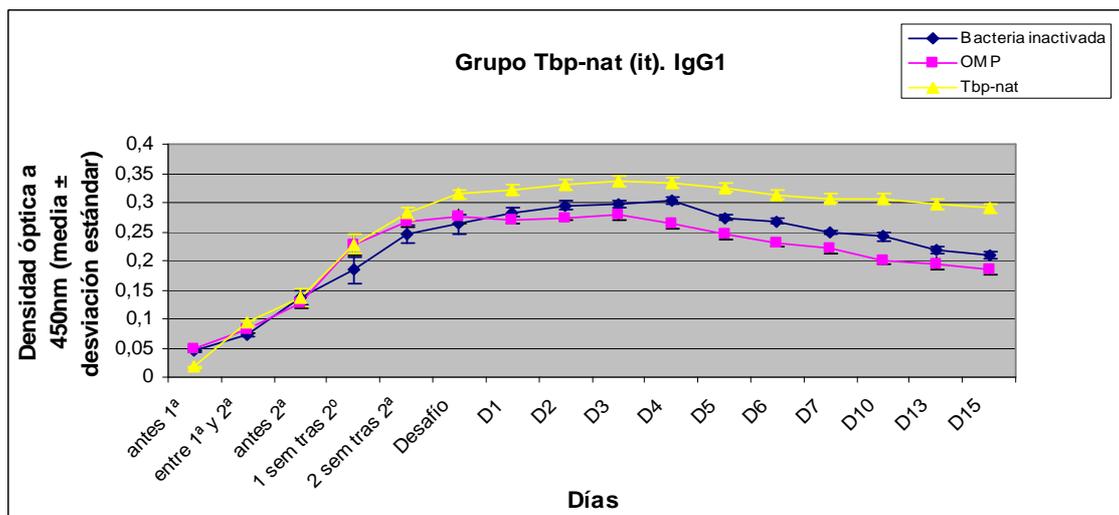


Figura 4.113. Evolución de las IgG1 en el grupo de Tbp-it.

### 7.5.d. IgG2

Los resultados obtenidos con esta subclase coincidieron prácticamente con los de las IgG1, alcanzándose los valores máximos (0,362) con las Tbp-nat, observándose, en este caso, diferencias estadísticamente significativas entre todos los momentos estudiados (Tabla 4.23). En la Figura 4.114 se presenta la evolución de las IgG2 en este grupo.

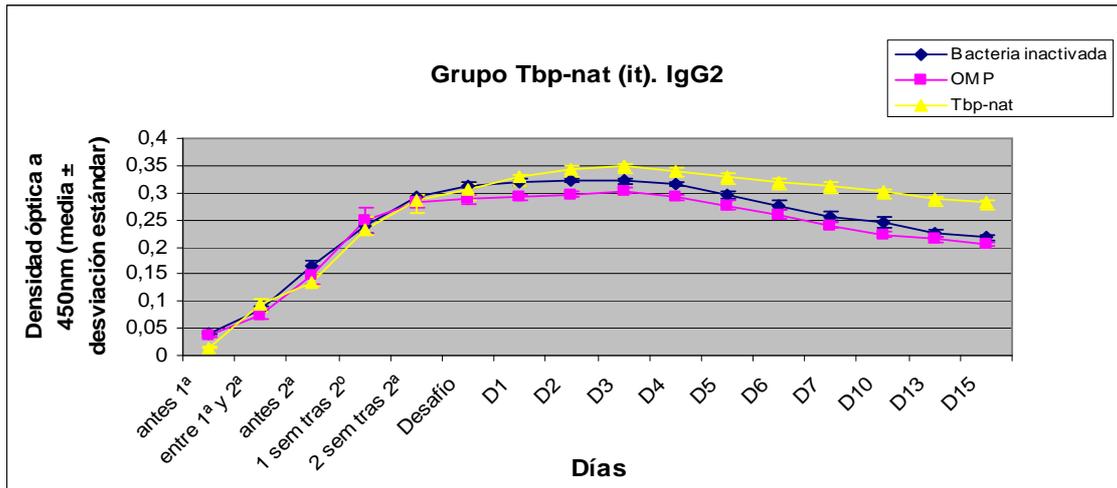


Figura 4.114. Evolución de las IgG2 en el grupo de Tbp-it.

### 7.5.e. Estudio estadístico del grupo inmunizado con las proteínas nativas de unión a la transferrina por vía intratraqueal, en diferentes momentos del experimento

Tabla 4.23. Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (clases y subclases de Ig) medidas por distintos tipos de ELISA en tres momentos de la prueba experimental.

IgGt			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0019. S	0,0021. S	0,0038. S
II	0,0016. S	0,0033. S	0,0048. S
III	0,1009. NS	0,0662. NS	0,1073. NS
IgM			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0021. S	0,0047. S	0,0032. S
II	0,0017. S	0,0019. S	0,0012. S
III	0,1560. NS	0,0930. NS	0,0763. NS
IgG1			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0023. S	0,0025. S	0,0005. S
II	0,0042. S	0,0033. S	0,0016. S
III	0,0767. NS	0,0765. NS	0,0897. NS
IgG2			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0023. S	0,0025. S	0,0017. S
II	0,0042. S	0,0033. S	0,0023. S
III	0,0980. NS	0,0674. NS	0,0831. NS

I: Antes de la 1ª inmunización- antes de la 2ª. II: antes de la 2ª inmunización- antes del desafío. III: antes del desafío- antes del sacrificio. S= significativo ( $p < 0,005$ ). NS= no significativo.

## 7.6. Cerdos control (inoculados con PBS)

### 7.6.a. IgG totales (IgGt)

Los cuatro animales de este grupo murieron durante las primeras 48 horas después de la infección. No se observó umbral de positividad en los sueros, que no superaron una densidad óptica de 0,048 ni existieron diferencias estadísticamente significativas en ningún momento del estudio (Tabla 4.24). En la Figura 4.115 se describe la evolución de las IgGt en este grupo.

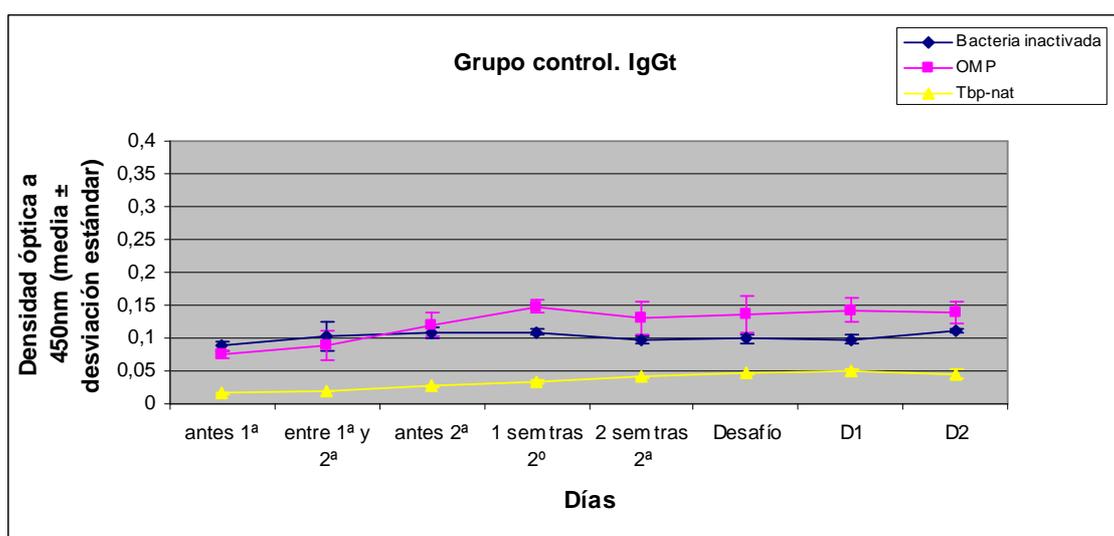


Figura 4.115. Evolución de las IgGt en el grupo control.

### 7.6.b. IgM

Como en el caso anterior, los cuatro animales se comportaron de manera similar, incluso con mayor uniformidad en los valores de densidad óptica. Lógicamente, tampoco se apreciaron diferencias significativas (Tabla 4.24). En la Figura 4.116 se presenta la evolución de las IgM en este grupo.

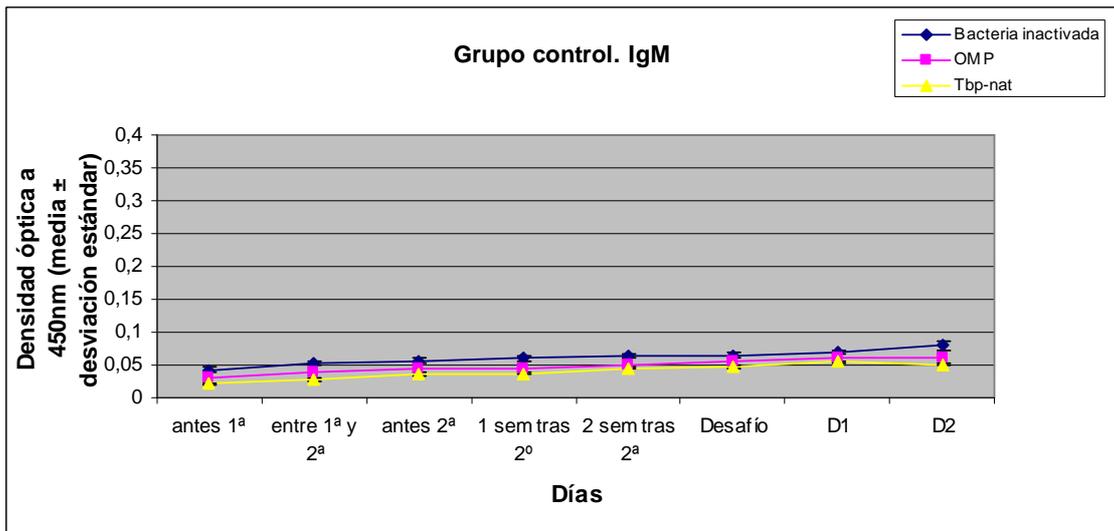


Figura 4.116. Evolución de las IgM en el grupo control.

### 7.6.c. IgG1

El comportamiento de esta subclase resultó similar a lo descrito antes. Los datos del ELISA tapizado con OMP mostraron una ligera elevación en la densidad óptica dos días después de la infección (0,114). No se obtuvieron, una vez más, diferencias significativas (Tabla 4.24). En la Figura 4.117 se refleja la evolución de las IgG1 en este grupo.

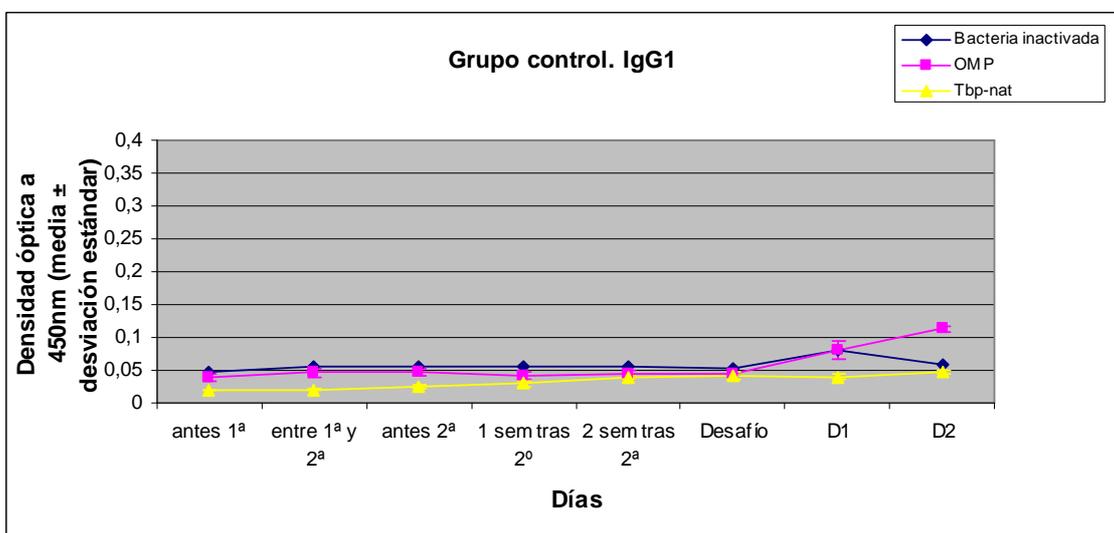


Figura 4.117. Evolución de las IgG1 en el grupo control.

### 7.6.d. IgG2

Para esta subclase se observó lo mismo que para la anterior, es decir, en el ELISA tapizado con proteínas de la membrana externa se detectó un pequeño aumento de los valores de densidad óptica tras el desafío. No se obtuvieron diferencias

significativas a lo largo del estudio (Tabla 4.24). En la Figura 4.118 se presenta la evolución de las IgG2 en este grupo.

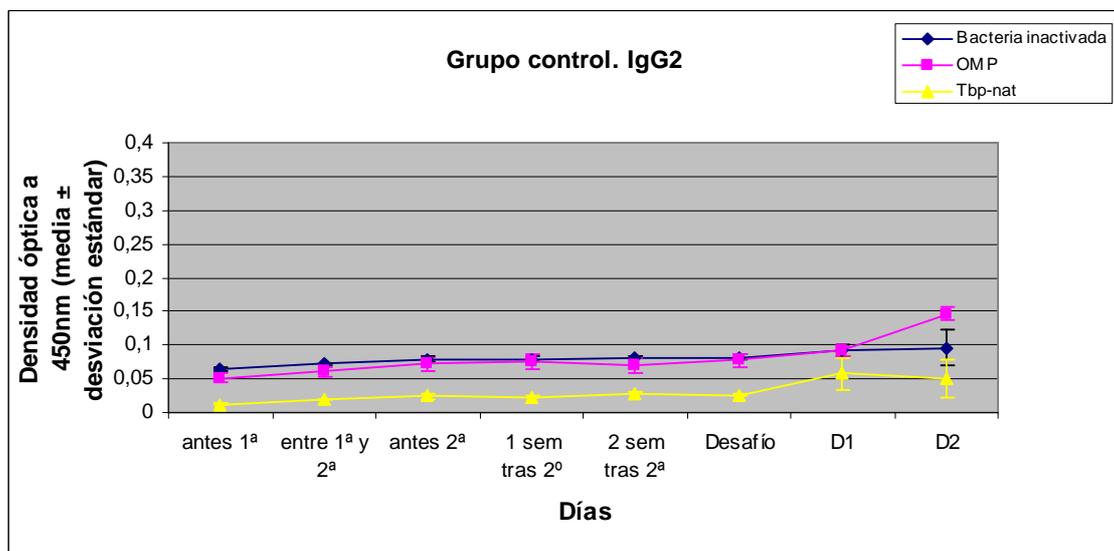


Figura 4.118. Evolución de las IgG2 en el grupo control.

### 7.6.e. Estudio estadístico del grupo control en diferentes momentos del experimento

Tabla 4.24. Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (clases y subclases de Ig) medidas por distintos tipos de ELISA en tres momentos de la prueba experimental.

IgGt			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0838. NS	0,0911. NS	0,0915. NS
II	0,2330. NS	0,1240. NS	0,1067. NS
IgM			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0945. NS	0,0802. NS	0,0678. NS
II	0,0630. NS	0,1294. NS	0,0681. NS
IgG1			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0810. NS	0,0723. NS	0,0659. NS
II	0,0273. NS	0,0564. NS	0,0190. NS
IgG2			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0655. NS	0,0652. NS	0,0891. NS
II	0,0086. NS	0,0074. NS	0,0010. NS

I: Antes de la 1ª inmunización- antes de la 2ª. II: antes de la 2ª inmunización- antes del desafío.  
S= significativo ( $p < 0,005$ ). NS= no significativo.

### 7.7. Estudio estadístico global. Diferencias entre grupos.

Para estudiar la existencia de diferencias significativas entre grupos se aplicó el programa estadístico SPSS comparando los valores de los distintos lotes el día del desafío. Como no se partía del mismo valor de densidad óptica, se trabajó con la variable “diferencia”, calculada restando a cada valor del día cero (desafío), el valor del día anterior a la primera inmunización. Aplicada esta variable, se analizó la existencia de diferencias entre grupos, como se muestra en la Tabla 4.25.

En el caso de los ELISA con antígeno de bacterias inactivadas, se observó que el grupo inmunizado con la vacuna comercial y las inmunizaciones con las Tbp-nat (im) y con las Tbp-nat (it) presentaban diferencias con el grupo control y con los vacunados con las proteínas recombinantes.

Cuando el antígeno utilizado en el ELISA fueron las OMPs, se pudieron diferenciar dos bloques, uno representado por los grupos TbpA-r, TbpB-r y control, que presentaron diferencias estadísticamente significativas con el bloque formado por los grupos inmunizados con la vacuna comercial y con las proteínas nativas de unión a la transferrina.

Cuando el antígeno utilizado en los ELISA fueron las Tbp-nat, los resultados obtenidos coincidieron con los de los dos antígenos anteriores.

**Tabla 4.25.** Diferencias estadísticamente significativas entre grupos, en cada una de las clases o subclases de inmunoglobulinas estudiadas para los diferentes ELISA utilizados. Sólo se representan los valores que fueron significativos ( $p < 0,005$ ).

Antígeno	Grupos	Inmunoglobulinas			
		IgGt	IgG1	IgG2	IgM
ELISA con bacteria inactivada como Ag	TbpA-r	control comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-im Tbp-it	comercial Tbp-im Tbp-it	comercial Tbp-im Tbp-it
	TbpB-r	control comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	control comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)
	Comercial	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control
	Tbp-nat (im)	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpB-r control
	Tbp-nat (it)	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control
	Control	TbpA-r comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	TbpB-r comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)
ELISA con OMP como Ag	TbpA-r	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)
	TbpB-r	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)
	Comercial	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control
	Tbp-nat (im)	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control
	Tbp-nat (it)	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control
	Control	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)
ELISA con Tbp-nat como Ag	TbpA-r	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)
	TbpB-r	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-im Tbp-it	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)
	Comercial	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)
	Tbp-nat (im)	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control
	Tbp-nat (it)	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control	TbpA-r TbpB-r control
	Control	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)	comercial Tbp-nat (im) Tbp-nat (it)

### 7.8. ELISA para IgA

La intención fue comprobar diferencias respecto de las IgA entre los grupos inmunizados con las proteínas nativas de unión a la transferrina, con dos adyuvantes diferentes y utilizando distintas vías de administración.

Se llevaron a cabo los tapizados de las placas con los tres antígenos señalados (bacteria inactivada, OMP y Tbp-nat). La evolución de cada animal en los diferentes momentos del estudio se detalla en la Figura 4.133 (anexo). La media y desviación estándar de cada grupo se presenta a continuación.

#### 7.8.a. Cerdos inmunizados con la TbpA recombinante

Los niveles de anticuerpos (densidad óptica) se mantuvieron en valores mínimos, por lo que no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 4.119).

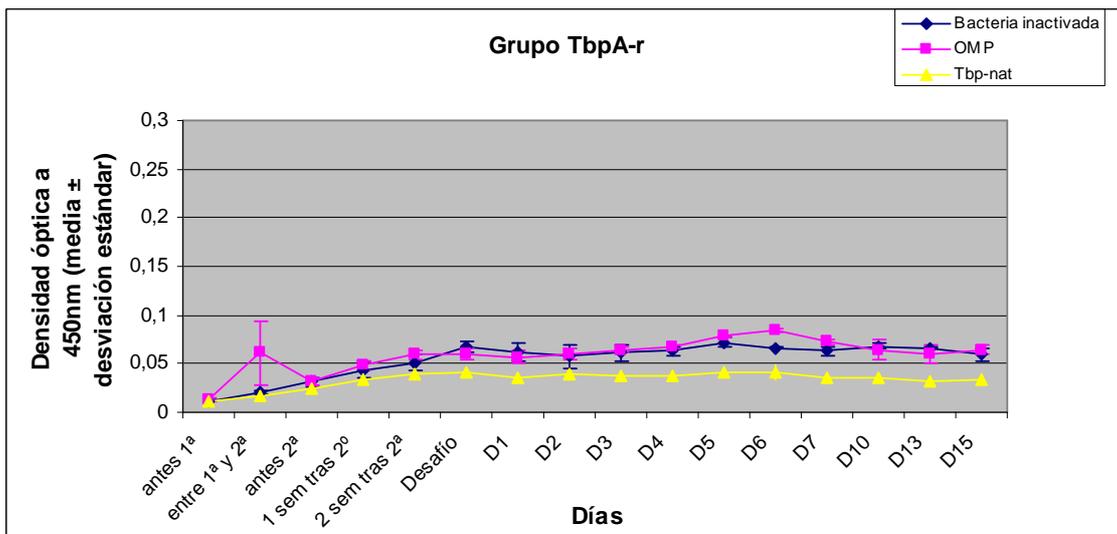


Figura 4.119. Evolución de las IgA en el grupo TbpA-r.

#### 7.8.b. Cerdos inmunizados con la TbpB recombinante

Como en el caso anterior, la densidad óptica de las IgA en el suero fue muy discreta, sin significancia estadística (Figura 4.120).

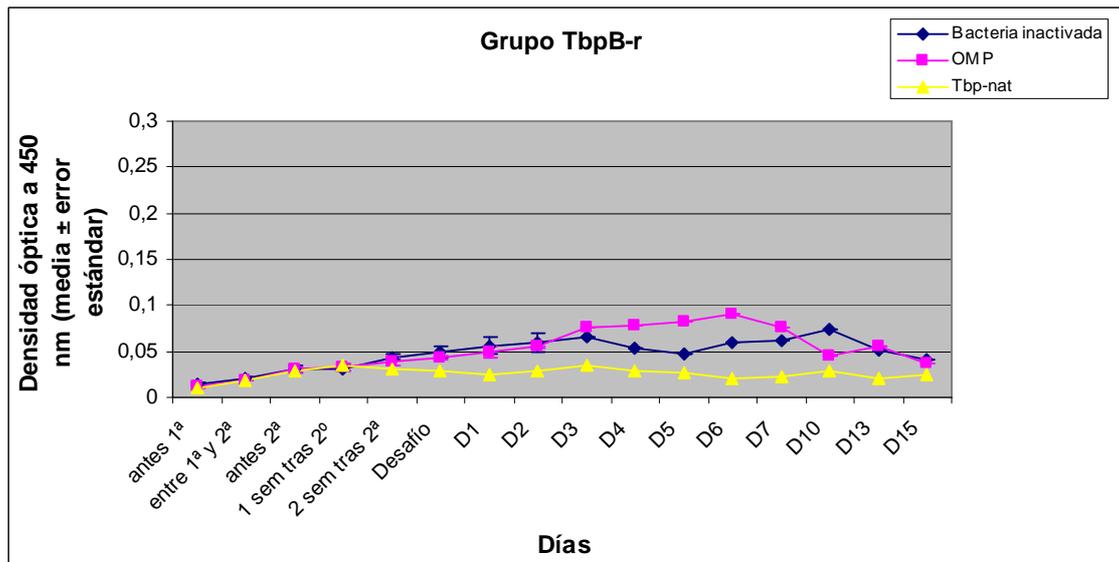


Figura 4.120. Evolución de las IgA en el grupo TbpB-r.

### 7.8.c. Cerdos inmunizados con la vacuna comercial

En este grupo de animales tampoco se observaron variaciones dignas de mención ni diferencias significativas. La Figura 4.121 muestra la evolución de las IgA en este grupo.

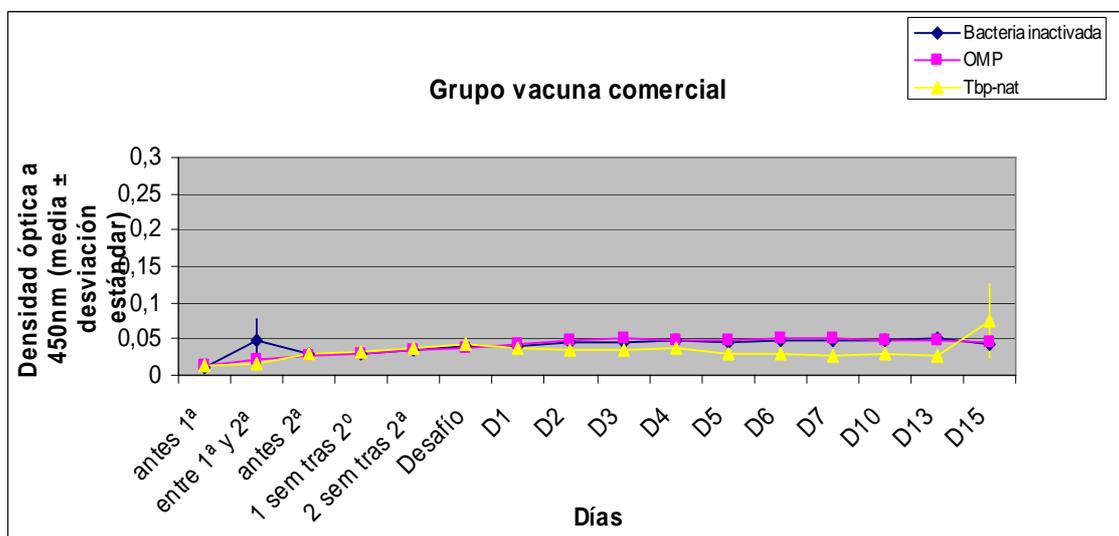


Figura 4.121. Evolución de las IgA en el grupo inmunizado con la vacuna comercial.

### 7.8.d. Cerdos inmunizados con las proteínas de unión a la transferrina administradas por vía intramuscular

Como en los casos anteriores, no se apreciaron a lo largo del estudio diferencias significativas (Figura 4.122).

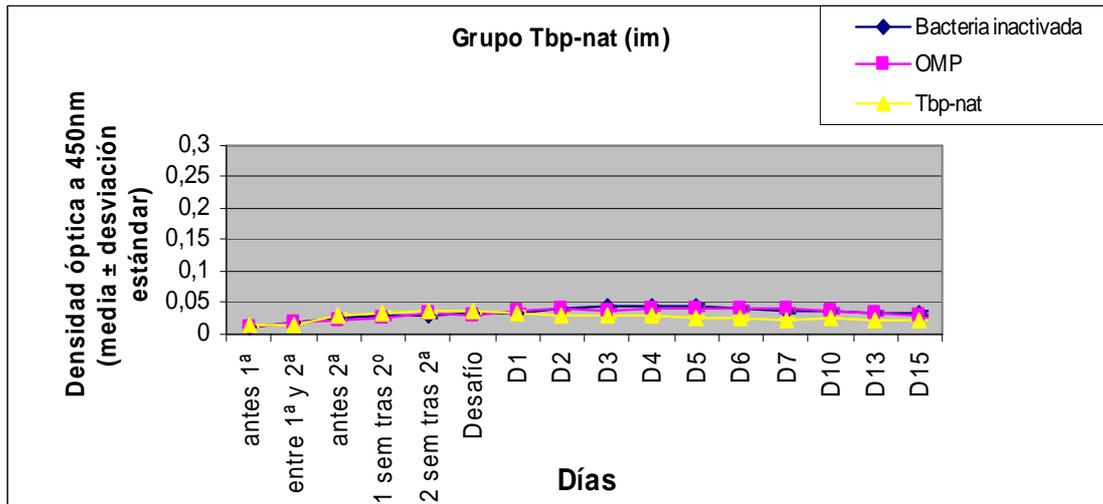


Figura 4.122. Evolución de las IgA en el grupo Tbp-nat (im).

### 7.8.e. Cerdos inmunizados con las proteínas nativas de unión a la transferrina administradas por vía intratraqueal

Como era de esperar, en este grupo la vía de administración fue determinante en la producción de anticuerpos de la clase IgA. Cuando se comparan los resultados obtenidos con las medidas de la densidad óptica de los sueros después de la 1ª inmunización, después de la 2ª y antes del sacrificio, se observaron diferencias significativas (Figura 4.123 y Tabla 4.26).

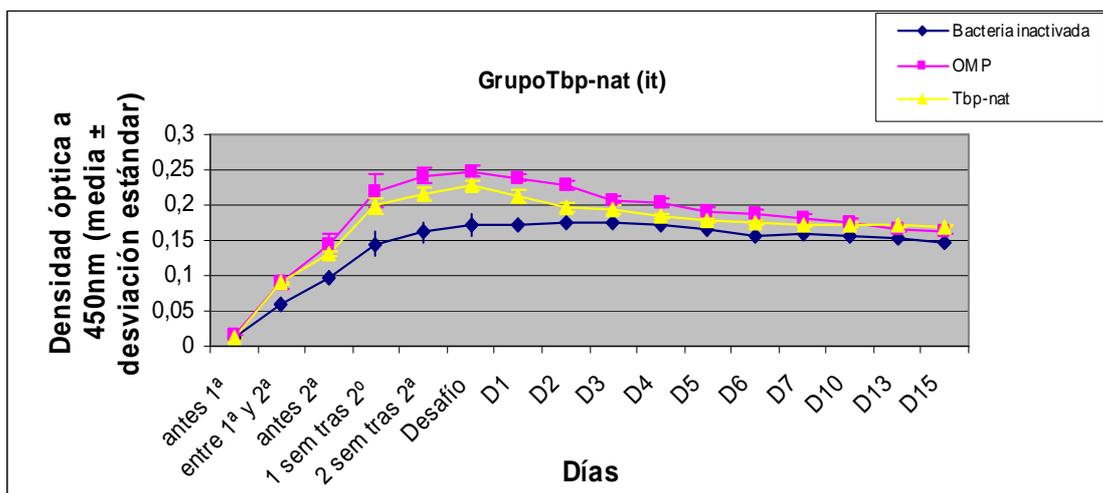


Figura 4.123. Evolución de las IgA en el grupo Tbp-nat (it).

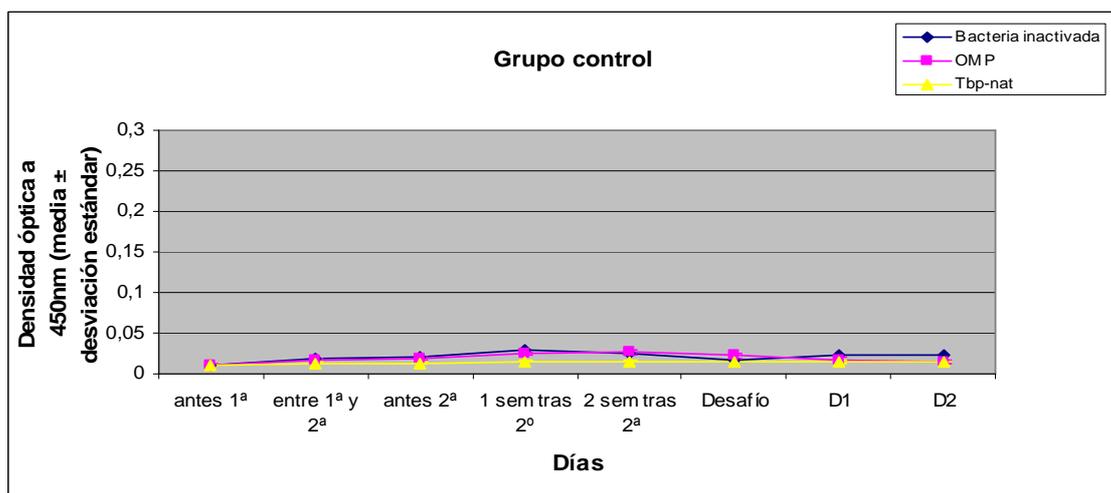
**Tabla 4.26.** Valores de p y significación estadística en los resultados de anticuerpos séricos (IgA) medidos por distintos ELISAs en tres momentos de la prueba experimental.

IgA			
	Bact. inactivada	OMP	Tbp-nat
I	0,0021. S	0,0033. S	0,0012. S
II	0,1216. NS	0,0933. NS	0,0848. NS
III	0,0931. NS	0,1123. NS	0,0847. NS

**I:** Antes de la 1ª inmunización- antes de la 2ª. **II:** antes de la 2ª inmunización- antes del desafío. **III:** antes del desafío- antes del sacrificio. **S=** significativo ( $p < 0,005$ ). **NS=** no significativo.

### 7.8.f. Cerdos control (inoculados con PBS)

Como era de esperar, no se observaron datos relacionados con la presencia de IgA (Figura 4.124).



**Figura 4.124.** Evolución de las IgA en el grupo control.

### 7.8.g. Estudio estadístico global

Una vez estudiado lo ocurrido en cada uno de los grupos, procedimos a comprobar si existían diferencias globales entre ellos. Se utilizó el programa informático SPSS. Se compararon los valores de los distintos lotes el día del desafío pero, como no se partía del mismo valor de densidad óptica, se trabajó con la variable “diferencia”, que fue calculada restando a cada uno de los valores del día cero (desafío), el valor del día antes de la primera inmunización. Aplicada esta variable, se analizó si existían diferencias entre grupos, como aparece en la Tabla 4.27.

Resultados

**Tabla 4.27.** Diferencias estadísticamente significativas entre grupos, en la IgA, para diferentes ELISA utilizados. Sólo se representan los valores significativos ( $p < 0,005$ ).

IgA	ELISA con Ag bacteria inactivada					
	TbpA-r	TbpB-r	Comercial	Tbp-nat (im)	Tbp-nat (it)	Control
	Tbp-nat (it)	Tbp-nat (it)	Tbp-nat (it)	Tbp-nat (it)	TbpA-r TbPB-r control comercial Tbp-nat (im)	Tbp-nat (it)
	ELISA con Ag OMP					
	TbpA-r	TbpB-r	Comercial	Tbp-nat (im)	Tbp-nat (it)	Control
	Tbp-nat (it)	Tbp-nat (it)	Tbp-nat (it)	Tbp-nat (it)	TbpA-r TbPB-r control comercial Tbp-nat (im)	Tbp-nat (it)
	ELISA con Ag Tbp-nat					
	TbpA-r	TbpB-r	Comercial	Tbp-nat (im)	Tbp-nat (it)	Control
	Tbp-nat (it)	Tbp-nat (it)	Tbp-nat (it)	Tbp-nat (it)	TbpA-r TbPB-r control comercial Tbp-nat (im)	Tbp-nat (it)

TbpA-r: proteína de unión a la transferrina A recombinante

TbpB-r: proteína de unión a la transferrina B recombinante

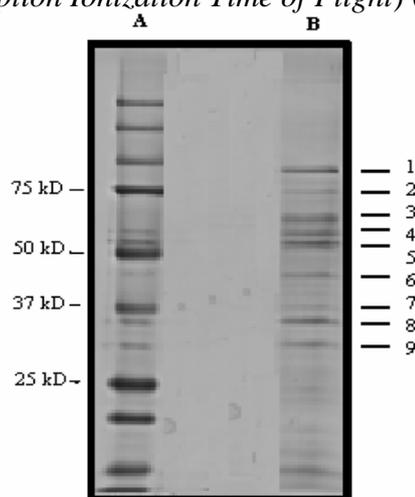
Tbp-nat (im): proteínas nativas de unión a la transferrina inoculadas por vía intramuscular

Tbp-nat (it): proteínas nativas de unión a la transferrina inoculadas por vía intratraqueal

Se aprecia claramente cómo el único grupo que presentó diferencias estadísticamente significativas con el resto fue el de animales inmunizados con las proteínas nativas de unión a la transferrina por vía intratraqueal, lo que parece relacionado únicamente con la vía de inoculación, o bien con el efecto conjunto de la vía y el empleo del inmunopotenciador.

## 8. Identificación de las proteínas de unión a la transferrina

El extracto proteico enriquecido con las proteínas nativas de unión a la transferrina fue sometido a un proceso de purificación-concentración (apartado 3.2.a de Métodos), previo a su identificación. El extracto concentrado fue sometido a electroforesis en una dimensión (Figura 4.125) y se identificaron un total de 9 proteínas mediante la aplicación de un análisis de espectrometría de masas por MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight*) (Tabla 4.28).



**Figura 4.125.** Gel 1D teñido con azul Coomassie coloidal. **A:** Marcador de peso molecular de 250 a 10 kDa (Biorad). **B:** extracto proteico de unión a la transferrina (marcadas del 1-9 las bandas identificadas por MALDI-TOF).

**Tabla 4.28.** Características de las nueve proteínas identificadas en el extracto de Tbp-nat.

Banda	Número de acceso	Nombre	Masa	Punto isoeléctrico (teórico)	Nº péptidos encontrados/ buscados	Proteína cubierta (%)	Puntuación
1	gi/33305754	Proteína de unión a la transferrina A (TbpA)	106.614	9,11	18/32	21	152
2	sp/P09571	Transferrina de cerdo	78.971	6,93	8/20	14	77
3	gi/161408008	Proteína de unión a la transferrina B (TbpB)	59.835	6,40	16/37	31	157
4	gi/167855391	Transportador ABC de unión al hierro periplásmico	57.908	8,23	15/30	30	156
5	gi/219692447	Catalasa	54.954	6,50	14/22	33	180
6	gi/219692224	Factor de elongación Tu	43.501	5,23	11/17	32	140
7	gi/209968888	Proteína de membrana externa P2	38.552	9,20	5/13	17	60
8	gi/219691519	Proteína de unión al hierro periplásmico	37.755	8,80	15/39	50	174
9	gi/219691491	Transportador ABC de unión al hierro periplásmico quelado	32.632	7,74	7/22	32	84

## *Resultados*

Las proteínas identificadas incluyeron la TbpA, TbpB, dos transportadores de hierro y dos proteínas de membrana externa relacionadas también con el intercambio de este elemento. De estas proteínas es conocida su función y su dependencia del hierro, por lo que se esperaba su extracción. Se obtuvo también alguna proteína no relacionada con la captación del hierro, como la catalasa o el factor de elongación Tu, posiblemente ligado a una copurificación de la columna, debido a la unión inespecífica. También se obtuvo la proteína con la que se purificó el extracto bacteriano (la transferrina de cerdo), esperable cuando las purificaciones se llevan a cabo mediante columnas de afinidad.

## 9. Inmunoproteómica

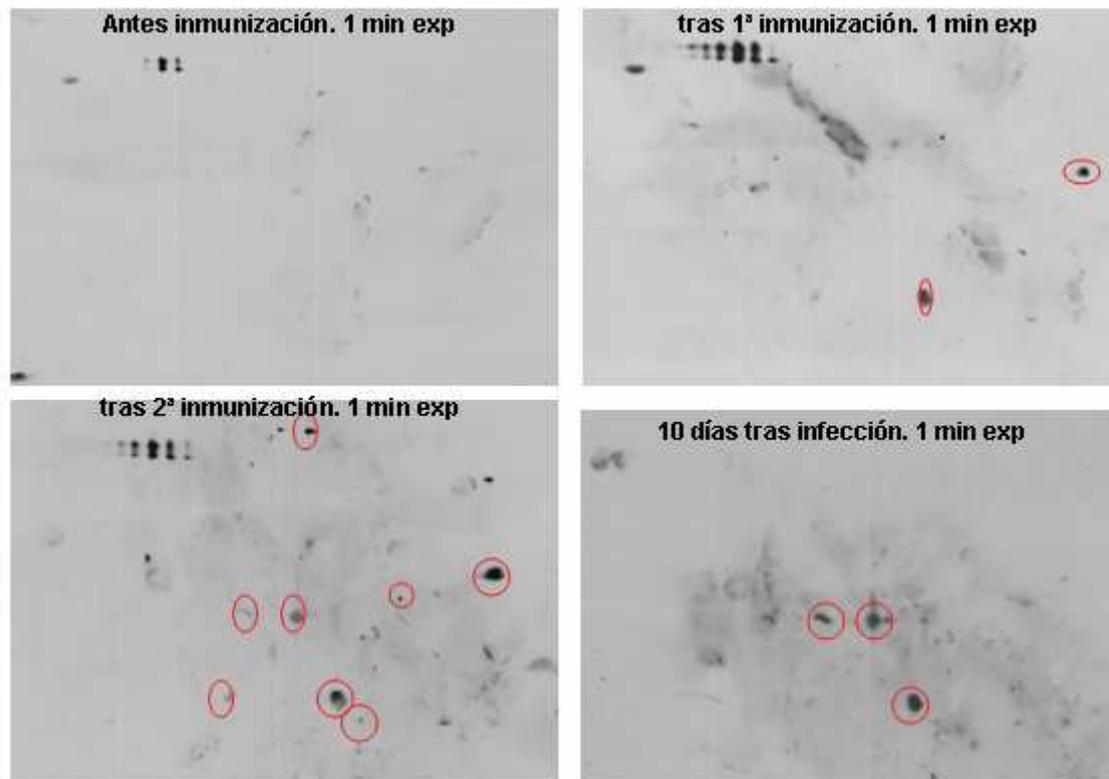
Se estudiaron los grupos que sobrevivieron a la infección por *H. parasuis*, para analizar las proteínas frente a las que se producía mayor cantidad de anticuerpos a lo largo de la prueba experimental y conocer de este modo cuáles eran las proteínas más inmunógenas.

Se realizaron geles 2D (en dos dimensiones) con la muestra de proteínas de unión a la transferrina y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, que fueron expuestas a diferentes sueros de los animales, en cuatro momentos del estudio: antes de las inmunizaciones, tras la 1ª, tras la 2ª (coincidente con el momento previo a la infección) y 10 días después del desafío.

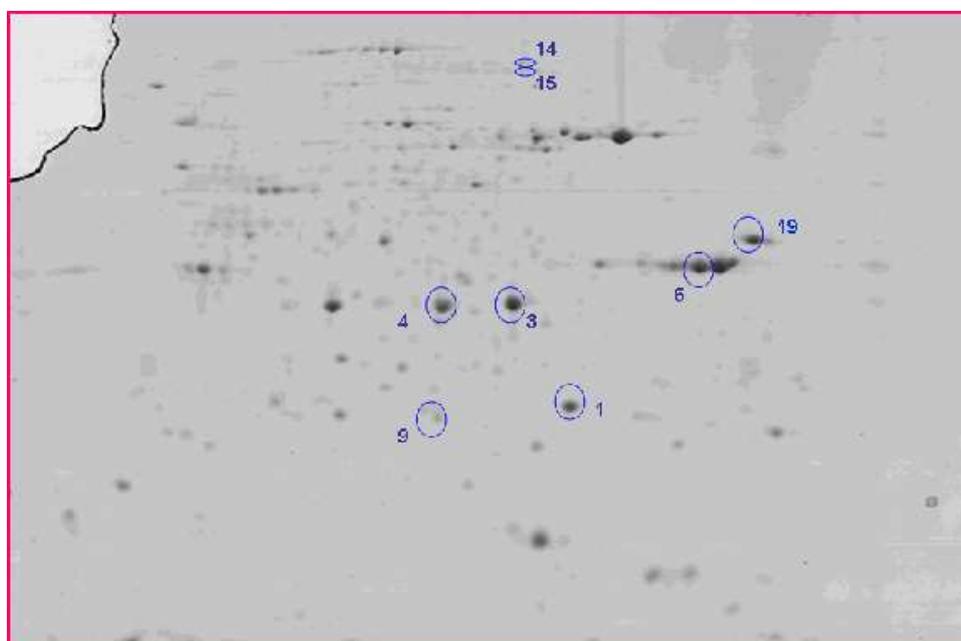
### 9.1. Grupo inmunizado con las proteínas nativas de unión a la transferrina administradas por vía intramuscular

Comparados los cuatro *immunoblotting*, se observó claramente la presencia de nuevas proteínas tras la 1ª inmunización, y especialmente después de la 2ª, en la que además se apreciaban con mayor intensidad. Por el contrario, a los 10 días del desafío algunas de estas proteínas desaparecían de la imagen (Figura 4.126). En el gel de la Figura 4.127 se seleccionaron los *spots* correspondientes a estas proteínas, para proceder a su identificación. En la Tabla 4.29 se especifican las proteínas identificadas.

## Resultados



**Figura 4.126.** *Immunoblotting* de cuatro momentos de la prueba experimental con los *spots* proteicos diferentes, encontrados en el grupo de animales inmunizado con las Tbp-nat (im).



**Figura 4.127.** *Spots* diferentes en este grupo, marcados en gel 2D, teñido con azul Coomassie coloidal.

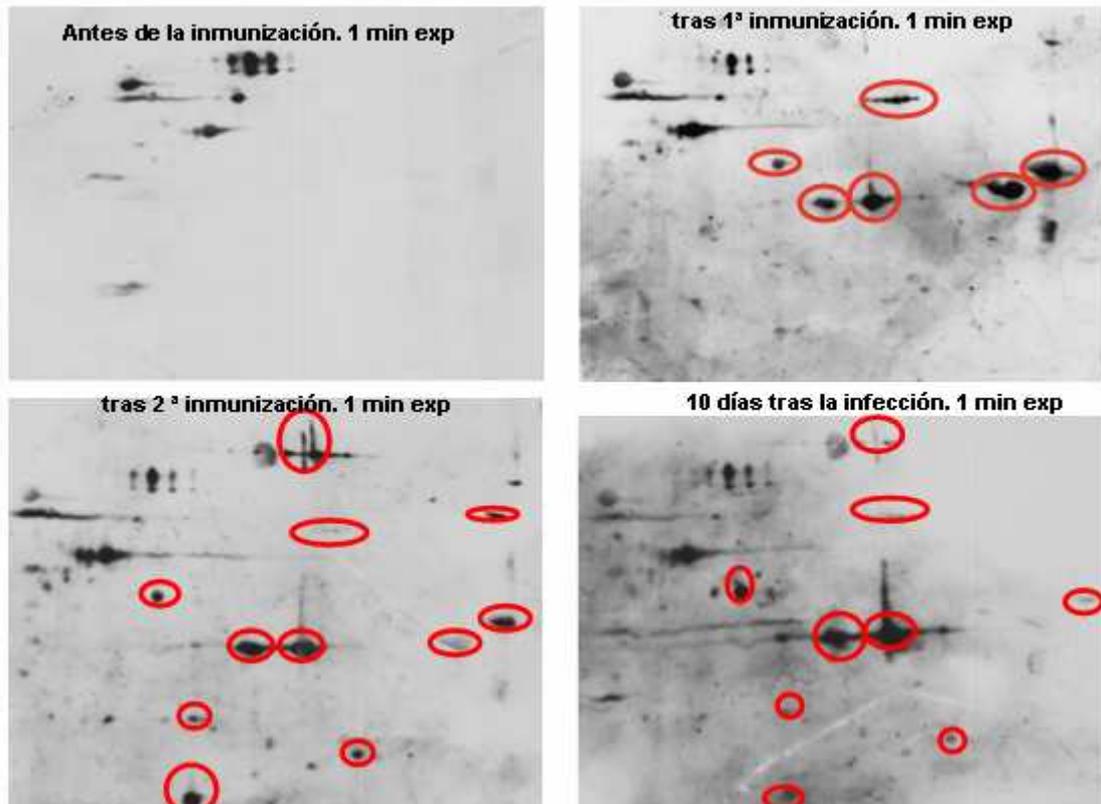
Tabla 4.29. Características de las proteínas seleccionadas en el grupo inmunizado con Tbp- nat (im).

Spot	Número de acceso	Nombre	Masa	Punto isoelectrico (teórico)	n° péptidos encontrados/ buscados	Proteína cubierta (%)	Puntuación
1	gi/219691880	FKBP- peptidil- prolil cis trans isomerasa	26.316	8,74	21/65	57	187
3	gi/219691491	Transportador ABC de unión al hierro periplásmico quelado	32.632	7,74	25/65	87	286
4	gi/219691491	Transportador ABC de unión al hierro periplásmico quelado	32.632	7,74	18/49	68	199
6	gi/219691519	Proteína de unión al hierro periplásmico	37.755	8,80	33/65	81	385
9	gi/219691880	FKBP- peptidil- prolil cis trans isomerasa	26.316	8,74	14/49	48	123
14	gi/167854834	Precursor de protección de superficie D15	90.241	7,04	34/65	46	310
15	gi/21691444	Neuraminidasa exo- $\alpha$ sialidasa nanH	74.913	7,25	13/65	9	53
19	gi/224177693	Proteína de membrana externa P2	38.595	9,25	27/78	59	283

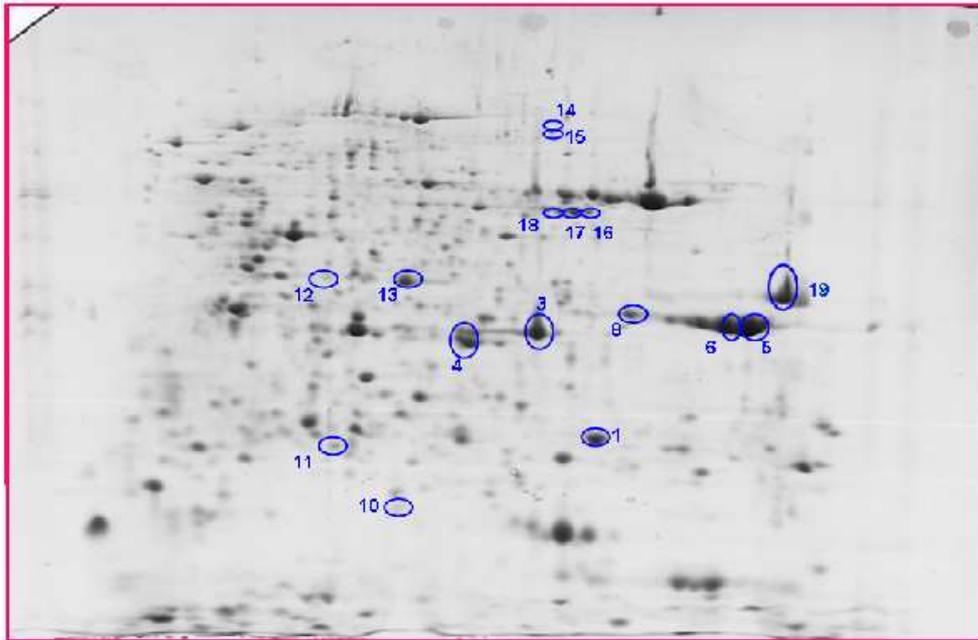
Lo primero que cabe destacar en la identificación de los *spots* proteicos encontrados es que algunos de ellos fueron isoformas de la misma proteína, por lo que se repitieron en la identificación. Además, algunas de las proteínas detectadas en este grupo ya habían sido encontradas en el extracto proteico de las proteínas nativas de unión a la transferrina, como es el caso de la proteína de unión al hierro periplásmico o el transportador ABC de unión al hierro quelado. El resto de proteínas que aparecen no se identificaron en el extracto, seguramente porque su concentración en él fue mínima por debajo del umbral de detección.

### 9.2. Grupo inmunizado con las proteínas nativas de unión a la transferrina administradas por vía intratraqueal

En este caso, se detectó un mayor número de proteínas frente a las que se producían anticuerpos, hasta un total de 16 (Figura 4.128), con mayor síntesis de anticuerpos frente a ellas que en el grupo anterior. En el gel de la Figura 4.129 se observaron los *spots* que se identificaron en este grupo.



**Figura 4.128.** *Immunoblotting* de cuatro momentos de la prueba experimental con los “*spots*” proteicos diferentes encontrados en el grupo de animales inmunizados con las Tbp-nat (it).



**Figura 4.129.** Spots diferentes en este grupo, marcados en gel 2D, teñido con azul Coomassie coloidal.

Tras la identificación de estos “spots”, las proteínas obtenidas figuran en la Tabla 4.30. Nuevamente se identificaron isoformas de la misma proteína en varios de los spots obtenidos. Aparecieron además algunas que ya habían sido identificadas en el extracto de proteínas nativas de unión a la transferrina, como la proteína de unión al hierro periplásmico, el transportador ABC del hierro quelado o la catalasa; así mismo, se detectaron otras proteínas que no aparecían en el extracto porque seguramente su concentración no era suficiente. Dentro de este último grupo, la mayoría ya aparecían cuando el grupo de estudio era el inmunizado con Tbp-nat (im), como la FKBP peptidil-prolil-cis-trans isomerasa, la neuraminidasa exo- $\alpha$ -sialidasa, el precursor de superficie D15 o la proteína de la membrana externa P2. En cambio, otras proteínas se detectaron por primera vez en este grupo experimental, como la xantina-guanina fosforribosil transferasa, la CMP-N-acetilneuramínico sintetasa, la fenilalanina ARN-t sintetasa o la gliceraldehído 3 fosfato.

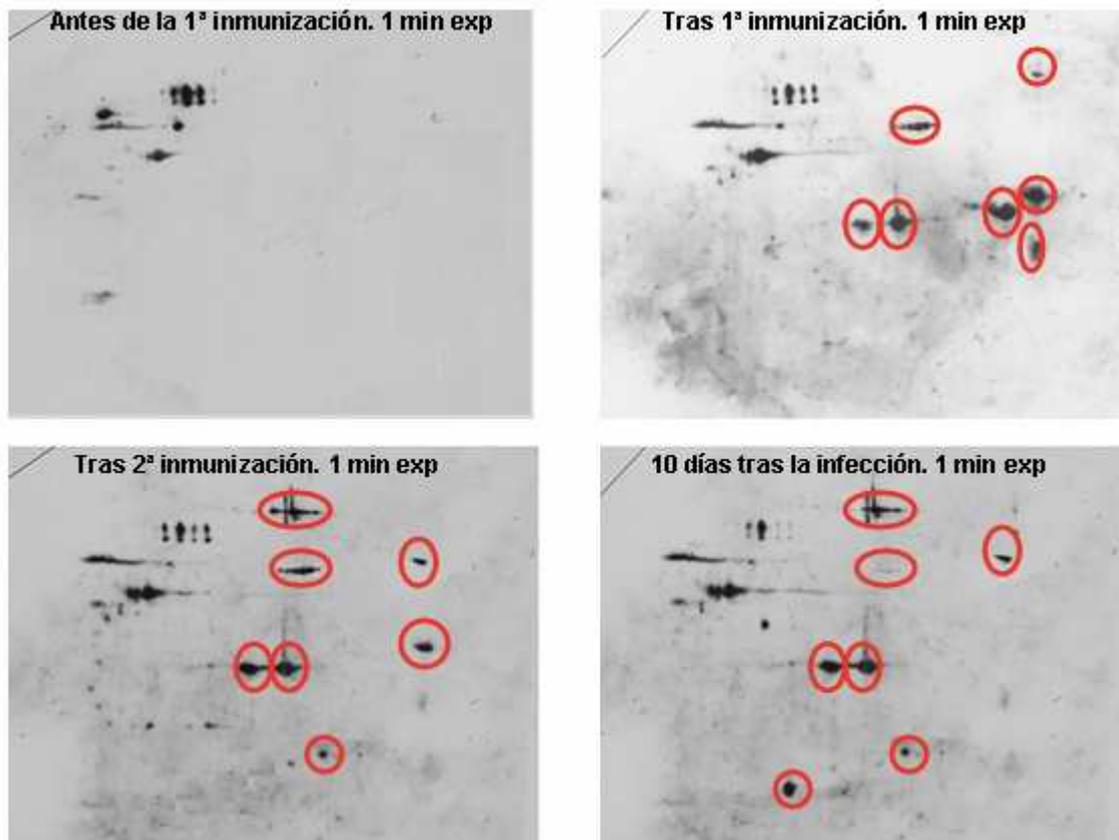
## Resultados

**Tabla 4.30.** Características de las proteínas seleccionadas en el grupo inmunizado con las Tbp-nat (it).

Spot	Número de acceso	Nombre	Masa	Punto isoeléctrico (teórico)	n° péptidos encontrados/ buscados	Proteína cubierta (%)	Puntuación
1	gi/219691880	FKBP- peptidil- prolil cis trans isomerasa	26.316	8,74	21/65	57	187
3	gi/219691491	Transportador ABC de unión al hierro periplásmico quelado	32.632	7,74	25/65	87	286
4	gi/219691491	Transportador ABC de unión al hierro periplásmico quelado	32.632	7,74	18/49	68	199
5	gi/219691491	Transportador ABC de unión al hierro periplásmico quelado	32.632	7,74	18/49	68	199
6	gi/219691519	Proteína de unión al hierro periplásmico	37.755	8,80	33/65	81	385
8	gi/219691519	Proteína de unión al hierro periplásmico	37.755	8,80	33/65	81	385
10	gi/219691806	Xantina- guanina fosforribosil transferasa	17.910	5,64	7/65	52	64
11	gi/219690522	CMP- N- acetilneurámico sintetasa	24.144	5,58	17/65	76	166
12	gi/21969114	Fenilalanina- ARN-t sintetasa	37.350	5,49	13/65	22	107
13	gi/219690484	Gliceraldehído 3- fosfato	36.380	5,82	23/65	69	240
14	gi/167854834	Precursor de protección de superficie D15	90.241	7,04	34/65	46	310
15	gi/21691444	Neuraminidasa exo- $\alpha$ sialidasa nanH	74.913	7,25	13/65	9	53
16	gi/219692447	Catalasa	54.954	6,50	26/65	50	244
17	gi/219692447	Catalasa	54.954	6,50	26/65	50	244
18	gi/219692447	Catalasa	54.954	6,50	26/65	50	244
19	gi/224177693	Proteína de membrana externa P2	38.595	9,25	27/78	59	283

### 9.3. Grupo inmunizado con la vacuna comercial

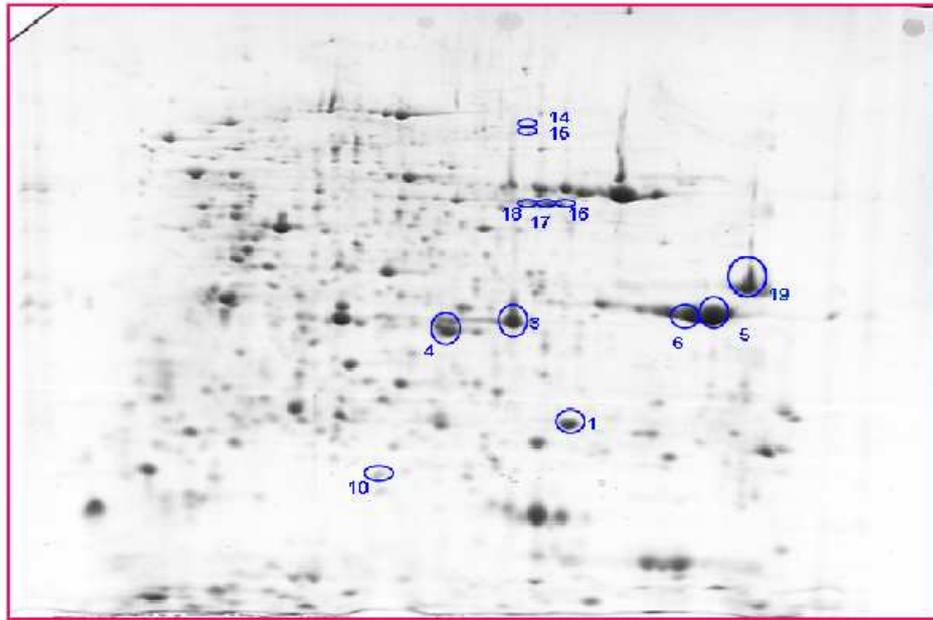
Tras la comparación de los dos grupos inmunizados con las proteínas nativas de unión a la transferrina, se llevaron a cabo los estudios pertinentes con el grupo de animales vacunados con la bacterina comercial.



**Figura 4.130.** Immunoblotting de cuatro momentos de la prueba experimental con los “spots” proteicos diferenciales encontrados en el grupo de animales inmunizados con la vacuna comercial.

En este caso, el número de proteínas diferentes detectadas después de comparar los geles correspondientes a los cuatro momentos del experimento seleccionados (Figura 4.130) resultó menor que en el grupo desafiado por vía intratraqueal, visualizándose un total de 12 *spots* (Figura 4.131). Las proteínas identificadas se muestran en la Tabla 4.31.

## Resultados



**Figura 4.131.** Spots diferentes en este grupo, marcados en gel 2D, teñidos con azul Coomassie coloidal.

**Tabla 4.31.** Características de las proteínas seleccionadas en el grupo inmunizado con la vacuna comercial.

Spot	Número de acceso	Nombre	Masa	Punto isoelectrico (teórico)	nº péptidos encontrados/ buscados	Proteína cubierta (%)	Puntuación
1	gi/219691880	FKBP- peptidil- prolil cis trans isomerasa	26.316	8,74	21/65	57	187
3	gi/219691491	Transportador ABC de unión al hierro periplásmico quelado	32.632	7,74	25/65	87	286
4	gi/219691491	Transportador ABC de unión al hierro periplásmico quelado	32.632	7,74	18/49	68	199
5	gi/219691491	Transportador ABC de unión al hierro periplásmico quelado	32.632	7,74	18/49	68	199
6	gi/219691519	Proteína de unión al hierro periplásmico	37.755	8,80	33/65	81	385
10	gi/219691806	Xantina- guanina fosforribosil transferasa	17.910	5,64	7/65	52	64
14	gi/167854834	Precursor de protección de superficie D15	90.241	7,04	34/65	46	310
15	gi/21691444	Neuraminidasa exo- $\alpha$ sialidasa nanH	74.913	7,25	13/65	9	53
16	gi/219692447	Catalasa	54.954	6,50	26/65	50	244
17	gi/219692447	Catalasa	54.954	6,50	26/65	50	244
18	gi/219692447	Catalasa	54.954	6,50	26/65	50	244
19	gi/224177693	Proteína de membrana externa P2	38.595	9,25	27/78	59	283

En la Tabla 4.31 se observan de nuevo isoformas de las mismas proteínas igual que en los grupos anteriores. En este caso, no destaca ninguna proteína diferente que no hubiera sido identificada en aquéllos. Aparecieron también proteínas que habían sido detectadas en el extracto proteico de unión a la transferrina, como la proteína de unión al hierro periplásmico, el transportador ABC del hierro quelado o la catalasa, además de otras no encontradas en el extracto por su escasa concentración, pero sí en los grupos experimentales anteriores.



## **V.DISCUSIÓN**



## 1. Preparación y producción de la TbpA recombinante

En los últimos tiempos, la enfermedad de Glässer ha sido controlada con el uso de bacterinas, que confieren protección frente al serotipo homólogo (Rapp- Gabrielson *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha descrito también la producción de anticuerpos frente a las proteínas de la membrana externa (OMP) de *H. parasuis*, lo que sugiere que representan un componente bacteriano inmunógeno (Miniats *et al.*, 1991). Martín de la Fuente *et al.* (2009) demostraron la protección parcial mediante inmunización con un extracto de proteínas de membrana externa en desafíos experimentales llevados a cabo con el serotipo 5, cepa Nagasaki. En la misma línea, Zhou *et al.* (2009) han confirmado como buenos candidatos vacunales algunas OMP como la PalA, Omp2, D15 y Hps06257; además, obtuvieron una buena inmunogenicidad cuando purificaron la OMP5 recombinante de *H. parasuis*.

Dentro de las OMP, las proteínas de unión a la transferrina (Tbp) han sido consideradas moléculas idóneas en el desarrollo de vacunas en otros microorganismos Gram negativos como *H. influenzae* (Loosmore *et al.*, 1996). La TbpB ha sido caracterizada en *H. parasuis* (del Río *et al.*, 2005), mientras que el gen *tbpA* fue empleado con éxito para llevar a cabo el genotipado de cepas de campo y de referencia por PCR-RFLP (de la Puente Redondo *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009).

En este trabajo, para amplificar la proteína TbpA de *H. parasuis* se recurrió a un cebador *forward* de diseño específico y a un *reverse* propuesto por De la Puente Redondo *et al.* (2000). Dado que la amplificación del producto del gen *tbpA* obtenido en *H. parasuis* resultó de diferente tamaño (2,8 Kb) al fragmento obtenido en *A. pleuropneumoniae* y *A. suis* (de la Puente Redondo *et al.*, 2000), la amplificación de este gen podría representar una buena herramienta diagnóstica en la diferenciación de las bacterias responsables de las enfermedades respiratorias porcinas causadas por la familia *Pasteurellaceae*.

Después de la selección del fragmento de 600 pb de la proteína TbpA de la cepa Nagasaki del serotipo 5 de *H. parasuis*, su purificación y elución, se obtuvo mediante SDS- PAGE una banda de 38,5kDa. Este procedimiento fue llevado a cabo en estudios anteriores (del Río *et al.*, 2005) para el diseño de un fragmento proteico recombinante de la proteína TbpB de *H. parasuis*, en el extremo N-terminal. En este trabajo, sin

embargo, se decidió seleccionar un fragmento intermedio de 600 nucleótidos (del 301 al 901) que comprende un lazo extracelular, debido a que la TbpA es una proteína integral de membrana compuesta por 11 lazos extracelulares y 10 más periplásmicos, cuyo extremo N-terminal es muy hidrofóbico. Trabajando con la TbpA de *Neisseria gonorrhoeae* (Cornelissen, 2004), se había demostrado que los fragmentos más expuestos y, por tanto, más accesibles a las células del sistema inmune, eran los dominios intermedios de la TbpA.

Con anterioridad al uso de la proteína recombinante obtenida en este trabajo, en estudios de protección inmune en el hospedador natural, se llevaron a cabo dos determinaciones específicas, dirigidas a conocer su comportamiento desde el punto de vista de su capacidad inmunógena. Por un lado, el uso de conejos para el estudio de producción de anticuerpos policlonales y, en segundo lugar, el estudio de la capacidad bactericida del suero (estudio de la presencia de anticuerpos fijadores del complemento).

En relación con la primera, los resultados obtenidos mediante ELISA a partir de los sueros de conejos inmunizados con diferentes preparados del fragmento seleccionado de la TbpA-r, demostraron que el fragmento elegido era una región inmunógena, así como que los anticuerpos producidos también reconocían otros microorganismos de la familia *Pasteurellaceae*, como *A. pleuropneumoniae*, hecho que revela la conservación filogenética de esta proteína, circunstancia descrita en investigaciones llevadas a cabo con otros microorganismos (Myers *et al.*, 1998).

Respecto de lo segundo, los estudios basados en la actividad bactericida pusieron de manifiesto que el fragmento recombinante de la TbpA inducía anticuerpos con capacidad bactericida (aunque no se tratara de la proteína entera) en el serotipo homólogo del que se obtenía el fragmento. Esta actividad bactericida del suero podría predecir su utilización potencial en la formulación de una vacuna eficaz contra la enfermedad. Precisamente, la protección producida por la TbpA de otros Gram negativos, como *N. meningitidis* (West *et al.*, 2001) o *A. pleuropneumoniae* (Kim y Lee, 2007), avalaría la posible eficacia del fragmento antigénico producido en este estudio.

## 2. Prueba experimental con cerdos privados de calostro

Los estudios de infección experimental de la enfermedad de Glässer en el hospedador natural se enfrentan habitualmente con la presencia de anticuerpos naturales generados como consecuencia de la precocidad de la colonización nasal de *H. parasuis* procedentes de la madre, al nacimiento, o en los primeros días de vida, a lo que se suma la transferencia pasiva de los mismos a través de la ingestión de calostro (Rodríguez-Ferri *et al.*, 2000; Oliverira *et al.*, 2003).

Las alternativas planteadas para resolver esta situación han pasado, tradicionalmente, por la utilización de cerdos SPF (Amano *et al.*, 1997), gnotobióticos obtenidos por cesárea o cerdos privados de calostro (Rapp-Gabrielson *et al.*, 1997); en cualquier caso, evitando las oportunidades de transmisión del microorganismo a los recién nacidos, desde la madre portadora. La opción planteada por los cerdos privados de calostro, obtenidos mediante parto natural, posee la ventaja de su menor coste y su utilidad resulta satisfactoria (Blanco *et al.*, 2004; Martín de la Fuente *et al.*, 2009), razones por las que en este trabajo se decidió mantener este criterio. Las modificaciones introducidas en los protocolos de obtención de lechones y su mantenimiento rindieron mejores resultados en el índice de supervivencia durante las primeras semanas de vida.

### 2.1. Estrategias de inmunización e infección

El tipo de inmunización más utilizado para el control de la enfermedad de Glässer se basa en el empleo de bacterinas (Back y Riising, 2002; Martín de la Fuente *et al.*, 2009), pero con el inconveniente de que su eficacia se limita al serotipo utilizado en la composición vacunal. Los últimos avances en la inmunización han planteado la utilidad de vacunas recombinantes o formuladas con proteínas extracelulares, presentes en todos los serotipos y que resultan accesibles al sistema inmune (del Río, 2004; McVicker *et al.*, 2006), teniendo como referencia la eficacia de las vacunas recombinantes en otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* (Goethe *et al.*, 2001).

En este trabajo se ha utilizado en la inmunización, entre otras opciones, una bacterina comercial con el resultado de una protección completa frente al desafío con el serotipo homólogo, situación que confirma los resultados obtenidos por otros autores (Oliveira *et al.*, 2003; Martín de la Fuente *et al.*, 2009). Otra de las formulaciones vacunales probadas en el estudio fue un extracto de proteínas de la membrana externa

con afinidad por la transferrina porcina. La razón de su elección se puede explicar mediante estudios previos en los que las OMP producían protección en otras especies próximas. Así, Goethe *et al.* (1991) demostraron en *A. pleuropneumoniae* la inmunogenicidad de algunas proteínas de la membrana externa, que se expresaban en mayor concentración en ausencia de hierro (hasta casi cuatro veces en el caso de la TbpB). Por ello, se decidió emplear una preparación cruda de proteínas de la membrana externa capaces de unirse a la transferrina, comparando su eficacia protectora con la de una vacuna comercial y con preparaciones purificadas de proteínas recombinantes (TbpA-r y TbpB-r).

Las vacunas recombinantes elaboradas con las dos proteínas de unión a la transferrina, TbpA-r y TbpB-r, han demostrado su inmunogenicidad en el caso de otros microorganismos de la familia *Pasteurellaceae* y de otras familias próximas. En *N. meningitidis* se comprobó que una vacuna recombinante con la proteína TbpA completa inducía buena protección (West, 2001); por el contrario, en el caso de *H. parasuis* (Martín de la Fuente *et al.*, 2009), el extremo N-terminal de la TbpB (del Río *et al.*, 2004) no confería protección, aunque se observara en los animales vacunados una disminución de las lesiones desarrolladas. En este trabajo, tanto la TbpA-r como la TbpB-r se han clonado en *E. coli* para obtener concentraciones más altas de estos antígenos.

Sobre la base de los resultados de la inmunización con la TbpB-r diseñada por del Río (2004), obtenidos por Martín de la Fuente *et al.* (2009), y en la TbpA-r diseñada en este trabajo, se planteó un ensayo de inmunización en cerdos privados de calostro en el que se obtuvo una protección parcial frente a la infección con el serotipo homólogo. En estudios anteriores se han obtenido también resultados similares. Myers *et al.* (1998) observaron que los anticuerpos generados frente a una TbpA-r reconocían epítomos en la superficie de la bacteria entera pero carecían de actividad bactericida. En el mismo sentido, Loosmone *et al.* (1996) inmunizaron pasivamente ratas con sueros de conejos vacunados frente a una TbpA-r de *H. influenzae* y los animales sobrevivían a la infección resultante del desafío con una cepa virulenta. Sin embargo, Potter *et al.* (1999) comprobaron que la asociación de la proteína TbpA nativa con una TbpB recombinante de *Mannheimia hemolytica* sí confería buena protección contra al desafío experimental.

Debido a los estudios previos, se puede pensar que la falta de buenos resultados obtenidos por la vacunación con la TbpB-r podría deberse a la secuencia antigénica insuficiente o inadecuada del fragmento proteico clonado, de modo que la secuencia de aminoácidos elegida no hubiera contemplado todos los sitios de unión a la transferrina. Retzer *et al.* (1998) clonaron y expresaron la porción completa N-terminal de la proteína TbpB de diferentes especies de las familias *Pasteurellaceae* y *Neisseriaceae* y demostraron el potencial de unión a la transferrina cargada con hierro que posee este fragmento.

Todas las formulaciones vacunales comparadas en este estudio, excepto una de las integradas por las proteínas nativas con afinidad por la transferrina (Tbp-nat), que se inoculó intratraquealmente, fueron administradas por vía intramuscular. El adyuvante elegido fue el Montanide IMS 2215 VG PR (Seppic), que ya había sido utilizado con anterioridad con resultados aceptables (Martín de la Fuente *et al.*, 2009), pero con otras formulaciones vacunales. Se trata de un producto comercial de nueva generación, compuesto por nanopartículas, con un inmunoestimulante soluble cuya función consiste en la atracción de células inmunocompetentes y la estimulación de la captura del antígeno por parte de las células presentadoras (Aucouturier *et al.*, 2000).

En la inmunización basada en las proteínas nativas con afinidad por la transferrina por vía intratraqueal se utilizó la neuraminidasa VI<sup>®</sup> de *Clostridium perfringens*, una glicoproteína que posee actividad enzimática sobre el ácido siálico durante la inflamación o infección, produciendo la desialización de los glicoconjugados presentes en la superficie de las células (Nan *et al.*, 2007). Kuroiwa *et al.* (2009) describieron el incremento en los niveles de secreción de la IL- 8 después de tratar *in vitro* células de pulmón con neuraminidasa. Stamatou *et al.* (2003) demostraron que, como respuesta a la desialización de los glicoconjugados presentes en los monocitos, se experimentaba un incremento en la producción de citoquinas inflamatorias específicas, como la IL-6. Por todo ello, se decidió emplear esta glicoproteína como agente estimulante de la respuesta inmune local, a fin de que aumentara la atracción de células fagocíticas y presentadoras de antígeno y de que se estimulara una respuesta inmune de mucosas.

La vacuna comercial Porcilis<sup>®</sup> Glässer reveló también una excelente eficacia frente al desafío experimental, como ya se había demostrado en otros trabajos (Bak-

Riising, 2002). Takahashi *et al.* (2000) resaltaron la falta de inmunidad heteróloga de su vacuna, compuesta por una bacterina del serotipo 5 de *H. parasuis*, el mismo serotipo que el usado en la vacuna comercial de nuestro estudio experimental.

El grupo control, no inmunizado y solo infectado, no sobrevivió, lo que demostró que la dosis letal del desafío elegida había sido bien ajustada. Algunos estudios llevados a cabo acerca de la reproducibilidad de la enfermedad (Oliveira *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2004) han demostrado que la inoculación de una suspensión bacteriana del serotipo 5, de entre  $10^6$  y  $10^9$  UFC, es capaz de reproducir la enfermedad, con sus lesiones típicas (poliserositis, meningitis, artritis), además de resultar posible la recuperación de la bacteria a partir de los animales afectados. Basándonos en el estudio llevado a cabo por Blanco *et al.* (2008), en el que se calculó que una dosis infecciosa comprendida entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^9$  UFC era el intervalo óptimo para el desarrollo de la enfermedad, se optó por infectar con  $3 \times 10^8$  UFC. Esta dosis permitió analizar en los diferentes lotes experimentales la evolución de las lesiones y llevar a cabo los aislamientos microbiológicos.

La infección experimental se llevó a cabo mediante punción entre dos anillos de la tráquea, como habían descrito trabajos anteriores (Blanco *et al.*, 2008; Martín de la Fuente *et al.*, 2009). Se trata de una práctica relativamente sencilla, que no requiere un manejo complejo ni anestesia previa. Tras la inoculación, se comprobó que los animales no padecían ninguna lesión tisular ni problemas respiratorios, derivados del modo de inoculación de los microorganismos.

## 2.2. Evolución clínica de los animales, estudios anatomopatológicos y hallazgos microbiológicos.

Los animales de los grupos inmunizados con las proteínas recombinantes que no sobrevivieron a la infección y los animales del grupo control comenzaron a mostrar síntomas de la enfermedad a las 6 horas de la infección. Al principio, presentaban dificultad respiratoria leve, cojeras y pérdida de apetito y, ya en el final de la enfermedad, postración e insuficiencia respiratoria grave.

Los animales del grupo control, infectados pero no inmunizados, presentaron signos de septicemia aguda, que provocó la muerte de todos ellos, con un cuadro similar al descrito por Amano *et al.* (1997) o Martín de la Fuente *et al.* (2008).

La inmunización con las TbpA-r y TbpB-r produjo una protección parcial y en los animales que no sobrevivieron a la infección se observó pleuritis, pericarditis, meningitis y peritonitis, al igual que lo descrito por otros autores (Blanco *et al.*, 2004; Martín de la Fuente *et al.*, 2009). Estos animales presentaron lesiones vasculares claras, asociadas con el desarrollo de una coagulación intravascular diseminada, propia de la distribución septicémica del agente, resultado de la liberación de endotoxinas, hecho que agravaba otros signos clínicos del agente, como la disnea o cianosis.

Los animales de los grupos inmunizados con la vacuna comercial y con el preparado de las proteínas nativas con afinidad por la transferrina (por cualquiera de las dos vías utilizadas) sobrevivieron todos ellos a la infección. Entre las escasas lesiones encontradas, presentaron hiperplasia reactiva de la pulpa blanca esplénica, que podría justificarse por el carácter invasivo de *H. parasuis* (Vahle *et al.*, 1995) y por la activación clonal de las células de memoria, en respuesta a los antígenos bacterianos.

Blanco *et al.* (2004) aislaron *H. parasuis*, después de la infección experimental de cerdos privados de calostro, en más de una localización orgánica (cerebro, bazo, pulmón, hígado, riñón, cavidad abdominal y articulaciones), en aquellos animales que no sobrevivieron a la infección. En nuestro caso, el perfil de aislamiento fue diferente según el grupo que se considere. De todos los animales del grupo control (no inmunizados) se aisló *H. parasuis* de cerebro, bazo y cavidad abdominal; en cambio, de los grupos que fueron inmunizados con las proteínas recombinantes (TbpA-r y TbpB-r) y no sobrevivieron a la infección, no exhibieron un patrón común de localización de la bacteria, sino que de cada animal fueron aisladas de órganos diferentes (ver tabla 4.6 de Resultados). Del resto de los grupos inmunizados, que sobrevivieron a la infección y no murieron (grupos inmunizados con la vacuna comercial y con Tbp-nat (im) y Tbp-nat (it), no se obtuvieron aislados de ninguna localización.

En lo que se refiere a la detección molecular por PCR de *H. parasuis* a partir de diferentes órganos, los resultados podrían asociarse a la acción del sistema inmune del cerdo, que determinaría la eliminación de la bacteria o una mayor supervivencia en las localizaciones donde pudo ser recuperada, ya que se ha comprobado que la capacidad de crecimiento de *H. parasuis* está directamente relacionada con la cantidad de NAD presente y ésta varía en función de los órganos porcinos (O'Reilly *et al.*, 2003).

Tanto las lesiones observadas como la distribución del origen de los aislamientos de *H. parasuis* podrían ayudarnos a comprender la patogenia de la enfermedad. La congestión y los edemas observados en los diferentes órganos podrían explicarse como una activación del sistema de coagulación y liberación de fibrina, para inmovilizar la bacteria. Todas las lesiones encontradas en pulmón, sobre todo las de tipo vascular, podrían ser la causa de la disnea observada en los animales.

### 3. Acción bactericida del suero

La capacidad de *H. parasuis* para producir una infección sistémica está directamente relacionada con su resistencia al sistema del complemento (Rautemaa *et al.*, 1999), razón por la que en este estudio se llevó a cabo el análisis de la actividad bactericida del suero en los diferentes grupos de animales.

Con carácter general, el suero de todos los lotes inmunizados, independientemente del producto utilizado para ello manifestaron una clara actividad bactericida al cabo de 8 días (previo a la 2ª inmunización), puesto que la reducción en el número de UFC/ml era de al menos 3 unidades logarítmicas (Cerdá-Cuellar *et al.*, 2008). Los grupos inmunizados con las TbpA-r y TbpB-r presentaron actividad bactericida tras la primera vacunación, a pesar de que la mayoría de los animales no sobrevivieron a la infección, lo que podría explicarse por una producción de anticuerpos insuficiente por parte de ellos, en caso de conferir protección frente a la enfermedad. Los animales inmunizados con la vacuna comercial y con las proteínas de unión a la transferrina exhibieron también una marcada acción bactericida del suero, aunque en estos casos los niveles de anticuerpos resultaron suficientes y específicos para proteger frente la enfermedad.

Queda clara, por tanto, la participación del sistema del complemento, a través de la producción de anticuerpos fijadores del complemento, en la eliminación de las bacterias, hecho por otra parte ya descrito por otros autores (Tadjine *et.al.*, 2004). En cualquier caso, además, la demostración de la participación del sistema del complemento en la eliminación de las bacterias pudo comprobarse al descomplementar los sueros en los que se había demostrado actividad bactericida, con la pérdida de dicha actividad y su recuperación cuando a estos mismos sueros descomplementados se les suministraba un aporte externo de complemento comercial de cobaya.

#### 4. Estudio de la respuesta de fase aguda

En una respuesta orgánica inmune frente a una infección bacteriana se desencadena gran cantidad de procesos metabólicos y fisiológicos, entre los que se pueden encontrar cambios en los niveles plasmáticos de un tipo de proteínas denominadas proteínas de fase aguda (PFA). Estas moléculas se han cuantificado en muchos estudios para valorar la respuesta aguda que sigue a la infección, (Hulten *et al.*, 2003; Martín de la Fuente *et al.*, 2008), porque su concentración varía rápidamente en el curso de una infección inducida (González-Ramón *et al.*, 1997). Tales cambios en su concentración suelen coincidir con la manifestación de los síntomas clínicos (Hulten *et al.*, 2000).

En el ganado porcino, las PFA han sido estudiadas en diferentes infecciones de origen bacteriano, como las producidas por *Yersinia enterocolitica* (Platt-Samoraj *et al.*, 2009), *A. pleuropneumoniae* (Sjölund *et al.*, 2010) y también *H. parasuis* (Martín de la Fuente *et al.*, 2008). Las proteínas plasmáticas que se inducen principalmente en el cerdo frente a cualquier infección incluyen la haptoglobina, proteína C-reactiva, pig MAP y apolipoproteína A-I, siendo ésta última una proteína de fase aguda negativa (Carpintero *et al.*, 2007).

En este estudio se han valorado estas cuatro PFA en el caso de cerdos privados de calostro después de la administración intratraqueal de una dosis letal de la cepa Nagasaki del serotipo 5 de *H. parasuis*, habiendo sido los animales inmunizados previamente con distintos preparados antigénicos. En cualquier caso, se valoró la influencia, en dicha respuesta, de las distintas inmunizaciones previas, comparándolas con el grupo control, que no fue vacunado.

Los animales del grupo control murieron en los dos primeros días tras la infección y en ellos se pudo observar que la concentración de la pig MAP, la haptoglobina y la proteína C reactiva aumentaba considerablemente, en tanto que la de la apolipoproteína A-I disminuía bruscamente, lo que demostró, como en estudios anteriores (Gonzalez-Ramón *et al.*, 1997), que la variación en las concentraciones de estas proteínas plasmáticas se desarrolla rápidamente tras un estímulo representado por la infección por *H. parasuis*.

## Discusión

Se observaron hechos similares en la concentración de estas cuatro proteínas cuando se analizaron los animales inmunizados con las TbpA-r y TbpB-r que no sobrevivieron a la infección. En todos ellos se pudo observar que la progresión de las PFA se encontraba estrechamente relacionada con los signos clínicos de la enfermedad de Glässer, como había sido comprobado por otros autores en bacterias próximas, como *A. pleuropneumoniae* (Hulten *et al.*, 2003).

Las proteínas que sufrieron este cambio de modo más rápido fueron la proteína C reactiva y la apolipoproteína A-I, mientras que la pig MAP y la haptoglobina ofrecieron una respuesta más lenta, lo que podría relacionarse con el hecho observado en otras especies, de que la proteína C reactiva es una proteína de fase aguda de tipo I, inducida por la IL-1 y la IL-6, caracterizada por un incremento inmediato como respuesta (Ramadori y Chirst, 1999), mientras que la haptoglobina y la pig MAP se consideran proteínas de tipo II, con una respuesta más tardía pero duradera (González-Ramón *et al.*, 2000). La evolución de nuestros resultados coinciden, en alguna de las composiciones vacunales utilizadas, con los obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio (Martín de la Fuente *et al.*, 2008).

Los animales inmunizados con las TbpA-r y TbpB-r, que sobrevivieron a la infección, siguieron una cinética en la concentración de estas cuatro PFA muy parecida a la de los grupos inmunizados con la vacuna comercial y con las proteínas nativas con afinidad por la transferrina, en los que sobrevivieron todos los animales a la infección. De este modo, estos cerdos sufrieron solamente pequeñas variaciones en la concentración de las PFA en los primeros momentos tras la infección, pero rápidamente los niveles se recuperaron hasta volver a los basales. En cualquier caso, ninguna de las concentraciones de estas proteínas superó los valores obtenidos en el grupo control, lo que coincide con lo anteriormente expuesto, es decir, que la concentración plasmática de estas proteínas está estrechamente ligada a la presencia de lesiones y síntomas clínicos, ya que en los animales que sobrevivieron a la infección no se apreciaron ni unas ni otros.

El estudio estadístico demostró que en los animales control, que no sobrevivieron a la infección, se producían diferencias significativas en todas las PFA estudiadas al comparar el momento antes de la infección con lo sucedido dos días después. En el caso de los cerdos inmunizados con la TbpB-r, en todas las proteínas se

obtuvieron de nuevo diferencias significativas al comparar estos dos instantes, excepto en la apolipoproteína A-I. En los animales inmunizados con la TbpA-r que no sobrevivieron a la infección, todas las proteínas presentaron diferencias significativas cuando se comparaba el momento previo al desafío con la determinación efectuada dos días después, excepto en el caso de la haptoglobina. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Martín de la Fuente *et al.* (2008), aunque en nuestro caso la respuesta se apreció antes, ya que los primeros cambios en la concentración de las PFA fueron observados al día siguiente de la infección.

Ninguno de los animales supervivientes, independientemente del grupo experimental al que perteneciera, manifestó diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las PFA estudiadas en ningún momento de la prueba experimental, ya que los valores permanecieron constantes hasta el momento del sacrificio.

Cabe destacar que uno de los animales inmunizado con las proteínas nativas con afinidad por la transferrina por vía intratraqueal desarrolló unos días antes del sacrificio un aumento considerable de la proteína C reactiva, lo que podría relacionarse con el mayor estrés sufrido por este animal desde el momento de la infección hasta su fallecimiento, que tuvo lugar en el curso de una extracción sanguínea, un día previo al sacrificio.

Cuando se compararon las diferentes proteínas en todos los grupos se observó que en el caso de la pig MAP, el grupo control presentaba diferencias estadísticamente significativas con todos los demás grupos y que los grupos de las proteínas recombinantes TbpA y TbpB exhibían diferencias con los lotes control, comercial y con los vacunados con las proteínas de unión a la transferrina. En el caso de la haptoglobina, únicamente el grupo control dio lugar a diferencias estadísticamente significativas con los grupos restantes. En el caso de la apolipoproteína A-I, la mayoría de los grupos presentaron diferencias significativas entre ellos, pero en la proteína C reactiva, de nuevo las exhibió únicamente el grupo control respecto a todos los demás.

## **5. Estudio de la respuesta inmune humoral**

Para valorar la respuesta humoral desarrollada en los diferentes grupos experimentales, se caracterizó la respuesta de las inmunoglobulinas séricas frente a diferentes antígenos del serotipo 5 de *H. parasuis*: bacterias enteras, sobrenadantes

## Discusión

enriquecidos en OMP y sobrenadante enriquecido en proteínas nativas con afinidad por la transferrina.

Existen numerosas moléculas antigénicas en una bacteria frente a las que se induce la síntesis de anticuerpos, pero son las proteínas, en razón de su composición y complejidad estructural, las que normalmente provocan una respuesta inmune adaptativa. La inmunogenicidad de una proteína depende de sus características moleculares, de su dosis y de la vía de administración (Janeway *et al.*, 2000).

Del análisis de cada uno de los animales del experimento, por separado, se observó que todos los cerdos producían anticuerpos tras la primera inmunización, aunque no sobrevivieran a la infección. Estos resultados difieren de los obtenidos por Martín de la Fuente *et al.* (2008), en que los animales que no sobrevivían no producían anticuerpos y su mayor producción tenía lugar tras la segunda inmunización. Como cabía esperar, en los animales control, sin inmunizar, no se detectaron anticuerpos a lo largo del experimento.

Los animales inmunizados con las TbpA-r y TbpB-r que sobrevivieron a la infección presentaron una elevación importante en los valores de densidad óptica, al igual que todos los animales pertenecientes a los grupos vacunados con la bacterina comercial y con las proteínas nativas con afinidad por la transferrina. Se pudo observar que la producción de anticuerpos de estos tres últimos grupos resultaba bastante superior a la de los grupos inmunizados con las proteínas recombinantes.

Todas las inmunizaciones se llevaron a cabo con proteínas del serotipo 5 de *H. parasuis*, incluso en el caso de la vacuna comercial, pero estudios anteriores han descrito reacciones cruzadas entre cepas de campo de los serotipos 2 y 4, que conferían protección frente a la infección por el serotipo 5 (Takahashi *et al.*, 2001; Martín de la Fuente *et al.*, 2008). La falta de animales no permitió ampliar los experimentos para desafiar con serotipo heterólogos y poder demostrar, en este trabajo, protección heterólogo.

En general, observamos que la inmunización con la vacuna comercial, así como con las proteínas nativas de unión a la transferrina, por las dos vías de administración utilizadas, estimulaban el sistema inmune frente a las OMP, frente a las proteínas nativas de unión a la transferrina y frente a los antígenos de la célula bacteriana

completa. Se comprobó que tras la primera vacunación se ponía en marcha una respuesta primaria, con un incremento significativo inicial de las IgM y de las IgG totales. Después de la revacunación se activó una respuesta secundaria, de menor intensidad que la primaria. Estos resultados difieren de otras investigaciones realizadas, en las que se hacía necesaria una revacunación para que los animales seroconvirtieran (Takahashi *et al.*, 2001; Martín de la Fuente *et al.*, 2008).

Los animales supervivientes presentaron tras el desafío una ligera elevación en los valores de anticuerpos (densidad óptica), no significativa, que se mantuvo hasta el momento del sacrificio. Esto ocurrió con todas las inmunoglobulinas (IgGt, IgG1, IgG2 e IgM) y coincide con lo observado por otros autores (Nielsen, 1993). En los animales que no sobrevivieron a la infección, pero que fueron inmunizados con las TbpA-r y TbpB-r, se observó un aumento en la síntesis de anticuerpos, aunque no significativo, tanto de IgG totales como de IgM, lo que parece indicar que la inmunización en estos animales no resultó eficaz o suficiente. Esto se confirmó al analizar las subclases IgG1 e IgG2, puesto que ninguno de estos animales fue seropositivo.

Los cerdos inmunizados con la proteína TbpA-r y posteriormente infectados se diferenciaron en dos grupos, según su comportamiento: muertos y supervivientes. Todos presentaron un importante incremento en la densidad óptica tras la primera inmunización con los tres antígenos comparados y para todas las inmunoglobulinas estudiadas, siendo en todos los casos, menor que cuando se estudiaban frente a las proteínas nativas con afinidad por la transferrina y aún menor en aquellos animales que no superaron el desafío, de lo que puede deducirse que en la protección no influye solo el nivel de anticuerpos (protectores) inducidos, sino su calidad, en este caso referida al tipo de antígeno inductor. Tras la infección, se advirtió en todos una elevación del nivel de anticuerpos, que no resultó significativo cuando se comparaba con otros momentos del estudio.

En el grupo de cerdos inmunizados con la TbpB-r y posteriormente infectados, los animales experimentaron un incremento destacable en la densidad óptica tras la primera inmunización con los tres antígenos comparados y para todas las inmunoglobulinas estudiadas, a pesar de que sólo un animal sobrevivió a la infección. Como cabía esperar, la producción de anticuerpos no resultó tan alta como en otros grupos experimentales y los valores menores se obtuvieron nuevamente cuando el

## Discusión

antígeno utilizado eran las proteínas de unión a la transferrina. El único animal superviviente presentó una cinética similar a las de los supervivientes del grupo anterior por lo que resulta aplicable las mismas explicaciones. En este grupo, las diferencias significativas se obtuvieron entre antes de la primera y de la segunda inmunización, excepto en las IgG2, en las que también resultó significativa la diferencia con respecto al momento previo a la infección.

La inmunización basada en la vacuna comercial protegió a los cerdos frente a la enfermedad de Glässer, lo que coincidió con el incremento de densidad óptica de todos los animales frente a los tres antígenos y para todas las inmunoglobulinas, con niveles elevados en todos los casos. Aún así, las proteínas nativas con afinidad por la transferrina fueron las que detectaron la menor producción de anticuerpos, por lo que debe entenderse que este caso son otros antígenos, derivados de la bacteria completa, los que se responsabilizan de la inducción de anticuerpos protectores, que soportan la supervivencia de los animales. Para las IgGt, para los subisotipos IgG1 e IgG2 y para las IgM se obtuvieron diferencias significativas entre antes y después de la primera inmunización y también entre la segunda y el momento de la infección. En este grupo, los valores de anticuerpos fueron tan elevados antes del desafío que no se pudieron observar nuevos incrementos tras él, de modo que los niveles a partir de ese momento se mantuvieron hasta el sacrificio. Tales resultados se corresponden con los publicados por Cerdá-Cuellar *et al.* (2010), que observan que una vez que se produce ese primer incremento acusado en los valores de anticuerpos, éstos se mantienen.

En los grupos inmunizados con las proteínas nativas con afinidad por la transferrina (vía intramuscular y vía intratraqueal), los resultados fueron similares a los descritos en el caso del grupo inmunizado con la vacuna comercial, con la única diferencia de que en los primeros se produjo una mayor producción de anticuerpos frente a las propias proteínas nativas de unión a la transferrina. Los momentos en los que se apreciaron diferencias estadísticamente significativas fueron, respectivamente, tras la primera inmunización y de nuevo tras la segunda, siendo los niveles de anticuerpos muy elevados en el momento de la infección, quedando así demostrada la eficacia de estas inmunizaciones.

Investigaciones anteriores (Goethe *et al.*, 2001; Martín de la Fuente *et al.*, 2008) habían indicado que las OMP presentaban gran inmunogenicidad. Mediante este estudio

se pone de manifiesto claramente que un pequeño grupo dentro de estas OMP, representado por las proteínas con afinidad por la transferrina porcina, presentó una gran inmunogenicidad, medida respecto de su capacidad de inducir inmunoglobulinas específicas IgGt, IgG1, IgG2 e IgM, independientemente de la vía de inoculación elegida.

Los animales del grupo control lógicamente no incrementaron los valores de densidad óptica con ninguno de los antígenos comparados ni frente a ninguna de las inmunoglobulinas estudiadas, siendo su producción de anticuerpos nula y constante hasta el momento de la muerte de los cerdos. Como estos animales fallecieron poco después de ser sometidos al desafío, no se pudo apreciar bien lo que ocurría con la respuesta inmune tras él, aunque se observó un pequeño aumento en el nivel de anticuerpos para las subclases IgG1 e IgG2. Estos datos coinciden con lo publicado en otras investigaciones relacionadas con infecciones experimentales (Melnikow *et al.*, 2005).

Debido a que los grupos que sobreviven a la enfermedad presentan todos ellos niveles elevados de anticuerpos, puede deducirse que en los animales inmunizados con las TbpA-r y TbpB-r, aunque se produjeron anticuerpos, y sin entrar en otras consideraciones ya apuntadas, los niveles no resultaron suficientes para la protección frente a la enfermedad. Seguramente se necesitarían, epitopos diferentes a los contenidos en la formulación vacunal utilizada en la inmunización de los animales.

Cuando se comprobó si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, respecto de las diferentes inmunoglobulinas, se pudieron establecer dos bloques: por un lado, los grupos control y de las proteínas recombinantes, y por otro, los otros tres grupos (comercial y de las proteínas de unión a la transferrina) en los que se observa un claro aumento en la producción de anticuerpos tras la primera inmunización.

Después de la valoración de las inmunoglobulinas anteriores, se procedió al estudio particular de las IgA en suero, aún siendo conscientes de que no era ésta la mejor opción para la medida de esta clase de inmunoglobulinas; no obstante, algunos autores han llevado a cabo la valoración de las IgA en suero con anterioridad, como por ejemplo, en infecciones producidas por *Pseudomonas aeruginosa*, concluyendo a propósito de su presencia y concentración (Yamashita *et al.*, 2010).

De entre todos los grupos de animales inmunizados y frente a los tres tipos de antígenos empleados para la valoración de las IgA, se observó que el único grupo que las presentaba era el inmunizado con las proteínas nativas de unión a la transferrina por vía intratraqueal. En los restantes, por el contrario, los niveles de IgA se mantuvieron prácticamente nulos y constantes desde el momento del inicio de la prueba hasta la muerte o sacrificio de los animales.

En el grupo inmunizado con las proteínas nativas de unión a la transferrina por vía intratraqueal, debido posiblemente a la vía de administración, se estimuló la inmunidad de mucosas de manera clara y significativa, en comparación con el resto de grupos, en los que las inmunizaciones fueron llevadas a cabo por vía intramuscular. Esta estimulación, dependiente de la vía de administración, se ha observado también en estudios llevados a cabo con *Lawsonia* (Guedes, 2010), en los que la inoculación en la mucosa intestinal estimulaba la producción de anticuerpos de esta clase. La vía nasal, al menos, se presenta desde este punto de vista como una opción vacunal de interés, como sucede en el caso de otros patógenos respiratorios porcinos.

## **6. Identificación de las proteínas nativas de unión a la transferrina. Inmunoproteómica.**

Uno de los objetivos de este trabajo fue la identificación de las proteínas nativas, que se habían purificado en el extracto de afinidad, por la transferrina porcina.

A partir de la muestra purificada se realizó un gel de una dimensión y se identificaron un total de nueve proteínas. Una de ellas fue la transferrina porcina, lo que era esperable ya que resulta habitual obtener restos de la proteína de la matriz con la que se ha purificado el extracto total, sobre todo cuando el método de purificación se lleva a cabo mediante una columna de afinidad.

Se identificaron además las proteínas TbpA y TbpB, esperadas, encargadas de introducir el hierro al interior de la bacteria y relacionadas también con el transporte del hierro, así como el transportador ABC en forma quelada y una proteína de unión al hierro de nombre desconocido, con localización en el espacio periplásmico. Además, se obtuvieron otras tres proteínas cuya función no se encuentra relacionada ni con el transporte ni con la captación del hierro: la catalasa, el factor de enlongación Tu y la proteína de membrana externa P2. Se podría explicar esto porque en todo proceso de

purificación asociado a una columna de afinidad se producen uniones inespecíficas a la matriz, que se eluyen junto a las otras proteínas.

Algunas de estas proteínas pueden resultar inmunógenas, como se ha descrito en estudios anteriores con microorganismos relacionados, como *N. meningitidis* (Williams, 2009), en que se han descrito por inmunoproteómica varias proteínas con inmunorreactividad, obteniendo entre ellas el transportador ABC, o como *Bordetella pertussis* (Altindis, 2009), en la que describe el factor de enlongación Tu como inmunógeno.

En la actualidad, la identificación de inmunógenos constituye un punto crucial para el desarrollo de vacunas. Los desarrollos llevados a cabo en los últimos años en genómica y proteómica han hecho posible encontrar proteínas inmunógenas en diversos patógenos bacterianos (Chen *et al.*, 2004). Las OMPs de las bacterias Gram negativas han sido consideradas tradicionalmente de gran interés tanto para el desarrollo de vacunas como en el de herramientas para el diagnóstico (Óbice *et al.*, 2006).

En el caso de *A. pleuropneumoniae* (Liao *et al.*, 2009) se han encontrado algunas proteínas, como la FepB, la AfuC y la FatB, que son componentes del sistema de transporte del hierro y que resultan inmunógenas en el hospedador natural, otro dato más que avala que las proteínas relacionadas con la captación y el transporte del hierro pueden resultar candidatas de interés para el desarrollo de vacunas de subunidades.

Los resultados de un gel bidimensional a partir de un extracto de proteínas nativas de afinidad por la transferrina porcina permitieron realizar un *immunoblotting* con los sueros de aquellos grupos de animales que sobrevivieron a la infección y poder determinar la presencia de nuevos antígenos como posibles candidatos vacunales. Zou *et al.* (2009) utilizaron un subproteoma de OMPs de *H. parasuis* y llegaron a identificar un total de 15 proteínas inmunógenas mediante MALDI-TOF, dentro de las cuales figuraban, como en nuestro caso, la proteína de membrana externa OMP2 y el transportador ABC; en cualquier caso, la proteína de membrana externa OMP2 de *H. parasuis* ya había sido descrita como inmunógena con anterioridad (Haase *et al.*, 1991).

Se realizó inmunoproteómica a partir de los sueros de los tres grupos de animales que quedaron completamente protegidos por sus respectivas formulaciones vacunales: el inmunizado con la vacuna comercial y los inmunizados con las proteínas

## Discusión

nativas de unión a la transferrina, tanto por vía intramuscular como intratraqueal. Se compararon cuatro momentos del estudio para comprobar si existían o no diferentes *spots* proteicos inmunógenos: antes de las inmunizaciones, después de la primera, después de la segunda (coincidente con el momento previo a la infección) y diez días después de la infección.

Con los sueros de los animales inmunizados con las proteínas nativas con afinidad por la transferrina por vía intramuscular, se observó que tras la primera inmunización aparecían dos proteínas nuevas y cuando se realizó el *blotting* con el suero tras la segunda inmunización el número de *spots* inmunógenos aumentó. En la última determinación, algunas de las proteínas se mantuvieron, mientras que otras desaparecieron. Del total de ocho *spots* proteicos inmunógenos, se identificaron las siguientes proteínas: la proteína de membrana externa 2 (OMP-2), el transportador ABC en su forma quelada y una proteína de unión al hierro de disposición periplásmica, que habían sido identificadas en el gel de una dimensión como componentes del extracto. Posteriormente, se identificaron otras tres que incluían la neuraminidasa, el precursor de protección de superficie D15 y la FKBP-peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa, que no habían sido identificadas en el gel simple, de una dimensión, seguramente porque su concentración era demasiado baja aunque después la intensidad de la respuesta inmune frente a ellas resultara mucho mayor que frente a las otras.

Respecto de los sueros de los animales inmunizados con las proteínas nativas con afinidad por la transferrina administradas por vía intratraqueal, se observó con nitidez una respuesta inmune mucho más intensa y dirigida frente a un número mayor de proteínas, ya que después de la primera inmunización se detectaron seis proteínas diferentes, aumentando el número después de la segunda inmunización. De nuevo, en la última determinación se mantuvieron algunos *spots* proteicos mientras que otros desaparecieron. En esta fase de la respuesta inmune se identificaron dieciséis *spots* correspondientes a las siguientes proteínas: cuatro que ya se habían detectado en el gel de una dimensión (OMP2, el transportador ABC en su forma quelada y la proteína de unión al hierro periplásmica, éstas tres aparecían también en la inoculación intramuscular, y la catalasa). Se identificaron también siete proteínas que no habían sido observadas en el gel de una dimensión, probablemente porque en el extracto proteico se encontraban en una concentración demasiado escasa (la neuraminidasa, el precursor de protección de superficie D15 y la FKBP- peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa); todas ellas

habían sido ya detectadas en el grupo inoculado por vía intramuscular. Aparecieron además otras cuatro proteínas nuevas en este grupo: la gliceraldehído 3 fosfato, la fenilalanina-RNAt sintetasa, la CMP-N-acetilneuramínico sintetasa y la xantina guanina fosforribosil sintetasa.

En lo que se refiere al estudio de los sueros procedentes de los animales inmunizados con la vacuna comercial, se obtuvieron resultados muy similares a los descritos en los dos grupos anteriores, con una respuesta inmune que parecía intermedia entre ambos. En este caso, después de la primera inmunización se observaron siete *spots* proteicos, situación que varió escasamente tras la segunda inmunización y diez días después de la infección. En todos los casos, las proteínas identificadas en este grupo ya habían sido observadas en los grupos anteriores. Se trató de cuatro proteínas identificadas en el gel de una dimensión: el transportador ABC en su forma quelada, la OMP2, la proteína de unión al hierro periplasmática (estas tres se encontraban presentes en los dos grupos anteriores) y la catalasa (que aparecía únicamente en el grupo inmunizado por vía intratraqueal), además de otras cuatro proteínas, no identificadas en el gel de una dimensión seguramente a consecuencia de su baja concentración en el extracto, pero ya descritas en los grupos anteriores, como la neuraminidasa, el precursor de protección de superficie D15, la FKBP-peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa y la xantina guanina fosforribosil sintetasa.

En definitiva, las proteínas que en el extracto proteico nativo de unión a la transferrina se encontraban en una concentración escasa, pero que dieron lugar a una respuesta inmune importante, podrían ser consideradas buenas candidatas vacunales, ya que su escasa concentración resultó suficiente para estimular de manera considerable el sistema inmunitario. Esto, al menos, ha sido descrito en algunos estudios realizados a partir de otros microorganismos, como *N. meningitidis* (Williams *et al.*, 2009), en los que se identificaron como proteínas inmunógenas el transportador ABC o la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa. En *Bordetella pertussis* (Altindis *et al.*, 2008) se ha detectado, entre otros muchos inmunógenos, la proteína FKBP-peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa. En *Mannheimia haemolytica* (Ayalew *et al.*, 2010) se identificaron como inmunógenos la OMP2 y el transportador ABC, mientras que en *Streptococcus suis* (Zhang *et al.*, 2008) se han descrito de nuevo el transportador ABC y la gliceraldehído 3 fosfato.



## **VI.CONCLUSIONES**



1...Un fragmento proteico recombinante de 200 aminoácidos, seleccionado dentro de la TbpA del serotipo 5 de *Haemophilus parasuis* (TbpA-r), induce una respuesta humoral inmune importante en conejos. El suero de los animales manifiesta actividad bactericida dependiente de la presencia de anticuerpos específicos.

2...La infección experimental de cerdos privados de calostro, inoculados con una dosis letal de  $3 \times 10^8$  UFC del serotipo 5 de *Haemophilus parasuis* por vía intratraqueal, produce enfermedad de Glässer. En los tres días posteriores a la infección, se produce la difusión sistémica del microorganismo, con el desarrollo del cuadro clínico y las lesiones macroscópicas y microscópicas típicas.

3...Las vacunas formuladas a partir de proteínas nativas con afinidad por la transferrina sérica porcina, administradas por vía intramuscular o intratraqueal, proporcionaron protección total frente a la enfermedad de Glässer, similar a la obtenida con una bacterina comercial a base de bacterias completas del serotipo 5, inactivadas y con un adyuvante a base de tocoferol.

4...El uso de neuraminidasa tipo VI<sup>®</sup> de *Clostridium perfringens*, como adyuvante de inmunidad en la vacuna formulada por proteínas nativas de unión a la transferrina, administrada por vía intratraqueal, representa una buena opción inmunorreguladora en la vacunación experimental frente a la enfermedad de Glässer.

5...Las proteínas recombinantes TbpA-r y TbpB-r utilizadas en la inmunización experimental de cerdos privados de calostro inducen solamente protección parcial, valorada en términos de anticuerpos protectores e insuficiente, frente al desafío con una dosis letal del serotipo 5 de *Haemophilus parasuis*.

6...Todas las formulaciones vacunales utilizadas indujeron en el hospedador natural la producción de anticuerpos séricos relacionados con la actividad bactericida del suero, circunstancia que subraya el interés de la activación del complemento mediada por anticuerpos (vía clásica) como uno de los sistemas más eficaces de aclaración de *Haemophilus parasuis* en el cerdo.

7...La infección experimental con *H. parasuis* induce cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de las proteínas de fase aguda pig MAP, haptoglobina, apolipoproteína A-I y proteína C reactiva. Tales cambios se relacionan con el cuadro

## *Conclusiones*

clínico y lesional que presentan los animales enfermos. Las formulaciones vacunales que protegen frente a la enfermedad reducen significativamente esta respuesta en los primeros momentos de la infección, recuperándose los niveles basales en las siguientes horas.

**8...**La respuesta inmune humoral en cerdos privados de calostro inmunizados experimentalmente con las formulaciones basadas en proteínas nativas de unión a la transferrina porcina, igual que la de la bacterina comercial, resulta fundamental en la protección frente al desafío con una dosis letal de *Haemophilus parasuis* serotipo 5.

**9...**La presencia de IgA sérica se induce únicamente cuando en la inmunización se utiliza la vía respiratoria directa (inoculación intratraqueal) para la administración del preparado vacunal.

**10...**Los estudios de inmunoproteómica demuestran, que el extracto de proteínas con afinidad por la transferrina porcina utilizado en los ensayos experimentales, incorpora otras proteínas, además de la TbpA y TbpB, cuyos potenciales inmunógenos resultan desconocidos, pero que podrían ser críticos, de modo particular el del transportador ABC de unión al hierro periplásmico quelado y la proteína de membrana externa P2.

**11...**En términos cuanti-cualitativos, las proteínas nativas de unión a la transferrina porcina administradas por vía intratraqueal, son las que generan la respuesta inmune de mayor intensidad de todos los preparados vacunales investigados.

## **VII. BIBLIOGRAFIA**



Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. **383**: 787-793.

Akyüz N., Boehden G. S., Süsse S., Rimek A., Preuss U., Scheidtmann K. H., Wiesmüller L. 2002. DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 6306-6317.

Altındış E., Tefon B. E., Yildirim V., Ozcengiz E., Becher D., Hecker M., Ozcengiz G. 2009. Immunoproteomic analysis of *Bordetella pertussis* and identification of new immunogenic proteins. *Vaccine* **27**: 542-548.

Amano H., Shibata M., Kajio N., Morozumi T. 1994. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovars 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. *J. Vet. Med. Sci.* **56**: 639-644.

Amano H., Shibata M., Takahashi K., Sasaki Y. 1997. Effects on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of *Haemophilus parasuis* infection. *J. Vet. Med. Sci.* **59**: 451-455.

Aragón V., Bouchet B., Gottschalk M. 2009. Invasion of endothelial cells by systemic and nasal strains of *Haemophilus parasuis*. *Vet. J.* **11**: 39-47.

Aucuturier, J., Game V., Laval A. 2000. Adjuvants designed for swine vaccines. 16<sup>th</sup> I.P.V.S. Congress, Melbourne, Australia, p. 80.

Ayalew S., Confer A. W., Hartson S. D., Shrestha B. 2010. Immunoproteomic analyses of outer membrane proteins of *Mannheimia haemolytica* and identification of potential vaccine candidates. *Proteomic.* **10**: 2151-2164.

Bailey M., Haverson K. 2006. The postnatal development of the mucosal immune system and mucosal tolerance in domestic animals. *Vet. Res.* **37**: 443-453.

Bak H., Riising H. J. 2002. Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*. *Vet. Res.* **151**: 502-505.

## Bibliografia

Baltes N., Hennig-Pauka I., Jacobsen I., Gruber A. D., Gerlach G. F. 2003. Identification of dimethyl sulfoxide reductase in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its role in infection. *Infect. Immun.* **71**: 6784-6792.

Baumann H., Gauldie J. 1994. The acute phase response. *Immunol. Today* **15**: 74-78.

Baumann G., Bilkei G. 2002. Effect of vaccinating sows and their piglets on the development of Glasser's disease induced by a virulent strain of *Haemophilus parasuis* serovar 5. *Vet. Record* **151**: 18-21.

Beitzinger M., Peters L., Zhu J. Y., Kremmer E., Meister G. 2007. Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol.* **4**: 76-84.

Bélangier M., Begin C., Jackes M. 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* **63**: 656-662.

Better M., Freifelder D. 1983. Studies on the replication of *Escherichia coli* phage lambda DNA. I. The kinetics of DNA replication and requirements for the generation of rolling circles. *Virology* **126**: 168-182.

Biberstein E. L., White D. C. 1969. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *J. Med. Microbiol* **2**: 75-78.

Bigas A., Garrido M. E., Badiola I., Barbe J., Llagostera M. 2006. Colonization capacity and serum bactericidal activity of *Haemophilus parasuis* thy mutants. *Int. Microbiol* **9**: 297-301.

Bimczok D., Post A., Tschernig T., Rothkötter H. J., 2006. Phenotype and distribution of dendritic cells in the porcine small intestinal and tracheal mucosa and their spatial relationship to epithelial cells. *Cell. Tissue. Res.* **325**: 461-468.

Bjellqvist B., Sanchez J.C., Pasquali C., Ravier F. 1993. Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis*.**14**: 1375-1378.

Blackall P. J., Trott D. J., Rapp-Gabrielson V., Hampson D. J. 1997. Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. *Vet. Microbiol.* **56**: 125-134.

Blanco I., Galina-Pantoja L., Oliveira S., Pijoan C., Sánchez C., Canals A. 2004. Comparison between *Haemophilus parasuis* infection in colostrum-deprived and sow-reared piglets. *Vet. Microbiol.* **103**: 21-27.

Blanco I., Canals A., Evans G., Mellencamp M. A., Cia C., Deeb N., Wang L., Galina-Pantoja L. 2008. Differences in susceptibility to *Haemophilus parasuis* infection in pigs. *Can. J. Vet. Res.* **72**: 228-235.

Boyce J. D., Cullen P. A., Nguyen V., Wilkie I., Adler B. 2006. Analysis of the *Pasteurella multocida* outer membrane sub-proteome and its response to the *in vivo* environment of the natural host. *Proteomics* **6**: 870-880.

Bradbeer, C. 1993. The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 3146-3150.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Brockmeier, S. L. 2004. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. *Vet. Microbiol.* **99**: 75-78.

Bronstein I., Voyta J. C., Murphy O. J., Bresnick L., Kricka L. J. 1992. Improved chemiluminescent western blotting procedure. *Biotechniques* **12**: 748-753.

Butler J. E., Klobasa F., Werhahn E. 1981. The differential localisations of IgA, IgM and IgG in the gut of suckled neonatal piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2**: 53-65.

Carbonetti N., Simnad V., Elkins C., Sparling P. F. 1990. Construction of isogenic gonococci with variable porin structure: effects on susceptibility to human serum and antibiotics. *Mol. Microbiol.* **4**: 1009-1018.

## Bibliografia

Carpintero R., Alonso C., Piñeiro M., Iturralde M., Andrés M., Le Potier M. F., Madec F., Alava M. A., Piñeiro A., Lampreave F. 2007. Pig major acute-phase protein and apolipoprotein A-I responses correlate with the clinical course of experimentally induced African Swine Fever and Aujeszky's disease. *Vet. Res.* **38**: 741-753.

Carson S. D., Klebba P. E., Newton S. M., Sparling P. F. 1999. Ferric enterobactin binding and utilization by *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **181**: 2895-2901.

Cerdà-Cuéllar, M., Aragón V. 2008. Serum-resistance in *Haemophilus parasuis* is associated with systemic disease in swine. *Vet. J.* **175**: 384-389.

Cerdà-Cuéllar M., Naranjo J. F., Verge A., Nofrarías M., Cortey M., Olvera A., Segalés J., Aragon V. 2010. Sow vaccination modulates the colonization of piglets by *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.* **14**: 37-49.

Clarke T. E., Rohrbach M. R., Tari L. W., Vogel H. J., Köster W. 2002. Ferric hydroxamate binding protein FhuD from *Escherichia coli*: mutants in conserved and non-conserved regions. *Biometals* **15**: 121-131.

Clokie M. R., Thalassinou K., Boulanger P., Slade S. E., Stoilova-McPhie S., Cane M., Scrivens J. H., Mann N. H. 2008. A proteomic approach to the identification of the major virion structural proteins of the marine cyanomyovirus S-PM2. *Microbiology* **154**: 1775-1782.

Cornelissen C. N., Anderson J. E., Sparling P. F. 1997. Characterization of the diversity and the transferrin-binding domain of gonococcal transferrin-binding protein 2. *Infect. Immun.* **65**: 822-828.

Correa-Rotter, R., Gamba G. 1997. Molecular biology in medicine. VIII. Analysis of gene expression. *Rev. Invest. Clin.* **49**: 163-166.

Curtis J., Bourne F. J. 1971. Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochem. Biophys. Acta* **236**: 319-332.

Chae T. H., Allen K. M., Davisson M. T., Sweet H. O., Walsh C. A. 2002. Mapping of the mouse *hyh* gene to a YAC/BAC contig on proximal chromosome 7. *Mammal Genome* **13**: 239-344.

Chan L. 1995. Use of somatic gene transfer to study lipoprotein metabolism in experimental animals *in vivo*. *Curr. Opin. Lipidol.* **6**: 335-340.

Charland N., D'Silva C. G., Dumont R. A., Niven D. F. 1995. Contact-dependent acquisition of transferrin-bound iron by two strains of *Haemophilus parasuis*. *Can. J. Microbiol.* **41**: 70-74.

Danve B., Lissolo L., Mignon M., Dumas P., Colombani S., Schryvers A. B., Quentin-Millet M. J. 1993. Transferrin-binding proteins isolated from *Neisseria meningitidis* elicit protective and bactericidal antibodies in laboratory animals. *Vaccine* **11**: 1214-1220.

De Arriba M. L., Carvajal A., Pozo J., Rubio P. 2002. Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses and protection in conventional pigs exposed to virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus. *Vet. Immunol. Immunopathol* **85**: 85-97.

De Groote M. A., Ochsner U. A., Shiloh M. U., Nathan C., McCord J. M., Dinauer M. C., Libby S. J., Vazquez-Torres A., Xu Y., Fang F. C. 1997. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 13997-14001.

De la Fuente A. J. M., Ferri E.F. R., Tejerina F., Frandoloso R., Martínez S.M., Martín C.B.G. 2009. Cytokine expression in colostrum-deprived pigs immunized and challenged with *Haemophilus parasuis*. *Res. Vet. Sci.* **87**: 47-52.

De la Puente Redondo V. A., Navas Méndez J., García del Blanco N., Ladrón Boronat N., Gutiérrez Martín C. B., Rodríguez Ferri E. F. 2003. Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene. *Vet. Microbiol.* **92**: 253-262.

Del Río M. L., Gutiérrez C. B., Rodríguez Ferri E. F. 2003. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 880-882.

## Bibliografía

Del Río M. L., Gutiérrez-Martín C. B., Rodríguez-Barbosa J. I., Navas J., Rodríguez-Ferri E. F. 2005. Identification and characterization of the TonB region and its role in transferrin-mediated iron acquisition in *Haemophilus parasuis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* **45**: 75-86.

Del Río M. L., Martín C. B., Navas J., Gutiérrez-Muñiz B., Rodríguez-Barbosa J. I., Rodríguez Ferri E. F. 2006. *aroA* gene PCR-RFLP diversity patterns in *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus* species. *Res. Vet. Sci.* **80**: 55-61.

DeRosa D. C., Veenhuizen M. F., Bade D. J., Shryock T. R. 2000. *In vitro* susceptibility of porcine respiratory pathogens to tilmicosin. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**: 541-546.

Dewhirst F. E., Paster B. J., Olsen I., Fraser G. J. 1992. Phylogeny of 54 representative strains of species in the family *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* **174**: 2002-2013.

Diallo, I. S., Frost A. J. (2000). Survival of avian strains of *Pasteurella multocida* in chicken serum. *Vet. Microbiol.* **72**: 153-161.

Ernst R. K., Guina T., Miller S. I. 1999. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *J. Infect. Dis.* **179**: S326-S330.

Faraldo-Gómez, J. D., Sansom M. S. 2003. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**: 105-116.

Fenwick B. W., Osburn B. I., Olander H. J. 1986. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **47**: 1433-1441.

Gabay, C., Kushner I. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* **340**: 448-454.

Gerlach G. F., Klashinsky S., Anderson C., Potter A. A., Willson P. J. 1992. Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Infect. Immun.* **60**: 3253-3261.

Goethe R., González O. F., Lindner T., Gerlach G. F. 2000. A novel strategy for protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccines: detergent extraction of cultures induced by iron restriction. *Vaccine* **19**: 966-975.

Goldberg M. B., DiRita V. J., Calderwood S. B. 1990. Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae*, using TnphoA mutagenesis. *Infect. Immun.* **58**: 55-60.

González G. C., Yu R. H., Rosteck P. R., Schryvers A. B. 1995. Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes. *Microbiology* **141**: 2405-2416.

Gray-Owen S. D., Loosmore S., Schryvers A. B. 1995. Identification and characterization of genes encoding the human transferrin-binding proteins from *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **63**: 1201-1210.

Green G. M., Jakab G. J., Low R. B., Davis G. S. 1977. Defense mechanisms of the respiratory membrane. *Am. Rev. Respir. Dis.* **115**: 479-514.

Groux H. 2001. An overview of regulatory T- cells. *Microbes. Infect.* **3**: 883-889.

Harding J. C., Baarsch M. J., Murtaugh M. P. 1997. Association of tumour necrosis factor and acute phase reactant changes with post arrival disease in swine. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* **44**: 405-413.

Harty, J. T., White D. 1999. A knockout approach to understanding CD8+ cell effector mechanisms in adaptive immunity to *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology* **201**: 196-204.

Havlasová J., Hernychová L., Halada P., Pellantová V., Krejsek J., Stulík J., Macela A., Jungblut P. R., Larsson P., Forsman M. 2002. Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Proteomics* **2**: 857-867.

Heberman, R. B. 1978. Immunodiagnosis and its applicability for cancer screening. *Antibiot. Chemother.* **22**: 59-66.

## Bibliografia

Hebertson, M. 2004. Recombinant activated factor VII in cardiac surgery. *Blood. Coagul. Fibrinolysis* **15**: 131-137.

Holtmeier, W., Kabelitz D. 2005. Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem. Immunol. Allergy* **86**: 151-183.

Horejsi V., Hilgert I. 1983. Nitrocellulose membrane as an antigen or antibody carrier for screening hybridoma cultures. *J. Immunol. Method.* **62**: 325-329.

Hulten C., Johansson E., Fossum C., Wallgren P. 2003. Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobin as markers of treatment efficacy in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* **95**: 75-89.

Hsu C. A., Lin W. R., Li J. C., Liu Y. L., Tseng Y. T., Chang C. M., Lee Y. S., Yang C. Y. 2008. Immunoproteomic identification of the hypothetical protein NMB1468 as a novel lipoprotein ubiquitous in *Neisseria meningitidis* with vaccine potential. *Proteomics* **8**: 2115-2125.

Jacobson M., Fellström C., Lindberg R., Wallgren P., Jensen-Waern M. 2004. Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J. Med. Microbiol.* **53**: 273-280.

Janeway, C. A. 2001. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.* **3**: 1167-1171.

Jung K., Ha Y., Kim S. H., Chae C. 2004. Development of polymerase chain reaction and comparison with *in situ* hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Med. Sci.* **66**: 841-845.

Jungersen G., Jensen L., Riber U., Heegaard P. M., Petersen E., Poulsen J. S., Bille-Hansen V., Lind P. 1999. Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. *Int. J. Parasitol.* **29**: 1307-1319.

Kielstein P., Rapp-Gabrielson V. J. 1992. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 862-865.

Kilian M. 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.* **93**: 9-62.

Kim T. J., Kim K. H., Lee J. I. 2007. Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against recombinant transferrin-binding protein B of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with chitosan after tracheal administration in piglets. *J. Vet. Med. Sci.* **69**: 535-539.

Kuroiwa, A., Hisatsune, A., Isohama, Y., Katsuki, H. 2009. Bacterial neuraminidase increases IL-8 production in lung epithelial cells via NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**: 754–759.

Kovacs B., Maus M. V., Riley J. L., Derimanov G. S., Koretzky G. A., June C. H., Finkel T. H. 2002. Human CD8<sup>+</sup> T cells do not require the polarization of lipid rafts for activation and proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 15006-15011.

Kushner I. 1982. The phenomenon of the acute phase response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **389**: 39-48.

Lachmann P. 2006. Complement before molecular biology. *Mol. Immunol.* **43**: 496-508.

Lampreave F., González-Ramón N., Martínez-Ayensa S., Hernández M. A., Lorenzo H. K., García-Gil A, Piñeiro A. 1994. Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis* **15**: 672-676.

Langford P. R., Loynds B. M., Kroll J. S. 1992. Copper-zinc superoxide dismutase in *Haemophilus* species. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 517-522.

Lecce J. G., Justice W. H. 1960. Significance of husbandry, pleuropneumonia-like organisms, and *Hemophilus influenzae suis* in the pathogenesis of porcine polyserositis with arthritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **137**: 345-347.

Li J. X., Jiang P., Wang Y., Li Y. F., Chen W., Wang X. W., Li P. 2009. Genotyping of *Haemophilus parasuis* from diseased pigs in China and prevalence of two coexisting virus pathogens. *Vet. Med.* **91**: 274–279.

## Bibliografía

Liao Y., Deng J., Zhang A., Zhou M., Hu Y., Chen H., Jin M. 2009. Immunoproteomic analysis of outer membrane proteins and extracellular proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* JL03 serotype 3. *BMC Microbiol.* **20**: 172-181.

Lichtensteiger C. A., Vimr E. R. 1997. Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 269-274.

Lichtensteiger C. A., Vimr E. R. 2003. Purification and renaturation of membrane neuraminidase from *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol.* **93**: 79-87.

Liebler-Tenorio E. M., Vimr E. R. 1997. Neuraminidase activity of *Haemophilus parasuis*. *FEMS Microbiology.* **152**: 269-274.

Lillie B. N., Hammermueller J. D., Macinnes J. I., Jacques M., Hayes M. A. 2006. Porcine mannan-binding lectin A binds to *Actinobacillus suis* and *Haemophilus parasuis*. *Dev. Comp. Immunol.* **30**: 954-965.

Lorenzo H., Quesada O., Assunção P., Castro A., Rodríguez F. 2006. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **109**: 199-207.

Loosmore, S. M., Yang, Y., Coleman, D. C., Shortreed, J. M., England, D. M., Harkness, R. E., Chong, P. S. C., Klein, M. H. 1996. Cloning and expression of the *Haemophilus influenzae* transferrin receptor gene. *Mol. Microbiol.* **19**: 575-586.

Lunney J. K., Pescovitz M. D. 1987. Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **17**: 135-144.

Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F. 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**: 235-254.

Martín de la Fuente A. J., Carpintero R., Rodríguez Ferri E. F., Alava M. A., Lampreave F., Gutiérrez Martín C. B. 2008. Acute-phase protein response in pigs experimentally infected with *Haemophilus parasuis*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **29**: 125- 137.

Martín de la Fuente A. J., Gutiérrez Martín C. B., Pérez Martínez C., García Iglesias M. J., Tejerina F., Rodríguez Ferri E. F. 2009. Effect of different vaccine formulations on the development of Glasser's disease induced in pigs by experimental *Haemophilus parasuis* infection. *J. Comp. Pathol.* **140**: 169-176.

Martín de la Fuente A. J., Rodríguez-Ferri E. F., Frandoloso R., Martínez S., Tejerina F., Gutiérrez-Martín C. B. 2009. Systemic antibody response in colostrum-deprived pigs experimentally infected with *Haemophilus parasuis*. *Re. .Vet. Sci.* **86**: 248-253.

Martínez-López R., Nombela C., Díez-Orejas R., Monteoliva L., Gil C. 2008. Immunoproteomics analysis of the protective response obtained from vaccination with *Candida albicans* ecm33 cell wall mutant in mice. *Proteomics* **8**:2651-2664.

Masai E., Harada K., Peng X., Kitayama H., Katayama Y., Fukuda M. 2002. Cloning and characterization of the ferulic acid catabolic genes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4416-4424.

McCabe L. R., Banerjee C., Kundu R., Harrison R. J., Dobner P. R., Stein J. L., Lian J. B., Stein G. S. 1996. Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology* **137**: 4398-4408.

McManus B. M., Gascoyne R. D. 1997. Pathology and laboratory medicine. *J.A.M.A.* **277**: 1887-1889.

McVicker J. K., Tabatabai L. B. 2006. Isolation and characterization of the P5 adhesin protein of *Haemophilus parasuis* serotype 5. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **36**: 363-374.

Melnikow E., Dornan S., Sargent C., Duszenko M., Evans G., Gunkel N., Selzer P. M., Ullrich H. J. 2005. Microarray analysis of *Haemophilus parasuis* gene expression under *in vitro* growth conditions mimicking the *in vivo* environment. *Vet. Microbiol.* **110**: 255-263.

## Bibliografía

Mendoza-Vargas A., Olvera L., Olvera M., Grande R., Vega-Alvarado L., Taboada B., Jimenez-Jacinto V., Salgado H., Juárez K., Contreras-Moreira B., Huerta A. M., Collado-Vides J., Morett E. 2009. Genome-wide identification of transcription start sites, promoters and transcription factor binding sites in *E. coli*. *PLOS One*. **19**: 7526-7532.

Mercado A., Gamba G. 1997. Molecular biology in medicine. VII. Molecular hybridization. *Rev. Invest. Clin.* **49**: 75-78.

Mikael L. G., Pawelek P. D., Labrie J., Sirois M., Coulton J. W., Jacques M. 2002. Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (fhu) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **148**: 2869-2882.

Miller J. F., Mekalanos J. J., Falkow S. 1989. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* **243**: 916-922.

Miniats O. P., Smart N. L., Ewert E. 1991. Vaccination of gnotobiotic primary specific pathogen-free pigs against *Haemophilus parasuis*. *Can. J. Vet. Res.* **55**: 33-36.

Miniats O. P., Smart N. L., Rosendal S. 1991. Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs. *Can. J. Vet. Res.* **55**: 37-41.

Moorkamp L., Nathues H., Spergser J., Tegeler R., Beilage E. G. 2008. Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *Vet. J.* **175**: 273-275.

Møller K., Andersen L. V., Christensen G., Kilian M. 1993. Optimization of the detection of NAD dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. *Vet. Microbiol.* **36**: 261-271.

Moreno G., Gamba G. 1996. Molecular biology in medicine. I. Molecular structure of the gene. *Rev. Invest. Clin.* **48**: 81-84.

Morozumi T., Nicolet J. 1986. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 138-142.

Morton D. J., Williams P. 1989. Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins. *FEMS Microbiol. Lett.* **53**: 123-127.

Müller G., Köhler H., Diller R., Rassbach A., Berndt A., Schimmel D. 2003. Influences of naturally occurring and experimentally induced porcine pneumonia on blood parameters. *Res. Vet. Sci.* **74**: 23-30.

Münch S., Grund S., Krüger M. 1992. Fimbriae and membranes on *Haemophilus parasuis*. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* **39**: 59-64.

Murata H. 2007. Stress and acute phase protein response: an inconspicuous but essential linkage. *Vet. J.* **173**: 473-474.

Murphy F. A., Gibbs E. P. J., Horzinek M. C., Studdent M. J. 1999. *Veterinary Virology*. 3<sup>a</sup> ed. Academic Press. San Diego.

Murtaugh M. P., Foss D. L. 2002. Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **87**: 109-121.

Myers L. E., Yang Y. P., Du R. P., Wang Q., Harkness R. E., Schryvers A. B., Klein M. H. y Loosmore S. M. 1998. The transferrin binding protein B of *Moraxella catarrhalis* elicits bactericidal antibodies and is a potential vaccine antigen. *Infect. Immun.* **66**: 4183-4192.

Nan X., Carubelli I., Stamos N. M. 2007. Sialidase expression in activated human T lymphocytes influences production of IFN-gamma. *J. Leukoc. Biol.* **81**: 284-296.

Narita M., Kawashima K., Matsuura S., Uchimura A., Miura Y. 1994. Pneumonia in pigs infected with pseudorabies virus and *Haemophilus parasuis* serovar 4. *J. Comp. Pathol.* **110**: 329-339.

Nielsen, R. 1993. Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes. *Acta. Vet. Scand.* **32**: 193-198.

Nielsen C. H., Fisher E. M., Leslie G. Q. 2000. The role of complement in the acquired immune response. *Immunology* **100**: 4-12.

## Bibliografía

Oliveira S., Galina L., Pijoan C. 2001. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* **13**: 495-501.

Oliveira S., Batista L., Torremorell M., Pijoan C. 2001. Experimental colonization of piglets and gilts with systemic strains of *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis* to prevent disease. *Can. J. Vet. Res.* **65**: 161-167.

Oliveira S., Galina L., Pijoan C. 2001. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* **13**: 495-501.

Oliveira, S., Blackall P. J. 2003. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping. *Am. J. Vet. Res.* **64**: 435-442.

Oliveira S., Galina L., Blanco I., Canals A., Pijoan C. 2003. Naturally-farrowed, artificially-reared pigs as an alternative model for experimental infection by *Haemophilus parasuis*. *Can. J. Vet. Res.* **67**: 146-150.

Olson, E. R. 1993. Influence of pH on bacterial gene expression. *Mol. Microbiol.* **8**: 5-14.

Olvera A., Calsamiglia M., Aragón V. 2006. Genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* field strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3984-3992.

Olvera A., Ballester M., Nofrarías M., Sibila M., Aragón V. 2009. Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains. *Vet. Res.* **40**: 24-27.

Olvera A., Pina S., Pérez-Simó M., Oliveira S., Bensaid A. 2010. Virulence-associated trimeric autotransporters of *Haemophilus parasuis* are antigenic proteins expressed *in vivo*. *Vet. Res.* **41**: 26-29.

Oswald, I. P. 2006. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *Vet. Res.* **37**: 359-368.

Pallarés F. J., Martínez-Subiela S., Seva J., Ramis G., Fuentes P., Bernabé A., Muñoz A., Cerón J. J. 2008. Relationship between serum acute phase protein concentrations and lesions in finishing pigs. *Vet. J.* **177**: 369-373.

Pampusch M. S., Bennaars A. M., Harsch S., Murtaugh M. P. 1998. Inducible nitric oxide synthase expression in porcine immune cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **61**: 279-289.

Petersen H. H., Nielsen J. P., Heegaard P. M. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* **35**: 163-187.

Platt-Samoraj A., Szweda W. 2009. The influence of experimental *Yersinia enterocolitica* infection on the pregnancy course in sows--preliminary studies. II. Antibodies, C-reactive proteins and haptoglobin as an immunological response. *Pol. J. Vet. Sci.* **12**: 491- 498.

Pilatte Y., Bignon J., Lambré C. R. 1993. Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology* **3**: 201-218.

Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. 2004. Microbiología. 5ª ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.

Postle K., Skare J. T. 1988. *Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus. *J. Biol. Chem.* **263**: 11000-11007.

Potter A. A., Schryvers A. B., Ogunnariwo J. A., Hutchins W. A., Lo R. T. C. , Watt T. 1999. Protective capacity of the *Pasteurella haemolytica* transferrin-binding proteins TbpA and TbpB in cattle. *Microb. Pathogen.* **27**: 197–206.

Price G. A., Russell M. W., Cornelissen C. N. 2005. Intranasal administration of recombinant *Neisseria gonorrhoeae* transferrin binding proteins A and B conjugated to the cholera toxin B subunit induces systemic and vaginal antibodies in mice. *Infect. Immun.* **73**: 3945-3953.

Pyle S. W., Schill W. B. 1985. Rapid serological analysis of bacterial lipopolysaccharides by electrotransfer to nitrocellulose. *J. Immunol. Methods* **85**: 371-382.

## Bibliografia

Radoja S., Frey A. B., Vukmanovic S. 2006. T-cell receptor signaling events triggering granule exocytosis. *Crit. Rev. Immunol.* **26**: 265-290.

Rafiee M., Bara M., Stephens C. P., Blackall P. J. 2000. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.* **78**: 846-849.

Rafiee M., Blackall P. J. 2000. Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.* **78**: 172-174.

Ramadori G., Christ B. 1999. Cytokines and the hepatic acute phase response. *Semin. Liver. Dis.* **19**: 141-155.

Ramsey B. W. 1996. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **335**: 179-188.

Rapp-Gabrielson V. J., Gabrielson D. A. 1992. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. *Am. J. Vet. Res.* **53**: 659-664.

Rapp-Gabrielson V. J., Gabrielson D. A., Schamber G. J. 1992. Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs. *Am. J. Vet. Res.* **53**: 987-994.

Rautemaa R., Meri S. 1999. Complement-resistance mechanisms of bacteria. *Microbes Infect.* **1**: 785-794.

Retzer M. D., Yu R., Zhang Y., Gonzalez G. C., Schryvers A. B. 1998. Discrimination between apo and iron-loaded forms of transferrin by transferrin binding protein B and its N-terminal subfragment. *Microb. Pathogen.* **25**: 175-180.

Rokbi B., Mazarin V., Maitre-Wilmotte G., Quentin-Millet M. J. 1993. Identification of two major families of transferrin receptors among *Neisseria meningitidis* strains based on antigenic and genomic features. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**: 51-57.

Rossi-Campos A., Anderson C., Gerlach G. F., Klashinsky S., Potter A. A., Willson P. J. 1992. Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine* **10**: 512-518.

Rúbies X., Kielstein P., Costa L., Riera P., Artigas C., Espuña E. 1999. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. *Vet. Microbiol.* **66**: 245-248.

Ruiz A., Oliveira S., Torremorell M., Pijoan C. 2001. Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1757-1762.

Rutz J. M., Liu J., Lyons J. A., Goranson J., Armstrong S. K., McIntosh M. A., Feix J. B., Klebba P. E. 1992. Formation of a gated channel by a ligand-specific transport protein in the bacterial outer membrane. *Science* **258**: 471-475.

Scougaard K., Mortensen S., Boye Mette C. 2009. Radip and widely disseminated acute phase protein response after experimental bacterial infection of pigs. *Veterinary Res.* **24**: 40-43.

Sechi S., Chait B.T. 1998. Modification off cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal. Chem.* **70**: 5150-5158.

Segalés J., Domingo M., Solano G. I., Pijoan C. 1997. Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of experimentally infected swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* **9**: 237-243.

Sjölund-Karlsson M., Folster J. P., Pecic G., Joyce K., Medalla F., Rickert R., Whichard J. M. 2009. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates from humans in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 2142-2144.

Sjölund-Karlsson M., Wallgren P. 2010. Field experience with two different vaccination strategies aiming to control infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a fattening pig herd. *Acta Vet. Scand.* **25**: 52-71.

Smart N. L., Miniats O. P., MacInnes J. I. 1988. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. *Can. J. Vet. Res.* **52**: 319-324.

## Bibliografia

Smart N. L., Miniats O. P. 1989. Preliminary assessment of a *Haemophilus parasuis* bacterin for use in specific pathogen free swine. *Can. J. Vet. Res.* **53**: 390-393.

Solano G. I., Segalés J., Collins J. E., Molitor T. W., Pijoan C. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.* **55**: 247-257.

Solano-Aguilar G. I., Pijoan C., Rapp-Gabrielson V., Collins J., Carvalho L. F., Winkelman N. 1999. Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection. *Am. J. Vet. Res.* **60**: 81-87.

Solheim J. 1999. Class I MHC molecules: assembly and antigen presentation. *Immunogenetics* **35**: 151-162.

Sorensen N. S., Tegtmeier C., Andresen L. O., Piñeiro M., Toussaint M. J., Campbell F. M., Lampreave F., Heegaard P. M. 2006. The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **113**: 157-168.

Stamatos N. M., Curreli S., Zella D., Cross A. S. 2003. Desialylation of glycoconjugates on the surface of monocytes activates the extracellular signal-related kinases ERK 1/2 and results in enhanced production of specific cytokines. *J. Leukoc. Biol.* **75**: 307-313.

Stokes C., Bourne J. F. 1989. Mucosal immunity. In: *Veterinary Clinical Immunology*. R.E.W. Haliwell, N.T. Gorman, eds. Philadelphia; W. B. Saunders Company, 164-192.

Stumpe S., Schmid R., Stephens D. L., Georgiou G., Bakker E. P. 1998. Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 4002-4006.

Tadjine M., Mittal K. R., Bourdon S., Gottschalk M. 2004. Production and characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis* and study of their protective role in mice. *Microbiology* **150**: 3935-3945.

Takahashi K., Naga S., Yagihashi T., Ikehata T., Nakano Y., Senna K., Maruyama T., Murofushi J. 2001. A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions. *J. Vet. Med. Sci.* **63**: 487-491.

Takamatsu H. H., Denyer M. S., Stirling C., Cox S., Aggarwal N., Dash P., Wileman T. E., Barnett P. V. 2006. Porcine gammadelta T cells: possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **112**: 49-61.

Teixeira-Gomes A. P., Cloeckert A., Bézard G., Dubray G., Zygmunt M. S. 1997. Mapping and identification of *Brucella melitensis* proteins by two-dimensional electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis* **18**: 156-162.

Thompson D., Whicher J. T., Banks R. E. 1992. Acute phase reactants in predicting disease outcome. *Baillieres Clin. Rheumatol.* **6**: 393-404.

Turni C., Blackall P. J. 2007. Comparison of sampling sites and detection methods for *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.* **85**: 177-184.

Vahle J. L., Haynes J. S., Andrews J. J. 1995. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriological and morphologic findings. *J. Vet. Diagn. Invest.* **7**: 476-480.

Vahle J. L., Haynes J. S., Andrews J. J. 1997. Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrum deprived (CDCD) swine. *Can. J. Vet. Res.* **61**: 200-206.

Van Reeth K., Van Gucht S., Pensaert M. 2002. *In vivo* studies on cytokine involvement during acute viral respiratory disease of swine: troublesome but rewarding. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **87**: 161-168.

Vanier G., Szczołka A., Friedl P., Lacouture S., Jacques M., Gottschalk M, 2006. *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells. *Microbiology* **152**: 135-142.

Wang Y., Goodman S. D., Redfield R. J., Chen C. 2002. Natural transformation and DNA uptake signal sequences in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Bacteriol.* **184**: 3442-3449.

West D., Reddin K., Matehson M., Heath R., Funnell S., Hudson M., Robinson A., Gorringe A. 2001. Recombinant *Neisseria meningitidis* transferring binding protein A protects against experimental meningococcal infection. *Infect. Immun.* **69**: 1561–1567.

Williams R. D., Rollins L. D., Pocurull D. W., Selwyn M., Mercer H. D. 1978. Effect of feeding chlortetracycline on the reservoir of *Salmonella typhimurium* in experimentally infected swine. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **14**: 710-719.

Williams J. N, Skipp P. J, O'Connor C. D, Christodoulides M, Heckels J. E. 2009. Immunoproteomic analysis of the development of natural immunity in subjects colonized by *Neisseria meningitidis* reveals potential vaccine candidates. *Infect. Immun.* **77**: 5080-5089.

Yamashita M., Hida Y., Sugimoto H., Takahashi N., Kimura H., Nakatomi Y., Yoshida H., Hizaki T. 2010. A specific serum IgA antibody discriminates pneumonia from colonization state in patients with *Pseudomonas aeruginosa* in sputum culture. *J. Microbiol. Methods* **9**: 187-199.

Yost-Daljev M. K., Cornelissen C. N. 2004. Determination of surface-exposed, functional domains of gonococcal transferrin-binding protein A. *Infect. Immun.* **72**: 1775–1785.

Zhang A., Xie C., Chen H., Jin M. 2008. Identification of immunogenic cell wall-associated proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *Proteomics* **8**: 3506-3515.

Zhou M., Guo Y., Zhao J., Hu Q., Hu Y., Zhang A., Chen H., Jin M. 2009. Identification and characterization of novel immunogenic outer membrane proteins of *Haemophilus parasuis* serovar 5. *Vaccine* **27**: 5271-5277.

Zucker B., Krüger M., Rehak E., Horsch F. 1994. The lipopolysaccharide structure of *Haemophilus parasuis* strains in SDS-PAGE. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **107**: 78-81.

## **VIII. ANEXOS**



Tabla 4.4. Temperatura rectal de los cerdos desde el desafío hasta el sacrificio

Grupo	N°	Tiempo tras la infección															
		0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	96h	5° día	6° día	7° día	9° día	11° día	13° día	15° día
TbpA-r	1	40,1	39,7	39,7	39,9	39,8	40,6	40,1	39,5	39,8	39,5	39,1	39,3	39,2	39,2	39,2	39,4
	2	38,8	39,4	40,2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	3	39,6	39,5	41,1	41,8	40,0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	4	38,7	39,4	39,7	39,7	39,3	39,8	39,1	40,9	X	X	X	X	X	X	X	X
	5	38,7	41,2	41,1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	6	39,5	39,4	39,3	40,0	39,9	39,3	39,2	39,3	40,1	39,7	38,8	39,3	39,1	39,5	39,0	39,2
TbpB-r	7	38,5	39,3	39,4	39,2	39,0	39,1	39,1	38,4	39,1	39,1	39,1	39,0	39,2	39,2	39,5	39,5
	8	38,0	39,1	39,1	40,0	38,2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	9	38,7	39,2	39,1	40,3	40,0	40,0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	10	36,6	39,7	39,1	41,3	40,7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	12	38,4	39,3	41,5	41,5	40,6	39,8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vacuna comercial	18	38,4	39,1	39,1	38,9	39,1	38,9	38,1	39,0	38,7	38,9	38,7	39,0	39,3	39,0	39,0	39,1
	19	37,8	39,2	39,1	39,4	38,8	39,0	39,4	39,1	39,2	38,8	39,0	39,1	39,2	39,3	38,9	39,4
	20	38,7	39,5	39,5	39,0	38,8	39,4	39,6	39,2	39,1	39,3	38,7	39,5	39,4	39,7	39,1	39,3
	21	38,8	39,3	39,1	39,3	39,0	39,3	39,4	39,1	39,0	39,3	39,2	38,9	39,3	39,4	39,1	39,3
	22	38,9	39,2	39,2	39,3	39,1	39,0	39,0	39,1	39,0	39,1	39,0	39,0	39,3	39,2	38,9	39,1
	23	38,7	39,4	39,5	39,2	39,2	39,3	39,1	38,9	38,7	39,3	39,3	39,3	39,3	39,3	38,8	38,9
Tbp-nat (im)	24	40,0	39,2	39,6	39,1	38,9	39,3	39,0	38,9	38,2	39,4	39,1	38,8	39,3	39,4	39,1	39,1
	25	40,1	39,6	38,8	39,3	39,2	39,4	38,8	39,4	39,3	39,5	39,4	39,2	39,4	39,7	39,5	39,5
	26	39,7	39,3	39,7	39,2	39,3	39,1	39,8	39,2	39,0	39,3	39,1	39,2	39,3	39,6	39,2	39,2
	27	39,8	39,3	39,1	39,3	39,1	39,2	38,9	39,2	38,5	39,1	39,3	39,4	39,4	39,8	39,3	39,9
	28	39,4	39,3	39,6	39,0	38,9	39,2	38,9	38,8	38,0	39,4	39,1	39,2	39,2	40,2	40,6	40,0
	29	39,5	39,2	39,6	38,8	38,7	38,7	39,1	39,1	38,7	39,4	39,3	39,5	39,4	39,4	40,3	39,8
Tbp-nat (it)	30	39,8	30,0	39,5	39,1	39,0	39,0	38,7	40,7	40,1	40,3	39,6	39,2	39,3	39,3	39,8	X
	31	39,2	38,4	39,2	39,0	39,2	39,1	38,8	39,1	39,0	39,2	38,8	39,1	39,2	39,1	39,4	38,9
	32	39,7	39,1	39,3	38,8	38,7	38,3	38,1	39,4	38,7	39,3	39,0	39,2	39,2	39,6	38,6	39,2
	33	39,4	39,5	39,1	39,4	39,5	39,0	39,4	39,4	38,2	39,2	39,2	39,0	39,2	39,6	38,8	39,2
	34	40,0	39,2	39,2	39,4	39,6	39,1	39,2	39,1	39,0	39,5	40,0	39,2	39,4	39,1	39,1	39,5
	35	38,4	39,1	39,1	38,9	39,1	38,9	38,1	39,0	38,7	38,9	40,0	39,2	39,4	39,1	39,1	39,5
Control	13	38,1	39,3	40,5	41,0	41,7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	14	38,6	38,9	40,6	40,7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	15	38,8	39,3	39,1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	16	38,6	38,9	40,6	40,7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

TbpA-r: proteína de unión a la transferrina A recombinante

TbpB-r: proteína de unión a la transferrina B recombinante

Tbp-nat (im): proteínas nativas de unión a la transferrina inoculadas por vía intramuscular

Tbp-nat (it): proteínas nativas de unión a la transferrina inoculadas por vía intratraqueal

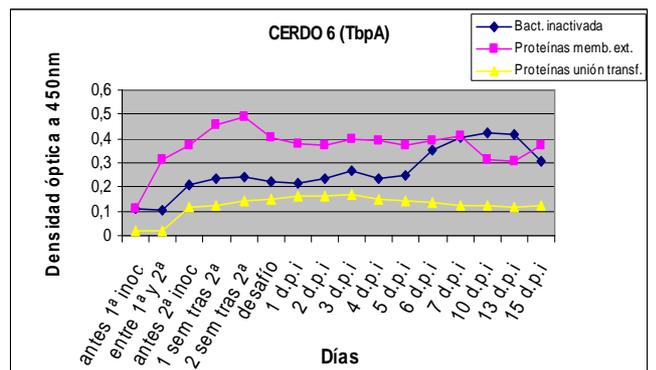
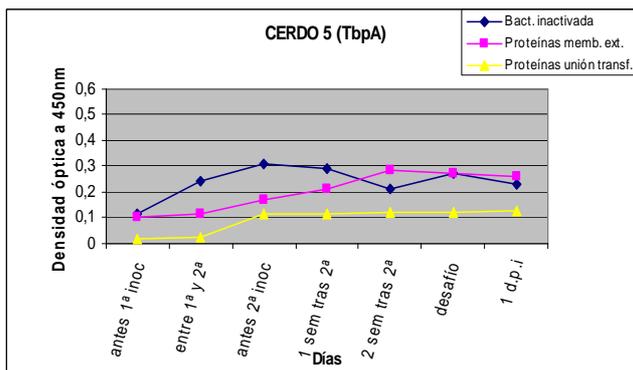
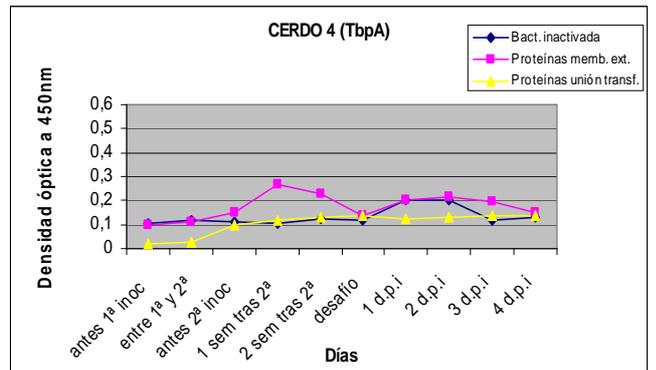
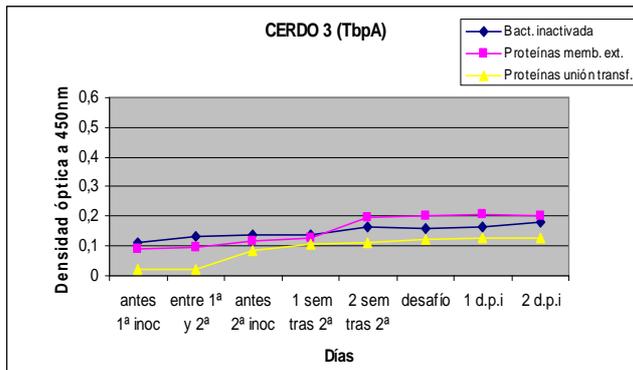
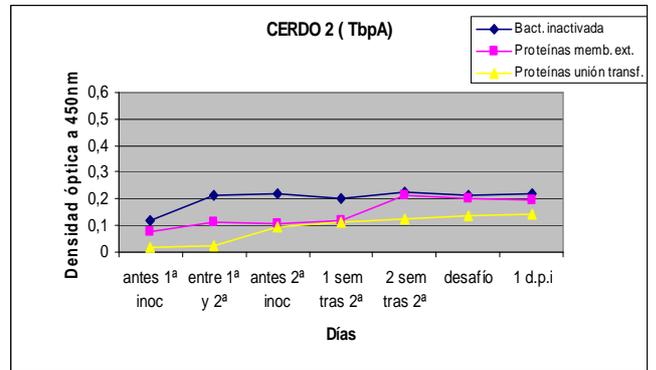
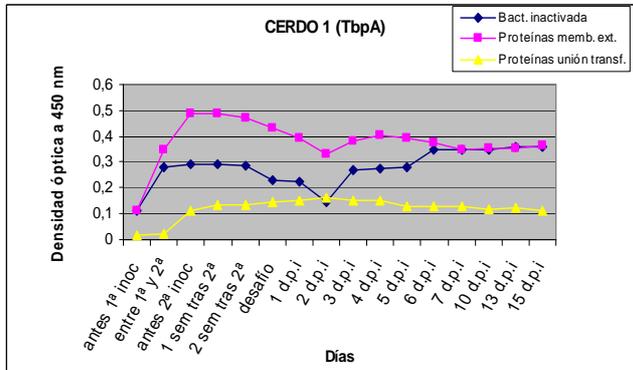
**Tabla 4.4. bis.** Media  $\pm$  desviación estándar de la temperatura rectal en cada grupo experimental

Tiempo tras infección	Media $\pm$ desviación estándar de la T <sup>a</sup> rectal de cada grupo experimental					
	TbpA-r	TbpB-r	Vacuna Comercial	Tbp-nat (im)	Tbp-nat (it)	Control
0h	39,23 $\pm$ 0,58	38,04 $\pm$ 0,84	38,55 $\pm$ 0,40	39,83 $\pm$ 0,27	39,58 $\pm$ 0,23	38,43 $\pm$ 0,39
12h	30,70 $\pm$ 0,71	39,32 $\pm$ 0,22	39,28 $\pm$ 0,50	39,45 $\pm$ 0,21	38,82 $\pm$ 0,31	39,13 $\pm$ 0,39
24h	40,18 $\pm$ 0,76	39,64 $\pm$ 1,04	39,25 $\pm$ 0,39	39,43 $\pm$ 0,27	39,27 $\pm$ 0,28	40,37 $\pm$ 0,53
36h	39,81 $\pm$ 0,15	40,46 $\pm$ 0,95	39,18 $\pm$ 0,19	39,32 $\pm$ 0,18	39,25 $\pm$ 0,23	40,72 $\pm$ 0,86
48h	39,72 $\pm$ 0,17	39,71 $\pm$ 1,07	39,0 $\pm$ 0,17	39,37 $\pm$ 0,32	39,21 $\pm$ 0,26	40,42 $\pm$ 0,29
60h	39,90 $\pm$ 0,12	39,7 $\pm$ 1,07	39,21 $\pm$ 0,21	39,20 $\pm$ 0,32	39,17 $\pm$ 0,18	X
72h	39,43 $\pm$ 0,15	39,13	39,1 $\pm$ 0,16	39,21 $\pm$ 0,16	39,06 $\pm$ 0,16	X
84h	39,91 $\pm$ 0,15	38,47	39,02 $\pm$ 0,18	39,10 $\pm$ 0,21	39,67 $\pm$ 0,23	X
96h	39,91 $\pm$ 0,12	39,18	38,95 $\pm$ 0,14	38,61 $\pm$ 0,23	39,53 $\pm$ 0,45	X
5° día	39,65 $\pm$ 0,10	39,19	39,11 $\pm$ 0,12	39,35 $\pm$ 0,26	39,47 $\pm$ 0,45	X
6° día	39,0 $\pm$ 0,23	39,13	38,92 $\pm$ 0,54	39,20 $\pm$ 0,35	39,80 $\pm$ 0,35	X
7° día	39,31	39,00	39,14 $\pm$ 0,65	39,21 $\pm$ 0,42	39,37 $\pm$ 0,42	X
9° día	39,15 $\pm$ 0,12	39,15	39,33 $\pm$ 0,23	39,33 $\pm$ 0,19	39,42 $\pm$ 0,25	X
11° día	39,31 $\pm$ 0,32	39,30	39,31 $\pm$ 0,45	39,68 $\pm$ 0,34	39,23 $\pm$ 0,34	X
13° día	39,11 $\pm$ 0,21	39,15	39,12 $\pm$ 0,26	39,66 $\pm$ 0,31	39,04 $\pm$ 0,37	X
15° día	39,32 $\pm$ 0,19	39,30	39,39 $\pm$ 0,37	39,58 $\pm$ 0,23	39,33 $\pm$ 0,30	X

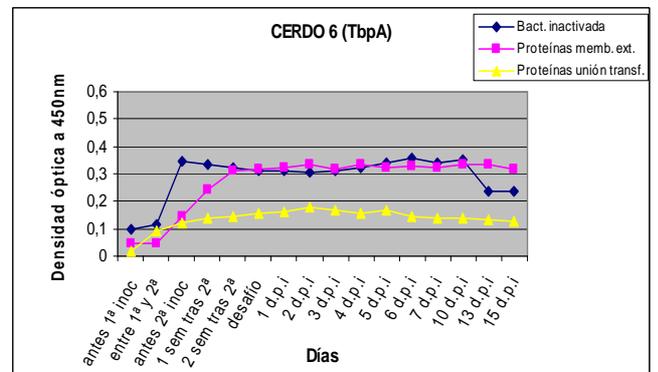
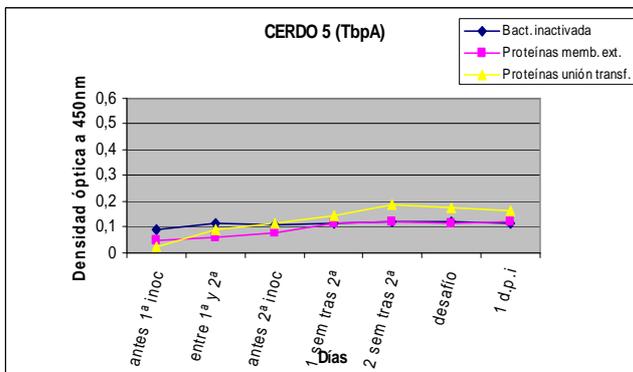
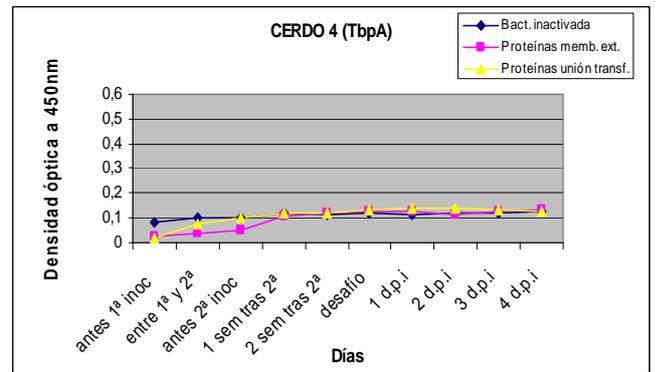
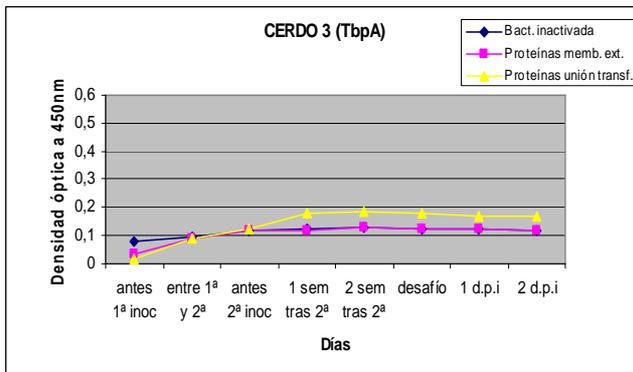
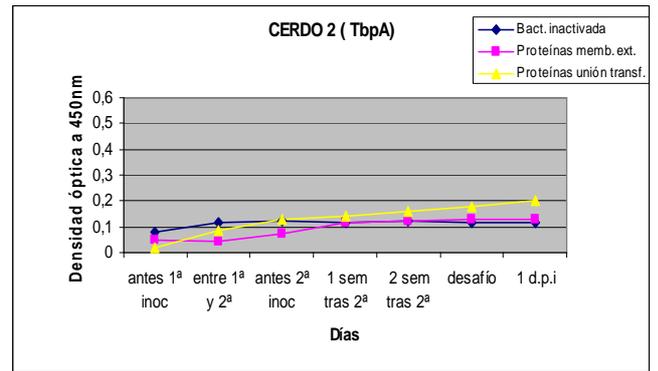
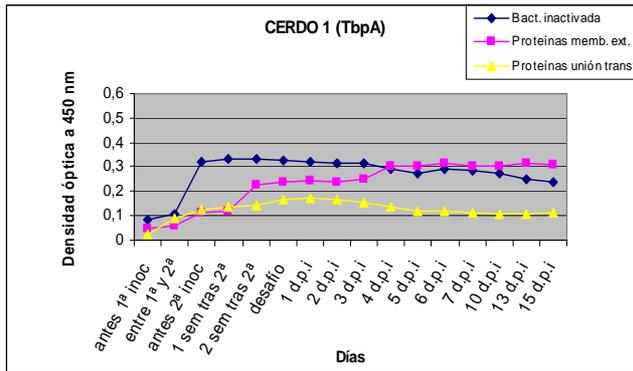
**Figura 4.132:** Evolución de las IgGt, IgM, IgG1 e IgG2 en todos los animales del estudio.

• **GRUPO TbpA-r**

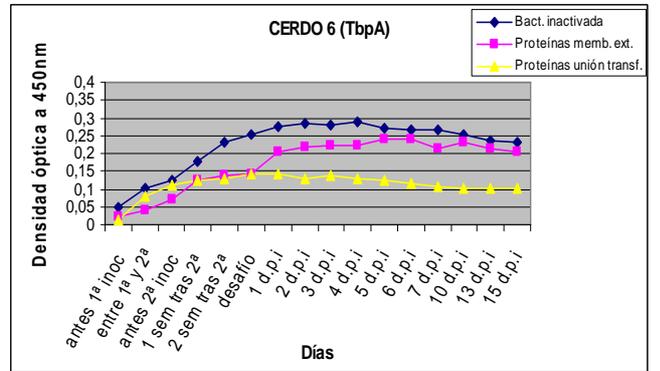
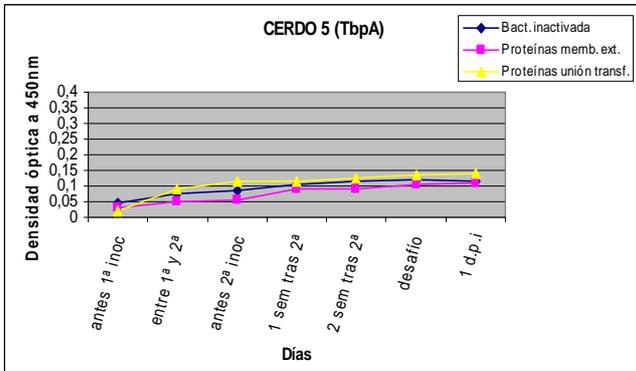
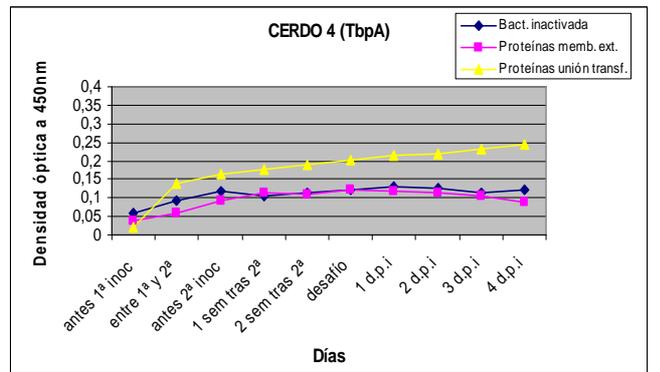
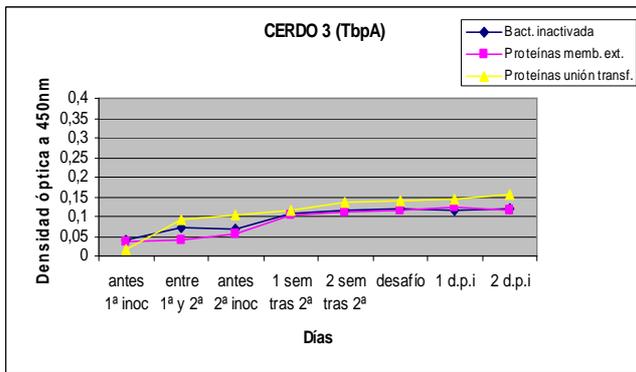
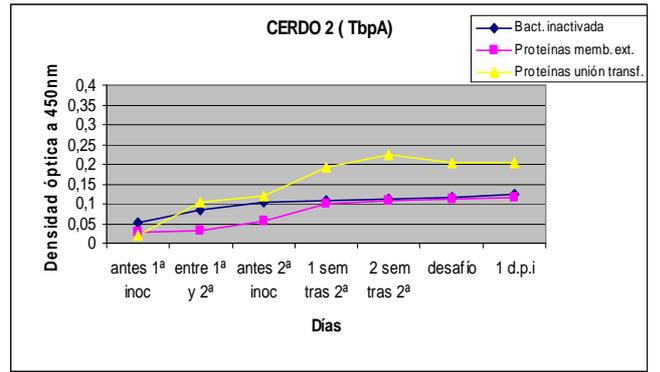
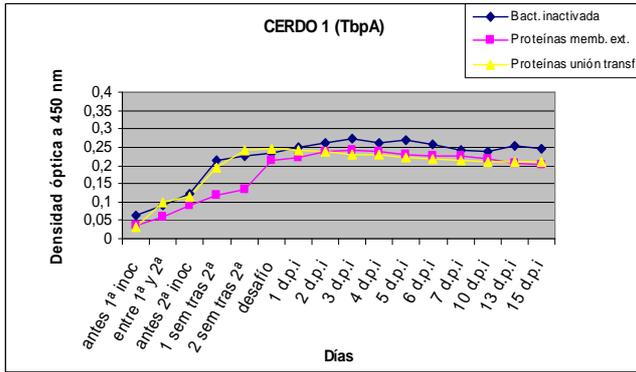
**IgGtotales**



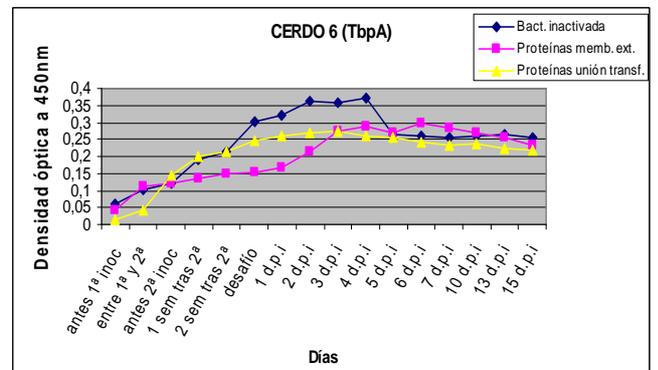
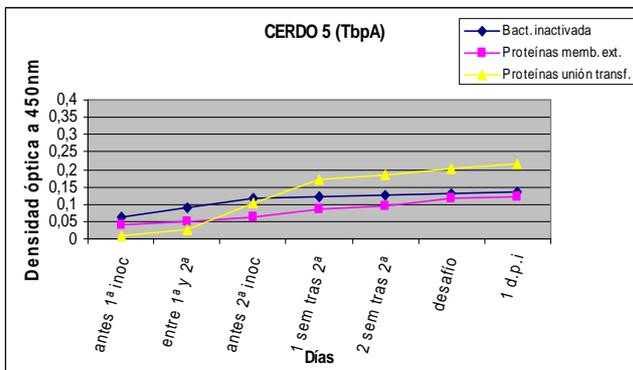
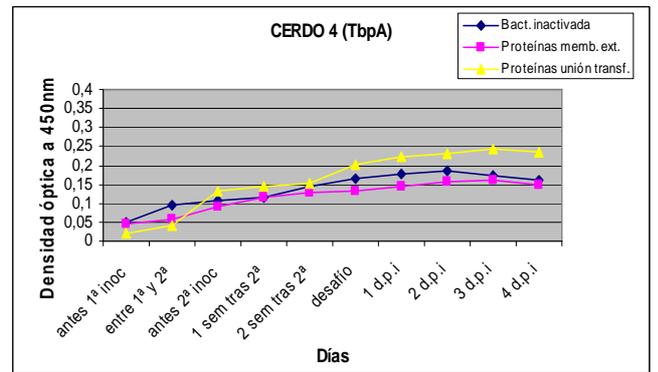
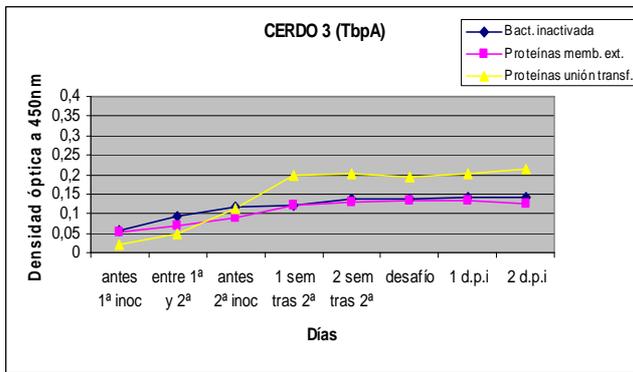
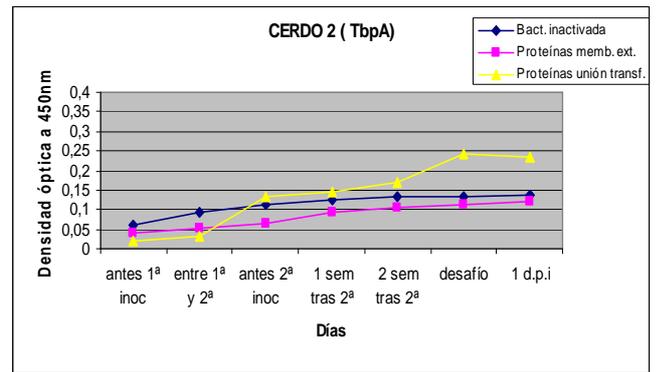
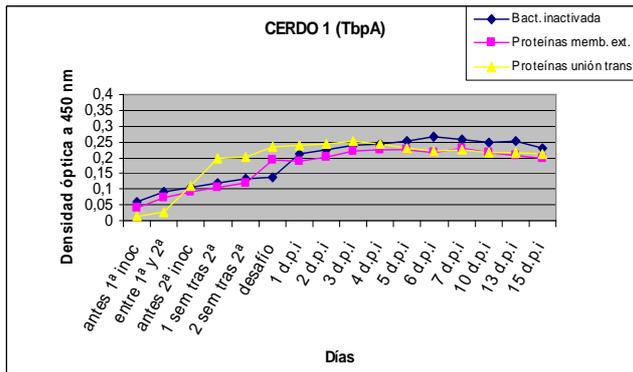
IgM



IgG1

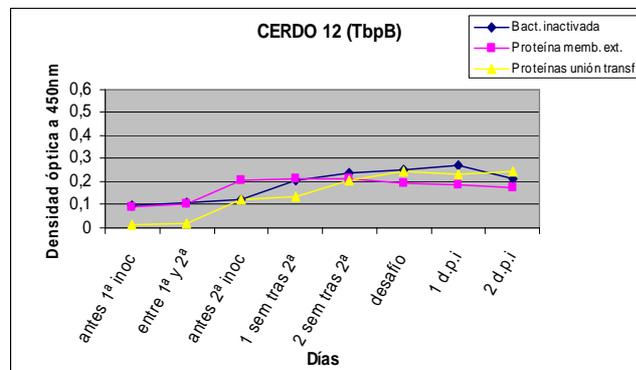
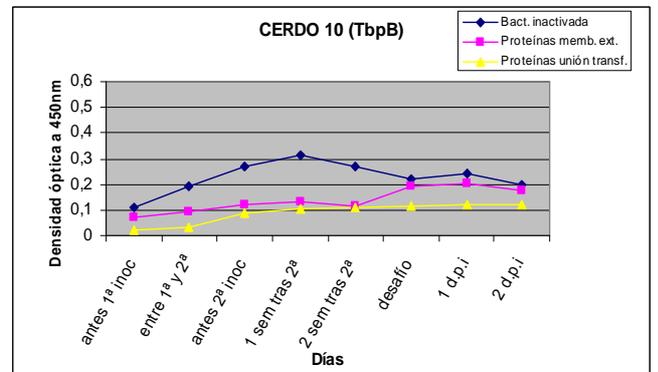
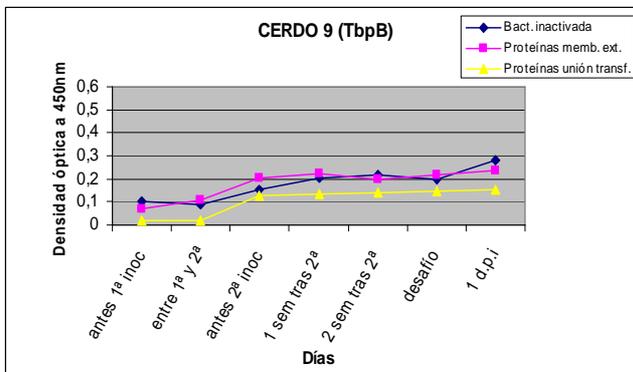
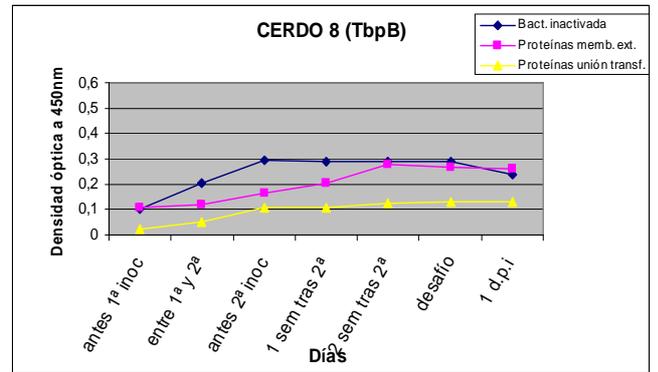
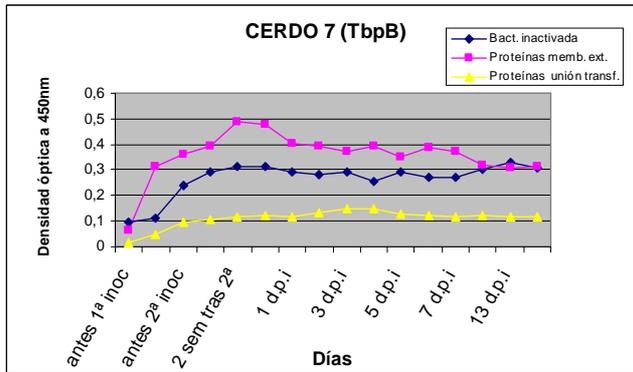


IgG2

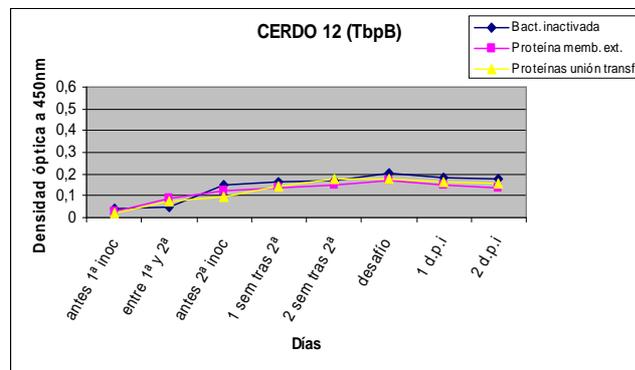
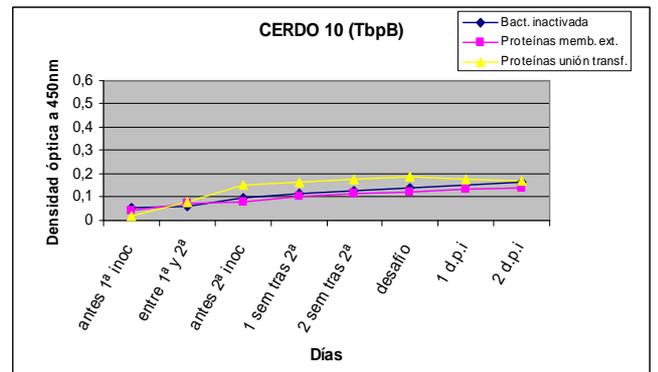
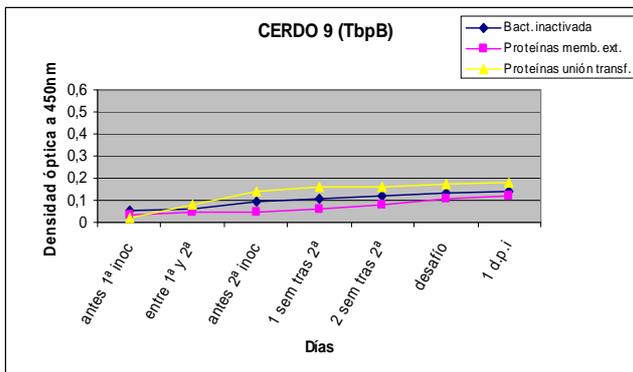
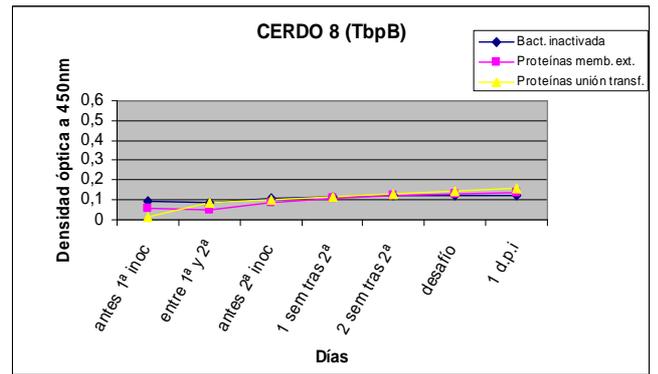
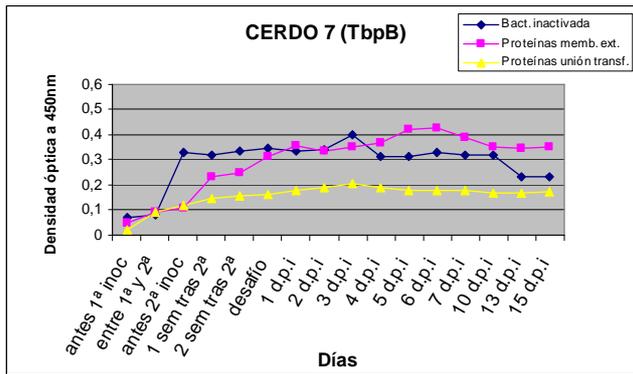


• GRUPO TbpB-r

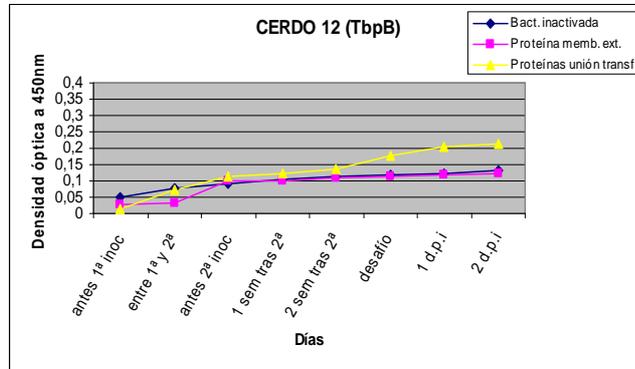
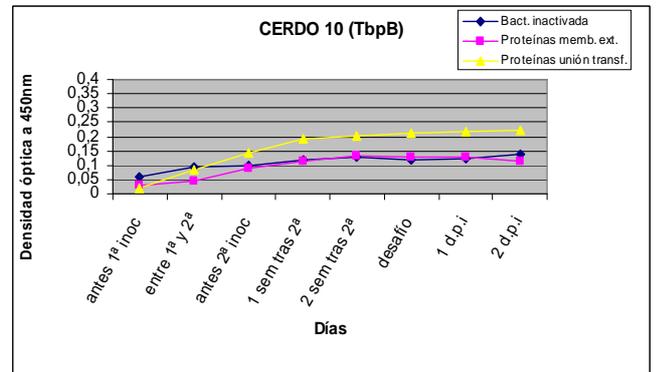
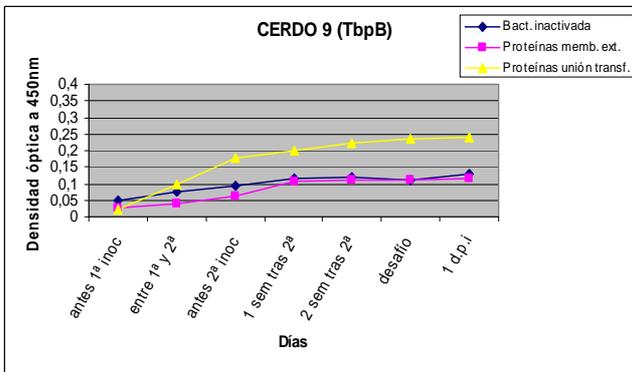
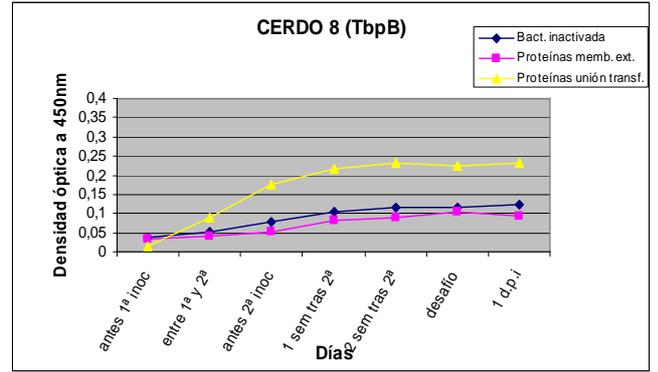
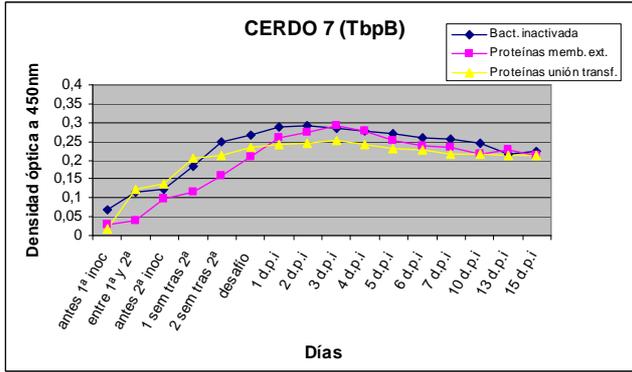
IgGtotales



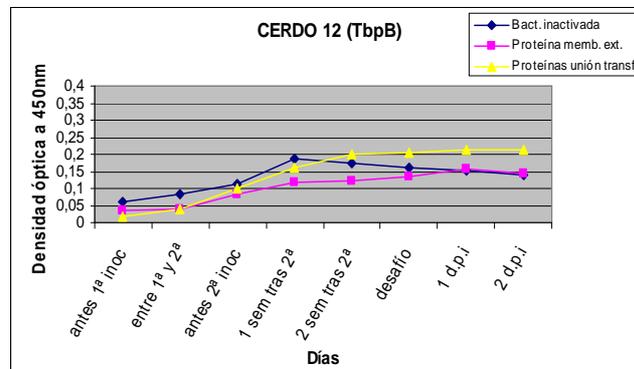
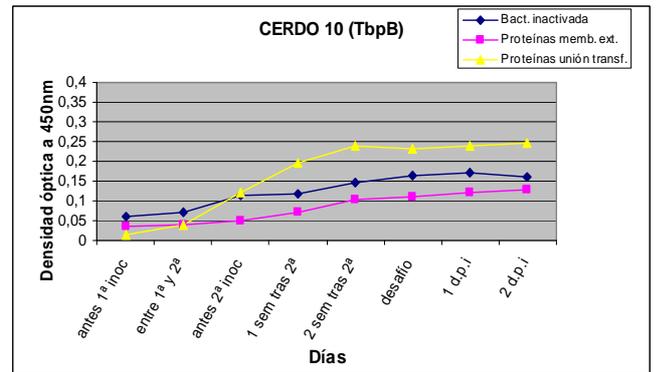
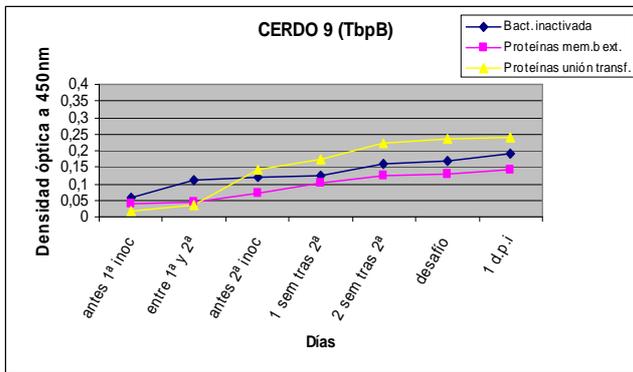
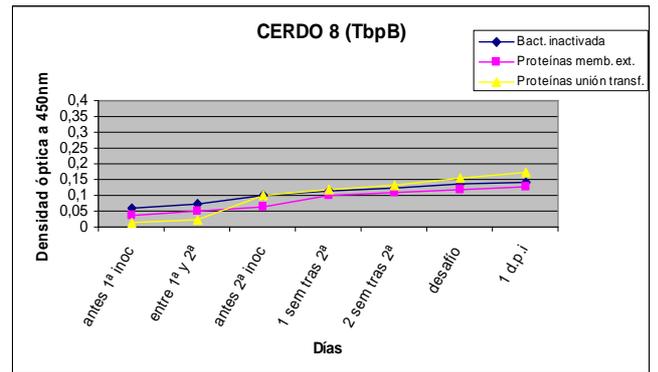
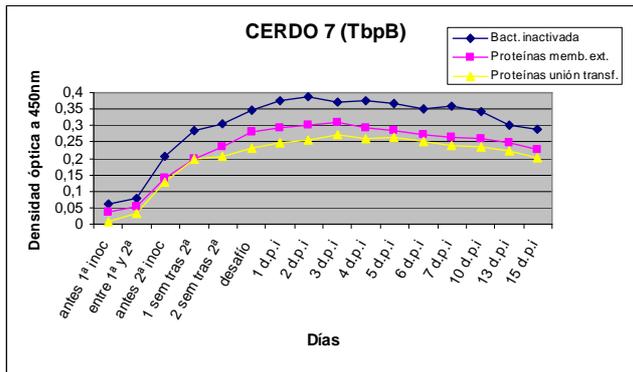
IgM



IgG1

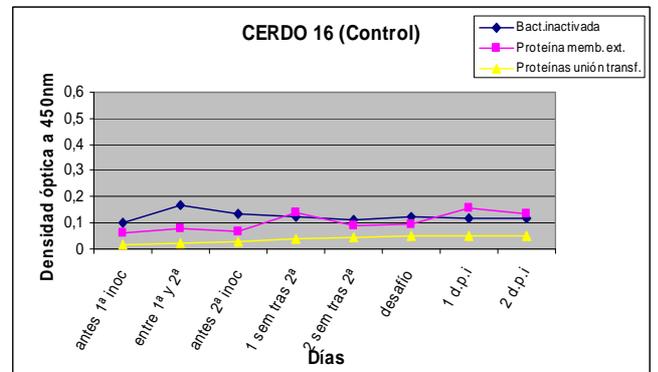
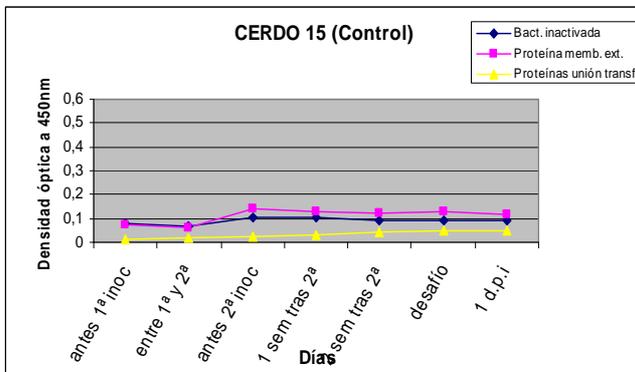
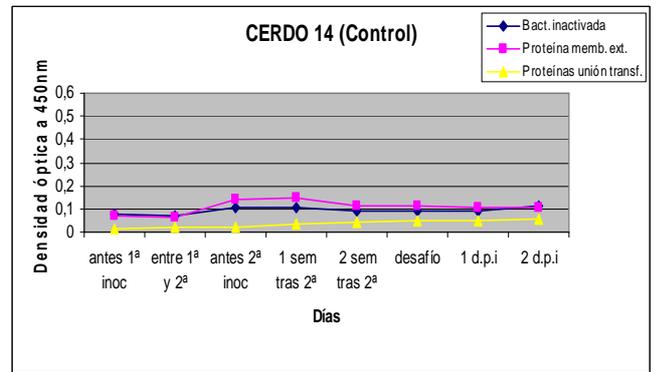
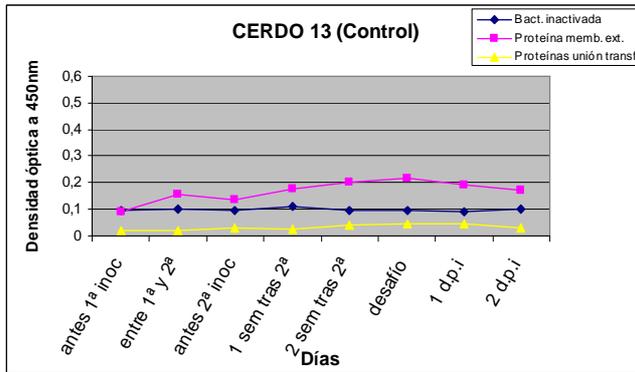


IgG2

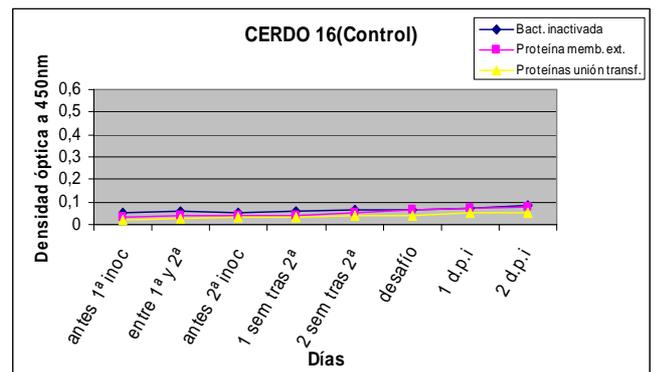
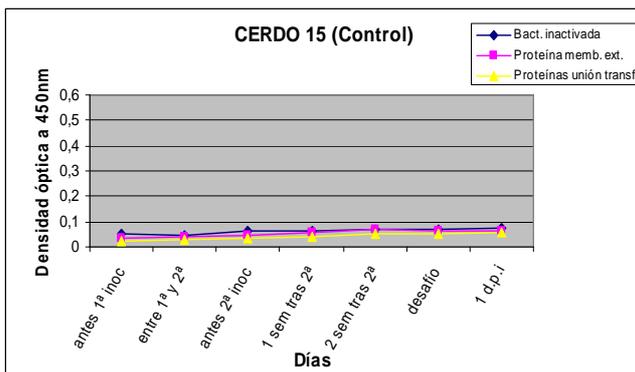
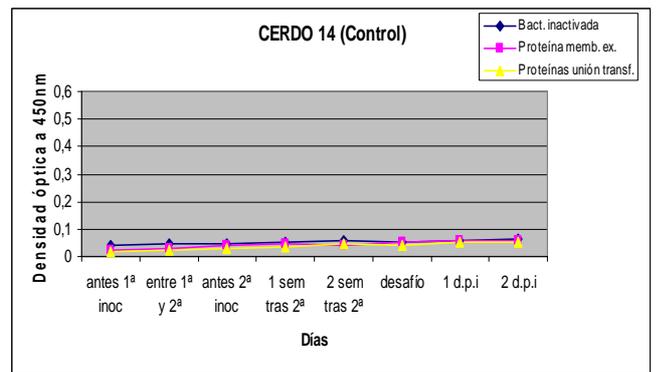
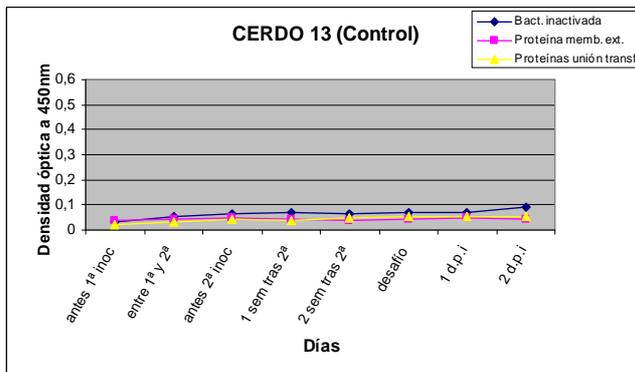


• GRUPO Control

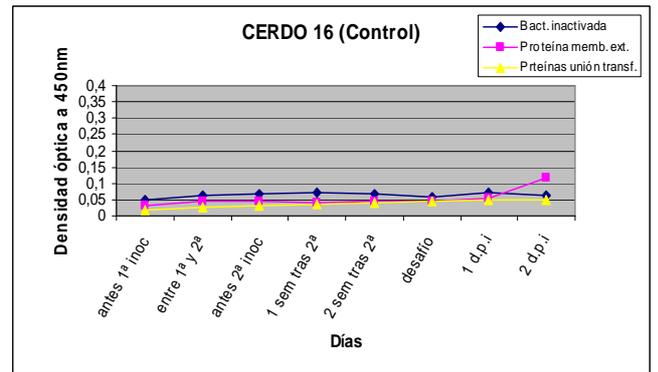
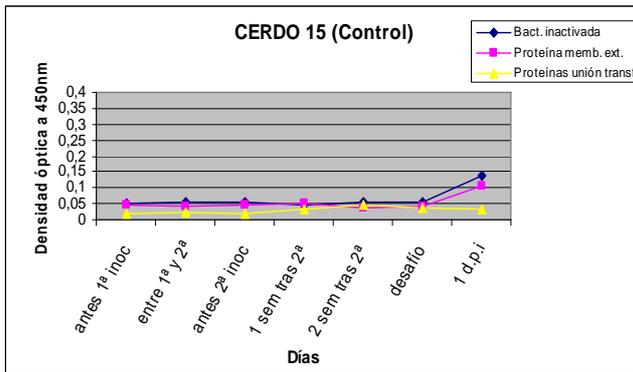
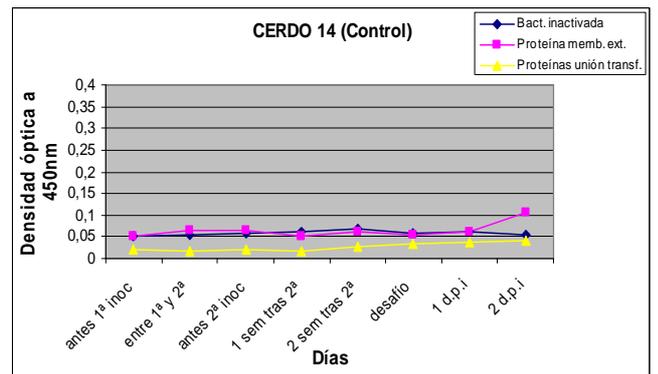
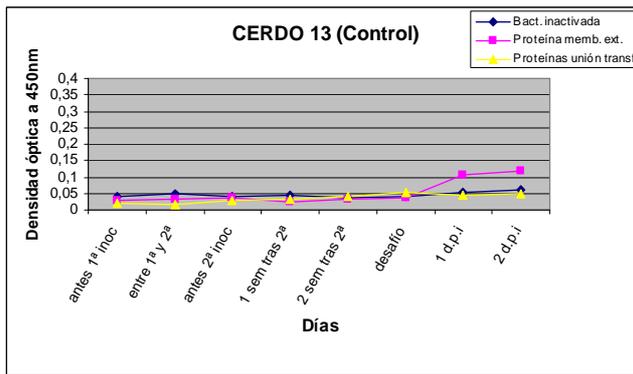
IgGtotales



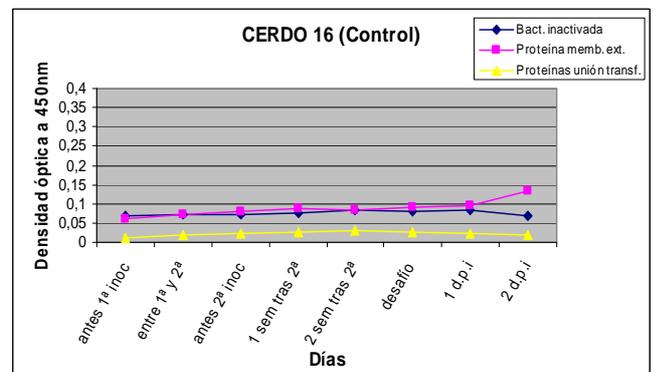
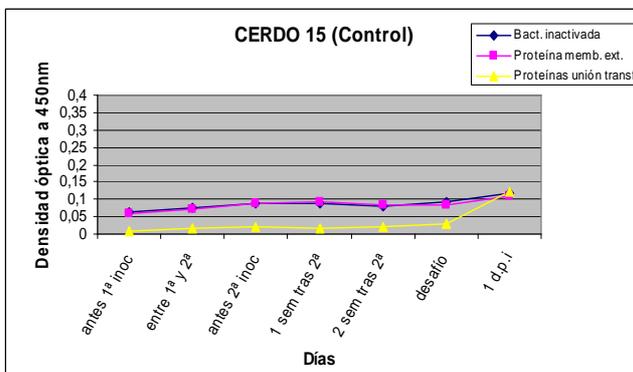
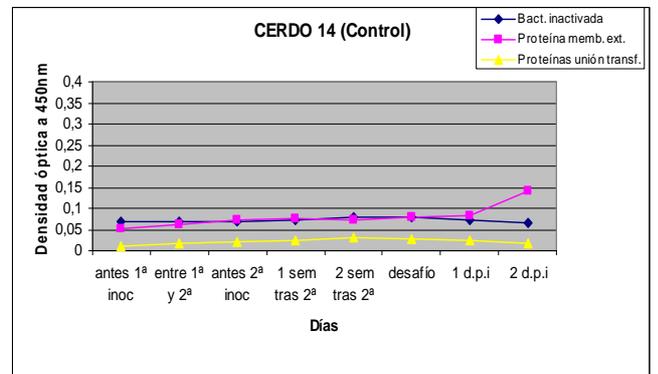
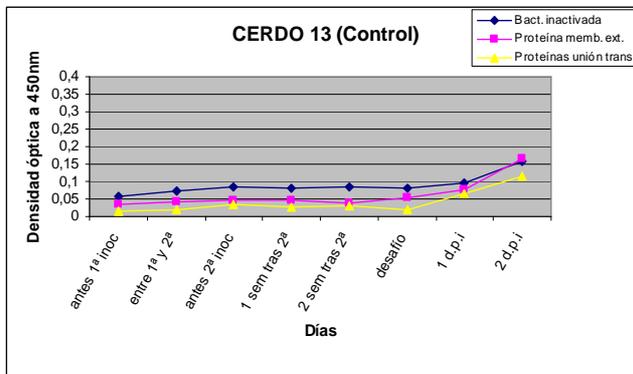
IgM



IgG1

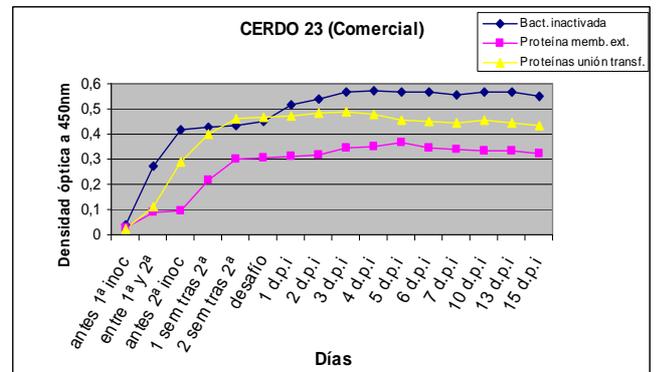
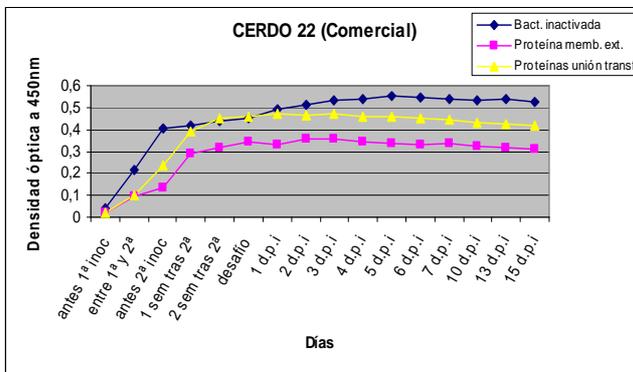
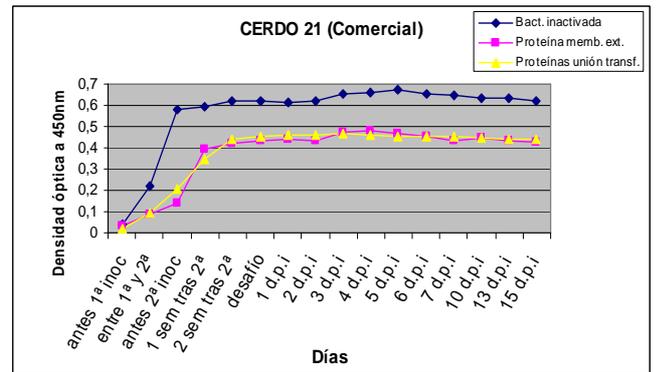
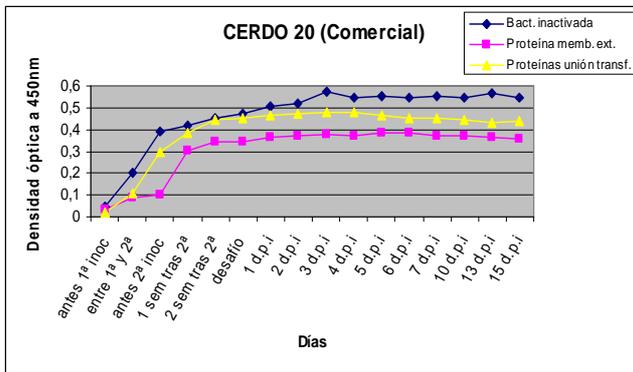
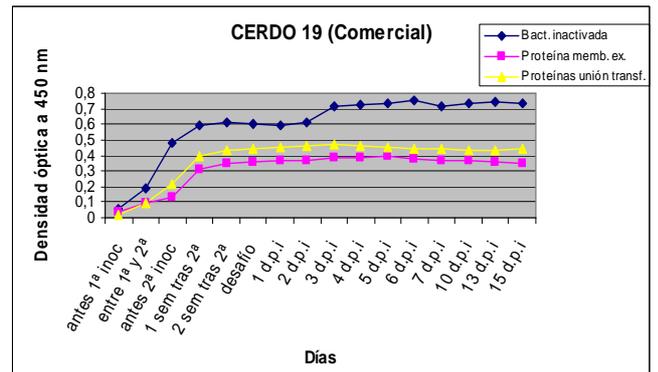
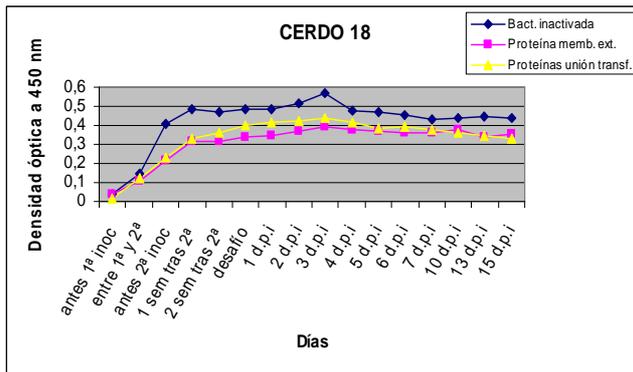


IgG2

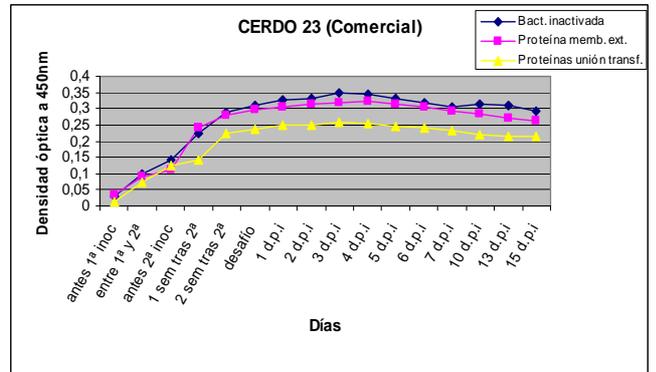
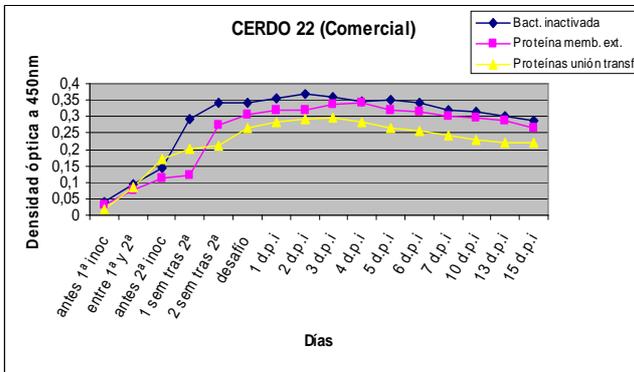
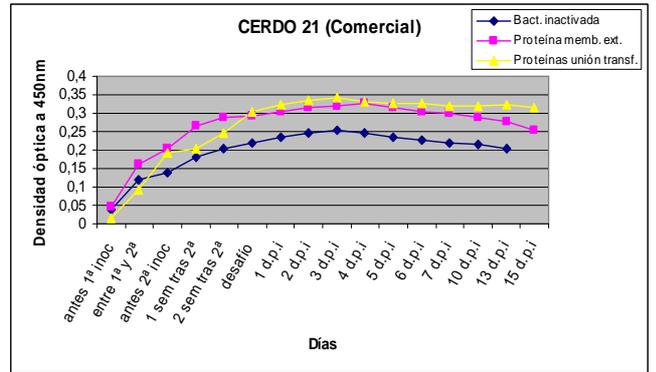
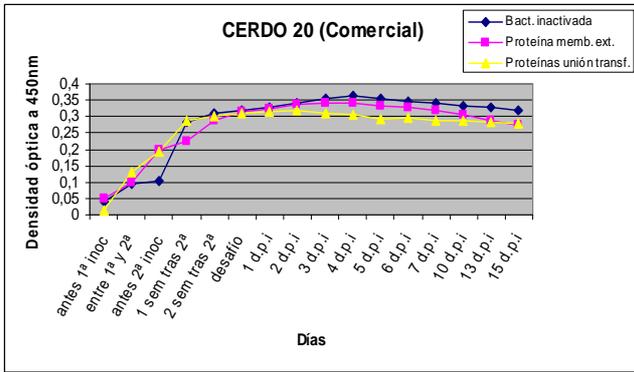
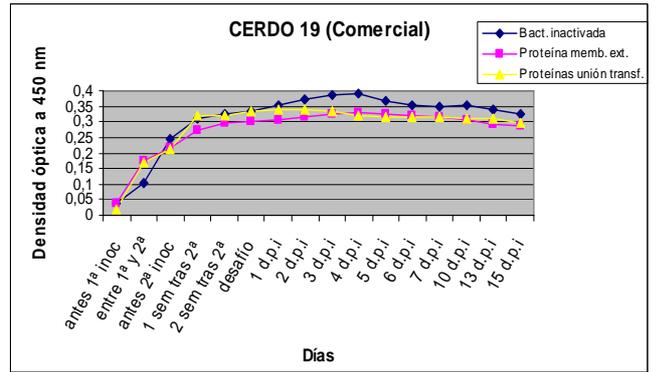
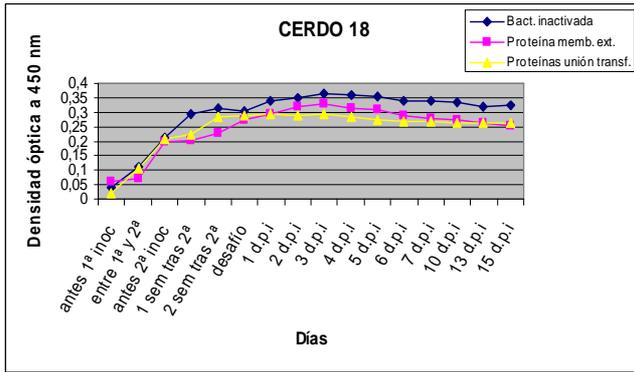




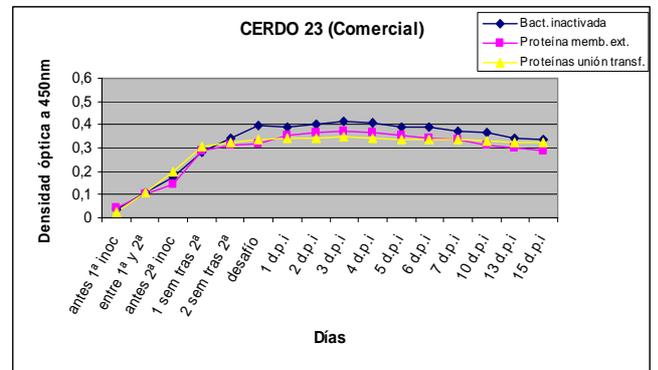
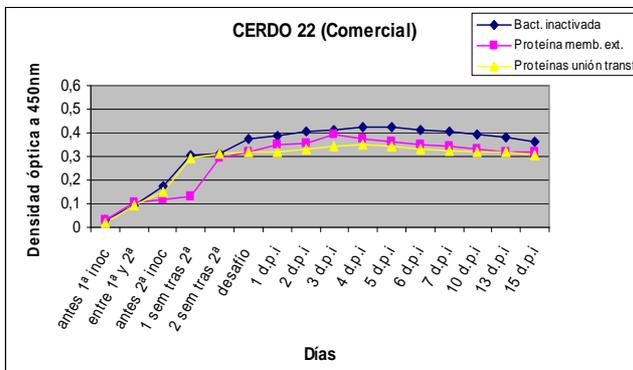
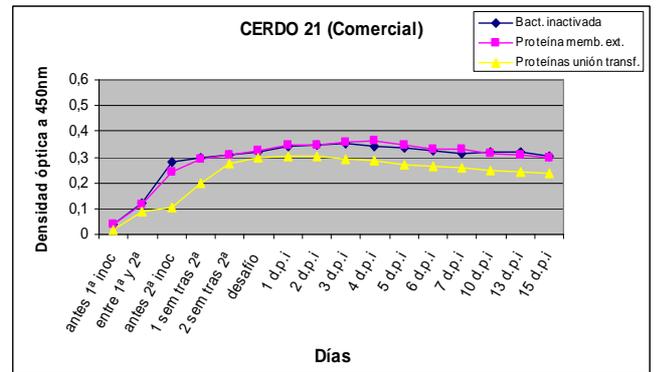
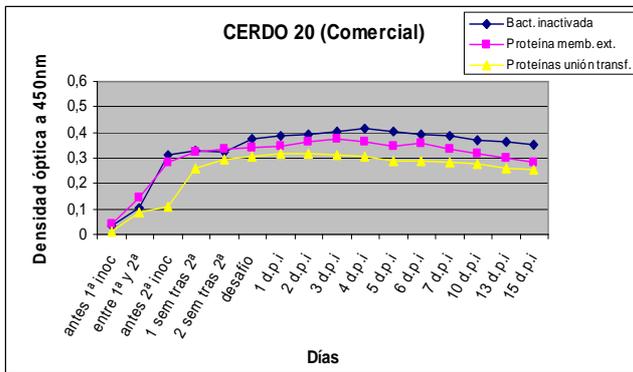
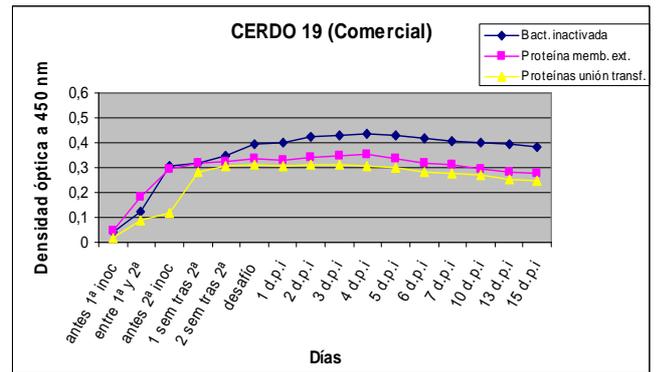
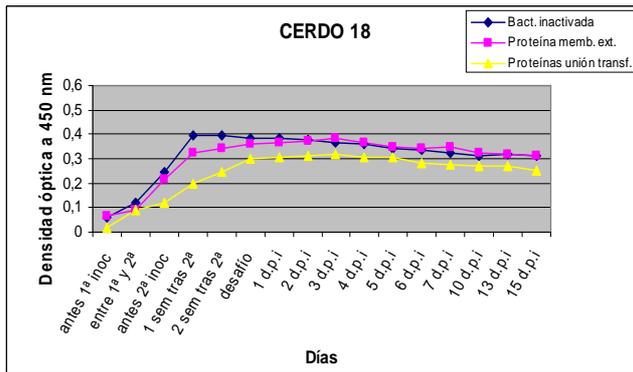
IgM



IgG1

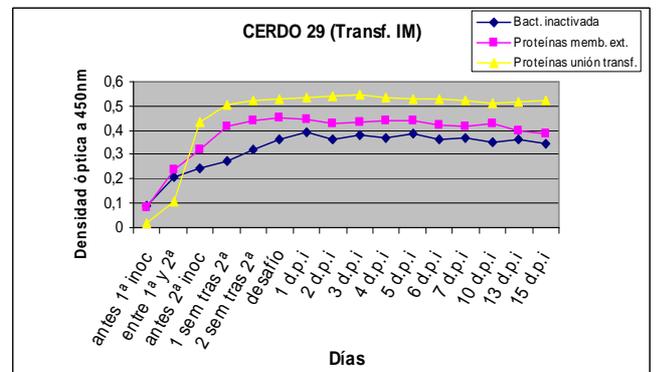
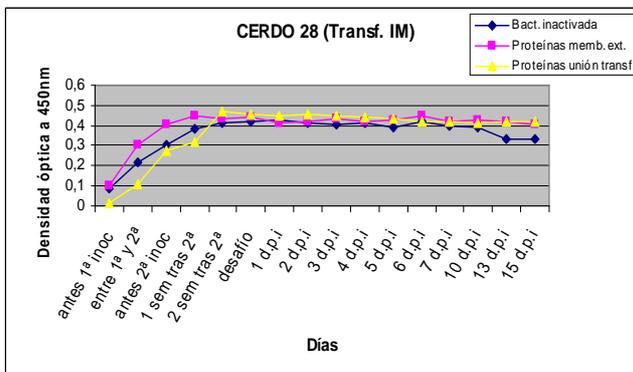
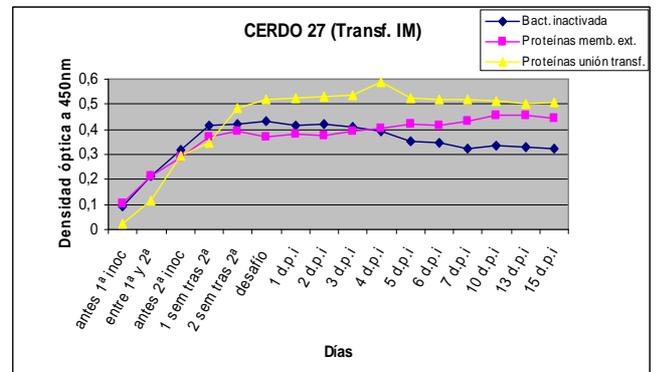
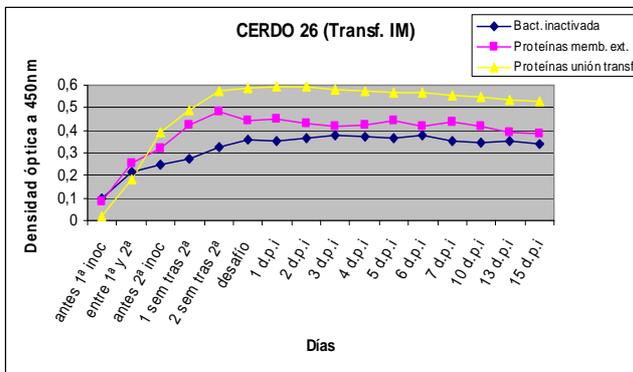
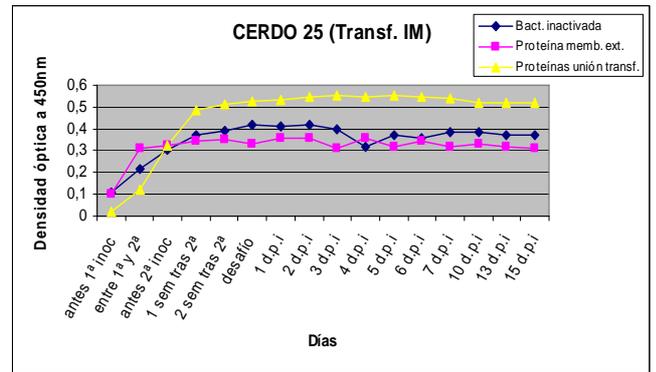
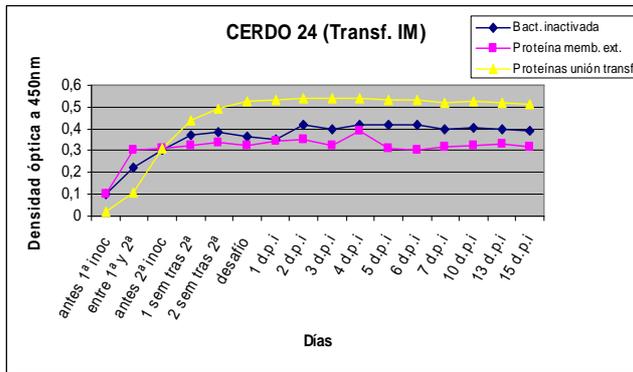


IgG2

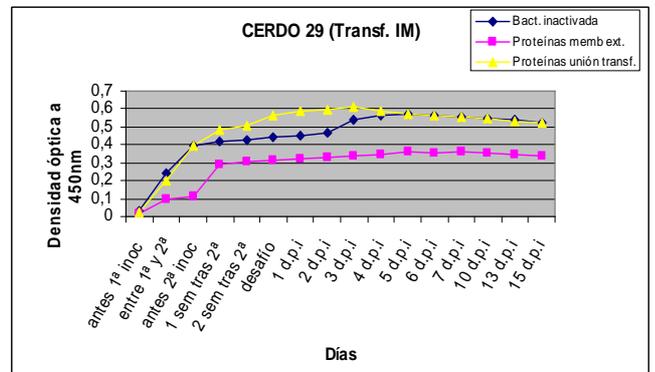
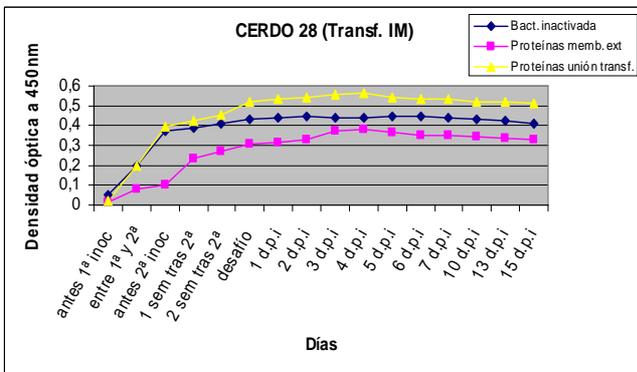
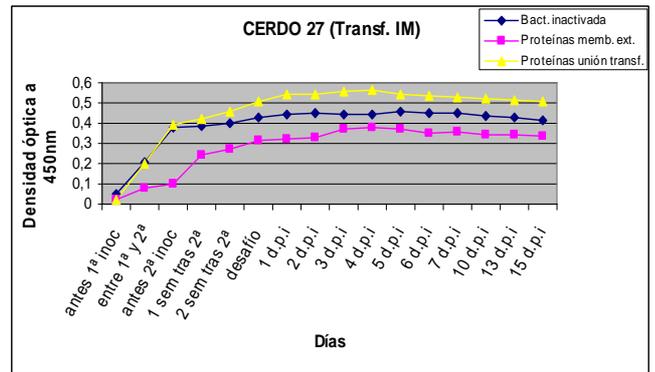
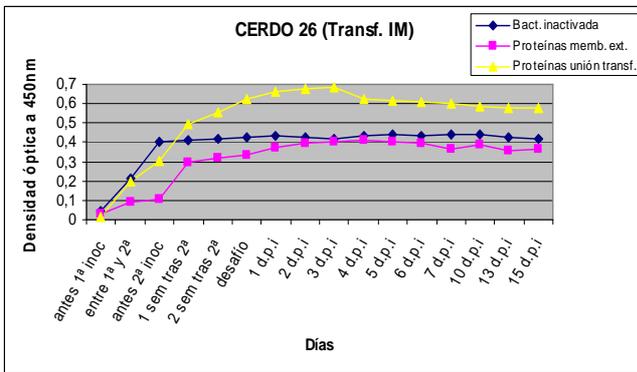
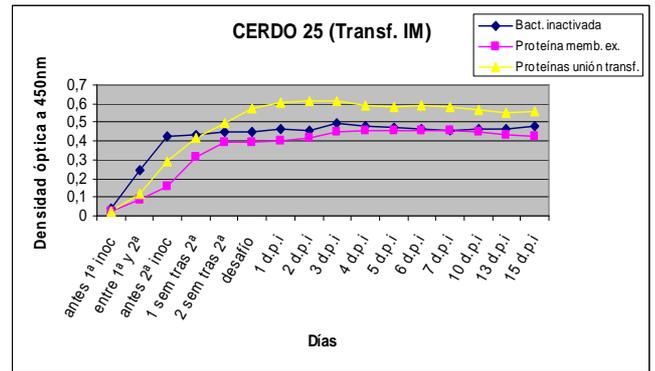
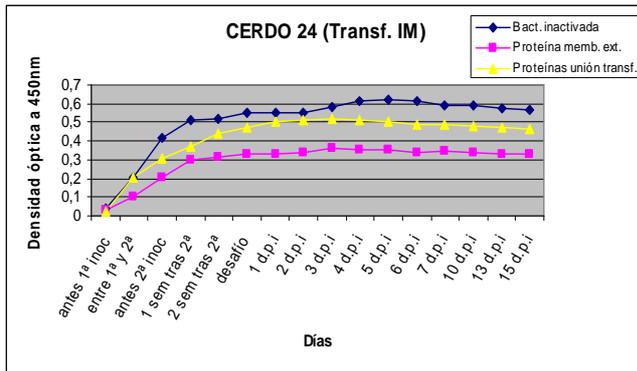


• GRUPO Tbp-im

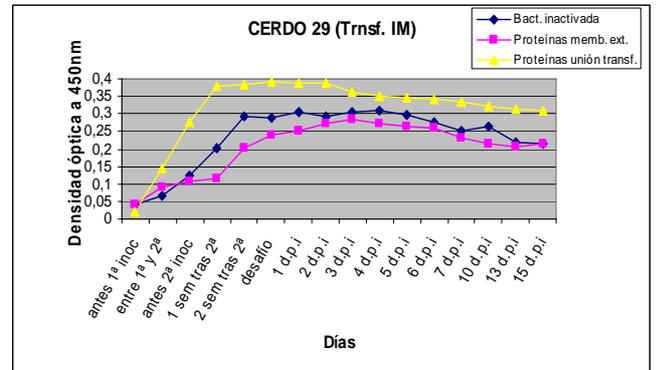
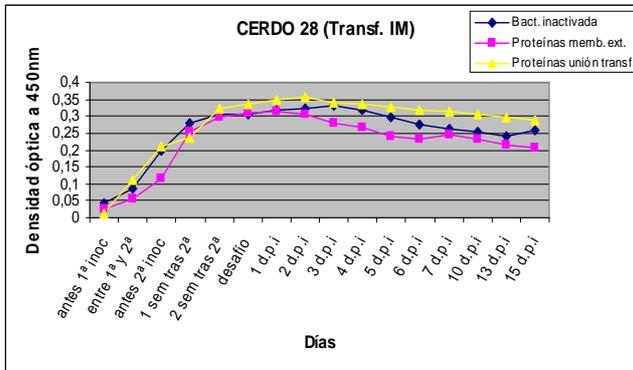
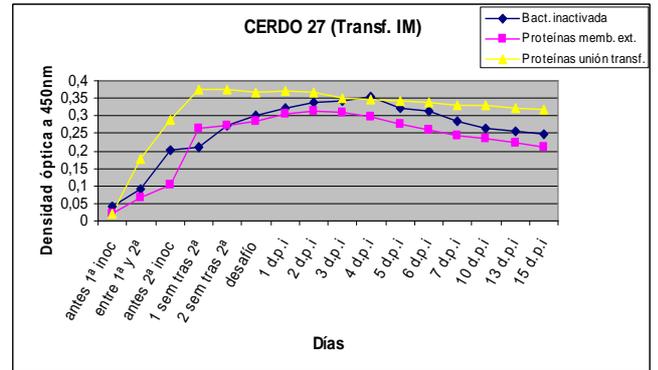
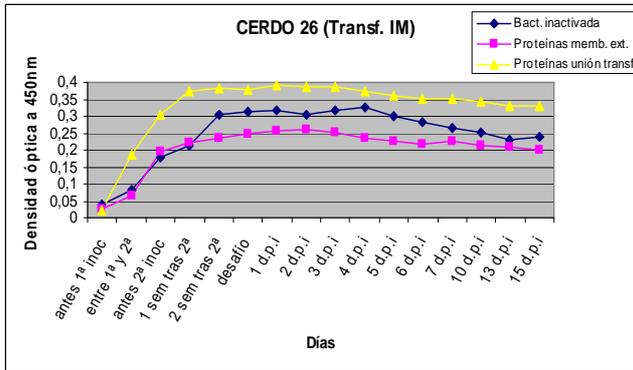
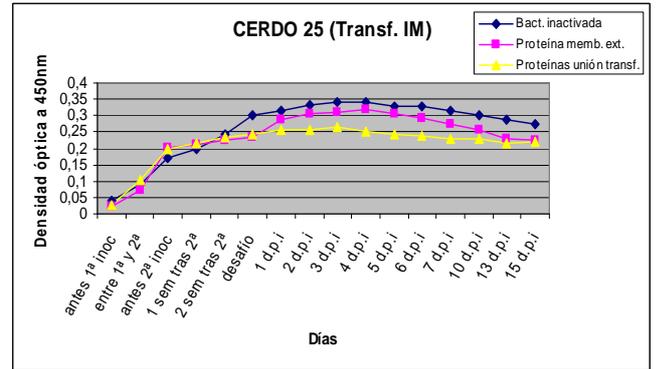
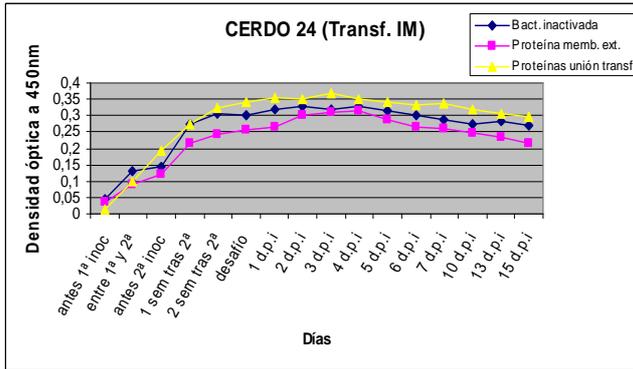
IgGtotales



IgM



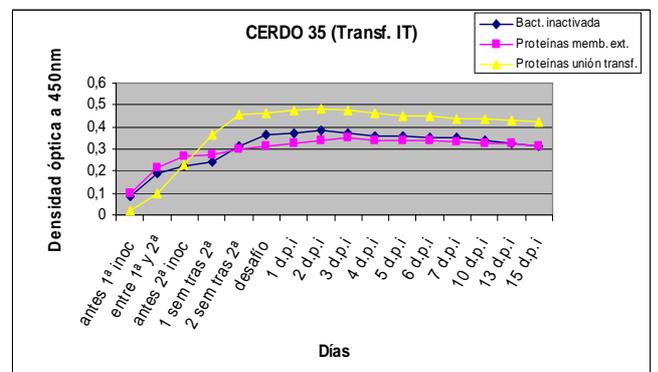
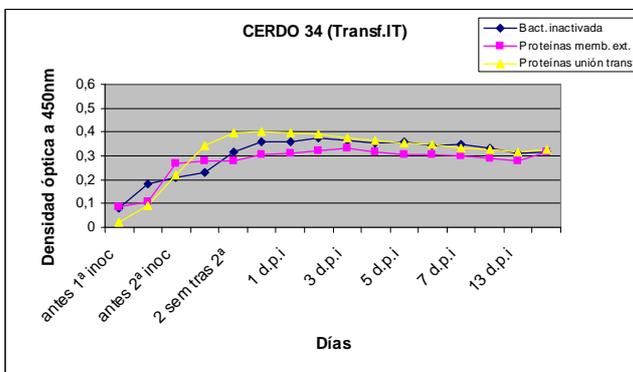
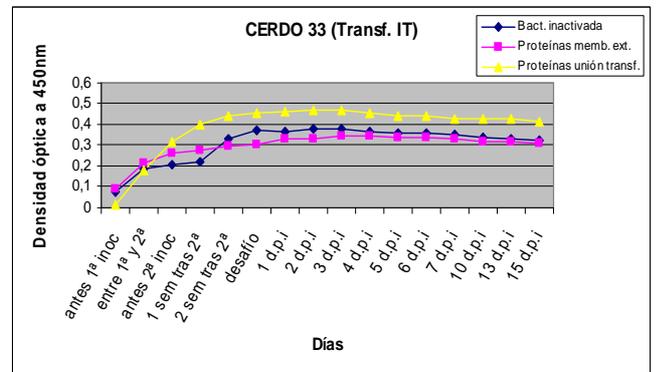
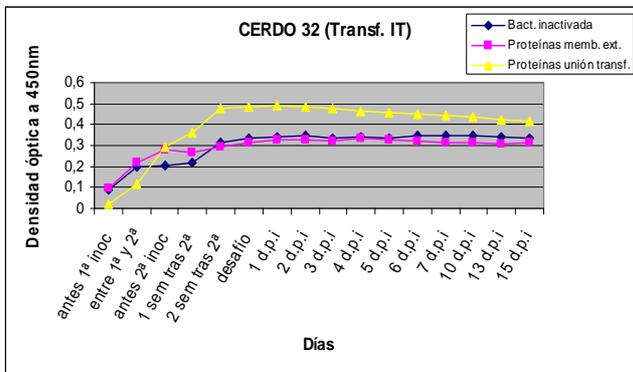
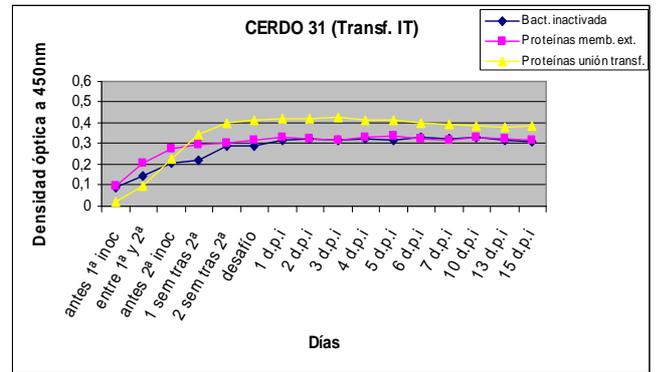
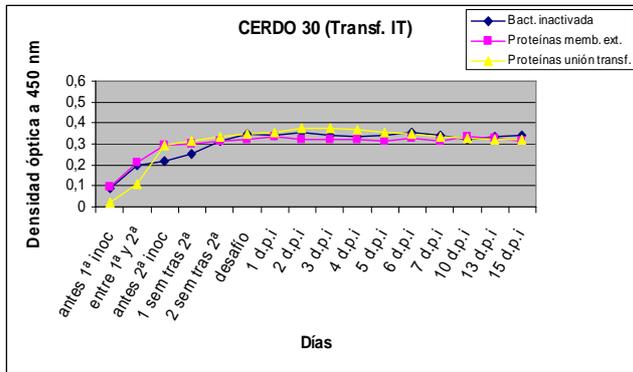
IgG1



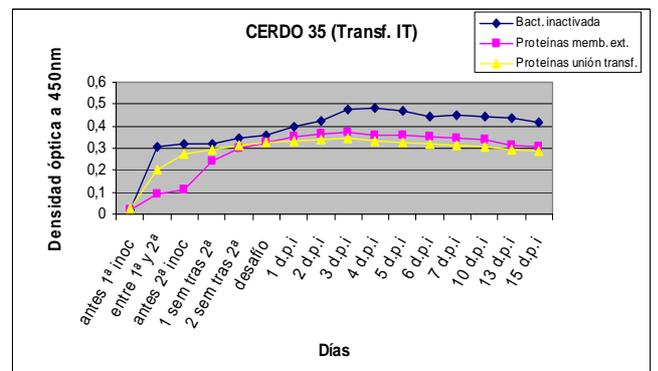
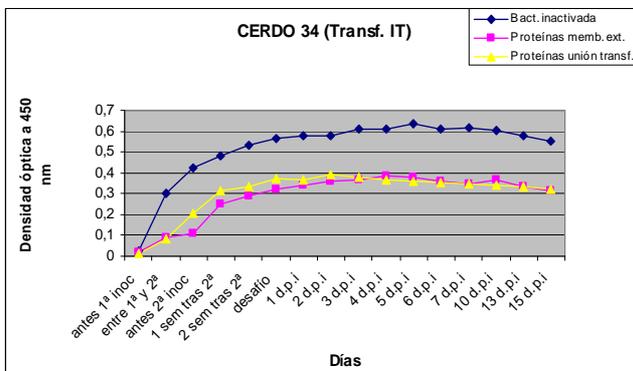
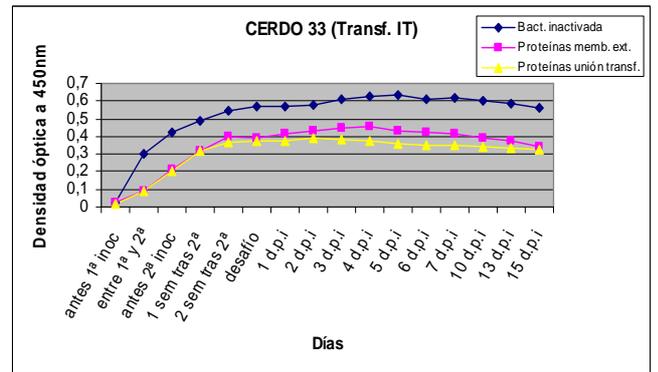
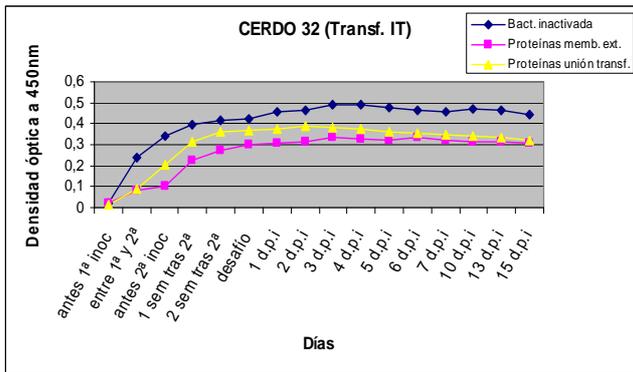
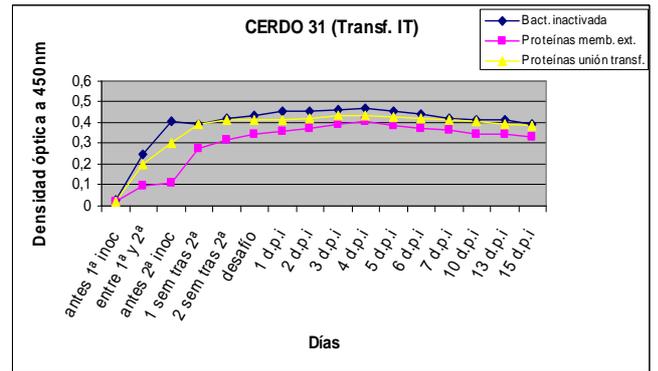
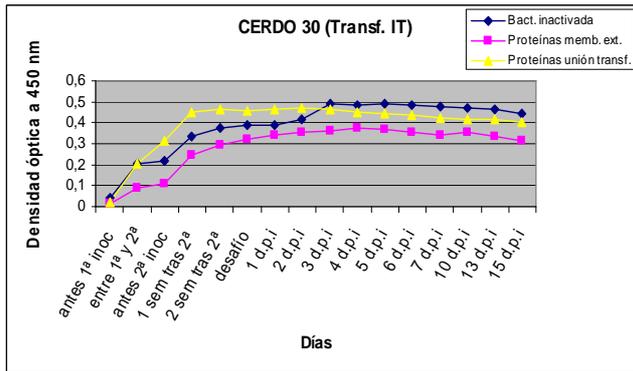


• GRUPO Tbp-it

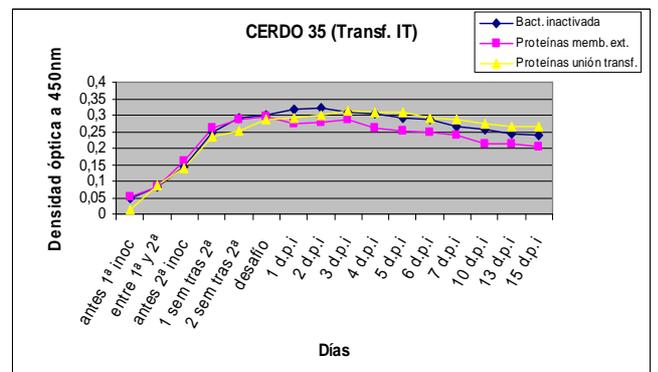
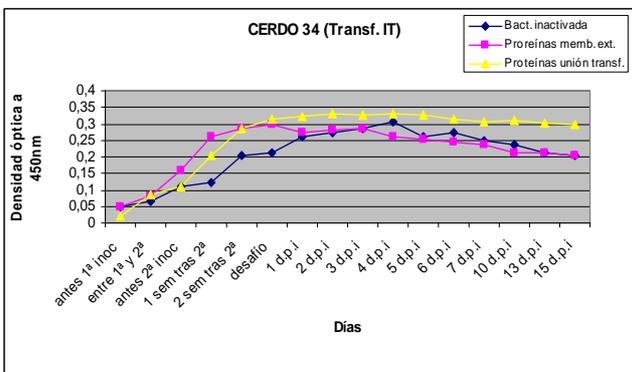
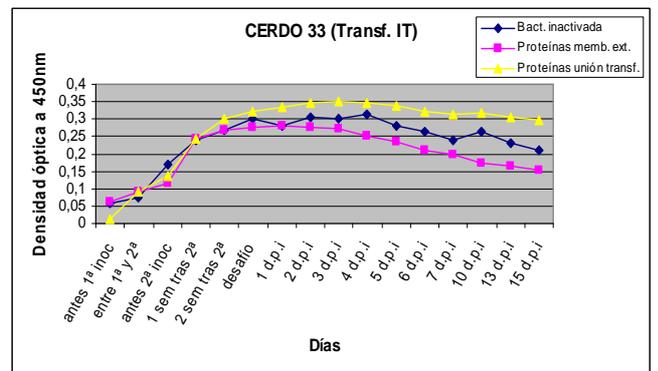
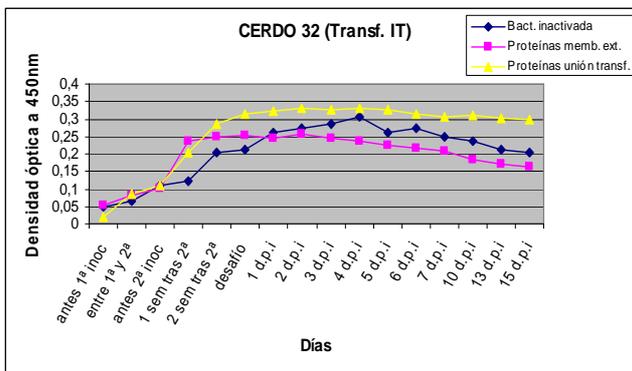
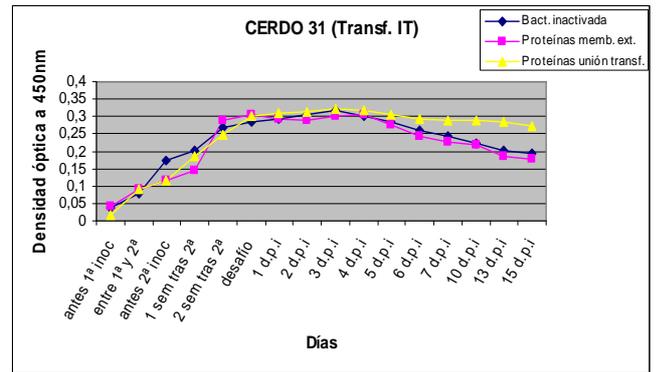
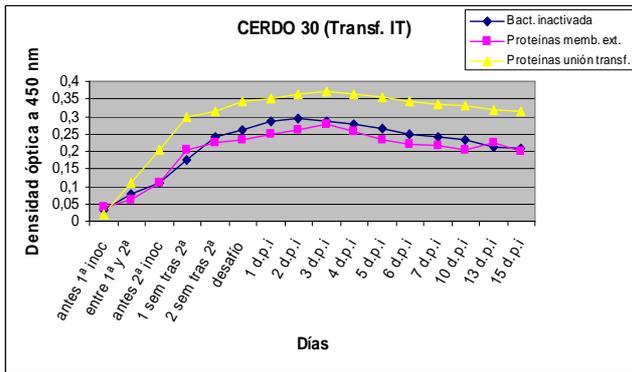
IgGtotales



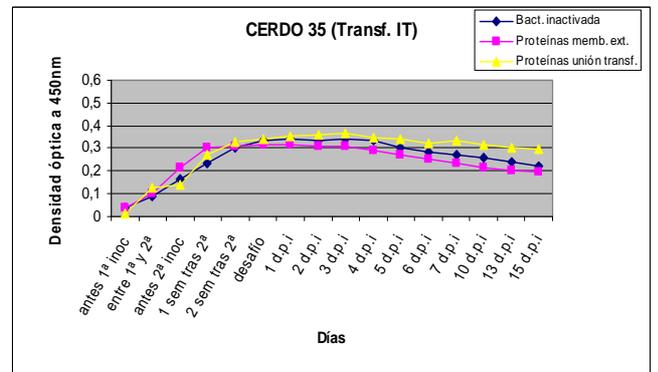
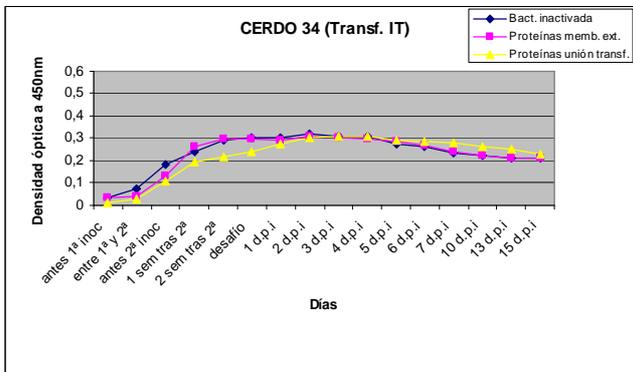
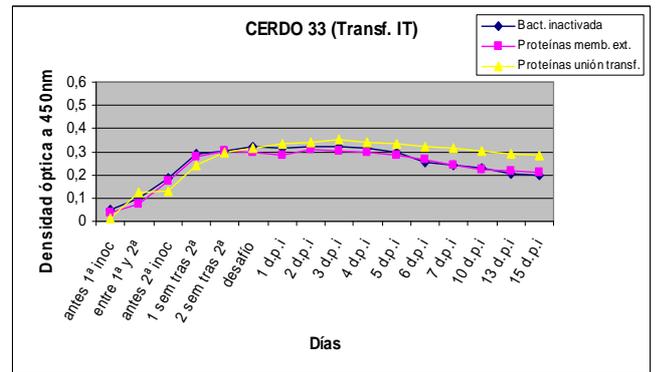
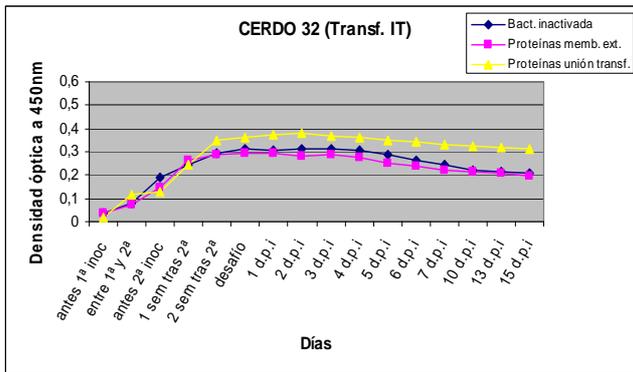
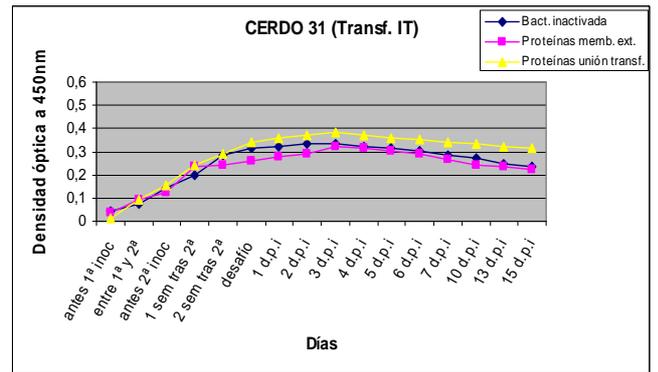
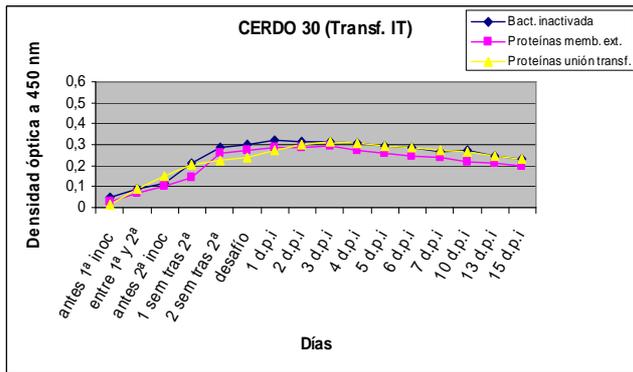
IgM



IgG1

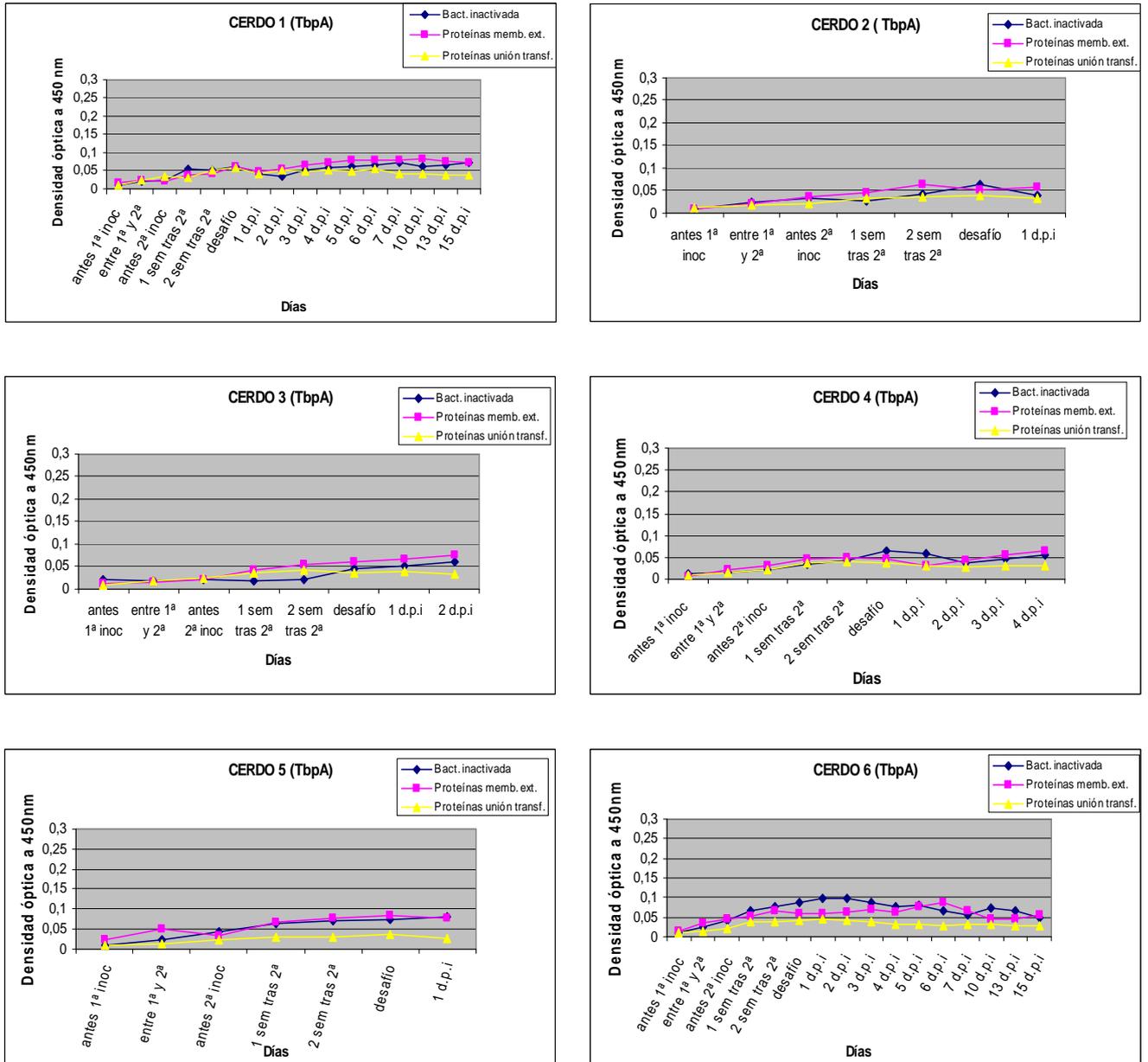


IgG2

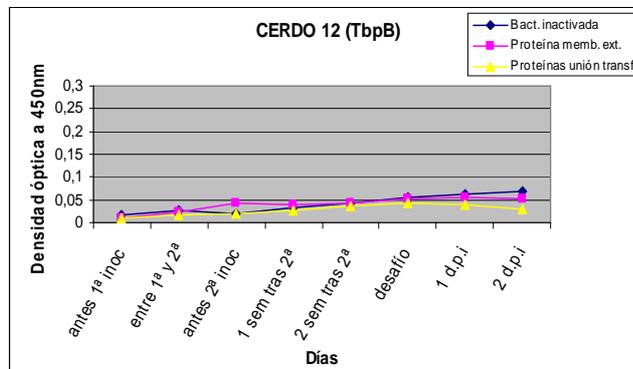
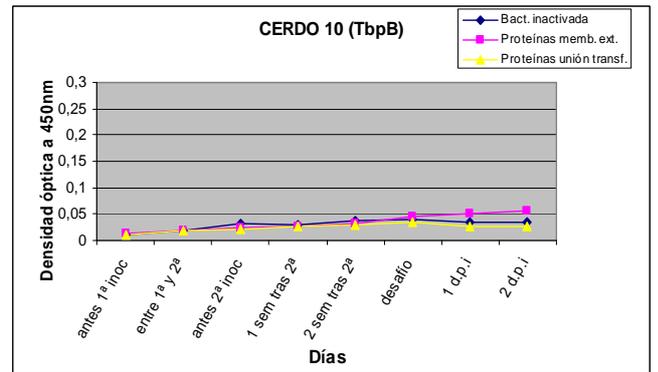
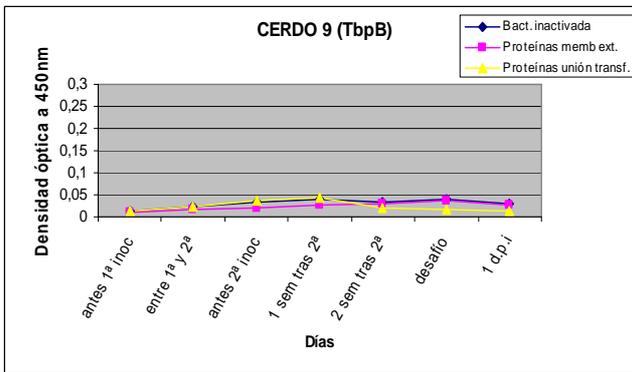
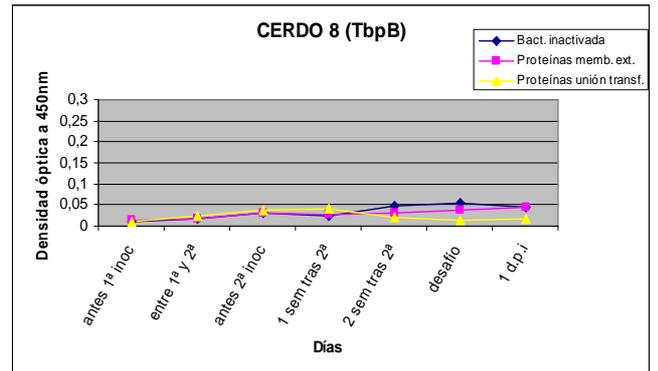
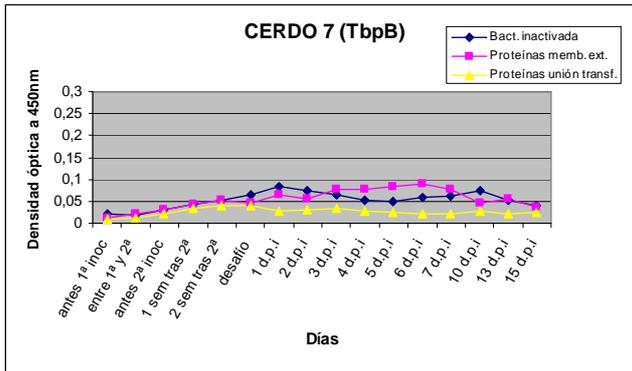


**Figura 4.133:** Evolución de las IgA en todos los animales del estudio con los tres antígenos utilizados.

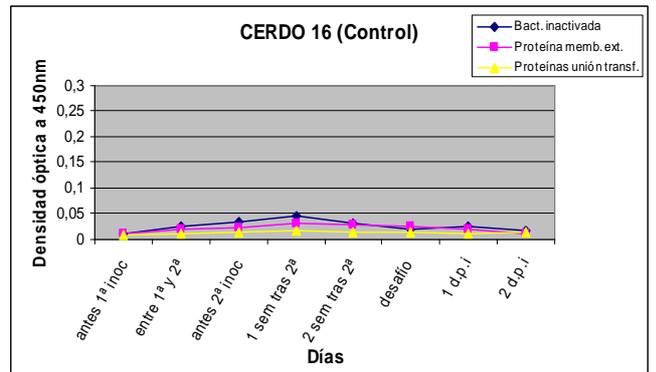
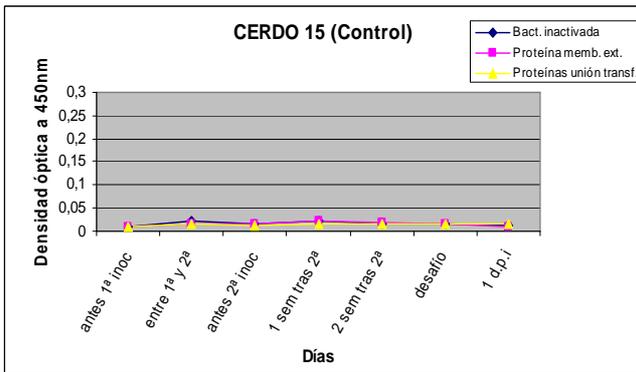
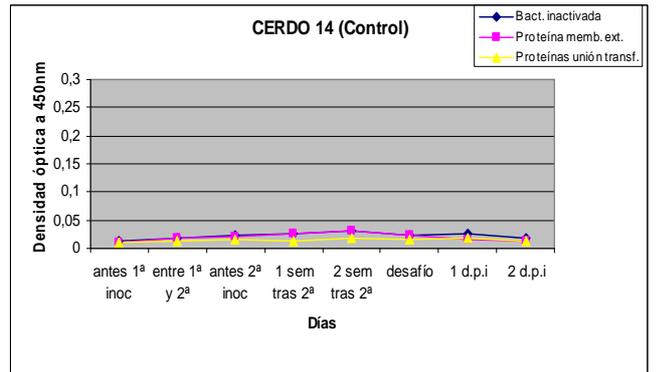
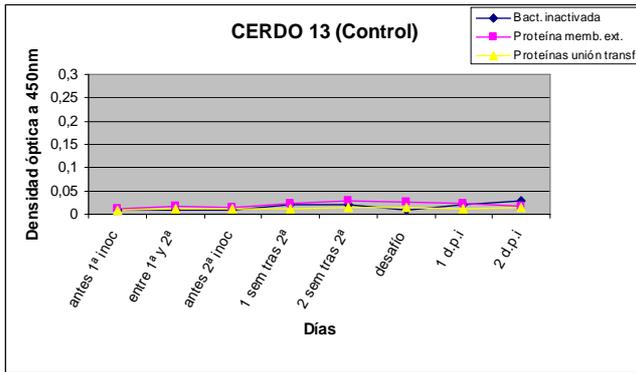
• **Grupo TbpA-r:**



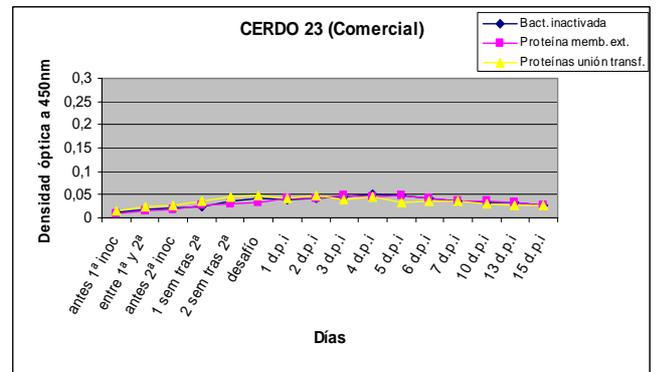
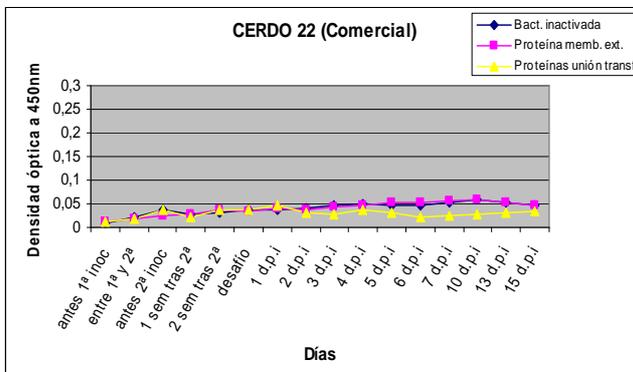
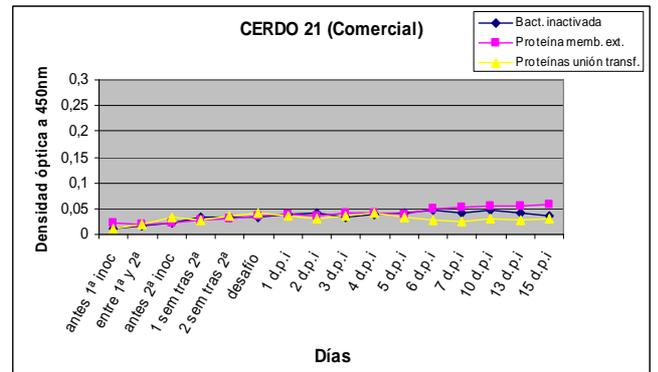
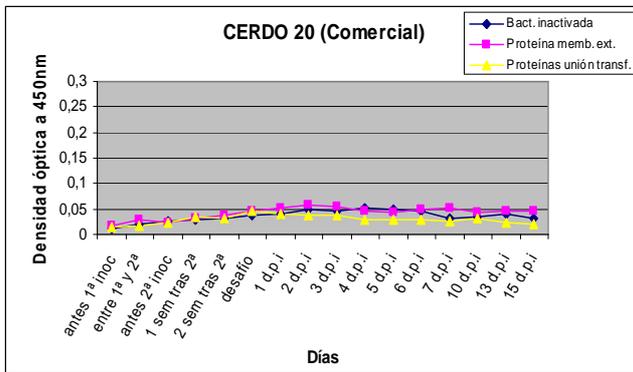
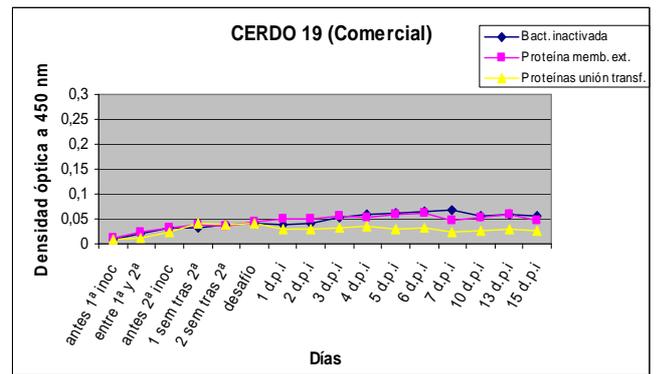
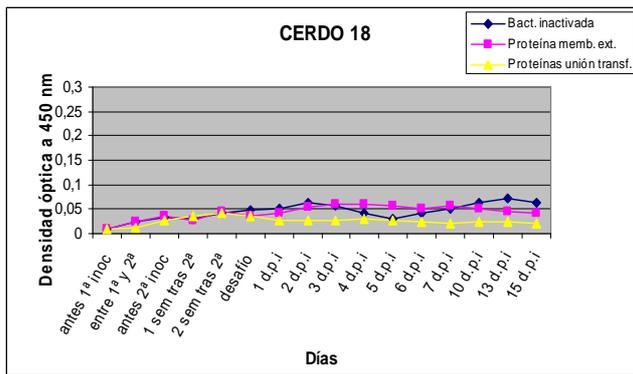
• Grupo TbpB-r:



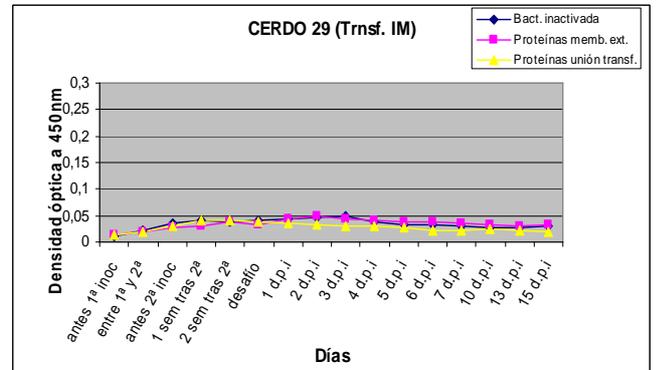
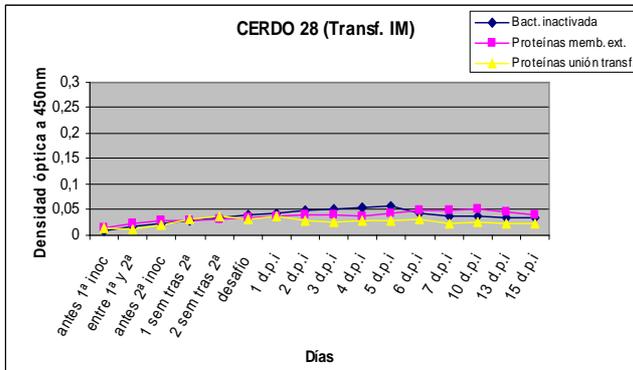
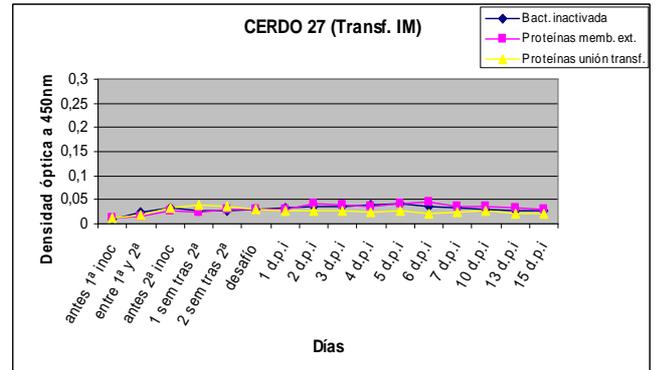
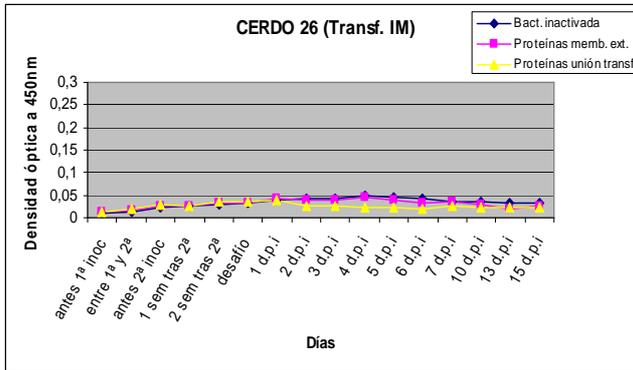
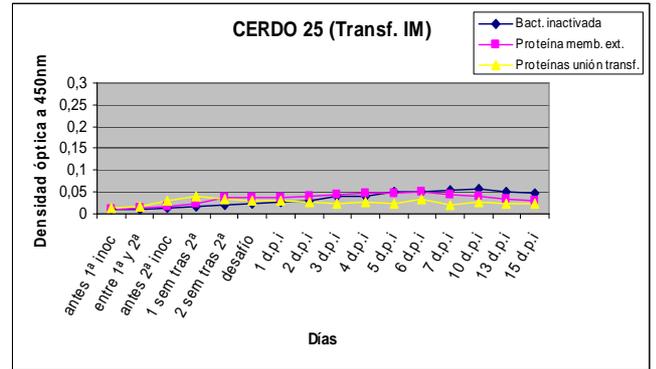
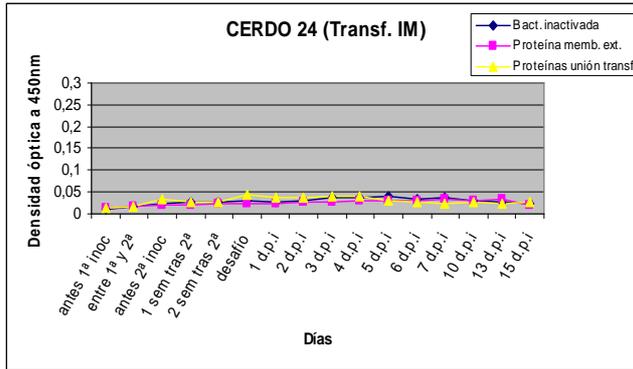
• Grupo control:



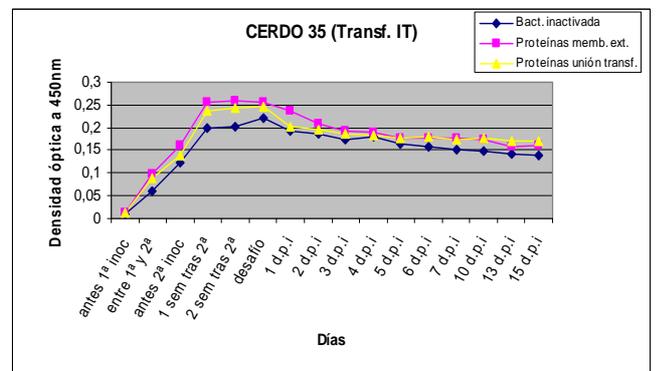
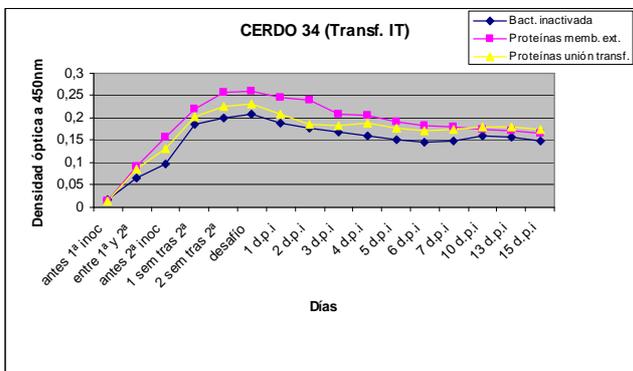
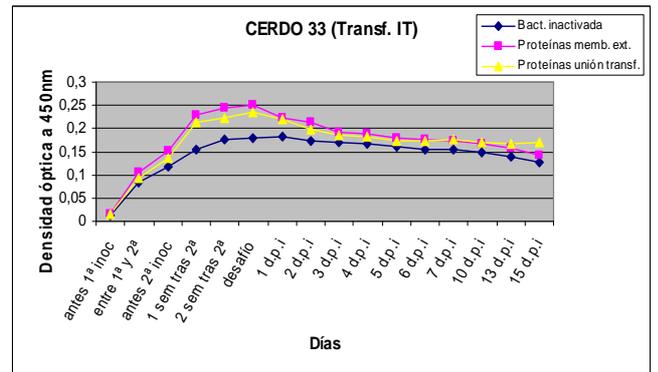
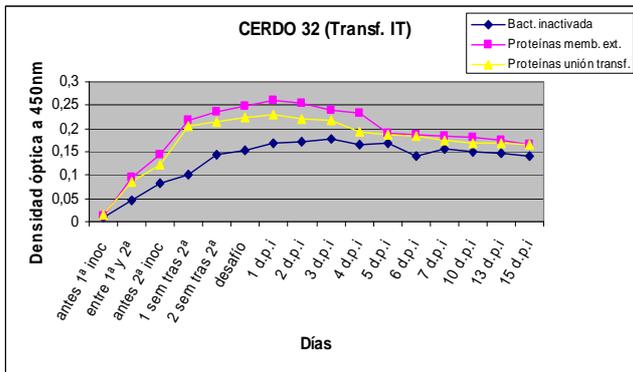
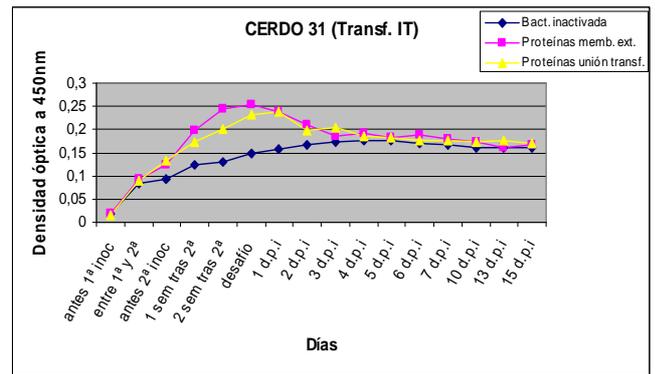
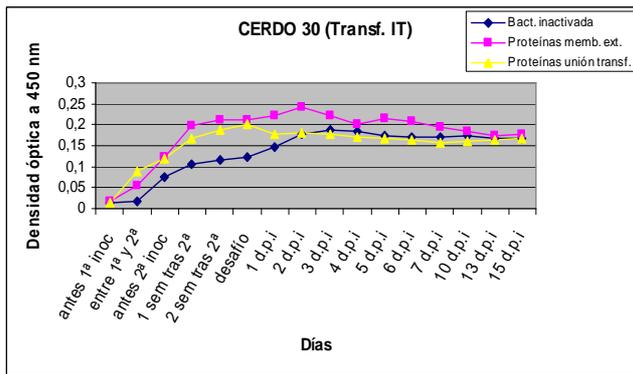
• Grupo vacuna comercial:



• Grupo Tbp-im:



• Grupo Tbp-it:



## **IX. RESUMEN**



La enfermedad de Glässer, causada por *H. parasuis*, ha ido adquiriendo importancia en los últimos años debido a las pérdidas económicas que supone en el sector porcino. Su patogenia e interacción con el sistema inmune presentan aún muchos aspectos desconocidos, lo que impide el avance de las estrategias de prevención y control de la enfermedad.

Basándonos en trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio, se centró este estudio en las proteínas de *H. parasuis* relacionadas con la captación del hierro, ya que en otros microorganismos próximos filogenéticamente estas proteínas han desarrollado una buena respuesta inmune. Debido a que nuestro grupo de investigación ya había expresado la proteína recombinante TbpB del serotipo 5 de *H. parasuis* con fines vacunales, se diseñó y produjo ahora una proteína recombinante TbpA. Ensayada su capacidad de producir inmunogenicidad en animales de experimentación, los resultados fueron favorables en conejos.

Se reprodujo también la enfermedad en un modelo experimental basado en el hospedador natural. Se recurrió para ello a cerdos privados de calostro que desarrollaron un cuadro clínico y lesional característico de la enfermedad, lo que nos permitió estudiar la patogenia y la respuesta inmune frente a la bacteria, a la vez que la protección conferida por diversas formulaciones vacunales, entre ellas, las proteínas recombinantes TbpA y TbpB.

Las inmunizaciones llevadas a cabo con las proteínas recombinantes TbpA y TbpB del serotipo 5 de *H. parasuis*, cepa Nagasaki, proporcionaron una protección parcial, con supervivencia de tan solo algunos de los lechones inmunizados. Otro procedimiento de vacunación consistió en la utilización de un extracto proteico con afinidad por la transferrina, obtenido a partir de un protocolo de extracción de proteínas de *H. parasuis* en condiciones restrictivas de hierro y su posterior purificación a través de una columna de afinidad por la transferrina. Este extracto proteico fue inoculado en dos lotes experimentales diferentes: en un caso por vía intramuscular y en el otro, por vía intratraqueal. En ambos casos confirieron una protección total frente a la infección por la bacteria, con supervivencia de todos los animales sin presentar las lesiones típicas de la enfermedad. Se utilizó también, un grupo experimental al que se le administró una vacuna comercial inactivada basada en el serotipo 5 de *H. parasuis*. La protección resultó igualmente total. Por último, se mantuvo un grupo control, que no fue

## Resumen

inmunizado, a fin de confirmar que la dosis de infección era la correcta para el desarrollo normal de la enfermedad. Estos animales murieron como consecuencia de un proceso septicémico agudo, tal y como se dedujo del estudio de los síntomas clínicos y de las lesiones anamopatológicas.

Todos los antígenos seleccionados para la prueba experimental fueron preparados con el mismo adyuvante (Montanide IMS 2215 VG PR), excepto las proteínas de unión a la transferrina administradas por vía intratraqueal, que se potenciaron con la neuraminidasa tipo VI<sup>®</sup> de *C. perfringens*. Después del desafío, sólo se pudo recuperar la bacteria a partir de los animales que murieron. Fueron los animales control, no inmunizados pero infectados, los que presentaron una distribución de la bacteria más amplia, mientras que *H. parasuis* no pudo ser aislado de ninguna de las localizaciones muestreadas en los animales vacunados con el extracto proteico nativo de unión a la transferrina o con la bacterina comercial.

Antes de llevar a cabo la infección, se estudió la actividad bactericida de los sueros de los diferentes grupos experimentales. Se observó cómo en todos los animales vacunados se producían anticuerpos tras la primera inmunización, que conferían actividad bactericida. Se puso además de manifiesto la necesidad del complemento en los sueros de los animales para llevar a cabo la actividad bactericida.

Se estudió asimismo la respuesta de fase aguda valorando para ello los niveles de pig-MAP, haptoglobina, proteína C reactiva y apolipoproteína A-I, desde el momento de la infección hasta la muerte o sacrificio de los animales. Se observó claramente que los animales que murieron tras la infección, los cerdos control y algunos de los inmunizados con las proteínas recombinantes presentaban unas variaciones estadísticamente significativas desde el momento de la infección, en todas las proteínas de fase aguda valoradas. Los valores máximos coincidieron, en la mayoría de los casos, con el momento previo a la muerte. Los animales que sobrevivieron, independientemente de la inmunización recibida, no presentaron variaciones significativas en sus proteínas de fase aguda hasta el momento del sacrificio.

El estudio de respuesta humoral reveló que todos los animales inmunizados producían anticuerpos frente a las IgG totales, IgG1, IgG2 y IgM tras la primera inmunización. Los grupos parcialmente protegidos mostraron unos valores de

anticuerpos inferior al de los lotes con protección total en todas y cada una de las inmunoglobulinas estudiadas. En los grupos parcialmente protegidos y en el inmunizado con la vacuna comercial, se detectó mayores niveles de anticuerpos en todas las inmunoglobulinas, en los ELISAs tapizados con la bacteria inactivada. En cambio, en los inmunizados con las proteínas de unión a la transferrina, los valores de densidad óptica más elevados se obtuvieron en los ELISAs tapizados con dichas proteínas. En el grupo control, cuyos animales murieron rápidamente tras la infección, sólo se pudo estudiar la respuesta humoral hasta el momento del desafío. Estos animales no presentaron en ningún momento seroconversión frente a los antígenos de *H. parasuis*.

En el caso concreto de la IgA, la cinética de sus valores dependió claramente del tipo de inmunización recibida. No se produjo anticuerpos en ningún grupo experimental, excepto en el inmunizado con las proteínas de unión a la transferrina por vía intratraqueal, en donde el principal aumento ya se detectaba tras la primera inmunización y estos valores continuaban aumentando hasta el momento del desafío. Estos datos revelan cómo las musosas se ven estimuladas tras la inmunización intratraqueal, lo que no parece suceder cuando las inmunizaciones se efectúan por vía intramuscular.

El estudio de la respuesta humoral en los grupos en que la protección fue total determina la relación directa entre los niveles de anticuerpos y la capacidad de protección frente a la enfermedad. Sin embargo, esta relación no se cumplió en los animales inmunizados con las proteínas recombinantes, ya que los animales que no sobrevivían a la infección presentaban valores aceptables en la producción de anticuerpos, lo que significa que, o bien estos anticuerpos producidos no resultaban suficientes, o no eran específicos para la protección frente a *H. parasuis*.

Cuando se llevó a cabo la identificación de las proteínas que formaban parte del extracto proteico con afinidad por la transferrina, se obtuvieron varias de las esperadas, como la TbpA o la TbpB, así como otras proteínas relacionadas con la captación y el transporte del hierro interesantes como candidatos antigénicos y finalmente, algunas proteínas cuya función no se pudo relacionar con este elemento químico.

Al realizar la inmunoproteómica con los grupos que habían obtenido la protección total, se comprobó cómo las proteínas de las que se podía esperar una buena

## *Resumen*

respuesta inmune, como la TbpA o la TbpB, no eran capaces de desarrollarla. En cambio, otras que en el extracto proteico presentaban unas concentraciones escasas podían producir una respuesta inmune intensa, como sucedió con el transportados ABC o con la proteína de membrana externa OMP2. En el grupo inmunizado con el extracto proteico de unión a la transferrina por vía intratraqueal fue en el que se obtuvo una respuesta inmune más intensa y frente a un mayor número de proteínas. En el grupo inmunizado con la vacuna comercial, su respuesta resultó muy parecida a la de los cerdos vacunados con las proteínas de unión a la transferrina. Por tanto, ambos preparados presentaron unos resultados de inmunidad similares, con la ventaja de que nuestro antígeno sólo integraba un subproteoma de *H. parasuis* y no la bacteria entera inactivada.

Queda demostrada la importancia de las proteínas de unión a la transferrina en la protección frente a la infección por *H. parasuis*, pudiéndose encontrar entre ellas algunos candidatos vacunales eficaces frente a la enfermedad de Glässer. Se pone de manifiesto también cómo las inmunizaciones intratraqueales pueden suponer una nueva vía alternativa de protección frente a esta enfermedad.

## **VII. SUMMARY**



Glässer's disease caused by *H. parasuis* has gained importance in recent years due to the economic losses involved in pig practice. Its pathogenesis and interaction with immune system remained still unknown, which prevent the progress of strategies for prevention and control of the disease.

Based on previous works conducted in our laboratory, this study focused on proteins of *H. parasuis* related to iron uptake, as in other phylogenetically close organisms in which these proteins have developed a good immune response. Because our research group had already expressed the recombinant TbpB from *H. parasuis* serotype 5 for vaccination purposes, we designed and produced now a recombinant TbpA. Their ability to produce immunogenicity in experimental animals was tested and the results were favourable in rabbits.

We also reproduced the disease in an experimental model based on the natural host. We used colostrum-deprived pigs that developed clinical symptoms and lesions characteristic of the disease, which allowed us to study the pathogenesis and immune response to bacteria, as well as the protection afforded by different vaccine formulations, including those formulated with the recombinant proteins TbpA and TbpB.

The immunizations performed with recombinant proteins TbpA and TbpB from *H. parasuis* serotype 5, Nagasaki strain, provided a partial protection, with the survival of only some of the immunized piglets. Another formulation consisted of a protein extract with affinity for transferrin, obtained from a protocol for extracting protein from *H. parasuis* in iron restrictive conditions and their subsequent purification through an affinity column. This antigenic formulation was inoculated by using two experimental groups: one of them was immunized intramuscularly and the other, intratracheally. In both cases, a complete protection was conferred against infection by  $3 \times 10^8$  UFC of *H. parasuis*, with survival of all animals without typical lesions of the disease. An experimental group which received a commercial vaccine based on inactivated *H. parasuis* serotype 5, Nagasaki strain, was also compared. A total protection against Glässer disease was also searched for this bacterin. Finally, a control group which was not immunized, but challenged was used to confirm that the infective dose chosen was the correct for the development of the disease. These control animals died of acute

## Summary

septicarimia, as revealed the clinical symptoms and pathological lesions observed in these pigs.

All antigens selected were prepared with the same adjuvant (Montanide IMS 2215 PR VG), except binding proteins transferrin intratracheally administered, which were enhanced with neuraminidase type VI<sup>®</sup> from *C. perfringens*. After challenge, the bacteria only could be recovered from the animals that died. Control animals which were not immunized but infected, showed larger a distribution of *H. parasuis*, while this organism could not be isolated from any of the locations sampled in the animals vaccinated with the extract of native proteins binding to transferrin or with the commercial bacterin.

Before carrying out the infection, we studied the bactericidal activity of sera from different experimental groups. It was observed how all vaccinated animals produced antibodies after the first immunization, which conferred bactericidal activity. It was show that complement in the animal sera was necessary to perform the bactericidal activity.

It was also examined the acute phase response (pig-MAP, haptoglobin, C reactive protein and apolipoprotein A-I), from the time of infection until death or sacrifice of animals. Control pigs and some of those immunized with the recombinant TbpA or TbpB proteins showed significant variations from the time of infection in all the acute phase proteins examined. The maximum values were obtained, in most cases, at the moment before death. The surviving animals, irrespective of the immunization received, did not show significant changes in acute phase proteins.

The humoral response revealed that all immunized animals produced antibodies to IgGt, IgG1, IgG2 and IgM after the first immunization. Partially protected groups showed lower antibody levels compared with the receiving full protection for all the immunoglobulins studied. In partially protected groups and in those immunized with the commercial vaccine higher levels of antibodies were detected for all immunoglobulins in ELISAs coated with inactivated bacteria. In contrast, those immunized with the transferrin binding proteins, optical density values were higher in the ELISAs covered with these proteins. In the control group, whose animals died quickly after infection, the humoral response could be tested only until the challenge.

In the case of IgA, the kinetics of its values clearly depended on the type of immunization received. There were no antibodies in experimental groups, except in that immunized with transferrin binding proteins given intratracheally, in which the main increase was already detected after the first immunization, and these values continued increasing until challenge. These data reveal that mucosae are stimulated after intratracheal immunization, which does not seem to happen when immunizations were administered intramuscularly.

The humoral response in the groups in which total protection was observed correlated with the ability to protect against the disease. However, this relationship was not seen in the animals receiving the recombinant proteins, because the animals that did not survive after the infection had acceptable antibody values. Therefore, antibodies were not sufficient or not were specific for protection against *H. parasuis*.

In the identification of the proteins that were part of the transferrin binding extract, were those expected, as TbpA or TbpB were obtained. Among them, other proteins involved in the iron recruitment and transportation of iron and some proteins whose function might be related to this chemical element.

Concerning immunoproteomic studies with the groups that obtained total protection, those proteins from which a good immune response could be expected, such as TbpA or TbpB, were not able to develop it. However, others showing lower concentrations could produce a strong immune response, as happened with the ABC transporter protein or outer membrane OMP2. In the group immunized with the transferrin binding protein administered intratracheally, which a more intense immune response against a larger number of proteins was detected. In the group immunized with the commercial vaccine, the response was close similar to that of pigs vaccinated with transferrin binding proteins. Therefore, both preparations showed similar immunity results, with the advantage that our antigen only integrated a subproteome from *H. parasuis*, but not the whole inactivated bacteria.

Therefore, it has been demonstrated the importance of binding native transferrin proteins in the protection against challenge with *H. parasuis*. The intratracheal immunization might be a good alternative to intramuscular administration of effective vaccine formulations against Glässer's disease.

