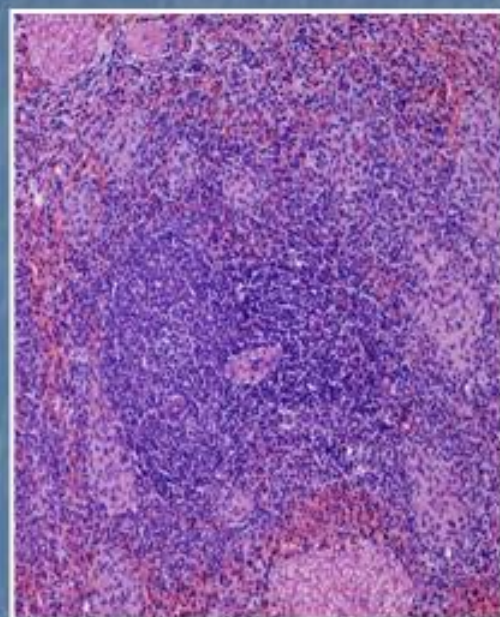




UNIVERSIDAD DE LEÓN  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



# Estudios de inmunidad en cerdos frente a *Haemophilus* *parasuis*



Ana Judith Martín de la Fuente

Octubre 2007



UNIVERSIDAD DE LEÓN  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

ESTUDIOS DE INMUNIDAD EN CERDOS FRENTE A  
*Haemophilus parasuis.*

*Memoria que presenta para optar al grado de Doctor la Licenciada en  
Veterinaria*

ANA JUDITH MARTÍN DE LA FUENTE

*León, Septiembre de 2007*

**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS**  
**(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

El Dr. D. ELÍAS-F. RODRÍGUEZ FERRI y el Dr. D. CESAR-B. GUTIÉRREZ MARTÍN como Directores de la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIOS DE INMUNIDAD EN CERDOS FRENTE A *Haemophilus parasuis*" realizada por D. ANA-J. MARTÍN DE LA FUENTE en el Departamento de SANIDAD ANIMAL, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mis directores Ferri y César, por acogerme en su grupo de investigación y facilitar mi formación durante todo este tiempo, en el que aprender a su lado ha sido para mí, tanto en el terreno profesional como en el personal, un gran privilegio. Sin duda no hubiera sido posible realizar esta tesis si no hubiera contado con sus directrices, consejos y completa dedicación, mostrándome en todo momento una gran cercanía y apoyo. Agradecerles también el haberme contagiado la ilusión y el empeño que le ponen a todos sus trabajos, por lo que me ha resultado mucho más sencillo y gratificante dedicarme a este proyecto.

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, por la Beca FPU que me fue concedida durante cuatro años, y que también me permitió realizar estancias en el extranjero, y a Proinserga S. A., por la beca que actualmente disfruto.

Al Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León, por haberme permitido disponer de las instalaciones y material que necesité para el desarrollo de esta tesis.

A laboratorios SYVA S.A., por su colaboración en el desarrollo de las vacunas y por facilitarme las dependencias de una granja asociada para poder realizar una parte de la fase experimental.

Al grupo de Inmunología Porcina del INIA, por “introducirme” dentro del mundo de la citometría de flujo y los anticuerpos monoclonales, que además me cedieron amablemente para poder realizar este estudio.

Al laboratorio de M. Murtaugh, en el Departamento de Biopatología de la Universidad de Minnesota, con un recuerdo especial para Coleen Finnegan, mi maestra de la PCR a tiempo real.

A la sección de Inmunología Veterinaria y Virología de la Universidad de Suecia, por ayudarme en la realización de las pruebas de proliferación *in vitro*.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, en la Universidad de Zaragoza, por su ayuda en el estudio de las proteínas de fase aguda y por su hospitalidad durante los días que estuve allí.

A Mateo del Pozo y Jose María Jiménez, por su colaboración durante la fase experimental con los cerdos, especialmente en el momento de los partos. A Raquel y su familia, de la granja de Cantalejo en Segovia, por su simpatía y amabilidad, que ayudaron a que los duros días que pasé allí fuesen un poco más llevaderos.

A Ana y su familia, por su hospitalidad durante mi periodo de reclusión en la granja de Navafría, siempre dispuesta a acogerme en su casa en las noches en las que la nieve impedía mi vuelta a León, así como por su excelente trabajo con los cerdos. A Paco y su grupo de veterinarios, por su disponibilidad para conseguirme el calostro y a las explotaciones ganaderas que se lo cedieron.

A todos los alumnos y licenciados de Veterinaria que vinieron a ayudarme con los cerdos privados de calostro, sin cuya ayuda no hubiese podido conseguir que sobreviviesen, demostrando en todo momento un gran entusiasmo, así como unas enormes ganas de colaborar, lo que supuso para mí un revulsivo para sacar fuerzas de flaqueza, olvidándome del cansancio acumulado.

Al Departamento de Cirugía de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, por su ayuda en la realización de las inoculaciones de la bacteria.

A Claudia, por su inestimable ayuda y excelente trabajo en la realización del estudio anatomopatológico, así como por su disponibilidad y amabilidad para explicarme las dudas que me iban surgiendo.

A mis cerdos privados de calostro, en especial a los 25 valientes que consiguieron sobrevivir hasta el final, aguantando las duras noches de invierno, gastroenteritis, pinchazos..., que hicieron que los largos días y noches sin descanso mereciesen la pena.

A todos los compañeros del Departamento con los que he coincidido estos cinco años, a los que además de su ayuda y consejos para la realización de los experimentos, agradezco el haberme permitido disfrutar de momentos para el recuerdo, de diversión y risas que han hecho mucho más placentero y gratificante el trabajo.

A Pani, por sus consejos y gran ayuda en la docencia; a Javier, por la preparación de una parte del material; a Nacho, por compartir conmigo sus conocimientos sobre Inmunología; a Malú y Beatriz, por sus trabajos previos sobre *H. parasuis*.

A mi "familia política" por su apoyo y hospitalidad, así como por lo mucho que me han ayudado a que la morriña de mi casa sea más llevadera.

A todos los amigos que me escucharon, animaron y ayudaron durante estos años, tanto a los que están aquí cómo a los que tengo lejos me gustaría expresar mi agradecimiento de forma individual, pero se alargaría demasiado. Sólo decir que nunca olvidaré vuestra compañía durante la noche que nacieron los cerdos y lo mucho que supuso para mí ese gesto de amistad y generosidad.

A toda mi familia, que a pesar de la distancia física, siempre ha estado cerca de mí, apoyándome incondicionalmente cuando más falta me hacía. Me faltan palabras para describir todo lo que les debo y lo agradecida que estoy de poder contar con unos padres que siempre han creído en mí, entendiendo las veces que mi dedicación al trabajo me impedía pasar más tiempo con ellos; que me han enseñado a no rendirme y plantarle cara a las adversidades, animándome a encontrar la parte positiva a los problemas, con una dedicación y generosidad que no tiene límite.

A mi hermana, que ha sido para mí un gran apoyo, siempre dando su toque optimista a todas las cosas, además de un gran ejemplo de superación y trabajo. A mis abuelos, con un cariño especial para mi abuelo Santiago, cuyo deseo era que uno de sus nietos siguiese la tradición familiar y fuese veterinario, porque sé que le hubiese gustado mucho compartir conmigo este trabajo.

A Fernando, porque se ha implicado tanto en esta tesis como si fuese propia, intentando y consiguiendo en todo momento que las cosas fuesen más sencillas, acompañándome siempre que lo necesitaba, moviendo cielo y tierra por ayudarme. Ha sido tal su apoyo y dedicación durante todos estos años que sería imposible resumirlo en estas líneas. El tener una persona así a mi lado me ha dado las fuerzas que necesitaba para seguir adelante, incluso cuando parecía que todo estaba en mi contra, aprendiendo de su sabiduría para enfrentarse a los problemas, de su paciencia y compostura.

Porque la unión hace la fuerza...

A todos, muchísimas gracias...



# ÍNDICES



<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I: <i>Haemophilus parasuis</i> .....</b>	<b>1</b>
1. La enfermedad de Glässer .....	1
2. <i>Haemophilus parasuis</i> .....	2
3. Epidemiología .....	14
4. Patogénesis .....	16
5. Cuadro clínico y lesional .....	17
6. Diagnóstico .....	18
7. Respuesta inmune frente a la infección .....	20
8. Control y prevención .....	23
<b>Capítulo II: Caracteres generales de la respuesta inmune en el cerdo .....</b>	<b>25</b>
1. El sistema inmune del ganado porcino .....	25
2. Respuesta inmune innata y adquirida .....	35
3. Memoria inmunológica .....	43
4. Respuesta inmune celular y humoral .....	44
5. Inmunidad de mucosas .....	46
6. Respuesta inmune primaria y secundaria .....	46
7. Respuesta inmune frente a bacterias .....	47
<b>PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
1. Cepas bacterianas.....	51
2. Medios de cultivo .....	52
3. Soluciones de antibióticos y suplementos .....	54
4. Productos y reactivos .....	54
5. Laboratorios e instalaciones utilizadas .....	60
6. Animales .....	60
7. Protocolo de infección de ratones .....	62
8. Protocolo de infección en cobayos .....	63
9. Desarrollo de una bacterina frente a la enfermedad de Glässer .....	64
10. Desarrollo de una vacuna con proteínas de membrana externa (TbpB) frente a la enfermedad de Glässer .....	70
11. Desarrollo de una vacuna recombinante frente a la enfermedad de Glässer. Proteína TbpB .....	73
12. Protocolos de inmunización e infección de cerdos con <i>H. parasuis</i> .....	75
13. Obtención de suero .....	77

14. Obtención y conservación de leucocitos de sangre periférica .....	77
15. Conservación de tejidos .....	78
16. Extracción y cuantificación del RNA total .....	79
17. Estudio anatomopatológico .....	80
18. Estudio de las inmunoglobulinas séricas frente a <i>H. parasuis</i> y sus antígenos durante las pruebas de inmunización e infección .....	81
19. Estudio de las poblaciones leucocitarias durante la pruebas de inmunización e infección. Citometría de flujo .....	84
20. Estudio de la respuesta de fase aguda durante las pruebas de inmunización y posterior infección .....	87
21. Análisis de las citocinas presentes en los tejidos .....	87
22. Respuesta <i>in vitro</i> .....	92
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>95</b>
<b>Capítulo I: Infecciones experimentales de ratones y cobayas con <i>Haemophilus parasuis</i> .....</b>	<b>95</b>
1. Infecciones experimentales de ratones con <i>H. parasuis</i> .....	95
2. Infecciones experimentales de cobayas con <i>H. parasuis</i> .....	95
<b>Capítulo II: Desarrollo de vacunas frente a <i>Haemophilus parasuis</i> .....</b>	<b>99</b>
1. Desarrollo de una bacterina frente a la enfermedad de Glässer .....	99
2. Desarrollo de una vacuna con proteínas de membrana externa frente a la enfermedad de Glässer .....	106
3. Desarrollo de una vacuna recombinante frente a la enfermedad de Glässer .....	111
<b>Capítulo III: Estudios de inmunización e infección con <i>Haemophilus parasuis</i> en cerdos: hallazgos clínicos, microbiológicos y anatomopatológicos .....</b>	<b>113</b>
1. Inmunización e infección de cerdos con <i>H. parasuis</i> .....	113
2. Análisis microbiológico .....	115
3. Estudio anatomopatológico .....	117
<b>Capítulo IV Estudio de las inmunoglobulinas séricas frente a <i>Haemophilus parasuis</i> y sus antígenos .....</b>	<b>123</b>
1. Cerdos privados de calostro .....	123
2. Cerdos criados de forma convencional .....	153
3. Comparación entre los grupos del estudio .....	171
<b>Capítulo V. Estudio de la respuesta de base celular frente a <i>H. parasuis</i> .....</b>	<b>181</b>
1. Estudio de la evolución de las poblaciones leucocitarias en inmunizaciones e infecciones <i>in vivo</i> .....	181
2. Respuesta <i>in vitro</i> : Pruebas de proliferación de leucocitos sanguíneos .....	200

<b>Capítulo VI. Respuesta de fase aguda en infecciones de cerdos con <i>Haemophilus parasuis</i></b> .....	<b>205</b>
1. Cerdos privados de calostro .....	<b>205</b>
2. Cerdos criados de forma convencional .....	<b>217</b>
3. Comparación entre los grupos del estudio .....	<b>222</b>
<b>Capítulo VI. Respuesta mediada por citocinas en infecciones de cerdos con <i>Haemophilus parasuis</i></b> .....	<b>229</b>
1. Pulmón .....	<b>229</b>
2. Bazo .....	<b>235</b>
3. Ganglio linfático .....	<b>241</b>
4. Cerebro .....	<b>247</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>253</b>
1. Infección experimental con <i>H. parasuis</i> : Modelos animales .....	<b>253</b>
2. Estrategias de inmunización frente a una infección con <i>H. parasuis</i> .....	<b>257</b>
3. Inmunización e infección con <i>H. parasuis</i> : patogenia, cuadro clínico, estudio anatomopatológico y hallazgos microbiológicos .....	<b>262</b>
4. Respuesta humoral .....	<b>265</b>
5. Respuesta celular .....	<b>275</b>
6. Respuesta de fase aguda .....	<b>279</b>
7. Respuesta mediada por citocinas .....	<b>284</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>293</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>295</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>313</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>345</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>349</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABTS</b>	Ácido 2,2-azino-bis (3 etilbenzotiazolin-6 sulfónico)
<b>AcMo</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>ApoA-I</b>	Apolipoproteína A-I
<b>BALT</b>	<i>Bronchus associated lymphoid tissue</i> (tejido linfoide asociado a los bronquios)
<b>BCR</b>	<i>B-cell receptor</i> (receptor de células B)
<b>BHI</b>	Infusión de cerebro y corazón
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i> (albúmina sérica bovina)
<b>CALT</b>	<i>Conjunctiva associated lymphoid tissue</i> (tejido linfoide asociado a la conjuntiva)
<b>CAS</b>	<i>Chrome azurol sulfato assay</i> (ensayo de sulfato de cromoazurol)
<b>CDCD</b>	<i>Cesarean derived, colostrum deprived</i> (obtenidos por cesárea y privados de calostro)
<b>CD</b>	Grupo de diferenciación
<b>CD<sup>hi</sup></b>	Expresión alta
<b>CD<sup>low</sup></b>	Expresión baja
<b>CEA</b>	<i>Carcinoembryonic antigen</i> (antígeno carcinoembriogénico)
<b>CID</b>	Coagulación intravascular diseminada
<b>Cit</b>	Citado
<b>Cols</b>	Colaboradores
<b>CpAg</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>c.p.m.</b>	Cuentas por minuto
<b>CR</b>	Receptor del complemento
<b>CRP</b>	<i>C-reactive protein</i> (proteína C-reactiva)
<b>Ct</b>	Ciclo umbral
<b>CXC</b>	Quimiocinas $\alpha$
<b>CC</b>	Quimiocinas $\beta$
<b>Df log</b>	Diferencial de logaritmo
<b>DL-50</b>	Dosis letal 50
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DOC</b>	Deoxicolato sódico
<b>DIPTAR</b>	Detección, tipado e identificación de <i>Haemophilus parasuis</i>
<b>E</b>	Eficiencia (PCR)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicoltetraacético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (enzimoinmunoensayo).
<b>ERIC-PCR</b>	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence</i> (PCR PCR basadas en secuencias intergénicas consenso repetitivas de enterobacterias)
<b>FTM</b>	<i>Fluid thioglycollate medium</i> (caldo de tioglicolato)
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias granulocito-macrófago.
<b>Fab</b>	<i>Fragment antigen binding</i> (fragmento de unión al antígeno)

<b>Fbp</b>	<i>Ferric binding protein</i> (proteína de unión al hierro)
<b>Fc</b>	Fragmento cristalizante de las inmunoglobulinas.
<b>Fhu</b>	<i>Ferric hydroxamate uptake</i> (captador de hidroxamato férrico)
<b>Fig</b>	Figura
<b>Fur</b>	<i>Ferric uptake regulator</i> (regulador de la captación de hierro)
<b>GALT</b>	<i>Gut associated lymphoid tissue</i> (tejido linfoide asociado al intestino)
<b>HEPES</b>	Ácido N-2 hidroxietil-piperazina.
<b>HPT</b>	Haptoglobina
<b>Hsp60</b>	<i>Heat shock protein of 60kDa</i> (proteína de choque térmico de 60 kDa)
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>Igt</b>	Inmunoglobulinas totales
<b>IL</b>	Interleucina
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LB</b>	Linfocitos B
<b>Lbp</b>	<i>Lactoferrin binding protein</i> (proteína de unión a la lactoferrina)
<b>LOS</b>	Lipooligosacárido
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LT</b>	Linfocitos T
<b>LTh</b>	Linfocitos T colaboradores
<b>LTALT</b>	<i>Larynx associated lymphoid tissue</i> (tejido linfoide asociado a la laringe).
<b>MALT</b>	<i>Mucosal associated lymphoid tissue</i> (tejido linfoide asociado a mucosas)
<b>MCP</b>	<i>Monocyte chemotactic protein</i> (proteína quimiotáctica de monocitos).
<b>MIP</b>	<i>Macrophage inflammatory protein</i> (proteína de inflamación de macrófagos)
<b>MLST</b>	<i>Multilocus sequence typing</i> (tipificación por secuencia de multilocus)
<b>MOPS</b>	Ácido 3-[N-]morfolino propanosulfónico
<b>NAD</b>	Dinucleótido de adenina y nicotinamida.
<b>NK</b>	<i>Natural killer cells</i> (células asesinas naturales)
<b>Nm</b>	Nanómetros
<b>OMP</b>	<i>Outer membrane proteins</i> (proteínas de membrana externa)
<b>OSCPH</b>	<i>Oligonucleotide-specific capture plate hybridization assay</i> (ensayo de hibridación en placa)
<b>Pb</b>	Pares de bases
<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>PCR-RFLP</b>	<i>Restriction fragment length polymorphism-PCR</i> (análisis por restricción de productos de amplificación)
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>Por</b>	Porina
<b>PRRS</b>	<i>Porcine reproductive and respiratory syndrome</i> (síndrome respiratorio y reproductivo porcino)
<b>Q<sup>-</sup></b>	Carga negativa
<b>R<sub>Ct</sub></b>	Fluorescencia en ciclo umbral (PCR).
<b>R<sub>0</sub></b>	Fluorescencia en ciclo inicial (PCR)
<b>REF</b>	<i>Restriction endonuclease finger printing</i> (huellas de endonucleasas de restricción)
<b>RT</b>	Retrotranscriptasa
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.
<b>SLA</b>	<i>Swine leukocyte antigen complex</i> (antígeno de histocompatibilidad porcina)
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico.
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa.
<b>SPF</b>	<i>Specific pathogen free</i> (libres de patógenos)
<b>SSA</b>	Amiloide sérico A
<b>Tbp</b>	<i>Transferrin binding protein</i> (proteína de unión a la transferrina)
<b>TBE</b>	Tampón Tris-Borato-EDTA
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TCR</b>	<i>T-cell receptor</i> (receptor de células T)
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformante β.
<b>TMB</b>	3,3',5, 5' - tetrametilbenzidina
<b>TSB</b>	Caldo de triptona y soja
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral α
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>VLA</b>	<i>Very late activation antigens</i> (antígenos de activación muy tardía)

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución del MALT en el sistema inmune del ganado porcino .....	<b>26</b>
<b>Tabla 2.</b> Métodos para el estudio de poblaciones leucocitarias .....	<b>27</b>
<b>Tabla 3.</b> Subpoblaciones de linfocitos T en base a la expresión de los antígenos CD4 y CD8 .....	<b>31</b>
<b>Tabla 4.</b> Características fenotípicas y funcionales de las subpoblaciones de monocitos CD163 <sup>+</sup> y CD163 <sup>-</sup> .....	<b>33</b>
<b>Tabla 5.</b> Clasificación de las células dendríticas en función de su localización .....	<b>35</b>
<b>Tabla 6.</b> Principales proteínas plasmáticas de fase aguda descritas en el ganado porcino y su variación respecto a los niveles normales .....	<b>37</b>
<b>Tabla 7.</b> Características de los principales isotipos de inmunoglobulinas descritos en el ganado porcino .....	<b>45</b>
<b>Tabla 8.</b> Principales funciones biológicas mediadas por inmunoglobulinas .....	<b>45</b>
<b>Tabla 9.</b> Relación de cepas bacterianas utilizadas en el estudio .....	<b>51</b>
<b>Tabla 10.</b> Cepas de <i>H. parasuis</i> utilizadas en el diseño de una bacterina .....	<b>65</b>
<b>Tabla 11.</b> Formulación vacunal .....	<b>69</b>
<b>Tabla 12.</b> Protocolos de inmunización empleados en cerdos privados de calostro y cerdos de criados de forma convencional .....	<b>75</b>
<b>Tabla 13.</b> Antisueros empleados en los ELISA indirectos .....	<b>82</b>
<b>Tabla 14.</b> Anticuerpos monoclonales empleados en la citometría de flujo .....	<b>85</b>
<b>Tabla 15.</b> Oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR a tiempo real .....	<b>89</b>
<b>Tabla 16.</b> Componentes de la primera mezcla (Mastermix 1) .....	<b>90</b>
<b>Tabla 17.</b> Componentes de la segunda mezcla (Mastermix 2) .....	<b>90</b>
<b>Tabla 18.</b> Programa de RT .....	<b>90</b>
<b>Tabla 19.</b> Componentes de la reacción de PCR .....	<b>90</b>
<b>Tabla 20.</b> Condiciones de amplificación y curva de fusión .....	<b>91</b>
<b>Tabla 21.</b> Concentración de los inductores .....	<b>93</b>
<b>Tabla 22.</b> Valores de UFC/ml ( $\times 10^7$ ) a diferentes tiempos de incubación .....	<b>102</b>
<b>Tabla 23.</b>	
<b>A)</b> Ensayos de inactivación de <i>H. parasuis</i> (serotipo 5) con formaldehído (I) .....	<b>103</b>
<b>B)</b> Ensayos de inactivación de <i>H. parasuis</i> (serotipo 5) con formaldehído (II) .....	<b>104</b>
<b>Tabla 24.</b>	
<b>A)</b> Ensayos de inactivación de <i>H. parasuis</i> (serotipo 5) con thimerosal (I) .....	<b>104</b>
<b>B)</b> Ensayos de inactivación de <i>H. parasuis</i> (serotipo 5) con thimerosal (II) .....	<b>104</b>
<b>Tabla 25.</b> Concentración proteica en los sobrenadantes extraídos con concentraciones de DOC (en $\mu\text{g/ml}$ ) .....	<b>107</b>
<b>Tabla 26.</b> Resumen de las lesiones macroscópicas y microscópicas de los ensayos de inmunización y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>121-122</b>
<b>Tabla 27.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA-in, de la respuesta de las IgM durante la inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo II .....	<b>125</b>
<b>Tabla 28.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA-in, de la respuesta de las IgGt durante la inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo II .....	<b>127</b>

<b>Tabla 29.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG1 durante la inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo II .....	<b>128</b>
<b>Tabla 30.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG2 durante la inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo II .....	<b>130</b>
<b>Tabla 31.</b>	
<b>A) ELISA-sb.</b> Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>132</b>
<b>B) ELISA-in.</b> Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>133</b>
<b>Tabla 32.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgM durante la inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo III .....	<b>136</b>
<b>Tabla 33.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgGt durante la inmunización con una vacuna conjugada y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo III .....	<b>136</b>
<b>Tabla 34.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG1 durante la inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo III .....	<b>138</b>
<b>Tabla 35.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG2 durante la inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo III .....	<b>139</b>
<b>Tabla 36.</b>	
<b>A) ELISA-sb.</b> Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>140</b>
<b>B) ELISA-in.</b> Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>141</b>
<b>Tabla 37.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgM durante la inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo V .....	<b>145</b>
<b>Tabla 38.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgGt durante la inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo V .....	<b>147</b>
<b>Tabla 39.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG1 durante la inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo V .....	<b>148</b>
<b>Tabla 40.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG2 durante la inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo V .....	<b>149</b>
<b>Tabla 41.</b>	
<b>A) ELISA-sb.</b> Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>151</b>
<b>B) ELISA-in.</b> Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>152</b>
<b>Tabla 42.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgM durante la inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo VI .....	<b>154</b>



<b>Tabla 43.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgGt durante la inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . GrupoVI .....	<b>155</b>
<b>Tabla 44.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG1 durante la inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . GrupoVI .....	<b>156</b>
<b>Tabla 45.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG2 durante la inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . GrupoVI .....	<b>158</b>
<b>Tabla 46.</b>	
<b>A) ELISA-sb.</b> Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>160</b>
<b>B) ELISA-in.</b> Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>161</b>
<b>Tabla 47.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgM durante la inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . GrupoVII .....	<b>163</b>
<b>Tabla 48.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgGt durante la inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . GrupoVII .....	<b>164</b>
<b>Tabla 49.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG1 durante la inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . GrupoVII .....	<b>165</b>
<b>Tabla 50.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG2 durante la inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . GrupoVII .....	<b>167</b>
<b>Tabla 51.</b>	
<b>A) ELISA-sb.</b> Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>169</b>
<b>B) ELISA-in.</b> Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>170</b>
<b>Tabla 52.</b>	
<b>A) ELISA-sb.</b> Resumen y comparación de la evolución de las IgM entre los grupos de estudio .....	<b>172</b>
<b>B) ELISA-in.</b> Resumen y comparación de la evolución de las IgM entre los grupos de estudio .....	<b>173</b>
<b>Tabla 53.</b>	
<b>A) ELISA-sb.</b> Resumen y comparación de la evolución de las IgGt entre los grupos de estudio .....	<b>174</b>
<b>B) .ELISA-in.</b> Resumen y comparación de la evolución de las IgGt entre los grupos de estudio ....	<b>175</b>
<b>Tabla 54.</b>	
<b>A) ELISA-sb.</b> Resumen y comparación de la evolución de las IgG1 entre los grupos de estudio ....	<b>176</b>
<b>B) ELISA-in.</b> Resumen y comparación de la evolución de las IgG1 entre los grupos de estudio ....	<b>177</b>
<b>Tabla 55</b>	
<b>A) .ELISA-sb.</b> Resumen y comparación de la evolución de las IgG2 entre los grupos de estudio ...	<b>178</b>
<b>B) .ELISA-in.</b> Resumen y comparación de la evolución de las IgG2 entre los grupos de estudio ...	<b>179</b>
<b>Tabla 56.</b> Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo I, obtenida por gradiente de densidad .....	<b>182</b>

<b>Tabla 57.</b> Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo II obtenida por gradiente de densidad .....	<b>183</b>
<b>Tabla 58.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar la ratio SWC3/CD3 en el grupo II. <b>D.P.I.</b> días post-infección .....	<b>184</b>
<b>Tabla 59.</b> Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo III, obtenida por gradiente de densidad .....	<b>184</b>
<b>Tabla 60.</b> Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo IV obtenida por gradiente de densidad. ....	<b>186</b>
<b>Tabla 61.</b> Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo V, obtenida por gradiente de densidad .....	<b>187</b>
<b>Tabla 62.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar la ratio SWC3/CD3 en el grupo V .....	<b>188</b>
<b>Tabla 63</b> Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo VI, obtenida por gradiente de densidad .....	<b>188</b>
<b>Tabla 64.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar la ratio SWC3/CD3 en el grupo VI .....	<b>188</b>
<b>Tabla 65.</b> Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo VII obtenida por gradiente de densidad .....	<b>190</b>
<b>Tabla 66</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar la ratio SWC3/CD3 en el grupo VII .....	<b>191</b>
<b>Tabla 67.</b> Evolución de los marcadores leucocitarios y sus ratios, después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>192-193</b>
<b>Tabla 68.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar los porcentajes relativos de expresión de marcadores leucocitarios y sus ratios en los diferentes grupos experimentales .....	<b>199</b>
<b>Tabla 69.</b> Promedio y desviación estándar de los valores de c.p.m. en respuesta a diferentes concentraciones de la cepa Nagasaki de <i>H. parasuis</i> inactivada con calor .....	<b>201</b>
<b>Tabla 70.</b> Promedio y desviación estándar de los valores c.p.m. en en respuesta a diferentes concentraciones de sobrenadantes con proteínas de membrana externa enriquecidos en TbpB, de la cepa Nagasaki de <i>H. parasuis</i> .....	<b>201</b>
<b>Tabla 71.</b> Promedio y desviación estándar de los valores c.p.m. en respuesta a diferentes concentraciones de extractos eluidos de <i>E.coli</i> con la proteína recombinante PBAD-Thio-TbpB-V5-His .....	<b>202</b>
<b>Tabla 72.</b> Valores de c.p.m. en respuesta a la cepa Nagasaki de <i>H. parasuis</i> inactivada con calor, a los sobrenadantes de membrana externa con OMP y a la proteína recombinante PBAD-Thio-TbpB-V5-His (TbpB-His) .....	<b>203</b>
<b>Tabla 73.</b> Resumen de la respuesta de la pig MAP en los distintos grupos del estudio .....	<b>223</b>
<b>Tabla 74.</b> Resumen de la respuesta de la haptoglobina en los distintos grupos del estudio .....	<b>224</b>
<b>Tabla 75.</b> Resumen de la respuesta de la CRP en los distintos grupos del estudio .....	<b>225</b>
<b>Tabla 76.</b> Resumen de la respuesta de la apolipoproteína A-I en los distintos grupos del estudio ...	<b>226</b>
<b>Tabla 77.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar las concentraciones de la pig MAP en los diferentes grupos experimentales .....	<b>227</b>
<b>Tabla 78.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar las concentraciones de haptoglobina en los diferentes grupos experimentales .....	<b>227</b>
<b>Tabla 79.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar las concentraciones de CRP en los diferentes grupos experimentales .....	<b>228</b>
<b>Tabla 80.</b> Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar las concentraciones de apolipoproteína A-I en los diferentes grupos experimentales .....	<b>228</b>



<b>Tabla 97.</b> Resultados de la cuantificación relativa en el grupo III de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor $R_0$ normalizado con el valor $R_0$ de un gen conservado (ciclofilina). Ganglio linfático .....	<b>242</b>
<b>Tabla 98.</b> Resultados de la cuantificación relativa en el grupo IV de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor $R_0$ normalizado con el valor $R_0$ de un gen conservado (ciclofilina). Ganglio linfático .....	<b>242</b>
<b>Tabla 99.</b> Resultados de la cuantificación relativa en el grupo V de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor $R_0$ normalizado con el valor $R_0$ de un gen conservado (ciclofilina). Ganglio linfático .....	<b>242</b>
<b>Tabla 100.</b> Resultados de la cuantificación relativa en el grupo VI de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor $R_0$ normalizado con el valor $R_0$ de un gen conservado (ciclofilina). Ganglio linfático .....	<b>243</b>
<b>Tabla 101.</b> Resultados de la cuantificación relativa en el grupo VII de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor $R_0$ normalizado con el valor $R_0$ de un gen conservado (ciclofilina). Ganglio linfático .....	<b>243</b>
<b>Tabla 102.</b> Resultados de la cuantificación relativa en el grupo I de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor $R_0$ normalizado con el valor $R_0$ de un gen conservado (ciclofilina). Cerebro .....	<b>247</b>
<b>Tabla 103.</b> Resultados de la cuantificación relativa en el grupo II de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor $R_0$ normalizado con el valor $R_0$ de un gen conservado (ciclofilina). Cerebro .....	<b>247</b>
<b>Tabla 104.</b> Resultados de la cuantificación relativa en el grupo III de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor $R_0$ normalizado con el valor $R_0$ de un gen conservado (ciclofilina). Cerebro .....	<b>247</b>
<b>Tabla 105.</b> Resultados de la cuantificación relativa en el grupo IV de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor $R_0$ normalizado con el valor $R_0$ de un gen conservado (ciclofilina). Cerebro .....	<b>248</b>
<b>Tabla 106.</b> Resultados de la cuantificación relativa en el grupo V de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor $R_0$ normalizado con el valor $R_0$ de un gen conservado (ciclofilina). Cerebro .....	<b>248</b>
<b>Tabla 107.</b> Resultados de la cuantificación relativa en el grupo VI de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor $R_0$ normalizado con el valor $R_0$ de un gen conservado (ciclofilina). Cerebro .....	<b>248</b>
<b>Tabla 108.</b> Resultados de la cuantificación relativa en el grupo VII de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor $R_0$ normalizado con el valor $R_0$ de un gen conservado (ciclofilina). Cerebro .....	<b>248</b>
<b>Tabla 109.</b> Resultados del análisis comparativo de la expresión de citocinas entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección .....	<b>252</b>
<b>Tabla 110.</b> Registro de las temperaturas corporales en el grupo infectado con una DL (grupo I) ....	<b>313</b>
<b>Tabla 111.</b> Registro de las temperaturas corporales en el grupo inmunizado con una bacterina e infectado con una DL (grupo II) .....	<b>313</b>
<b>Tabla 112.</b> Registro de las temperaturas corporales en el grupo inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL (grupo III) .....	<b>314</b>
<b>Tabla 113.</b> Registro de las temperaturas corporales en el grupo inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL (grupo IV) .....	<b>314</b>
<b>Tabla 114.</b> Registro de las temperaturas corporales en el grupo inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL (grupo V) .....	<b>315</b>

**Tabla 115.** Registro de las temperaturas corporales en el grupo inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una DL (grupo VI) ..... **315**

**Tabla 116.** Registro de las temperaturas corporales en el grupo inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una DL (grupo VII)..... **316**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Líneas celulares que derivan de una célula madre pluripotencial .....	26
<b>Fig. 2.</b> Estructura del TCR en LT $\alpha\beta$ y LT $\gamma\delta$ .....	28
<b>Fig. 3.</b> Principales alteraciones metabólicas, endocrinas y fisiológicas que constituyen la respuesta de fase aguda .....	37
<b>Fig. 4.</b> Citocinas inflamatorias: efectos locales y sistémicos .....	40
<b>Fig. 5.</b> Esquema de la cooperación celular durante la respuesta adaptativa .....	43
<b>Fig. 6.</b> Cinética de la aparición, mantenimiento y desaparición de los tipos de inmunoglobulinas .....	47
<b>Fig. 7.</b> Electroforesis del RNA .....	80
<b>Fig. 8.</b> Crecimiento de 4 cepas del serotipo 5 de <i>H. parasuis</i> .....	99
<b>Fig. 9.</b> Crecimiento de 4 cepas del serotipo 4 de <i>H. parasuis</i> .....	99
<b>Fig. 10.</b> Crecimiento de 4 cepas del serotipo 2 de <i>H. parasuis</i> .....	100
<b>Fig. 11.</b> Crecimiento de 2 cepas del serotipo 5 de <i>H. parasuis</i> .....	100
<b>Fig. 12.</b> Crecimiento de 2 cepas del serotipo 4 de <i>H. parasuis</i> .....	101
<b>Fig. 13.</b> Crecimiento de 2 cepas del serotipo 2 de <i>H. parasuis</i> .....	101
<b>Fig. 14.</b> Curvas de crecimiento de las cepas 11261, 13 PC 1 y 19 M2 de <i>H. parasuis</i> .....	101
<b>Fig. 15.</b> SDS-PAGE con sedimentos bacterianos .....	105
<b>Fig. 16.</b> <i>Immunoblotting</i> con antisuero policlonal de conejo frente a la proteína de fusión pGEX-6P-1-GST-TbpB del serotipo 5 de <i>H. parasuis</i> . Se muestra la concentración de la proteína <b>TbpB</b> tras la adición de diferentes concentraciones de detergente. <b>1:</b> sin DOC; <b>2:</b> con DOC al 0,01%; <b>3</b> con DOC al 0,015%; <b>4</b> con DOC al 0,025%; <b>5</b> con DOC al 0,05%, <b>6</b> con DOC al 0,075% y <b>7</b> con DOC 0,1%. ..	108
<b>Fig. 17.</b> <i>Immunoblotting</i> con el antisuero policlonal de conejo frente a la proteína de fusión pGEX-6P-1-GST-TbpB del serotipo 5 de <i>H. parasuis</i> . Se muestra la concentración de la proteína <b>TbpB</b> tras la adición de diferentes concentraciones de detergente. <b>1:</b> con DOC 0,075%; <b>2</b> con DOC al 0,1%; <b>3</b> con DOC al 0,15% y <b>4</b> con DOC al 0,05% .....	108
<b>Fig. 18.</b> <i>Immunoblotting</i> con el antisuero policlonal anti-TbpA de <i>A. pleuropneumoniae</i> . Muestra la expresión de la proteína <b>TbpA</b> de <i>H. parasuis</i> en sedimentos bacterianos y en los sobrenadantes obtenidos tras la adición de diferentes concentraciones de DOC. <b>1:</b> con DOC al 0,075%, <b>2:</b> con DOC al 0,1%, <b>3:</b> con DOC al 0,15%, <b>4:</b> con DOC al 0,05%, <b>5</b> y <b>6:</b> Sedimentos bacterianos .....	108
<b>Fig. 19.</b> <i>Immunoblotting</i> con el antisuero policlonal de conejo frente a la proteína de fusión pGEX-6P-1-GST-TbpB del serotipo 5 de <i>H. parasuis</i> . Muestra la expresión de la proteína <b>TbpB</b> de <i>H. parasuis</i> en los sobrenadantes antes ( <b>1</b> ) y después ( <b>2</b> ) del proceso de precipitación con ácido tricloroacético ..	109
<b>Fig. 20.</b> <i>Immunoblotting</i> con el antisuero policlonal de conejo frente a la proteína de fusión pGEX-6P-1-GST-TbpB del serotipo 5 de <i>H. parasuis</i> . Muestra la expresión de la proteína <b>TbpB</b> de <i>H. parasuis</i> en sobrenadantes antes y después del proceso de ultrafiltración .....	110
<b>Fig. 21.</b> <i>Immunoblotting</i> con el antisuero policlonal de conejo frente a la proteína de fusión pGEX-6P-1-GST-TbpB del serotipo 5 de <i>H. parasuis</i> . <b>1:</b> Inactivación con thimerosal; <b>2:</b> Filtración; <b>3.</b> Ultrafiltración y <b>4.</b> Sobrenadante sin inactivar .....	110
<b>Fig. 22.</b> <i>Immunoblotting</i> con el anticuerpo monoclonal anti-V5 que identifica el epítipo V5 presente en la proteína de fusión pBAD-Thio-TbpB-V5-His. <b>1.</b> Extracto eluido, <b>2.</b> Extracto eluido y concentrado por ultrafiltración, <b>3.</b> Extracto concentrado e inactivado .....	111
<b>Fig. 23.</b> Evolución de las IgM en el grupo I, infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	123
<b>Fig. 24.</b> Evolución de las IgGt en el grupo I, infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	124
<b>Fig. 25.</b> Evolución de las IgG1 en el grupo I, infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	124
<b>Fig. 26.</b> Evolución de las IgG2 en el grupo I, infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	124

<b>Fig. 27.</b> Evolución de las IgM en el grupo II, inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>126</b>
<b>Fig. 28.</b> Evolución de las IgGt en el grupo II, inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>127</b>
<b>Fig. 29.</b> Evolución de las IgG1 en el grupo II, inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>129</b>
<b>Fig. 30.</b> Evolución de las IgG2 en el grupo II, inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>130</b>
<b>Fig. 31.</b> Evolución del índice de avidéz medio de las IgG en el grupo II, inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>131</b>
<b>Fig. 32.</b> Evolución de las IgM en el grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>135</b>
<b>Fig. 33.</b> Evolución de las IgGt en el grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>135</b>
<b>Fig. 34.</b> Evolución de la IgG1 en el grupo III inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>137</b>
<b>Fig. 35.</b> Evolución de las IgG2 en el grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>138</b>
<b>Fig. 36.</b> Evolución de índice de avidéz medio de las IgGt en el grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>139</b>
<b>Fig. 37.</b> Evolución de las IgM en el grupo IV, inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>142</b>
<b>Fig. 38.</b> Evolución de las IgGt en el grupo IV, inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>142</b>
<b>Fig. 39.</b> Evolución de la IgG1 en el grupo IV, inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>143</b>
<b>Fig. 40.</b> Evolución de la IgG2 en el grupo IV, inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>143</b>
<b>Fig. 41.</b> Evolución de las IgM en el grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL de <i>Haemophilus parasui</i> .....	<b>145</b>
<b>Fig. 42.</b> Evolución de las IgGt en el grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>146</b>
<b>Fig. 43.</b> Evolución de las IgG1 en el grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una dosis letal de <i>H. parasuis</i> .....	<b>148</b>
<b>Fig. 44.</b> Evolución de las IgG2 en el grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>150</b>
<b>Fig. 45.</b> Evolución de índice de avidéz medio de las IgG en el grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>150</b>
<b>Fig. 46.</b> Evolución de las IgM en el grupo VI, inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>153</b>
<b>Fig. 47.</b> Evolución de las IgGt en el grupo VI, inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una dosis letal de <i>H. parasuis</i> .....	<b>155</b>
<b>Fig. 48.</b> Evolución de las IgG1 en el grupo VI, inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>157</b>
<b>Fig. 49.</b> Evolución de las IgG2 en el grupo VI, inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>158</b>

<b>Fig. 50.</b> Evolución de índice de avidéz medio de las IgGt en el grupo VI inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>159</b>
<b>Fig. 51.</b> Evolución de las IgM en el grupo VII, inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>162</b>
<b>Fig. 52.</b> Evolución de las IgGt en el grupo VII, inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una dosis letal de <i>H. parasuis</i> . .....	<b>164</b>
<b>Fig. 53.</b> Evolución de las IgG1 en en el grupo VII, inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> . .....	<b>166</b>
<b>Fig. 54.</b> Evolución de las IgG2 en el grupo VII, inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>167</b>
<b>Fig. 55.</b> Evolución del índice de avidéz medio de las IgGt en el grupo VII inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> . , desafío y <b>D.P.I.</b> , días post-infección .....	<b>168</b>
<b>Fig. 56.</b> Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo I, obtenida por gradiente de densidad .....	<b>181</b>
<b>Fig. 57.</b> Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo II, obtenida por gradiente de densidad .....	<b>183</b>
<b>Fig. 58.</b> Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo III, obtenida por gradiente de densidad .....	<b>185</b>
<b>Fig. 59.</b> Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo IV, obtenida por gradiente de densidad .....	<b>186</b>
<b>Fig. 60.</b> Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo V, obtenida por gradiente de densidad .....	<b>187</b>
<b>Fig. 61.</b> Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo VI, obtenida por gradiente de densidad .....	<b>189</b>
<b>Fig. 62.</b> Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo VII, obtenida por gradiente de densidad .....	<b>190</b>
<b>Fig. 63.</b> Índices de proliferación en respuesta a la cepa Nagasaki de <i>H. parasuis</i> inactivada con calor, a los sobrenadantes con OMP, y a la proteína recombinante PBAD-Thio-TbpB-V5-His (TbpB-His) .....	<b>203</b>
<b>Fig. 64.</b> Evolución de los niveles de pig MAP después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo I .....	<b>205</b>
<b>Fig. 65.</b> Evolución de los niveles de haptoglobina después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo I .....	<b>206</b>
<b>Fig. 66.</b> Evolución de los niveles de CRP después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo I .....	<b>207</b>
<b>Fig. 67.</b> Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo I .....	<b>207</b>
<b>Fig. 68.</b> Evolución de los niveles de pig MAP después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo II .....	<b>208</b>
<b>Fig. 69.</b> Evolución de los niveles de haptoglobina después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo II .....	<b>209</b>
<b>Fig. 70.</b> Evolución de los niveles de CRP después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo II .....	<b>209</b>
<b>Fig. 71.</b> Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo II .....	<b>210</b>
<b>Fig. 72.</b> Evolución de los niveles de pig MAP después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo III .....	<b>211</b>



<b>Fig. 73.</b> Evolución de los niveles de haptoglobina después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo III .....	<b>212</b>
<b>Fig. 74.</b> Evolución de los niveles de CRP después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo III .....	<b>213</b>
<b>Fig. 75.</b> Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo III .....	<b>214</b>
<b>Fig. 76.</b> Evolución de los niveles de pig MAP después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo V .....	<b>214</b>
<b>Fig. 77.</b> Evolución de los niveles de haptoglobina después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo V .....	<b>215</b>
<b>Fig. 78.</b> Evolución de los niveles de CRP después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo V .....	<b>216</b>
<b>Fig. 79.</b> Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo V .....	<b>217</b>
<b>Fig. 80.</b> Evolución de los niveles de pig MAP después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo VI .....	<b>218</b>
<b>Fig. 81.</b> Evolución de los niveles de haptoglobina después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo VI .....	<b>218</b>
<b>Fig. 82.</b> Evolución de los niveles de CRP después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo VI .....	<b>219</b>
<b>Fig. 83.</b> Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo VI .....	<b>220</b>
<b>Fig. 84.</b> Evolución de los niveles de pig MAP después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo VII .....	<b>220</b>
<b>Fig. 85.</b> Evolución de los niveles de haptoglobina después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo VII .....	<b>221</b>
<b>Fig. 86.</b> Evolución de los niveles de CRP después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo VII .....	<b>222</b>
<b>Fig. 87.</b> Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I después de la infección con una DL de <i>H. parasuis</i> . Grupo VII .....	<b>222</b>
<b>Fig. 88.</b> Grupo I. Cavidad abdominal. Peritonitis fibrinosa .....	<b>317</b>
<b>Fig. 89.</b> Grupo I. Congestión visceral generalizada .....	<b>317</b>
<b>Fig. 90.</b> Grupo I. Hígado .....	<b>317</b>
<b>Fig. 91.</b> Grupo I. Bazo .....	<b>318</b>
<b>Fig. 92.</b> Grupo I. Ganglio linfático mesentérico .....	<b>318</b>
<b>Fig. 93.</b> Grupo I. Pulmón .....	<b>318</b>
<b>Fig. 94.</b> Grupo II. Pulmón .....	<b>319</b>
<b>Fig. 95.</b> Grupo II. Bazo .....	<b>319</b>
<b>Fig. 96.</b> Grupo II. Ganglio linfático mesentérico .....	<b>319</b>
<b>Fig. 97.</b> Grupo III (cerdos no supervivientes). Pulmón .....	<b>319</b>
<b>Fig. 98.</b> Grupo III (cerdos no supervivientes). Encéfalo .....	<b>320</b>
<b>Fig. 99.</b> Grupo III (cerdos no supervivientes). Encefálo.....	<b>320</b>

<b>Fig 100.</b> Grupo III. Pulmón .....	<b>320</b>
<b>Fig 101.</b> Grupo IV. Corazón .....	<b>321</b>
<b>Fig. 102.</b> Grupo IV. Riñón .....	<b>321</b>
<b>Fig. 103.</b> Grupo IV. Bazo .....	<b>321</b>
<b>Fig. 104.</b> Grupo IV. Pulmón .....	<b>322</b>
<b>Fig 105.</b> Grupo V (cerdos no supervivientes). Pulmón .....	<b>322</b>
<b>Fig. 106.</b> Grupo V (cerdos no supervivientes). Ganglio linfático mesentérico .....	<b>322</b>
<b>Fig 107.</b> Grupo VII. Bazo .....	<b>322</b>
<b>Fig. 108.</b> Grupo VII. Riñon .....	<b>323</b>
<b>Fig. 109.</b> Grupo VI. Pulmón .....	<b>323</b>
<b>Fig 110.</b> Grupo VII. Pulmón .....	<b>323</b>
<b>Fig. 111.</b> Evolución de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo I, infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>324</b>
<b>Fig. 112.</b> Evolución de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo II, inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL de <i>H.parasuis</i> .....	<b>325</b>
<b>Fig. 113.</b> Evolución de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>326</b>
<b>Fig. 114.</b> Evolución de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo IV, inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>327</b>
<b>Fig. 115.</b> Evolución de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL de <i>Haemophilus parasuis</i> .....	<b>328</b>
<b>Fig. 116.</b> Evolución de las IgM. IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo VI inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>329</b>
<b>Fig. 117.</b> Evolución de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo VII inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una DL de <i>H. parasuis</i> .....	<b>330</b>
<b>Fig. 118.</b> Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo infectado con una DL (grupo I) .....	<b>331-332</b>
<b>Fig. 119.</b> Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL (grupo II) .....	<b>333-334</b>
<b>Fig. 120.</b> Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo inmunizado con una vacuna conjugada y posteriormente infectado con una DL (grupo III) .....	<b>335-336</b>
<b>Fig. 121.</b> Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL (grupo IV) .....	<b>337-338</b>
<b>Fig. 122.</b> Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una dosis letal (grupo V) .....	<b>339-340</b>

- Fig. 123.** Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una DL (grupo VI) ..... **341-342**
- Fig. 124.** Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo inmunizado con la vacuna comercial B y posteriormente infectado con una DL (grupo VII) ..... **343-344**

# INTRODUCCIÓN

# Capítulo I: *Haemophilus parasuis*

## **1. La enfermedad de Glässer**

### **2. *Haemophilus parasuis***

#### 2.1. Caracteres generales

#### 2.2. Factores de virulencia

##### 2.2.1. Cápsula

##### 2.2.2. Lipooligosacárido

##### 2.2.3. Proteínas de membrana externa (OMPs)

##### 2.2.4. Superóxido dismutasa

##### 2.2.5. Neuraminidasa (sialidasa)

##### 2.2.6. Fimbrias y adhesinas

##### 2.2.7. Biofilms

##### 2.2.8. Factores de virulencia relacionados con la captación de hierro

#### 2.3. Taxonomía, clasificación. Tipificación

##### 2.3.1. Métodos serológicos de tipificación

##### 2.3.2. Métodos moleculares de tipificación

## **3. Epidemiología**

## **4. Patogénesis**

## **5. Cuadro clínico y lesional**

#### 5.1. Poliserositis fibrinosa o enfermedad de Glässer

#### 5.2. Septicemia

#### 5.3. Miositis de los músculos maseteros

#### 5.4. Forma respiratoria

## **6. Diagnóstico**

#### 6.1. Diagnóstico directo

#### 6.2. Diagnóstico indirecto

##### 6.1. Métodos serológicos

##### 6.2. Métodos moleculares

## **7. Respuesta inmune frente a la infección**

#### 7.1. Respuesta innata

#### 7.2. Respuesta adquirida

##### 7.2.1. Respuesta humoral

##### 7.2.2. Respuesta celular

## **8. Control y prevención**



*Haemophilus parasuis* es el agente causal de la enfermedad de Glässer, un proceso del ganado porcino que afecta principalmente a los animales jóvenes, cursando con poliserositis, artritis, neumonía, meningitis y otras manifestaciones (Rapp-Gabrielson, 1999; Rodríguez-Ferri y cols., 2000). Se considera uno de los problemas porcinos emergentes de mayor interés económico, porque en las condiciones de la explotación intensiva actual, con un alto estatus sanitario, se han detectado casos agudos de la enfermedad en animales de cualquier edad (Rodríguez-Ferri y cols., 2000), ocasionando auténticos desastres económicos debidos a la mortalidad y a los costos derivados de los retrasos en el crecimiento (Rapp-Gabrielson, 1999). La prevalencia de la enfermedad ha aumentado de forma espectacular en los últimos años, especialmente asociada al síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP) (Solano y cols., 1997)

## 1. La enfermedad de Glässer

Fue descrita en 1910 por Glässer como una inflamación fibrinosa de las articulaciones de los cerdos durante los tres primeros meses de vida. Se asociaba a situaciones de estrés y presentaba una elevada mortalidad. En 1942, Hjärre y Wramby (Rodríguez-Ferri, y cols., 2000) identificaron el agente como *Haemophilus suis*; posteriormente, Lecce (Lecce y cols., 1960) lo denominaría *Haemophilus influenzae*. En 1962 se reprodujo la enfermedad en cerdos mediante la inoculación intranasal de cepas aisladas de animales con procesos meningíticos (cit. por del Río, 2004). Con los trabajos realizados por

Birbestein (Birbestein y cols., 1969) y Kilian (Kilian, 1976), se observó la independencia de esta especie bacteriana del factor X de coagulación de la sangre y el agente recibió la denominación actual de *Haemophilus parasuis*. En 1977, Siodrov y cols. (Siodrov y cols., 1977) reprodujeron de forma experimental la enfermedad en cobayos y ratones. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la escasa o nula patogenicidad de la bacteria en el ratón, al contrario de lo que sucedía en el caso del cobayo, en el que originaba cuadros de meningitis, septicemia y, en algunos casos, la muerte del animal. Estos resultados serían corroborados en 1981 por Morozumi y cols, quienes concluyeron que el cobaya es el modelo experimental más apropiado. La investigación fue continuada por Rapp-Gabrielson y cols., en 1992, comparando la virulencia de los siete primeros serotipos en el cobaya. La inoculación por la vía intraperitoneal no ofrecía diferencias significativas entre los serotipos; sin embargo, cuando se empleaba la vía intratraqueal, los resultados obtenidos eran los siguientes: los serotipos 1 y 5 eran los más invasivos, con localizaciones pulmonares y sistémicas, pudiendo producir la muerte o una septicemia generalizada, en función de la dosis; los serotipos 2 y 6, de menor invasividad, provocaban una bronconeumonía grave, con mortalidad a dosis elevadas y los serotipos restantes producían sintomatología pasajera, con leve bronconeumonía, aunque no se conseguía aislar el agente de las muestras de los órganos de estos animales. Cuando la infección se realizaba por la vía intranasal, sólo los serotipos 1 y 5 producían los síntomas y lesiones típicos de la enfermedad de Glässer.

Para reproducir la infección en el hospedador natural se han empleado cerdos SPF y cerdos convencionales inoculados por las vías intraperitoneal (Morozumi y cols., 1981) o intranasal (Barigazzi y cols., 1994); también se han utilizado cerdos privados de calostro y obtenidos por cesárea (CDCD, “colostrum-deprived, cesarean derived”), mediante la inoculación intratraqueal (Neil y cols., 1969) o intranasal por aerosoles (Smart y Miniats, 1989). La alternativa más reciente son los cerdos privados de calostro obtenidos por parto natural e infectados por vía intratraqueal. A diferencia de los cerdos de cría convencional, estos sí desarrollaban la enfermedad y se conseguía confirmar la presencia de la bacteria por PCR y aislamiento a partir de diferentes órganos y tejidos afectados (Oliveira y cols., 2003, Blanco y cols., 2004).

## 2. *Haemophilus parasuis*

### 2.1. Caracteres generales

*H. parasuis* incluye pequeños bacilos o cocobacilos Gram negativos, pleomórficos, con una longitud variable, desde 1 a 7  $\mu\text{m}$  de largo y de 0,2 a 0,7  $\mu\text{m}$  de ancho. Más de la mitad de las cepas aisladas son acapsuladas. Es dependiente del factor V de coagulación de la sangre (NAD), posee actividades catalasa y oxidasa débiles, pero no ureasa. Produce ácido a partir de glucosa, manosa, maltosa y sacarosa, pero no de xilosa, manitol, ramnosa, arabinosa o lactosa. Es capaz de reducir los nitratos a nitritos, no descarboxila la ornitina ni la lisina o la arginina, y no produce indol (Vahle y cols., 1995).

Su cultivo *in vitro* requiere NAD en una proporción de 0,01-0,025%, una temperatura de 37°C y 24-48 horas de incubación. Las colonias son translúcidas, de 0,12  $\mu\text{m}$  de diámetro y no hemolíticas (característica que, junto con otras permite diferenciarlo de *Actinobacillus pleuropneumoniae*). Es anaerobio facultativo (del Río, 2004).

Según la clasificación actual, atendiendo a la reacción con antiseros policlonales de conejo en el *test* de precipitación en gel de ágar, se han descrito 15 serotipos (Rapp-Gabrielson, 1992).

### 2.2. Factores de virulencia

La importancia del conocimiento de los factores de virulencia radica en su utilidad para clarificar la patogenia de la enfermedad y desarrollar estrategias para combatirla, desde técnicas diagnósticas hasta el desarrollo de tratamientos y medidas preventivas eficaces.

#### 2.2.1. Cápsula

Se trata de un polímero de carbohidratos con grupos ácido que le proporciona una fuerte Q. En la mayoría de las cepas presenta residuos de azúcar en las cadenas 2 y 4. No existen datos concluyentes sobre la existencia de cápsula en los 15 serotipos de *H. parasuis*. En 1986, Morozumi y Nicolet describieron las cápsulas de los primeros 9 serotipos por medio de técnicas de aglutinación en acriflavina y hervido, de producción de iridiscencia y de precipitación del polisacárido ácido con Cetavlon® o hexadecil trimetil amonio (en este último caso, algunas de las cepas capsuladas no



precipitaron, lo que llevó a pensar en la existencia de diferencias químicas en la composición de las mismas). Estos experimentos se repitieron en nuestro laboratorio (datos sin publicar), pero únicamente se obtuvieron resultados similares a los de Morozumi y Nicolet con los serotipos 2, 3 y 5. Sólo se pudo obtener resultados concluyentes para los serotipos 1, 2, 3 y 11, que se clasificaron como capsulados, y para el 5, que se clasificó como no capsulado.

### 2.2.2. Lipooligosacárido (LOS)

A diferencia de otras bacterias Gram negativas, *H. parasuis* carece de las cadenas laterales O, de ahí que este componente de la pared celular reciba la denominación de lipooligosacárido, en vez de la habitual de lipopolisacárido. Los estudios sobre la interacción del LOS con los mecanismos de defensa del hospedador *in vivo e in vitro* (Amano y cols., 1997) ponen de manifiesto su papel en la respuesta inflamatoria, produciendo trombosis y coagulación intravascular diseminada. La acción parece ser ejercida sobre monocitos y macrófagos, que secretan una elevada variedad de mediadores proinflamatorios.

Por medio de la prueba de lisado de amebocitos se determinó que la actividad biológica del LOS es de 5,6 UI/ng. Se han realizado estudios *in vitro* para valorar la capacidad mitogénica del LOS de *H. parasuis* en células del bazo de ratones BALB/c, y se observó que decrecía a partir de los 200 µg, pero que no había diferencias cuando su concentración se encontraba entre 2 ng y 2 µg/ml. Se valoró también la producción de

TNF- $\alpha$  en respuesta al LOS y se comprobó que era independiente de la dosis y similar a la que se producía frente a otras bacterias Gram negativas como *E. coli* o *A. pleuropneumoniae* (Ogikubo y cols., 1999). Sin embargo, existe cierta controversia con respecto al papel del LOS en la virulencia bacteriana, puesto que tanto las cepas virulentas como las avirulentas presentan LOS con patrones similares. (Zucker y cols., 1996).

### 2.2.3. Proteínas de membrana externa (OMP, “outer membrane proteins”)

Existen diversos estudios que proponen una relación entre estas proteínas y la virulencia (Munich y cols., 1992; Rapp-Gabrielson, 1999; Ruíz y cols., 2001) basándose en la existencia de una homología en los patrones de DNA y de las OMPs de los aislamientos clínicos. Sin embargo, otros autores (Rosner y cols., 1991 Nielsen, 1993) defienden que también se puede encontrar homología entre las cepas de cerdos sanos. En estudios realizados en nuestro laboratorio (del Río, 2004), se ha puesto de manifiesto que algunas de estas proteínas se producen a una mayor concentración en condiciones restrictivas de hierro, por lo que facilitarían la supervivencia del agente en el hospedador.

Estas proteínas OMP se diferencian en dos grupos, las integrales de membrana y las lipoproteínas, que se anclan a la membrana por su extremo N-terminal. Se han estudiado ampliamente en otras bacterias Gram negativas obteniéndose los siguientes datos:

- Son mecanismos de resistencia frente a péptidos antimicrobianos. Funcionalmente, bien

provocan su adhesión seguida de degradación (Stumpe y cols., 1998), o bien impiden su unión a la membrana externa mediante modificación de su permeabilidad.

- Proporcionan resistencia a la acción bactericida del suero, impidiendo la activación del sistema del complemento y/o bloqueando la formación del complejo C5-C9 de ataque de la membrana, como ocurre en el caso de la Por1A (porina 1A) de *Neisseria gonorrhoeae* (Morello y Bohnhoff, 1989; Carbonetti y cols., 1990).

- Actúan como mecanismos de defensa frente a las sales biliares, función desarrollada principalmente por las porinas, como las OmpF y OmpC de *E. coli*. (Thanassi y cols., 1997) y las OmpU y OmpT de *Vibrio cholerae* (Provenzano y Klose, 2000)

#### 2.2.4. Superóxido dismutasa (SOD)

Se ha descrito una SOD con resistencia a la cianida y al peróxido de hidrógeno en todas las especies del género *Haemophilus*, pero además, en el caso concreto de *H. parasuis* y algunas otras especies del género, se ha observado una segunda SOD dependiente de cobre y zinc (Langford y cols., 1992). Su mecanismo de acción se basa en catalizar la conversión de los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno, confiriendo de esta forma protección frente a la acción oxidativa de los neutrófilos. (Mc Cord y Fridovich, 1969; Clark y cols., 1987; Hasset y Cohen, 1989; Farrant y cols., 1997).

#### 2.2.5. Neuraminidasa (sialidasa)

La neuraminidasa de *H. parasuis* se caracteriza porque es inhibida por Neu-Ac2 (inhibidor específico) y no por EDTA o EGTA, por lo que no depende de cationes divalentes para actuar (Liechtensteiger y Vimr, 1997 y 2003). No presenta actividad frente a la mucina o el ácido colomínico y sin embargo, sí es activa frente a la feuína, la N-acetilneuroaminolactosa y la  $\alpha$ -ácido glicoproteína. Cuando se purificó y renaturalizó, presentaba un peso molecular de 82 kDa (Liechtensteiger 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 indicaría que el ácido es metabolizado por la bacteria (Liechtensteiger y Vimr, 1997 y 2003). Se cree que esta enzima junto con permeasas y aldolasas, podría intervenir en la virulencia bacteriana, captando carbohidratos de la célula hospedadora.

#### 2.2.6. Fimbrias y adhesinas

Los estudios realizados sobre la producción de fimbrias y membranas en una infección experimental en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo, pusieron de manifiesto que su expresión depende de las condiciones de cultivo. Entre los hallazgos encontrados, destacaba el mayor grosor de la pared bacteriana en las zonas lesionadas del

mesodermo y la presencia de invaginaciones citoplasmáticas y estructuras filamentosas de 3 nm de diámetro, adyacentes al glucocálix, que comunicaban a las bacterias entre sí. Estas estructuras desaparecían tras cultivar la bacteria en un medio sólido o después de pases sucesivos en agar. Tampoco era posible su tinción negativa (Munch y cols., 1992).

Se han caracterizado las adhesinas P5 y P2 en todos los serotipos de *H. parasuis*, de carácter proteico y con gran homología con las descritas previamente en *Haemophilus influenzae*. La adhesina P5 es una proteína de 32 kDa, que es reconocida por anticuerpos monoclonales desarrollados frente a la adhesina de *H. influenzae*, por lo que el epitopo diana estaría 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 CEA humano (“*carcinoembryonic antigen family*”), aunque se desconoce si se podría unir al de origen porcino (Mc.Vicker y Tabatai., 2006). La adhesina P2 también presenta epitopos conservados y se ha observado que su peso molecular es de 48 kDa en los serotipos virulentos, y de 55 kDa en los avirulentos (Mc Vicker y cols., 2004; Zimmerli y Tabatai, 2006).

### 2.2.7. Biofilms

La capacidad de formar biofilms varía considerablemente en función del serotipo y la cepa; además no existe una relación clara entre la virulencia de los serotipos y esta propiedad. De este modo, las cepas de referencia de los serotipos 12 y 13, que son muy virulentos; del serotipo 9, que es avirulento, y del serotipo 2, caracterizado por una virulencia moderada, no

forman biofilms (Jin y cols., 2006). En cualquier caso, se ha relacionado la capacidad de formación de biofilms con la persistencia de *H. parasuis* en el aparato respiratorio, puesto que las cepas que se aislaban de pulmón o del cerebro carecían de esta propiedad y sin embargo, la conservaban cuando se aislaban de la cavidad nasal (Jin y cols., 2006)

### 2.2.8. Factores de virulencia relacionados con la captación de hierro

El hierro es un elemento esencial para la supervivencia de los microorganismos. En el hospedador se encuentra principalmente de forma intracelular, a modo de complejos con algunas metaloproteínas (hemoglobina, mioglobina, ferritina, catalasa y citocromo c) o almacenado como ferritina. También se localiza de forma extracelular formando complejos con proteínas transportadoras (*carrier*), como la transferrina o la lactoferrina, en los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares (Wooldrige y Williams, 1993) y asociado a la hemoglobina extracelular y a la hemina (Litwin, 1993; Wooldrige, 1993). De esta forma, la cantidad de hierro libre disponible en el medio extracelular es muy pequeña (del orden de  $10^{-12}$   $\mu\text{M}$ ), en comparación con la necesaria para la supervivencia bacteriana (0,05-9,5  $\mu\text{M}$ ) (del Río, 2004).

Recientemente, en cultivos *in vitro* sometidos a ciertas condiciones adversas que se producen durante la infección (limitación de hierro, estrés de temperatura, estrés ácido y crecimiento en condiciones microaerófilas), se ha analizado la expresión de genes relacionados con la virulencia de la bacteria,

implicados en los procesos de adaptación. El resultado fue la identificación de 75 genes, la mayoría de los cuales codificaba transportadores de hierro, metabolitos de azúcares, enzimas metabólicas y para otras proteínas de función desconocida. Estos genes presentaban homología con otros relacionados con la virulencia, descritos en otras bacterias (Melnikow y cols., 2005).

En 2003, Zehr y cols. caracterizaron las proteínas reguladas por la concentración de hierro en *H. parasuis*, puesto que el hierro es un elemento esencial para la supervivencia de las bacterias. A partir de lisados bacterianos se realizó una electroforesis e *immunoblotting* con suero de cerdos convalecientes y se seleccionaron algunas bandas proteicas que se recogieron para identificarlas mediante programas informáticos. Las proteínas inmunorreactivas que eran reguladas positivamente por el hierro incluían dos OMP que se denominaron, respectivamente, OMP1 y OMP2 y una proteína de unión a la hemoglobina, y las que eran reguladas negativamente, incluían una proteína Fur, una ureasa y una proteasa. Las proteínas no inmunorreactivas incluían dos proteínas para la utilización de la hemopexina, una que se regulaba positivamente y la otra negativamente.

Las bacterias han desarrollado multitud de mecanismos para la captación del hierro, la mayoría de los cuales se han relacionado con la virulencia (Evans y Oakhill, 2002; Collins, 2003; Faraldo-Gómez and Sanson, 2003), aunque la situación depende según la especie que se considere. En el caso de *H. parasuis*, Morton y Williams (1989) defendieron la hipótesis de la existencia de sideróforos como

el único sistema de captación de hierro, que posteriormente sería sustituida por la de Charland y cols. (1995), que atribuyeron la captación de hierro a unas proteínas de unión a la transferrina porcina (receptores específicos), rechazando la presencia de sideróforos. Los últimos datos obtenidos en nuestro laboratorio (Del Río, 2004) ponen de manifiesto que *H. parasuis* posee ambos mecanismos de captación para el abastecimiento de hierro.

#### **2.2.8.1. Mecanismos dependientes de sideróforos**

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular capaces de unir  $\text{Fe}^{3+}$  con alta afinidad y especificidad, procedente de complejos insolubles o de compuestos presentes en el hospedador. Incluyen tres grandes grupos de compuestos: catecoles, hidroxamatos e hidroxicarboxilatos (del Río, 2004).

Estudios *in vitro* utilizando el medio CAS, pusieron de manifiesto que todos los serotipos de *H. parasuis* eran capaces de producir sideróforos; estos resultados fueron confirmados mediante la amplificación de la región *fhu* (*ferric hydroxamate uptake*) del genoma de *H. parasuis*, observándose que todos los serotipos presentaban los genes *fhuCDBA*, que codificaban las proteínas FhuCDBA, respectivamente (del Río, 2004 y 2006). Al secuenciar los genes de los serotipos 5 y 7, se comprobó que eran idénticos y presentaban la misma disposición que los de *A. pleuropneumoniae*, pero resultaban diferentes a los descritos para otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (del Río, 2004 y 2006). Los cuatro genes se disponen correlativamente

en el cromosoma bacteriano: *FhuC*, *FhuD*, *FhuB* y *FhuA*. Se desconoce la existencia de promotores (del Río, 2004).

La predicción de la estructura secundaria de estas proteínas, y su posterior comparación con la descrita en *E. coli* (no existe un gran conocimiento acerca de la estructura secundaria de estas proteínas en la familia *Pasteurellaceae*), permitió analizar su importancia funcional, tal y como se describe a continuación. El fragmento amino terminal de la proteína FhuA presenta una caja TonB, indicando que el aporte energético es Ton-dependiente. Esta proteína está compuesta por 22 láminas  $\beta$  paralelas transmembrana, unidas por 11 lazos extracelulares y 10 periplásmicos. Los bucles extracelulares E3 y E4 podrían intervenir en el reconocimiento y la captación del ligando. El bucle E11 presenta dos residuos de cisteína, responsables del plegamiento de la proteína tras la interacción con el hierro. La internalización del sideróforo en el espacio periplásmico se vería favorecida por los residuos de aspartato y glutamina. Se desconoce si el proceso de paso al citoplasma se produce de forma directa, tras la captación del sideróforo por la proteína FhuD, o indirectamente, previa interacción con la proteína FhuA. En este paso también intervienen la proteína FhuB, que actúa como permeasa, y la proteína FhuC, que proporciona el aporte energético necesario mediante un sistema ATP-asa. Una vez en el citoplasma, las sideróforo-reductasas reducen el ión férrico a ferroso, perdiendo así su afinidad por el sideróforo, que puede reciclarse o hidrolizarse (del Río, 2004 y 2006).

Finalmente, con un anticuerpo policlonal frente a la proteína FhuA de *A.*

*pleuropneumoniae* se demostró la presencia de dicha proteína en todas las cepas de referencia de *H. parasuis*.

Paralelamente, en estudios de crecimiento bacterianos *in vitro*, se comprobó que su expresión no aumentaba asociada a un descenso de la concentración del hierro en el medio. Estos resultados, unidos a la falta de un homólogo de la proteína reguladora Fur (“*ferric uptake regulator*”) en la secuencia de estos genes, permite suponer una posible independencia de la presencia de hierro en el medio (del Río, 2004).

#### 2.2.8.2. Mecanismos independientes de sideróforos

Incluyen la hemina, ferritina y las proteínas de unión a la transferrina y lactoferina. 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 algunas especies como *E. coli*, *Neisseria meningitidis*, *V. cholerae* o *A. pleuropneumoniae* (Stoebner y Payne, 1998; Belanger y cols., 1995; González y cols., 1995). La ferritina es un complejo que puede almacenar más de 4.000 átomos de hierro y es la fuente primaria de hierro en animales, plantas y bacterias.

Las proteínas de unión a la transferrina (Tbp: *transferrin binding protein*) se han descrito en todos los miembros de las familias *Pasteurellaceae* y *Neisseriaceae*, y las de

unión a la lactoferrina (Lbp: *lactoferrin binding protein*) sólo en algunas especies, como ocurre por ejemplo, con las especies patógenas del género *Neisseria*. El receptor de transferrina está constituido por dos proteínas presentes en la membrana externa. El primer componente es una lipoproteína denominada TbpB, de tamaño variable, 60-86 kDa intra e inter-especie (Williams and Griffiths, 1992; Rokbi y cols., 1993), con capacidad de reconocer la forma cargada de la transferrina, por la que presenta una elevada especificidad (Cornelissen y Sparling, 1994; Boulton y cols., 1998; Retzer y cols., 1998). Se localiza en la superficie de la bacteria, proyectándose en parte hacia su exterior, estando anclada a la membrana externa por dominios transmembrana. Los estudios de alineamientos de las proteínas TbpB ponen de manifiesto la existencia de seis regiones conservadas, la primera de ellas en el extremo amino terminal, cuatro en el extremo carboxilo y la última en la mitad de la proteína (Vonder y cols., 1994; Cornelissen y cols., 1997). El segundo componente es una proteína integral de membrana denominada TbpA, cuya función consiste en actuar a modo de canal de paso del hierro al espacio periplásmico (Rutz y cols., 1992). Su peso molecular es de aproximadamente 100 kDa y presenta diez residuos, también presentes en otras especies como *A. pleuropneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* ó *H. influenzae* (Legrain, 1993; Cornelissen, 1994; González, 1995; Gray-Owen, 1995). Estos datos indican que esta región podría ser la responsable del paso del hierro. Posteriormente, en el transporte y la internalización del hierro en el citoplasma intervienen las proteínas de unión periplásmica Fbp (*ferric binding protein*) (Chen y cols.,

1993; Mietzner y Morse, 1994; Nowalk y cols., 1994).

En 2001 (de la Puente, 2001), los estudios llevados a cabo por nuestro grupo, evidenciaron la presencia de los genes *tbpB* y *tbpA*, que codifican respectivamente las proteínas de unión a la transferrina TbpB (65,3 kDa) y TbpA (106, 2kDa), en todos los serotipos de *Haemophilus parasuis*. Posteriormente (del Río, 2004) se clonó y secuenció el gen *tbpB* de los serotipos 2, 3 y 5, y, más adelante de los serotipos restantes. Actualmente se está trabajando en la secuenciación y clonaje del gen *tbpA*. También se demostró por PCR, la presencia de los genes *tonB*, *exbB* y *exbD* en todos los serotipos (del Río, 2002 y 2004). Los tres genes se encontraban dispuestos de forma consecutiva en el cromosoma bacteriano a los genes *tbpB* y *tbpA*, lo que indicaría que podrían haber sido adquiridos simultáneamente para desarrollar un sistema eficaz de captación de hierro (del Río, 2002 y 2004). Dichos genes presentan un tamaño idéntico a los de *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* SO4, o *A.suis* CCM 5586 (del Río, 2004). Estos estudios permitieron establecer el grado de homología existente entre estos cinco genes dentro de la familia *Pasteurellaceae*. Las secuencias menos conservadas correspondían a las proteínas expuestas en la superficie extracelular, como la TbpB (sólo se conservaba su fragmento carboxilo), mientras que las proteínas integrales TonB, ExbB, ExbD y casi la totalidad de la TbpA presentaban un grado de conservación mayor. La mayor homología se observó con respecto a *A. pleuropneumoniae* y *A. suis*, con los que, además de una homología de secuencia, presentaban una homología de disposición de

los genes (*exbB*, *exbD*, *tbpB* y *tbpA*, en este orden), que no aparecía en otras especies, como las del género *Neisseria*, *P. multocida*, *M. haemolytica* y *H. influenzae*. A diferencia de otras especies, este sistema consta de un único promotor, que presenta una gran homología en las regiones consenso -10 y -35, con las de los promotores de *A. pleuropneumonie* (Doree, 2001; del Río, 2004). La distancia entre estas regiones es de 14 pb, a diferencia de lo que ocurre en otras bacterias Gram negativas, donde es de  $17 \pm 1$  pb (Harley y Reynolds, 1987; del Río, 2004). La presencia de un único promotor, junto con las características de las secuencias de iniciación de la traducción, son indicios de que los cinco genes forman parte de un operón. Esto puede ser debido a que al intervenir de forma conjunta necesitan transcribirse a la vez, o a que se necesitan en proporciones similares (del Río, 2004). Finalmente, se ha propuesto la teoría de que el sistema estaría regulado por la proteína Fur (*ferric uptake regulator*), puesto que se localizó una caja Fur antes del codón de iniciación del gen *TonB*.

Estudios recientes han demostrado 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 metales. También se observaron otros dos fragmentos de lectura abierta, que codificaban otra proteína y una flavodoxina. Los tres genes constituían una unidad transcripcional única, a diferencia de lo observado en *E. coli*. La importancia del gen *Fur* se puso de manifiesto cuando se observó que los mutantes defectivos en dicho gen no eran viables, sugiriendo que *H. parasuis* es muy sensible a elevadas

concentraciones de hierro, ya que esta proteína podría unir el hierro y así controlar su concentración intracelular (Bigas y cols., 2006).

Se han realizado estudios funcionales mediante la predicción de la estructura secundaria de las proteínas que intervienen en este sistema (del Río, 2004). El aporte energético necesario para captar e internalizar el hierro estaría representado por las proteínas TonB, ExbB y ExbD, ya que mantienen conservados los residuos implicados en el aporte de energía (histidina, glutamato y aspartato, respectivamente). La proteína TonB interaccionaría con la caja TonB del extremo amino terminal de la proteína TbpA para transferir la energía. La proteína TbpA presenta una secuencia transmembrana con 22 láminas  $\beta$  que forman un canal para el paso de hierro. Unidos a esta región presenta 11 lazos extracelulares y 10 periplásmicos. Los lazos extracelulares E4 y E5 intervendrían en la interacción con la transferrina y con la proteína TbpB. El sistema estaría estabilizado por seis residuos de cisteína, que junto con otros residuos aromáticos, permitirían el anclaje de la TbpA a la membrana externa. La proteína TbpB presenta un péptido señal rico en cisteína, que sería el responsable de la unión a lípidos y un residuo de serina en la posición 22, que determina su presencia en la membrana externa. Se localizaron seis regiones conservadas, la primera de las cuales sería la responsable del mantenimiento del fragmento amino terminal en contacto con el medio extracelular, la segunda intervendría en el mantenimiento de la estructura, la tercera conservaría la estructura en la superficie celular y de las tres restantes se desconoce su

función. El dominio de unión a la transferrina se localiza en el extremo amino terminal de las regiones 2 y 3, y en el carboxilo terminal de las regiones 1 y 4. El hierro, una vez unido a las proteínas Tbp, se libera y se internaliza en el periplasma, pasando después al citoplasma, aunque se desconocen los mecanismos implicados (del Río, 2004).

La producción de anticuerpos policlonales a partir de las proteínas de fusión, GST-ExbB, GST-TpbB y GST-TbpA permitió demostrar la presencia de dichas proteínas en todos los serotipos, así como su mayor expresión en condiciones restrictivas de hierro (del Río, 2004).

La lactoferrina se encuentra formando parte de las secreciones mucosas y en el interior los fagocitos. Presenta un interdominio cargado de hierro y su afinidad por el mismo es mayor que el de la transferrina (Baker y Lindley 1992). El receptor de la lactoferrina está formado por dos proteínas, LbpA y LbpB (del Río, 2004).

### 2.3. Taxonomía y clasificación. Tipificación

Actualmente se considera que la posición taxonómica de *H. parasuis* dentro de la familia *Pasteurellaceae* y el género *Haemophilus* es incierta, por la falta de homología de su ADN con otras bacterias del género (Morozumi y Nicolet 1986). Lo cierto es que mediante la aplicación de diversos procedimientos genómicos y otros de base inmunológica, se constata la enorme diversidad de cepas y serotipos de esta especie (Olvera y cols., 2006), que hacen presumir que en un futuro, tal vez no lejano, se reconsidere su posición actual.

#### 2.3.1. Métodos serológicos de tipificación

El primer sistema de clasificación serológica fue propuesto por Bakos (Bakos y cols., 2003) que diferenciaba 4 serotipos, A, B, C, y D, mediante un sistema de precipitación, utilizando como base de la diferenciación extractos antigénicos. Este método fue modificándose progresivamente en distintas etapas (Schimmel y cols., 1985; Morozumi y Nicolet 1986; Kielstein y cols., 1991) hasta llegar al actual propuesto por Kielstein y Rapp-Gabrielson (1992). Dicho sistema establece 15 serotipos a partir de una técnica de inmunodifusión en gel, utilizando antisueros obtenidos en conejo frente a un antígeno termoestable y resistente a enzimas proteolíticas. El método presenta el inconveniente de que un número elevado de cepas (más del 30%) no se pueden tipificar, debido a la gran variabilidad de los resultados obtenidos y al gran número de reacciones cruzadas observadas. Continuando estos estudios, Raffie y cols., (Raffie y Blackall, 2000) obtuvieron antisueros en conejo frente a todos los serotipos de referencia menos frente al 1 y al 7. Todos eran específicos, con la excepción de los serotipos 4 y 7, que reaccionaban con el 14 y el 10, respectivamente.

En nuestro laboratorio se obtuvieron antisueros policlonales de conejo para los 15 serotipos 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, utilizando 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. Además, fue posible la tipificación del 80% de las cepas de campo estudiadas (del Río y cols., 2003).

## 2.3.2. Métodos moleculares de tipificación

### 2.3.2.1. Métodos basados en el estudio de proteínas

#### 2.3.2.1.1. Electroforésis de enzimas multilocus

La técnica fue diseñada por Rapp Gabrielson y cols. (1992) para tipificar ocho serotipos de referencia y algunos aislamientos clínicos australianos, entre los que se encontró una gran heterogeneidad. Esta misma técnica fue empleada por Blackall y cols. (1997) en aislamientos australianos para obtener un patrón electroforético de cada uno de ellos. El análisis de los patrones permitió agrupar todos los aislamientos menos uno, en dos grupos, A y B. El grupo A estaba formado por dos cepas de referencia del serotipo 5, aislamientos de campo de los serotipos 4, 5 y 13 y algunas cepas no tipables. El grupo B estaba constituido por aislamientos de campo de los serotipos 1, 2, 7, 9, 10, 13 y por las cepas de referencia de los serotipos 1, 2, 3, 4, 8 y 9. No se observó relación entre los dos grupos y la virulencia, lo que confirma la existencia de una gran heterogeneidad y que el serotipo no representa un marcador epidemiológico ni de virulencia seguro.

#### 2.3.2.1.2. Proteínas de membrana externa (OMPs)

Ruiz y cols. (2001) realizaron un estudio comparativo entre los patrones de ADN y de las OMPs de cepas de procedencia sistémica y pulmonar, aisladas tanto de animales sanos como enfermos. El porcentaje de heterogeneidad entre las cepas de ambas procedencias fue de un 29% en los animales con neumonía, frente a un 34% en los animales sin esta afección. Blackall y Pahoff (1995) pusieron de manifiesto la existencia de una relación clonal entre las cepas virulentas. Los aislamientos obtenidos a partir de cuadros sistémicos, septicémicos o neumónicos presentaban una elevada homología (incluso cuando pertenecían a granjas y regiones diferentes), mientras que los aislamientos nasales exhibían características genotípicas y fenotípicas diferentes de los anteriores. Posteriormente, Oliveira y cols. (2003) agruparon las cepas procedentes de aislamientos sistémicos y pulmonares en un dendograma, observando una diversidad genética similar entre ambos orígenes. Se ha demostrado una elevada homogeneidad entre las OMPs de los aislamientos sistémicos, lo que permite deducir una posible relación entre éstas y la virulencia.

#### 2.3.2.1.3. Análisis informático de huellas de proteínas (“Computer based analysis of *Haemophilus parasuis* proteins fingerprints”)

Se realizó un análisis de las proteínas totales de *H. parasuis* por SDS-PAGE y los geles se tiñeron con azul de Coomassie (Oliveira y Pijoan, 2004). El resultado se

analizó mediante programas informáticos. De forma similar a lo observado en estudios previos (Nicolet y cols., 1980; Rapp-Gabrielson y cols., 1992; Ruíz y cols., 2001), se identificó una proteína de 36-38 kDa en algunos de los aislamientos, que se agruparon en el tipo II; mientras que el resto, que no la presentaban, se adscribieron al tipo I. Los perfiles proteicos se analizaron calculando las matrices de similitud de las curvas densitométricas de los carriles del gel, y se establecieron grupos de matrices por el método UPMGA (*Unweighted pair group method using arithmetic averages*). El resultado fue la descripción de 6 grupos. El primero estaba compuesto por todos los aislamientos de tipo II, procedentes de animales enfermos y obtenidos de diferentes localizaciones corporales, con cepas de los serotipos 1, 2, 4, 5, 7, 12, 13 y 14, junto con cepas no tipables. Este grupo Presentaba una gran diversidad, lo que se tradujo en 27 patrones de huellas. Los grupos restantes pertenecían al tipo I, con aislamientos procedentes del tracto respiratorio de animales sanos, y aislamientos pulmonares y sistémicos de animales enfermos, de los mismos serotipos que se describieron en el cluster 1, además del serotipo 3. También se observó una elevada diversidad genética entre estos aislamientos de tipo I, con 14 huellas diferentes. (Oliveira y Pijoan, 2004).

### **2.3.2.2. Métodos basados en el estudio de DNA**

#### 2.3.2.2.1. Huellas de endonucleasas de restricción (“Restriction endonuclease finger printing”, REF)

Consiste en la digestión del DNA por endonucleasas y el posterior análisis de los fragmentos por electroforesis. Se empleó para tipificar aislamientos de granjas convencionales y granjas SPF. Los resultados corroboraron la elevada heterogeneidad de la bacteria, puesto que en 64 aislamientos, se describieron 34 patrones REF únicos. Los aislamientos sistémicos eran diferentes de los presentes en el tracto respiratorio de animales sanos. También se puso de manifiesto la existencia de cepas no tipables y de cepas comunes que aparecían en los dos tipos de granjas (Smart y cols., 1988)

#### 2.3.2.2.2. RNA ribosómico 16S.

Se analizaron 54 cepas de la familia *Pasteurellaceae* (Dewhirst y cols., 1992), que se agruparon en cuatro grupos, cada uno con múltiples subgrupos. Las cepas del *H. parasuis* se incluyeron en el tercer grupo con las cepas tipo de *P. multocida*, *P. anatis*, *P. avium*, *P. canis*, *P. dagmatis*, *P. gallinarum*, *P. langaa*, *P. stomatis*, *P. volatium*, *H. haemoglobinophilus*, *H. paracuniculus*, *H. paragallinarum* (*Avibacterium paragallinarum*) y *A. capsulatus*.

Recientemente el análisis de la secuencia del RNA en las cepas de *H. parasuis* ha puesto de manifiesto que existe una gran variabilidad entre las distintas cepas de esta bacteria, y cómo todas las cepas procedentes de aislamientos clínicos, junto con las cepas de referencia de serotipos virulentos, se agrupaban dentro de un mismo cluster. Se trata de un método que permite realizar estudios epidemiológicos y filogenéticos al mismo tiempo, gracias a los cuales, se ha destacado la

posible existencia de transferencia lateral de genes entre *H. parasuis* y algunas especies del género *Actinobacillus* (Olvera, 2006).

2.3.2.2.3. PCR basadas en secuencias intergénicas repetitivas consenso de enterobacterias (“enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR”, ERIC PCR)

Se trata de un sistema de PCR que emplea los oligonucleótidos obtenidos a partir de secuencias intergénicas que se repiten en enterobacterias (Raffie y Blackall 2000), de tal forma que los 15 serotipos de *H. parasuis* se agrupan en un único patrón de ERIC-PCR. En estudios posteriores (Oliveira y cols., 2003) se destacó la utilidad de este método para realizar análisis epidemiológicos, debido a su bajo coste y a que permite reconocer la fuente de infección, así como el número de microorganismos implicados. Se puso de manifiesto que todas las cepas con genotipos similares formaban parte de un mismo serotipo, con la excepción del serotipo 1, puesto que en este grupo se encontraron cepas con un genotipo similar, clasificadas como no tipables o pertenecientes a los serotipos 1 y 13. La importancia de estos hallazgos estribaba en la posibilidad de utilizar una cepa de un serotipo determinado para inducir inmunidad cruzada con otras cepas pertenecientes al mismo. Por otro lado, los perfiles hallados en los aislamientos sistémicos sugieren un origen clonal de los mismos y son diferentes de otras cepas procedentes de animales sanos.

2.3.2.2.4. PCR-RFLP

Se basa en la amplificación de un gen específico, la posterior digestión del amplicón por endonucleasas de restricción y el análisis de los fragmentos resultantes por electroforesis en geles de agarosa.

Se han descrito tres aplicaciones de esta técnica para la identificación de *H. parasuis*, dos de ellas desarrolladas en nuestro laboratorio con los genes *tbpB*, (de la Puente y cols., 2000, 2001 y 2003) y *aroA* (del Río y cols., 2006) y una tercera con el RNA 16S (Lin, 2003).

Con respecto al gen *tbpA* se consiguió un elevado índice de tipabilidad y por lo tanto, el sistema goza de un gran valor en estudios epidemiológicos. De esta forma, se ha desarrollado un sistema de detección e identificación por PCR, denominado sistema DIPTAR (Detección, tipado e identificación de *Haemophilus parasuis*). El único inconveniente que plantea, es que se obtiene un número de tipos muy elevado, lo cual produciría muchos problemas de interpretación cuando se analizan poblaciones grandes. Para el desarrollo de esta técnica, se emplearon cebadores específicos y las enzimas de restricción *AvaI*, *RsaI* y *TaqI*. El resultado del proceso de amplificación de las 15 cepas de referencia de los serotipos y de 101 aislamientos clínicos fue un producto de 1,9 kb, cuya la digestión individual con los enzimas de restricción proporcionaba 10, 3 y 5 perfiles RFLP, respectivamente, que agrupados daban lugar a 15 perfiles RFLP para las cepas de referencia (AAA, BBB, CCC, BAD, DBE, BAF, ECG, BAH, BAI, BAA, EAF, DBE, BBE, DBE y DBE) y 33, para los aislamientos

clínicos, diez de los cuales coincidían con los de referencia. Además las cepas de referencia de los serotipos 5, 12, 14 y 15 compartían el mismo perfil.

Con el análisis del gen *aroA*, se puso de manifiesto la existencia de patrones de restricción comunes entre algunos serotipos de referencia de *H. parasuis* con miembros del género *Actinobacillus*.

Finalmente, los resultados obtenidos con el RNA 16S volvieron a confirmar la gran heterogeneidad entre los aislamientos de esta especie y la falta de relación entre genotipo y serotipo.

#### 2.3.2.2.5. Tipificación por secuenciación del gen *hsp60*

Se secuenció el gen *hsp60* o gen *groEL* en 103 aislamientos y se establecieron 36 secuencias tipo (ST), de las cuales la 3, la 8, la 9 y la 12 se asociaron con aislamientos clínicos, mientras que la 2, la 17 y la 19 se encontraron únicamente en aislamientos nasales, procedentes de animales portadores. Todos los aislamientos se agruparon en dos grupos, uno de ellos mostraba una elevada proporción de aislamientos clínicos y de cepas de referencia virulentas. Sorprendentemente, tres aislamientos clasificados como del género *Actinobacillus* se incluyeron en estos grupos. Se trata de un método de gran utilidad para estudios epidemiológicos locales, pero no para estudios filogenéticos (Olvera y cols., 2006).

#### 2.3.2.2.6. Tipificación por secuencia multilocus

Es un método basado en el análisis de las secuencias de varios genes conservados, presenta un alto poder de discriminación, pero representa costes muy elevados. La ventaja sobre el método anterior es que también permite realizar un estudio filogenético.

Los resultados obtenidos eran muy similares a los descritos para el análisis de la secuencia del RNA: de nuevo, los aislamientos clínicos se agrupaban dentro de un mismo grupo, mientras que los procedentes de las fosas nasales de animales sanos constituían otra subpoblación. La concordancia de estos resultados harían pensar en la posible existencia de dos especies distintas dentro de *H. parasuis*.

### **3. Epidemiología**

El cerdo es el hospedador exclusivo de *H. parasuis*. Como microorganismo comensal se puede aislar de las fosas nasales sin relación con cuadro clínico. Posee una especial relevancia en lechones de una semana de vida, cuya mucosa nasal coloniza de forma precoz (Rodríguez-Ferri y cols., 2000). La enfermedad se ha descrito principalmente en animales de entre dos semanas y cuatro meses de edad, con especial incidencia en los de dos meses. El proceso se vuelve relevante cuando afecta a explotaciones con un alto estatus sanitario o SPF, que no han estado en contacto previo con este agente etiológico. En estos casos, se producen unas altas tasas de mortalidad y morbilidad, afectando a los animales en cualquiera de las fases de producción.

La infección es particularmente problemática en el aparato respiratorio. En el caso de las fosas nasales, su presencia no tiene que desencadenar necesariamente una enfermedad, al poder mantenerse como comensal. En el pulmón se comporta habitualmente como un invasor secundario, oportunista de otros agentes infecciosos (*A. pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, virus de la enfermedad de Aujeszky, virus del PRRS, coronavirus...) o de situaciones de depresión inmunitaria, produciendo un cuadro similar al de la neumonía enzoótica porcina. Ocasionalmente, se ha podido demostrar su papel como agente primario, especialmente en los casos de bronconeumonía fibrinosupurativa. El aparato respiratorio constituye el punto de entrada del agente, desde el que se puede difundir por todo el organismo (Vahle y cols., 1997).

La prevalencia de la enfermedad ha aumentado considerablemente en los últimos años, sobre todo como consecuencia de la situación epidemiológica del PRRS y asociado a medidas de manejo, que implican la mezcla de animales de diferentes explotaciones o la entrada de nuevos lotes de animales. La enfermedad de Glässer ha sido diagnosticada en todo el mundo. En América del Norte, Australia y Japón los serotipos más frecuentes son el 4, el 5 y el 13 (Blackhall y Pahoff, 1995 y Rapp-Gabrielson y cols., 1992); en España, además se ha denunciado una prevalencia elevada del serotipo 2 (Rubies y cols., 1999).

Los estudios de aislamiento y serotipificación en granjas han puesto de manifiesto que el número de portadores nasales puede llegar hasta el 32%, si bien el 85% de

estos se corresponden con serotipos no patógenos. (cit. por Segalés, 1996). Un porcentaje similar de portadores se ha observado también en muestras obtenidas en mataderos, donde los aislamientos a partir de pulmón representaban únicamente un 1-2%. Los datos serológicos han revelado que hasta un 85% de los animales eran seropositivos. (Moller, 1993). La correlación entre el aislamiento y la serología era baja, puesto que sólo se aisló la bacteria del 30% de los animales seropositivos. Este dato es comprensible si se tiene en cuenta que existen muchos serotipos apatógenos y que las técnicas de aislamiento adolecen de baja sensibilidad y, sobre todo, que *H. parasuis* es un colonizador nasal muy precoz en un alto porcentaje de animales, induciendo una respuesta de anticuerpos, que no se corresponde con el padecimiento de la enfermedad, en lo que participan las características invasivas de la cepa y la correspondiente situación del animal.

La transmisión de la enfermedad se produce por contacto directo entre animales sanos y enfermos, por vía aerógena. Se cree que el aire puede transportar el agente a alguna distancia. Cuando la infección se instaura por primera vez en una explotación, tras un período de incubación de 14 días, se desencadena un cuadro sobreagudo, con muertes súbitas. Si se trata de reinfecciones, los animales experimentan el cuadro clínico típico de la enfermedad de Glässer. En granjas infectadas, los únicos animales que presentan la enfermedad son los que entran nuevos a la explotación (Rodríguez Ferri y cols., 2000).

#### 4. Patogénesis

Los datos disponibles se obtuvieron principalmente a partir del desarrollo de la enfermedad en modelos experimentales, como los cerdos obtenidos por cesárea y privados de calostro (“*cesarean derived, colostrum deprived*”) y los cerdos SPF inoculados con cepas virulentas de *H. parasuis*. En 1995 y 1997, Vahle y cols. estudiaron la patogenia y lesiones causadas por la bacteria, tras la inoculación por vía intranasal de cerdos privados de calostro. A partir de las 4 horas postinfección, se puso de manifiesto la presencia de una infiltración de neutrófilos en la submucosa nasal, que se fue reduciendo progresivamente en las 8 horas siguientes, dando paso a una infiltración linfocitaria, seguida de una pérdida de los cilios y una alteración de la mucosa (punto de propagación con carácter sistémico). A las 12 horas se aisló la bacteria de la cavidad nasal y de la tráquea. Se observó un cuadro de rinitis purulenta, junto con lesiones en la tráquea, que persistieron hasta el final del experimento, a las 36 horas. Entre las 12 y 36 horas, la bacteria difundió al torrente circulatorio, desde donde se propagó a los diferentes órganos y tejidos, aunque se aisló principalmente a partir de pericardio y articulaciones. En la cavidad nasal se detectaron las bacterias mediante microscopía electrónica, inicialmente en la superficie de las células ciliadas y a las 36 horas entre los cilios, mientras que en la tráquea sólo se detectaron en algunas ocasiones en la superficie de las células epiteliales intactas (Vahle y cols., 1997).

El daño en la mucosa del aparato respiratorio facilitaría la invasión sanguínea, provocando una septicemia que en los casos

más graves, desencadenaría la muerte del animal. En otras ocasiones, el animal es capaz de sobrevivir y la bacteria puede colonizar las serosas (poliserositis), las articulaciones (poliartritis), el aparato reproductor (abortos) o el sistema nervioso central, ocasionando meningitis y encefalitis que también pueden provocar la muerte del animal (citado por de la Puente, 2001). Mediante técnicas de hibridación *in situ*, se ha comprobado la presencia de la bacteria asociada a los infiltrados inflamatorios, especialmente vinculada a los macrófagos del pericardio y de la superficie del bazo e hígado (Jung y cols., 2004). En otras ocasiones, las bacterias pueden pasar desde la cavidad nasal al oído medio, produciendo otitis (cit. por de la Puente, 2001).

En el 2003, Muller y cols. estudiaron los cambios producidos en los parámetros sanguíneos después de la inoculación, por vía intratraqueal, de  $4 \times 10^{10}$  UFC de una cepa del serotipo 5. El número de leucocitos totales, la neumonía y la aparición de radicales libres presentaban una correlación positiva entre sí, pero no así con la fagocitosis, lo que podría hacer suponer un estado inmunitario deficiente y por lo tanto, una escasa protección frente a la infección.

Recientemente se ha comprobado, en estudios *in vitro*, la capacidad de *H. parasuis* para invadir las células del endotelio microvascular del cerebro. Su capacidad de invasión es superior a la de *Streptococcus suis*, y directamente relacionada con el tiempo de incubación y la concentración bacteriana (Vanier y cols., 2006). *H. parasuis* sobrevive en el interior de estas células, pero su número disminuye progresivamente como consecuencia de la muerte bacteriana o porque

dispone de mecanismos de escape (Vanier y cols., 2006).

Los serotipos 1, 2, 4, 5, 7, 12 y 13 son adherentes a las células del endotelio microvascular del cerebro y esta capacidad es superior en el caso de los serotipos 4 y 5. El tratamiento con antibióticos y proteasas no redujo la capacidad de invasión, pero sí la colchicina y la citocalasina, lo que parece indicar que en este mecanismo de invasión, participarían estructuras como los microtúbulos y los microfilamentos celulares.

## 5. Cuadro clínico y lesional

El cuadro clínico y lesional depende de la localización de las lesiones inflamatorias. Se han descrito cuatro formas clínicas (Hoefling, 1991): la enfermedad de Glässer o poliserositis, septicemia, miositis aguda (en los músculos maseteros) y la forma respiratoria. En infecciones experimentales, se ha demostrado que el desarrollo y evolución de la enfermedad podría ser independiente de la dosis empleada (Oliveira y cols., 2003).

### 5.1. Poliserositis fibrinosa o enfermedad de Glässer

El curso de la enfermedad es agudo y afecta principalmente a animales de entre 5-12 semanas. Se observa hipertermia, seguida de inapetencia, apatía y anorexia. En algunas ocasiones, se produce un fallo de la circulación periférica, con áreas cianóticas en la piel. La respiración no suele verse afectada, pero en algunos casos se observa disnea, con descarga nasal y taquicardia. Los animales suelen

presentar problemas de movimiento, con inflamación articular. En algunos brotes epidémicos aparecen animales con síntomas nerviosos, indicativos de meningitis. Las lesiones que caracterizan esta enfermedad son la poliserositis y poliartritis fibrino-purulenta, con fibrina que se dispone en láminas o capas, que pueden llegar a cubrir toda la superficie de los órganos. En las cavidades torácica, pericárdica y abdominal estas lesiones pueden ir acompañadas de un aumento de líquido serofibrinoso, mientras que en las articulaciones se observa un mayor volumen de líquido sinovial, que se muestra menos viscoso de lo habitual. Microscópicamente, se observan depósitos de fibrina junto con un infiltrado de células inflamatorias. Las lesiones en el sistema nervioso central se caracterizan por una opacidad de las meninges, detectándose un exudado inflamatorio, y un aumento del líquido cefalorraquídeo, que presenta una tonalidad blanquecina y opaca, causada por la presencia de leucocitos (Segalés, 1996).

### 5.2. Septicemia

En los casos de septicemia se observa depresión a las 16 horas postinfección, y a las 24 son evidentes la presencia de disnea, cianosis, y postración. La temperatura sube inicialmente a 40°C, pero desciende en los momentos previos a la muerte del animal. Los animales presentan alteración de la coagulación de la sangre, con aumento del tiempo de trombina y protrombina, descenso del número de plaquetas y leucopenia, ya a partir de las 24 horas post-infección. En la necropsia se observa congestión y edema en numerosos órganos y tejidos. El estudio

histopatológico revela la presencia de microtrombos de fibrina en pulmón, cerebro y riñón, y en algunos casos, meningitis, neumonía y poliserositis. La bacteria se localiza en los pequeños vasos, así como en el interior del citoplasma de las células que constituyen el infiltrado inflamatorio, de las lesiones antes citadas (Amano y cols, 1997).

### 5.3. Miositis de los músculos maseteros

Esta forma de la enfermedad ha sido descrita en las cerdas de una granja SPF. Se observó que los animales presentaban hipertermia, inapetencia, debilidad y ataxia, pero el rasgo más característico consistía en que la cabeza aparecía hinchada, con grandes áreas cianóticas. Durante el estudio histopatológico, se observó la presencia de un exudado que contenía abundante número de células inflamatorias en la fascia, grasa subcutánea y endomisio de los músculos (Hoefling, 1991).

### 5.4. Forma respiratoria

Se han observado cuadros respiratorios caracterizados por tos y disnea. En algunos estudios se ha relacionado la presencia de la bacteria con bronconeumonía catarral-purulenta, y en los casos más graves, fibrino-hemorrágica.

## 6. Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Glässer se puede realizar basándose en la historia clínica, síntomas y lesiones y también

mediante la detección del agente y sus antígenos, o en base a la presencia de anticuerpos específicos.

### 6.1. Diagnóstico Directo

Consiste en el aislamiento bacteriano a partir del líquido de las cavidades corporales, de hisopos nasales, traqueales o de otros tejidos u órganos afectados. Habitualmente se siembra en cualquiera de los siguientes medios de cultivo: agar sangre con una estría nodriza de un estafilococo productor del factor V, agar chocolate, PPLO, medio selectivo de Gilbride y Rosendal, medio de micoplasmas con bacitracina o caldo BHI suplementado con suero de caballo, extracto de levadura y antibióticos. La incubación se produce en condiciones microaerófilas, a 37° C durante 24-48 horas (Rodríguez Ferri y cols., 2000). La dificultad de este método de diagnóstico reside en una posible contaminación con otros microorganismos comensales y las complejas exigencias nutritivas del *H. parasuis*.

### 6.2 Diagnóstico Indirecto

Se puede realizar mediante métodos serológicos o moleculares.

#### 6.2.1. Métodos serológicos

##### 6.2.1.1. ELISA indirecto

En una primera descripción de esta técnica se utilizó un antígeno bacteriano, sin tener en cuenta su virulencia ni su patogenicidad, obteniendo unos resultados relativamente 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).

#### 6.2.1.2. Fijación del complemento

Se utilizó para la detección de anticuerpos circulantes en sangre, a los 6 y 8 días post-infección. Se trata de una técnica de sensibilidad y especificidad intermedia (cit. por Segalés, 1996).

En un estudio, en el que se infectaron cerdos con los 7 primeros serotipos de *H. parasuis*, se detectaron anticuerpos en las infecciones producidas, tanto con cepas patógenas como apatógenas, lo que llevó a concluir que los anticuerpos fijadores de complemento no se inducían en respuesta a los posibles factores de virulencia bacterianos (Nielsen, 1993). Precisamente esta circunstancia, unida a la ya comentada capacidad de *H. parasuis* para colonizar precozmente el tracto nasal de los cerdos produciendo anticuerpos circulantes, deprecia el valor de las técnicas serológicas como método de diagnóstico de la infección por este microorganismo, concediéndose mucho mayor valor a otros procedimientos, incluido el aislamiento, pese a los inconvenientes de recuperación descritos.

### 6.2.2. Métodos moleculares

#### 6.2.2.2. Lipooligosacárido (LOS)

Se trata de 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 parecen alojarse determinantes antigénicos de cepa, por lo que puede resultar útil en estudios epidemiológicos (Zucker y cols., 1994)

#### 6.2.2.1. Hibridación en placa (“*Oligonucleotide-specific capture plate hybridization assay*” OSCP)

Se trata de una reacción de PCR para el ARNr 16S, en la que el producto de amplificación se marca con digoxigenina, y los oligonucleótidos con las secuencias específicas de *H. parasuis*, con biotina. Su ejecución se lleva a cabo mediante la incubación de placas de ELISA con estreptavidina. Finalizada la reacción, el amplicón es capturado con una sonda y se añade un conjugado anti-digoxigenina, marcado con peroxidasa. Se adiciona finalmente el sustrato y se lee a 405 nm. Es una técnica que detecta menos de 100 UFC/ml en cultivo puro y del orden de  $10^3$  y  $10^4$  UFC/ml en cultivos mixtos. En muestras obtenidas a partir de hisopos nasales tiene una sensibilidad del 85% (Calsamiglia y cols., 1999).

#### 6.2.2.3. Inmunohistoquímica

Este método ha sido aplicado a la detección del serotipo 5 de *H. parasuis* en órganos y tejidos fijados con formalina y

embebidos en parafina, por medio de un sistema biotina-avidina inmunoperoxidasa. Se ha revelado como una técnica especialmente sensible y específica en el líquido cerebroespinal y en pulmón, pero no a partir del moco traqueal. El inconveniente consiste en que produce reactividad cruzada con *A. pleuropneumoniae* (Segalés y cols., 1997).

Otro estudio, permitió detectar la presencia de *H. parasuis* en lesiones de cerdos infectados por vía intranasal. En esta ocasión el anticuerpo primario estaba marcado con biotina y se revelaba con estreptavidina-peroxidasa (Amano, 1994).

#### **6.2.2.4. PCR aplicada a la secuencia del ARNr 16S**

Se sintetizaron oligonucleótidos específicos a partir de la secuencia del ARN 16S, y se obtuvo un producto de amplificación de 821 pb (pares de bases). Como ventaja, permitía discriminar entre *H. parasuis* y otras bacterias similares que no amplificaban, con excepción de *A. indolicus* y *A. pleuropneumoniae* que lo hacían ligeramente. Se puede emplear tanto en muestras procedentes de animales como en cultivos bacterianos puros (Oliveira y cols., 2001).

#### **6.2.2.5. Sistema de identificación DITPAR**

Se desarrolló en nuestro grupo (de la Puente y cols., 2001) a partir de una reacción de PCR para el gen *tbpA* con cebadores comunes para *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 estriba en que el oligonucleótido se anilla dentro del gen *tbpA* en diferentes lugares para las tres especies.

#### **6.2.2.6. PCR interna (“Internal PCR o nested PCR”)**

Esta técnica se compone de una PCR externa, con cebadores que amplificaban una parte del ARN 16S, y una PCR interna con cebadores que amplificaban una secuencia de 313 pb, contenida dentro del amplicón de la PCR externa (Jung y cols, 2004).

## **7. Respuesta inmune frente a la infección**

En relación con la respuesta inmune frente a *H. parasuis* y su aplicación práctica, desde el punto de vista preventivo, no se ha avanzado demasiado hasta el momento. Consideraremos las dos formas de expresión de la inmunidad: innata y adquirida.

### **7.1. Respuesta innata**

En el estudio de la respuesta innata, pueden señalarse aportaciones aisladas en relación con la producción de mediadores, fagocitosis y activación del sistema del complemento. A este respecto, diversos experimentos con cerdos infectados permitieron observar que la cantidad de óxido nítrico producido por los macrófagos alveolares y neutrófilos no aumentaba tras la

infección, lo que en principio excluiría la participación de este mecanismo, que tan trascendente resulta en la defensa frente a otros patógenos (Paumusch, 1998); sin embargo, otros autores, que estudiaron el efecto en los parámetros sanguíneos de la neumonía causada por *H. parasuis*, demostraron que después de la infección se producía un aumento en la concentración sanguínea de radicales libres (Muller y cols, 2003).

En cuanto a la participación de la fagocitosis, la detección de la bacteria en el citoplasma de macrófagos y neutrófilos presentes en las lesiones de poliserositis, meningitis y neumonía indicaría que la bacteria es fagocitada por estas células durante las etapas iniciales de la infección (Amano y cols., 1994).

Finalmente, algunos autores han observado recientemente en el suero de animales convalecientes, la existencia de una proteína de 32 kDa capaz de unirse a la bacteria y además a bolitas de manosa-sefarosa. La secuencia genética de esta proteína presenta una homología elevada con otras lectinas de unión a manano, lo que abriría la puerta para su posible intervención en fenómenos de activación del complemento (Lillie y cols, 2006)

## 7.2. Respuesta adquirida

### 7.2.1. Respuesta humoral

La información sobre la respuesta humoral es todavía escasa. La detección de anticuerpos en sangre se ha demostrado por varios procedimientos, incluyendo la fijación del complemento, *immunoblotting* o ELISA.

Estudios iniciales (Miniats, y cols., 1991) demostraron la presencia de anticuerpos específicos después de la inmunización con cepas de diversa virulencia. Tales anticuerpos iban dirigidos frente a varias OMPs, en particular frente a una proteína de 37 kDa; sin embargo no se detectaron anticuerpos frente al LOS o frente al antígeno capsular, hecho que pone de manifiesto una mayor inmunogenicidad de las OMPs, comparado con los otros posibles inmunógenos. Por otro lado, también se advirtió que los anticuerpos producidos tras la inmunización con cepas de baja virulencia no protegían frente al desafío heterólogo con cepas de alta virulencia, por lo que se puso en duda su capacidad protectora. En cualquier caso, hoy se admite que la protección está determinada por la existencia de inmunidad humoral (Segalés, 1996); de hecho, la inmunización con bacterinas origina seroconversión y el título de anticuerpos se mantiene alrededor de 2 meses, lo que capacita la supervivencia de los animales ante el desafío homólogo (Takahaschi, 2001).

La fijación del complemento detecta anticuerpos en sangre, pudiendo demostrarse la presencia de reacciones cruzadas entre los serotipos 1 y 3, igual que el serotipo 5 con el 2 ó el 4, el 6 y el 7 (Nielsen., 1993).

Los anticuerpos de origen maternal también proporcionan mayor resistencia a la enfermedad (Solano-Aguilar y cols., 1999); de hecho, los cerdos procedentes de madres vacunadas están protegidos contra la infección homóloga durante 4-10 semanas después del nacimiento. Además, los animales nacidos de las madres vacunadas no muestran ninguna sintomatología ni lesión cuando se infectan experimentalmente después del nacimiento, al

contrario que los cerdos nacidos de las madres no vacunadas, que tras la infección desarrollan un cuadro clínico y lesional grave. Estos autores, por otra parte, observaron también que la vacunación de los lechones protegía de la enfermedad reduciendo las lesiones pulmonares, tanto en el caso de animales procedentes de madres vacunadas como no vacunadas, aunque en los primeros, la vacunación de los lechones no desencadenaba un aumento sustancial del título de anticuerpos. El hecho de que el microorganismo fuera aislado de la tráquea de los cerdos que no desarrollaban la enfermedad, procedentes de las madres vacunadas, indicaría que los anticuerpos producidos después de la vacunación no interfieren en la colonización de la tráquea, pero sí evitan la diseminación sistémica de la bacteria.

Hoffman y cols., (2002) obtuvieron resultados similares. Después de la vacunación observaron seroconversión en las madres y su progenie se encontraba parcialmente protegida frente a una infección homóloga por vía intravenosa, por lo que el cuadro clínico y lesional resultaba mucho más leve que en animales nacidos de madres no vacunadas. Tras la infección no se observó seroconversión en ninguno de los cerdos nacidos de las madres vacunadas, pero sí en los procedentes de las madres no vacunadas, que sobrevivieron a la misma. Finalmente, cuando se comparó el efecto de la infección con *H. parasuis* en cerdos criados de forma natural y en cerdos privados de calostro, con los primeros no fue posible reproducir la enfermedad, ya que estos animales presentaban anticuerpos frente a la bacteria, puesto que habrían podido inmunizarse por contacto con las madres, a

diferencia de lo que ocurría con los cerdos privados de calostro que eran seronegativos (Blanco y cols., 2004).

### 7.2.2. Respuesta celular

Con respecto al estudio de mediadores (citocinas), únicamente se ha investigado la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$ , en cerdos a los que se les indujo neumonía experimental. Se detectó una mayor concentración de TNF- $\alpha$  en las zonas lesionadas del pulmón, con gran variación en función de la zona y del animal. La presencia de IL-6 se puso de manifiesto principalmente en lavados pulmonares, incluso de regiones no lesionadas. También se observó correlación positiva entre la concentración de IL-6 y el grado de neumonía, resaltando el papel inflamatorio de esta citocina (Muller y cols., 2003).

Igualmente se ha comprobado que los cerdos con neumonía por *H. parasuis* presentan aumentos en el número de linfocitos circulantes, mientras que los niveles de neutrófilos y granulocitos son más variables, disminuyendo en algunos casos y aumentando en otros. Por su parte, disminuyen los niveles de linfocitos activados, que expresan CD25 (receptor de IL-2), lo que podría explicarse por la liberación de inhibidores de su proliferación, por parte de macrófagos o por su difusión desde la sangre al pulmón (Muller y cols., 2003). Otros autores han observado cuadros de leucopenia en infecciones experimentales, aunque con dosis infectivas muy elevadas, lo que hace pensar en la existencia de *shock* endotóxico (Amano y cols., 1997)

## 8. Control y prevención

Como consecuencia de que la mucosa nasal del lechón puede ser colonizada antes de la primera semana de vida, no se consigue la eliminación de *H. parasuis*, mediante el destete precoz (Clark y cols., 1994), por lo que se hace preciso evaluar nuevas estrategias de destete precoz medicado, que han proporcionado resultados positivos, únicamente en los casos en los que se administraron, por vía oral o parenteral, dosis altas de antibióticos a los lechones, unido a unas medidas de manejo apropiadas.

La mezcla de cerdos de distintas edades con portadores de *H. parasuis*, durante la última etapa de producción, puede dar lugar a un brote con efectos devastadores; por lo tanto, la introducción de lotes nuevos debe ir precedida de un periodo amplio de aclimatación, para que se desarrolle inmunidad protectora por exposición a pequeñas dosis del agente. La adquisición de inmunidad natural mediante exposición a la bacteria es de suma importancia, como se pone de manifiesto en algunos estudios en los que cerdos expuestos a cepas avirulentas desarrollaban resistencia frente a cepas virulentas (Nielsen, 1993), y en estudios realizados en granjas con problemas por *H. parasuis* donde, mediante la inoculación de cerdos de 5 días, con cepas presentes en la granja, se consiguió descender la mortalidad y la sintomatología clínica (Oliveira y cols., 2001). Se ha destacado la eficacia de la vacunación de las madres en el control de la enfermedad, puesto que proporciona una inmunidad a los lechones, que se prolonga hasta 4 semanas (Solano-Aguilar, 1999).

Existen numerosos estudios sobre los éxitos en el control de la enfermedad utilizando bacterinas comerciales y autovacunas. En otras ocasiones; sin embargo, los resultados han terminado en fracaso, probablemente debido a la falta de protección cruzada entre los serotipos. Los dos primeros tipos de bacterinas aplicados por Smart en cerdos SPF se obtuvieron a partir de cepas de campo de *H. parasuis* (Smart, 1989); ambas contenían una concentración de  $10^9$  UFC/ml, formol como inactivante e hidróxido de aluminio como adyuvante y la única diferencia residía en su preparación, pues mientras la primera se obtuvo recogiendo el crecimiento en placas de cultivo y resuspendiéndolo en PBS, en la segunda se utilizó como antígeno un cultivo bacteriano en caldo. En ambos casos se utilizaron 5 ml de cada preparación por vía subcutánea, con revacunación a las 2 semanas. Las dos vacunas proporcionaron protección frente al desafío con cepas homólogas, pues los cerdos vacunados, a diferencia de los controles, no presentaban síntomas de enfermedad.

En estudios posteriores, Miniats y cols. (1991) prepararon bacterinas utilizando dos cepas virulentas y una avirulenta. Se establecieron cuatro grupos experimentales (control, inmunizado con la cepa avirulenta y dos más inmunizados con cepas de diferente virulencia) y los resultados pusieron de manifiesto una relación directa entre la virulencia de la cepa y el grado de protección, que en el caso de las cepas de baja virulencia solamente cubría las cepas homólogas. Rapp-Gabrielson y cols. (1997) inmunizaron cerdos CDCD, con bacterinas que contenían los serotipos 2, 4, 5, 12, 13 y 14 (los más prevalentes de América del Norte) utilizando

un esquema vacunal que incluía la vía intramuscular a los 7 y 10 días de vida, con revacunación a las 2 semanas. En total, realizaron cinco experimentos en los que pudo comprobarse: 1) la protección del serotipo 5 frente al 4 (pero no al contrario); 2) la falta de repetibilidad de la protección de los serotipos 5 y 4 frente a los 2, 12 y 13 (en unos experimentos se conseguía protección y en otros no).

Takahashi y cols. (2001) diseñaron bacterinas bivalentes con los serotipos 2 y 5 que protegían frente a ambos serotipos de forma individual, mientras que las formulaciones monovalentes solo protegían frente al serotipo homólogo. En otro estudio

(Back y Riising, 2002) se comprobó la protección heteróloga de una bacterina inactivada del serotipo 5 frente a los serotipos 1, 12, 13 y 14, y cómo la protección era superior en los animales vacunados y desafiados con mayor edad

Los últimos estudios (Oliveira y cols., 2003) se han realizado en cerdos privados de calostro, demostrando que los animales vacunados con una bacterina elaborada a partir de una cepa virulenta, si son desafiados con la misma cepa, no solo no desarrollan síntomas ni lesiones, sino que ni tan siquiera puede confirmarse la presencia de la bacteria por PCR.



# Capítulo II: Caracteres generales de la respuesta inmune en el cerdo

## **1. El sistema inmune del ganado porcino**

1.1. Órganos linfoides

1.2. Tipos celulares

1.2.1. Línea linfoide

1.2.2. Línea mieloide

## **2. Respuesta inmune innata y adquirida**

2.1. Respuesta innata

2.1.1. Fase de actuación rápida

2.1.3. Fase de actuación lenta

2.2. Respuesta adaptativa

2.2.1. Presentación del antígeno, activación y diferenciación de linfocitos T

2.2.2. Función efectora de los linfocitos T

2.2.3. Respuesta mediada por anticuerpos

## **3. Memoria inmunológica**

3.1. Células T de memoria

3.2. Células B de memoria

## **4. Respuesta inmune celular y humoral**

4.1. Respuesta celular

4.2. Respuesta humoral

4.2.1. Inmunoglobulinas

## **5. Inmunidad de mucosas**

## **6. Respuesta inmune primaria y secundaria**

## **7. Respuesta inmune frente a bacterias**

7.1. Respuesta innata

7.2. Respuesta adquirida



## 1. El sistema inmune del ganado porcino

En el cerdo, el sistema inmune, como en otras especies animales, está constituido por órganos linfoides primarios y secundarios y varios tipos celulares

### 1.1. Órganos linfoides

Los órganos linfoides primarios son la médula ósea y el timo. Son los encargados de la producción y diferenciación de linfocitos y células mieloides. En la médula ósea se encuentran las células progenitoras o unidades formadoras de colonias. En el timo tiene lugar la diferenciación de las células madres procedentes de la médula ósea a linfocitos. Los órganos linfoides secundarios son el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT).

En los ganglios linfáticos tiene lugar el procesamiento del antígeno y su presentación a los linfocitos; se dividen en corteza y médula. En la corteza se distribuyen los folículos linfoides y el tejido linfoide difuso, donde se localizan los linfocitos, mientras que en la médula se encuentran monocitos y macrófagos. La distribución celular y 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.

El bazo es el órgano responsable del reconocimiento de los antígenos que llegan vía sanguínea. Está constituido por la pulpa blanca y la roja. En la primera se encuentran los folículos linfoides, con linfocitos B y células presentadoras de antígeno (cpAg), y las vainas

periarteriolas con linfocitos T. La pulpa roja está formada por cordones esplénicos, con monocitos y eritrocitos, y por senos venosos con macrófagos.

El MALT se localiza en posiciones estratégicas para la captura y reconocimiento de los antígenos. Están constituidos por folículos linfoides y áreas interfoliculares. Los folículos linfoides están formados por células B rodeadas de células dendríticas foliculares y un pequeño número de linfocitos  $CD4^+$  y macrófagos. Las áreas interfoliculares contienen principalmente linfocitos  $CD4^+$  y  $CD8^+$ . El epitelio que recubre estos tejidos se encuentra infiltrado por linfocitos, células M y también células dendríticas, que transportan el antígeno a los folículos linfoides. En la tabla 1 se recogen las distintas clases de MALT descritas en el cerdo (Liebler-Tenorio y Pabst, 2006).

El BALT presenta un desarrollo y localización dependiente de antígeno y aumenta de tamaño en infecciones (Liebler-Tenorio y Pabst, 2006). El MALT gástrico se puede activar por la colonización de bacterias, observándose una gran cantidad de folículos linfoides (Liebler-Tenorio y Pabst, 2006). El GALT está constituido, entre otras estructuras, por las placas de Peyer, con la siguiente composición: a nivel de la submucosa se observan folículos linfoides, una corona con linfocitos T y una región interfolicular, mientras que en la mucosa aparece una cúpula formada por linfocitos T ( $CD4^+$ ), B, macrófagos, células dendríticas y células M. En la lámina propia se han observado células dendríticas inmaduras (Bailey y Harveson, 2006).

Tabla 1. Distribución del MALT en el sistema inmune del ganado porcino

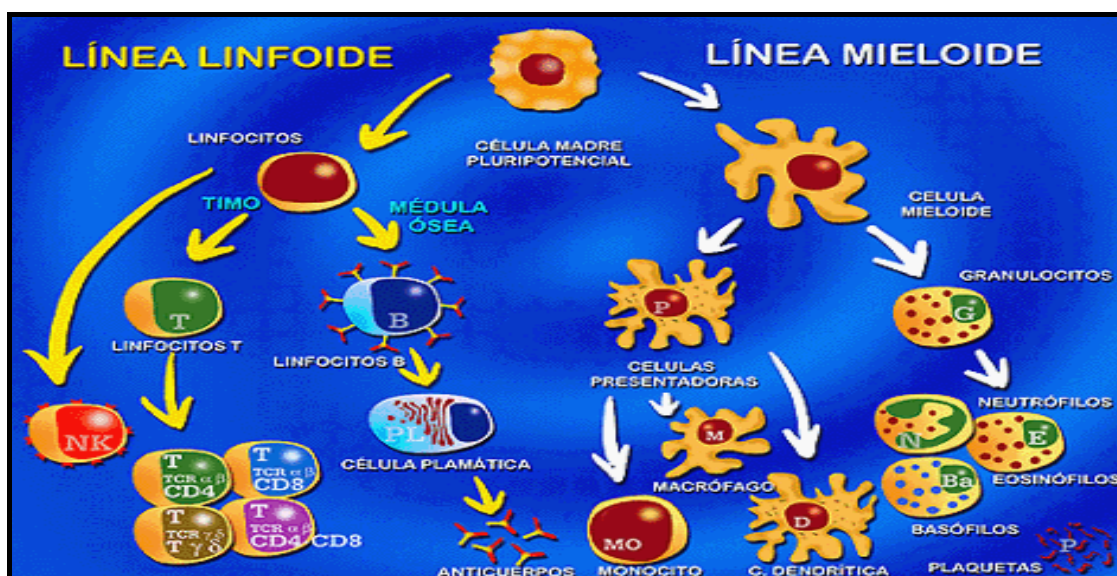
Denominación	Localización	Estructuras
CALT ( <i>conjuntiva associated lymphoid tissue</i> )	Conjuntiva	Linfonódulos
Anillo de Waldeyer	Nasofaringe y orofaringe	Tonsilas: linfonódulos y agregados de tejido linfoide no
LTALT ( <i>larynx associated lymphoid tissue</i> )	Laringe	Linfonódulos Agregados de tejido linfoide no organizado.
BALT (bronchus associated lymphoid tissues)	Bronquios	Folículos linfoides individuales.
MALT gastrico	Estómago	Linfonódulos Agregados linfocitarios
GALT (gut associated lymphoid tissue)	Intestino	Linfonódulos Placas de Peyer Agregados de tejido linfoide no organizado

### 1.2. Tipos celulares

Las células del sistema linfoide se forman a partir de una célula madre pluripotencial de la médula ósea. Ésta célula madre se diferencia dando lugar a una línea linfoide constituida por

linfocitos T, B y NK y una línea mieloide, a partir de la cual se forman granulocitos (neutrófilos eosinófilos y basófilos) y presentadoras de antígeno (monocitos, macrófagos y células dendríticas).

Figura 1. Líneas celulares que derivan de una célula madre pluripotencial



Para clasificar, agrupar y analizar la funcionalidad de las diferentes poblaciones leucocitarias se han utilizado diversos métodos, los más comunes se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Métodos para el estudio de poblaciones leucocitarias

Marcadores y receptores de membrana	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ LB→ Igs de superficie</li> <li>▪ LT →Rosetas con eritrocitos</li> </ul>
Antígenos de membrana	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Citometría de flujo</li> <li>▪ Inmunohistoquímica</li> </ul>
Pruebas funcionales	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proliferación linfocitaria</li> <li>▪ Actividad citotóxica.</li> <li>▪ Ensayos de fagocitosis</li> <li>▪ <i>Killing assay</i></li> </ul>

Los marcadores y receptores de membrana pasaron a un segundo plano, con el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales (AcMo) frente a los antígenos de membrana. En la actualidad, para la mayoría de los animales domésticos se han desarrollado paneles de AcMo específicos, que han permitido una clasificación mas completa de las células linfoides en los llamados “cluster de diferenciación” ó CD.

La proliferación linfocitaria estudia la capacidad de estimulación específica e inespecífica de los linfocitos en respuesta a un antígeno. La actividad citotóxica y los “*killing assay*” miden la capacidad de destrucción de las células diana en cultivos *in vitro* por los linfocitos y fagocitos, respectivamente. Finalmente, los ensayos de fagocitosis se basan en la capacidad de ingestión *in vitro* de los microorganismos.

## 1.2.1. Línea linfoide

### 1.2.1.1. Linfocitos B

#### 1.2.1.1.1. Caracteres generales

Estos linfocitos presentan receptores (BcR, *B Cell Receptors*) formados por inmunoglobulinas, cuyos dominios variables reaccionan con el antígeno, mientras que los dominios constantes transmiten la señal al interior de la célula. También disponen de co-receptores formados por tres moléculas de membrana: TAPA-1, CR-2 y CD19.

Estas propiedades fenotípicas han permitido su caracterización con anticuerpos monoclonales frente a las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas de superficie (Clon *K-139-E1*, Clon *5C9 INIA*, *Valdeolmos, Madrid*) o frente a la molécula completa de IgM, de tal forma que en cerdos de 2-4 semanas de edad representaban el 30% de los linfocitos en sangre y en animales de 4-6 semanas el 20% (Martín Consuegra, 1998 y Segalés y cols., 2001).

#### 1.2.1.1.2. Generación, diferenciación y activación.

Se generan a partir de un precursor en la médula ósea que se transforma en una célula preB. Esta célula interacciona con las células estromales y comienza a expresar el receptor para IL-7, que estimula la reordenación de los genes que codifican las inmunoglobulinas. De esta forma, se transforman en células preB con una inmunoglobulina de membrana formada por una cadena pesada de tipo  $\mu$  y un precursor de cadena ligera. Posteriormente, evolucionan a células B inmaduras, que ya presentan

cadena ligera de tipo  $\kappa$  o  $\lambda$  y expresan IgMs en su superficie. Finalmente evolucionan a células B maduras, que además de IgMs, expresan las IgDs con las cadenas pesadas  $\mu$  y  $\delta$  y las cadenas ligeras  $\kappa$  o  $\lambda$ .

Los linfocitos B cuando entran en contacto con el antígeno, migran a los folículos linfoides y contactan con las células dendríticas foliculares, cuyo receptor CD23 se une al CR2 de los linfocitos B liberando IL-1, que induce la proliferación y diferenciación de los linfocitos B. Para que tenga lugar la activación, además de la unión con las células dendríticas es necesario, en algunos casos, que las células B presenten el antígeno a los LT  $CD4^+$ , los cuales liberan citocinas que inducen el cambio de isotipo de IgM a IgG, una propiedad característica de las células plasmáticas y de las células B de memoria. Las células B activadas expresan en mayor cantidad el receptor para la IL-2 que consta de un antígeno, el CD25, frente al que se han desarrollado anticuerpos monoclonales (Clon 6 E12; R. Bullido y cols., 1996; Gómez del Moral 1998). Este marcador también se expresa en linfocitos T activados y aumenta con la edad del animal: en cerdos sanos de 3-4 semanas aparece en el 1-12 % de los linfocitos en sangre.

Las células plasmáticas tienen una vida media de 2-5 días, aunque algunas pueden evolucionar a células de memoria que, a diferencia de las otras, presentan una mayor expresión del receptor del complemento y de moléculas de adhesión, como el ICAM-1, junto con una mayor afinidad por el antígeno.

Algunas células B asociadas a la producción de auto-anticuerpos (Appleyard, y

Wilkei, 1998) expresan un receptor CD5 que está relacionado con los niveles de calcio y la activación celular.

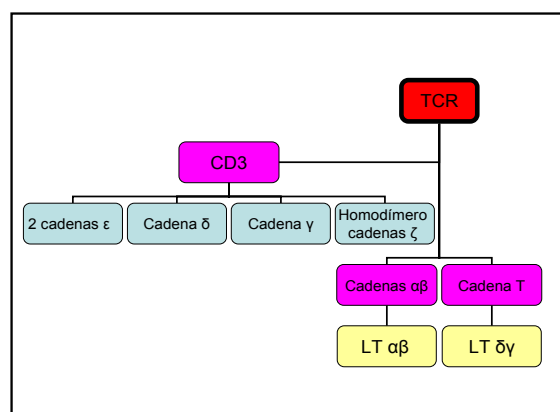
### 1.2.1.2. Linfocitos T

#### 1.2.1.2.1. Caracteres generales

Esta población de linfocitos presentan dos tipos de receptores TCR (*T- Cell Receptor*): el  $\alpha\beta$ , en el caso de los linfocitos  $\alpha\beta$ , y el  $\gamma\delta$ , para los linfocitos  $\gamma\delta$ .

El primero está constituido por dos cadenas hipervariables,  $\alpha$  y  $\beta$ , que no están presentes en el receptor  $\delta\gamma$ , en el que se sustituyen por una cadena T. El resto de las cadenas forman el complejo CD3, que interviene en la movilización de calcio y se emplea como antígeno para reconocer los linfocitos T, merced a la existencia de anticuerpos monoclonales frente a sus cadenas. En animales de 2-3 semanas de edad, el porcentaje de linfocitos en sangre con este receptor es del 48% y asciende al 68% en los animales de 4-6 semanas (Kirkham y cols., 1996).

Figura 2. Estructura del TCR en LT  $\alpha\beta$  y  $\delta\gamma$



#### 1.2.1.1.2. Generación, diferenciación y activación

Se generan a partir de una célula madre multipotencial que migra por el torrente sanguíneo al timo, donde tendrá lugar la selección positiva, tras la que sólo sobreviven aquellos linfocitos cuyos receptores pueden interactuar con complejos de histocompatibilidad porcinos (SLA, “*swine leukocyte antigen complex*’); mientras que se destruyen aquellas células que no reconocen el SLA o lo hacen con mucha afinidad, por lo que pueden ser potencialmente autorreactivas. Los linfocitos  $\alpha\beta$  que sobreviven a la selección, se diferencian funcionalmente en linfocitos T colaboradores, restringidos por moléculas de SLA-II y que expresan el antígeno CD4, y linfocitos supresores, restringidos por moléculas SLA- I, con el marcador CD8.

En algunos casos se observa la expresión de ambos antígenos en los denominados linfocitos dobles positivos. Existe cierta controversia sobre el origen de estos linfocitos. Algunos autores (Saalmuller, A., 1989) defienden que se trata de linfocitos CD4 de memoria que adquirieron el antígeno CD8 y lo mantuvieron cuando volvieron a estado de reposo. Otros piensan que son precursores de los linfocitos CD4 y CD8, que emigraron del timo al torrente sanguíneo y a los que todavía no ha dado tiempo a diferenciarse en linfocitos CD4 ó CD8 (Pescovitz y cols., 1994) .El hecho de que en las placas de Peyer y en las tonsilas se encuentre una proporción similar de ambas subpoblaciones, unido a la existencia de una continua estimulación antigénica en esos tejidos, podría indicar que a partir de los LTCD4<sup>+</sup> vírgenes, de las tonsilas y placas de Peyer, se generarían los linfocitos doble

positivos, que expresarían el CD8 tras la exposición a un antígeno (Zuckermann, 1996 y 1998). Además, cuando se compararon animales timentomizados con animales normales, se observó que con la edad, el aumento en el porcentaje de dobles positivos era igual para ambos; por lo tanto, la generación de estas células sería independiente del timo y dependiente de antígeno (Licence and Binns, 1995, Zuckermann, 1998).

En cuanto a los linfocitos T $\lambda\delta$  no está claro su origen, pero se cree que proceden del mismo precursor que los linfocitos T $\alpha\beta$  y luego divergen durante un estadio tardío de su desarrollo, como consecuencia de reordenamientos génicos.

Durante su diferenciación en el timo también se expresan otros receptores característicos de los LT, como los CD2, CD3 y CD5. El receptor CD5 interviene en la activación de las células T y su ligando es el CD72 de los linfocitos B, por lo que la unión de estas moléculas podría ser necesaria para la colaboración de los linfocitos T y B. La existencia de anticuerpos monoclonales frente a este receptor (Clon 5F12/9, INIA, Madrid), ha permitido establecer entre un 24-50 % de linfocitos CD5<sup>+</sup>, en animales de 3-4 semanas de edad (Bullido, 1996; Martín Consuegra, 1998). El CD2 es una molécula de adhesión que se une al CD58 (LFA-3) y activa las células T.

Estos linfocitos inmaduros migran atraídos por citocinas desde el timo a los tejidos linfoides periféricos y, una vez allí, puede tener lugar su activación o, en el caso de que ésta no se produzca, volverían a incorporarse al torrente circulatorio. Los

linfocitos penetran en estos tejidos debido a la unión de su selectina-L con receptores de selectinas y otras moléculas de adhesión, como el CD34 ó el GlyCAM-1, que se expresan en células endoteliales. Estas células también secretan citocinas que determinan la activación de LFA-1 (CD11a) en los linfocitos, que se une al ICAM-1 endotelial, y así el linfocito puede atravesar de forma más eficaz el endotelio para penetrar en los tejidos linfoides secundarios. Una vez activados, se dirigen desde los órganos linfoides periféricos al foco de infección, dejan de expresar L-selectina y expresan el VLA-4, con el que se unen al endotelio vascular para alcanzar los focos de infección. Una vez allí cuando reconocen el antígeno liberan TNF- $\alpha$ , que incrementa la expresión de adhesinas en el endotelio, favoreciendo la penetración de nuevas células T efectoras.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los linfocitos dobles positivos vírgenes presentan un antígeno 2 E3, que en animales jóvenes representa el 4,4-6 % de los linfocitos sanguíneos, aunque con la edad su expresión disminuye (Revilla y cols., 2004). Cuando los linfocitos T se activan, expresan el receptor para la IL-2 (CD25), junto con otros antígenos de membrana, como el CD29, CD11, CD44 y CD18 (receptores de integrinas).

#### 1.2.1.1.3. Subpoblaciones de linfocitos T

En el cerdo, en función de los cluster de diferenciación CD4 y CD8, se distinguen varias subpoblaciones de linfocitos T (Tabla 3). El CD8 es una glicoproteína que se une al dominio  $\alpha$ -3 del SLA-I y funciona como correceptor en la activación mediada por el

TCR. Es un dímero formado por dos cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$ , que puede presentarse como heterodímeros u homodímeros, de tal forma que los linfocitos que expresan las dos cadenas se clasifican fenotípicamente como “CD8 *high*”, y los que expresan el homodímero (generalmente CD8 $\alpha$ ) se denominan “CD8 *low*” (Yang y Parkhouse, 1996 y Zuckermann y cols., 1998). Los “CD8 *high*” son los linfocitos citotóxicos, mientras que los “CD8 *low*” pueden ser linfocitos dobles positivos (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), linfocitos  $\gamma\delta$  o células asesinas naturales (NK).

En el cerdo existe un porcentaje importante de linfocitos dobles positivos en sangre (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). El hecho de que ese porcentaje aumente con la edad, unido a que expresan CD3 en la misma proporción que los linfocitos maduros, parece indicar que se trata de células de memoria (Zuckermann y Husmann, 1996). Además, el 70 % de estas células en animales adultos de más de 6 meses, expresan CD29 con gran intensidad, siendo éste, un marcador característico de las células de memoria (Zuckermann y Husmann, 1996). La eficacia de estas células de memoria dobles positivas es superior con respecto a los linfocitos simples positivos, porque en las primeras tanto el antígeno CD4 como el CD8 intervienen en la respuesta mediada por el SLA y además, en comparación con los linfocitos CD4 presentan receptores para integrinas y una mayor producción de interferón (Zuckermann y cols., 1996, 1998). Por otro lado, al igual que los linfocitos simples, son capaces de producir IL-2 para estimular los LB.

Las células NK también presentan un fenotipo “CD8 *low*”, aunque en este caso son CD3<sup>-</sup>. Presentan citotoxicidad celular mediada

por anticuerpos y expresan en su superficie el receptor Fc $\gamma$ RIII ó CD16 que reconoce los anticuerpos IgG1 e IgG3 y dispara el ataque citotóxico sobre las células cubiertas por estos anticuerpos.

Los linfocitos  $\gamma\delta$  presentan activación y funciones muy parecidas a las de los linfocitos citotóxicos y las NK. Se han establecido tres tipos de TCR; el primero es común con otros ungulados, se identifica por el anticuerpo 86D y se expresa principalmente con un fenotipo CD2<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, que son células localizadas principalmente en sangre (anteriormente denominadas células nulas). El segundo tipo de receptor es una proteína de 37-40 KDa, que se expresa fundamentalmente en linfocitos  $\lambda\delta$

sanguíneos CD2<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> ó “CD8 *low*, y el tercero presenta un peso molecular de 40-46 KDa y se acumula en el tejido linfoide, en concreto en linfocitos  $\lambda\delta$  con fenotipo CD2<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>. (Saalmüller y cols., 1989; Licence y Binns 1995; Bullido, 1996; Davis, y cols., 1998). Las células nulas también se definen por el antígeno SWC6 (Davis, y cols., 1998 y Licence, y cols., 1995). La proporción de linfocitos  $\lambda\delta$  con respecto a los  $\alpha\beta$  es mayor en animales jóvenes; con la edad, aumentan los  $\alpha\beta$ , mientras que disminuyen los linfocitos  $\gamma\delta$  CD2<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup> o células nulas, pero los otros dos subtipos permanecen constantes. (Lunney y Pescovitz, 1987).

Tabla 3. Subpoblaciones de linfocitos T en base a la expresión de los antígenos CD4 y CD8

Cluster de diferenciación	Subpoblaciones linfocitarias	Porcentaje en sangre (Cerdos de 3-4 semanas).
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	Linfocitos <i>Helper</i>	2,1 ± 0,8
CD4 <sup>-</sup> CD8 <i>high</i>	Linfocitos citotóxicos	4,0 ± 1,5
CD4 <sup>+</sup> CD8 <i>low</i>	Linfocitos dobles positivos	2,2 ± 1,4
CD4 <sup>-</sup> CD8 <i>low</i>	Linfocitos $\delta\gamma$ Células asesinas naturales (NK)	3,7 ± 1,4
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	Células nulas	1,8 ± 0,3

### 1.2.2. Línea mieloide

A partir de la línea mieloide se forman otras células accesorias que incluyen monocitos-macrófagos, granulocitos y células dendríticas. Los progenitores del sistema mieloide presentan un fenotipo SWC3 *low* y SWC8<sup>-</sup>, luego se diferencian en células del sistema monocítico SWC3<sup>+</sup>, SWC8<sup>-</sup> y granulocitos SWC3<sup>+</sup>, SWC8<sup>+</sup> (Summerfield y McCullough, 1997).

#### 1.2.2.1. Monocitos-macrófagos

##### 1.2.2.1.1. Caracteres generales

Desde el punto de vista fenotípico, ambas células se caracterizan por marcadores comunes, como el SWC3, y específicos, como el SWC9 para los macrófagos o el SWC1 y el CD14, que se expresan con más intensidad en los monocitos.

Presentan receptores de membrana que les permiten fagocitar las células de forma inespecífica, como es el caso de las integrinas CD11b/CD18 y CD11c/CD1, el receptor de la manosa y el CD14. También presentan receptores para las Igs, como el CD16.

Ambas células disponen del SLA II, que es esencial para la presentación antigénica; sin embargo, se han observado diferencias en estos procesos entre monocitos y macrófagos, en concreto con los macrófagos alveolares. De este modo los monocitos, en presencia de IL-1, estimulan la respuesta proliferativa específica de antígeno, mientras que los macrófagos o el sobrenadante de cultivo de macrófagos la inhiben, estimulando, por el contrario, la proliferación inespecífica (en ausencia de antígeno), lo que reforzaría el papel de los macrófagos como reguladores de la respuesta inmune: estimularían las respuestas iniciales (inespecíficas) y después podrían controlarlas gracias su capacidad de inhibición de la proliferación específica (Basta y cols., 1999).

#### 1.2.1.1.2. Generación, diferenciación y activación

La síntesis de monocitos en la médula ósea se estimula durante una infección como consecuencia de la producción de factores de crecimiento hematopoyéticos, IL-3 y GM-CSF. Posteriormente, los monocitos abandonan la médula ósea, pasan al torrente circulatorio y se dirigen hacia el foco de infección, atraídos por proteínas quimiotácticas. Una vez allí atraviesan el endotelio vascular y migran a los tejidos donde se convierten en macrófagos, que

presentan diferente morfología y distinta actividad según su grado de maduración, activación y localización.

La activación de estos macrófagos está mediada por fenómenos inflamatorios y por el IFN- $\gamma$  producido por los linfocitos Th1, los LTCD8<sup>+</sup> y las células NK. Además, los LTCD8<sup>+</sup> expresan un receptor CD40, que se une a su homólogo presente en los macrófagos estimulando su activación. En algunos casos, el TNF- $\alpha$  y el TNF- $\beta$  sustituyen al CD40. Una vez activados, los macrófagos producen IL-12, que a su vez incrementa la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos y células NK y ayuda a la diferenciación de LTCD4<sup>+</sup> vírgenes en células efectoras. Los macrófagos activados tienen la ventaja de que fusionan con mayor eficacia los lisosomas a los fagosomas, y producen radicales de potente actividad antimicrobiana. Además, presentan una mayor expresión del SLA-II, CD40, B7 y de los receptores del TNF, por lo que son más eficaces en la presentación de antígenos a células T y responden mejor al efecto de los ligandos de estos receptores, como el TNF- $\alpha$  que sinergiza con el IFN- $\gamma$  y favorece la inducción de la producción de óxido nítrico.

Es necesario que la activación de los macrófagos esté regulada, porque producen radicales y mediadores que pueden inducir daño tisular. La regulación se consigue debido a que la producción de IFN- $\gamma$  es limitada en el tiempo y a que la célula T, activada por el macrófago, es capaz de sintetizar una proteína que degrada el ARNm de esta citocina.



Tabla 4. Características fenotípicas y funcionales de las subpoblaciones de monocitos CD163<sup>+</sup> y CD163<sup>-</sup>.

	CD163 <sup>+</sup>	CD163 <sup>-</sup>
SWC9	-	-
SWC1	+	+
CD16	+	+
CD14	+	++
SLA-II	++	+
Integrinas $\beta$ 1 y $\beta$ 2	++	+
Producción citocinas en respuesta a LPS	Inflamatorias	Inflamatorias Antinflamatorias
Inducción de respuesta linfoproliferativa (dosis altas LPS)	+	+
Inducción de respuesta linfoproliferativa (dosis bajas LPS)	++	+

#### 1.2.1.1.2. Subpoblaciones de monocitos

En la actualidad, se ha puesto de manifiesto la existencia de un antígeno de superficie, el CD163, cuya expresión es un indicativo del estado de maduración de la línea monocito/macrófago. Así, las células precursoras en la médula apenas expresan este antígeno, mientras que aparece prácticamente en la totalidad de los macrófagos. Por lo que se refiere a los monocitos, se han definido dos subpoblaciones, una que lo expresa y la otra que no, cuyas propiedades se resumen en la tabla 4.

La subpoblación CD163<sup>+</sup>, expresa en mayor cantidad el antígeno SLA-II necesario para la presentación antigénica (Chamorro y cols., 2000), lo que unido a que adquieren una morfología estrellada cuando se cultivan con suero y a que presentan una elevada expresión del marcador CD1, característico de células dendríticas, sugerirían una relación entre estas células y la subpoblación CD163<sup>+</sup> (Sánchez, y cols., 1999). La expresión de las moléculas de adhesión, superior en las células CD163<sup>+</sup>,

indica una mayor predisposición de esta subpoblación a emigrar a los tejidos inflamados, hecho que unido a su gran capacidad de producir citocinas inflamatorias (pero no antiinflamatorias) cuando son estimuladas *in vitro* con el LPS, pone de manifiesto el papel de esta subpoblación de monocitos en el desarrollo de la inflamación (Sánchez, y cols., 1999).

#### 1.2.2.2. Granulocitos

##### 1.2.2.2.1 Caracteres generales

El fenotipo de estas células se ha descrito como SWC1<sup>+</sup>, SWC3<sup>+</sup>, SWC8<sup>+</sup>, SWC9<sup>-</sup>, SLAII<sup>-</sup>, SLAI<sup>+</sup>, CD163<sup>-</sup>, CD11a<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD14<sup>+/-</sup>, CD16, CD18. El SWC8 se expresa en etapas tempranas de la maduración, por lo que los granulocitos inmaduros son SWC8<sup>+</sup> (Summerfield y cols., 2001).

Todos los tipos de granulocitos poseen receptores de membrana para la fracción Fc de las inmunoglobulinas, para las fracciones del complemento, como el C5Ar, importante en los

fenómenos quimiotácticos, el CR1 (CD35) y el CR3 (CD11b), que participan en los procesos de adhesión y fagocitosis.

#### 1.2.2.2.1 Generación, diferenciación y activación

Se generan a partir de un progenitor mieloide que pasa al torrente sanguíneo, donde madura y da lugar a tres tipos de células: neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Durante la maduración de los granulocitos también se produce la regulación negativa del CD49d/CD29 o integrina B1 (VLA) (Summerfield y cols., 1997 y 2001). Por el contrario, los antígenos SWC3, CD14, CD11a/18 y CD44 se regulan positivamente. Desempeñan una función vital en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune de carácter innato.

El grupo más abundante en el cerdo son los neutrófilos. Son capaces de activarse y fagocitar agentes patógenos en periodos de tiempo reducidos y su vida media es muy corta. Constituyen la primera línea de defensa del organismo. Los eosinófilos fagocitan principalmente parásitos. Por último, los basófilos liberan aminas vasoactivas, que contribuyen a la inflamación.

#### **1.2.2.3. Células dendríticas**

Con esta denominación se agrupan un conjunto muy heterogéneo de células con morfología estrellada, que se han caracterizado y clasificado atendiendo a varios criterios como el origen, la localización y la producción de citocinas.

#### 1.2.2.3.1. Origen

Se distinguen dos grupos principales en función de si su precursor es de origen linfoide o mieloide.

Las de origen mieloide se localizan en los epitelios superficiales y en la mayoría de los órganos sólidos y son células que expresan los dos antígenos de histocompatibilidad, los receptores CD11, CD18, CD1, el CD68 (actúa como ligando de las selectinas), moléculas co-estimuladoras como el p55, el CD80/86 o el CD16 y carecen de los marcadores de superficie específicos de los linfocitos. Estas células se estimulan con la infección y migran al MALT y órganos linfoides secundarios para presentar el antígeno a los linfocitos, en cuyo recorrido pierden su capacidad de fagocitar antígenos, a la vez que aumenta la expresión del SLA-II y de las moléculas co-estimuladoras. La presentación antigénica puede seguir dos rutas: una endocítica a través de la endocitosis y pinocitosis de antígenos extracelulares unidos al SLA- II, y otra citosólica, para antígenos endógenos unidos al SLA-I.

A partir de los precursores linfoides se generan células interdigitantes foliculares y células plasmacitoides o productoras de interferón. Las primeras se localizan en el timo, con un fenotipo CD2<sup>+</sup>, SLA II<sup>+</sup> y CD1<sup>+</sup> (Salmon y cols., 2000) y son especialmente abundantes en la médula tímica, para seleccionar los linfocitos que reaccionan frente a los antígenos propios. Las células plasmacitoides presentan un fenotipo CD4<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, “CD16 *low*”, CD1<sup>+</sup>, “CD80/86 *low*”, CD8<sup>-</sup> y “SLA-II *low*” (Summerfield y cols., 2003).

Tabla 5. Clasificación de las células dendríticas en función de su localización

Sangre	Órganos linfoides	Piel, mucosas, membranas y órganos no linfoides.
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Células dendríticas sanguíneas</li> <li>▪ Células dendríticas linfáticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Zona T:</b> células dendríticas interdigitantes</li> <li>▪ <b>Zona B:</b> células dendríticas foliculares</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Células de Langerhans</li> <li>▪ Células dendríticas intersticiales</li> </ul>

### 1.2.2.3.2. Localización

Las células dendríticas reciben diversas denominaciones en función de su localización (las). Las células dendríticas foliculares carecen de SLA-II; por tanto, no actuarían como células presentadoras de antígeno a los linfocitos T, pero sí a los linfocitos B, gracias su capacidad de presentación del antígeno en su superficie, en forma de complejo con factores del complemento. Sólo las células B que son capaces de procesar este antígeno sobreviven e interactúan con las células T colaboradoras, para diferenciarse a células B plasmáticas o de memoria.

### 1.2.2.3.3. Producción de citocinas

Las células dendríticas se han clasificado en células DC1 y DC2 según la capacidad de producir citocinas que estimulen la diferenciación de los linfocitos en LTh1 y LTh2 respectivamente. No obstante, ésta clasificación no es del todo estricta, ya que depende de la naturaleza del agente estimulador (Johanson, y cols., 2003).

## **2 Respuesta inmune innata y adquirida**

Cuando un agente extraño penetra en el organismo se activan una serie de mecanismos de forma coordinada con finalidades propósito de eliminarlo. La primera línea de defensa la constituyen las barreras físicas, químicas y biológicas. A los pocos minutos, comienza la respuesta inmune innata no específica.

### **2.1. Respuesta innata**

Esta respuesta se puede dividir en dos fases: fase de actuación rápida, entre los 4 minutos y 4 horas, y la de actuación lenta, que comienza a las 4 horas y finaliza a los 4 días.

#### **2.1.1. Fase de actuación rápida**

En la primera fase tiene lugar el inicio de la respuesta de fase aguda con la síntesis de proteínas de fase aguda, la activación del complemento y la de los macrófagos

##### **2.1.1.1. Respuesta de fase aguda**

La respuesta de fase aguda se define como el conjunto de procesos metabólicos,

endocrinos y fisiológicos que se producen de forma inmediata frente a situaciones de estrés, infecciones, quemaduras, cirugía mayor, crecimiento tumoral, alteraciones inmunológicas o agentes químicos que provocan daño tisular (Lampreave y cols., 1994).

Las proteínas identificadas en la respuesta de fase aguda en el cerdo se clasifican en proteínas de fase aguda positivas, que aumentan su concentración en sangre durante la respuesta, y en proteínas de fase aguda negativas, cuya concentración disminuye (Tabla 6)

#### 2.1.1.1.1. Regulación de la expresión de proteínas de fase aguda

La producción de proteínas de fase aguda está regulada por diversos tipos de mediadores, que se pueden agrupar en 4 categorías: las citocinas tipo IL-6, como la IL-6, IL-11, factor inhibidor de leucemia, oncostatina M y factor ciliar neutrófico; las citocinas tipo IL-1, como la IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$  y los glucocorticoides, y factores de crecimiento como el factor de crecimiento de los hepatocitos, factor de crecimiento de los fibroblastos y el TGF- $\beta$ .

Las citocinas actúan como estimuladores primarios y los glucocorticoides y factores de crecimiento, como moduladores de las respuestas inducidas por las citocinas. En la

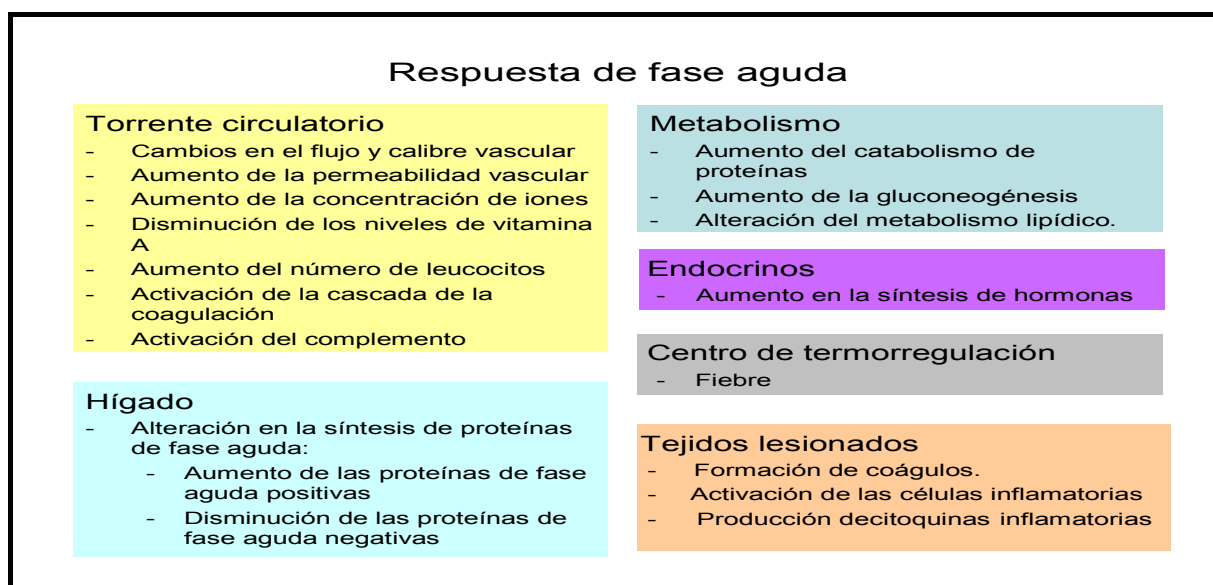
mayoría de los casos, la IL-6 aumenta de forma sinérgica la estimulación mediada por IL-1 y el TNF- $\alpha$ ; en cambio las citocinas del tipo IL-1 no estimulan el efecto de la IL-6, incluso tienen una influencia inhibitoria sobre la misma.

En el cerdo se ha estudiado *in vitro* el efecto de las citocinas IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$  sobre la producción de HPT, pig MAP y albúmina por los hepatocitos. Por lo que se refiere a las dos primeras proteínas, sólo se observó el efecto de la IL-6, que actúa como inductora, especialmente a dosis elevadas. Así, la expresión del mRNA de la Pig MAP en los hepatocitos se detecta a las 6 horas post-inducción, con niveles máximos a las 24 horas, momento en el que se pone de manifiesto su presencia en el medio de cultivo, con una concentración que va incrementándose y a las 48 horas es el doble de la inicial. Con respecto a la HPT, a las 24 horas se observa un notable incremento de su expresión en los hepatocitos, y su concentración en el medio es casi dos veces superior, alcanzando valores todavía más altos a las 48 horas. En el caso de la albúmina, las tres citocinas inducen un descenso en su secreción, más notable y duradero en el caso de la IL-1 y el TNF- $\alpha$  (González-Ramón y cols., 2000). El LPS ejerce una acción inductora sobre la pig MAP, similar a la observada con la IL-6 (González-Ramón, 2000).

Tabla 6. Principales proteínas plasmáticas de fase aguda descritas en el ganado porcino y su variación respecto a los niveles normales

Incremento >10x	Incremento 2-10x	Disminución
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pig MAP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Haptoglobina (HPT)</li> <li>▪ Fibrinógeno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Albúmina</li> <li>▪ Transferrina</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proteína C-reactiva (CRP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Amiloide sérico A</li> <li>▪ <math>\alpha</math>1antiquimotripsina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Apolipoproteína A-I (ApoA-I)</li> </ul>

Figura 3. Principales alteraciones metabólicas, endocrinas y fisiológicas que constituyen la respuesta de fase aguda



#### 2.1.1.1.2. Desarrollo de la respuesta de fase aguda.

En general, la magnitud de la respuesta de fase aguda está relacionada con la gravedad del proceso inflamatorio y la extensión de la enfermedad. La cinética de inducción es variable entre las distintas proteínas aunque la rapidez y la magnitud del cambio suelen ir parejas. La pig MAP presenta el incremento relativo más acusado: aumenta entre 20 y 30

veces para volver a alcanzar valores basales 10 ó 15 días después de iniciarse el proceso. La HPT aumenta entre 5 y 10 veces y 8-15 días después, vuelve a presentar valores normales. La CRP se incrementa hasta 12 veces y sus valores se normalizan más rápidamente que en el caso de las anteriores. Finalmente, el amiloide sérico presenta un aumento menos notable en los primeros días y a partir del 5º, comienza a normalizarse (Heegaard y cols.,

1998). Respecto de las proteínas de fase aguda negativa, la apoA-I disminuye de 2 a 3 veces en infecciones bacterianas, los valores mínimos se alcanzan a los 2 y 3 días y su respuesta puede persistir hasta 13-15 días (Carpintero y cols., 2005).

Existen diferencias significativas entre la producción de proteínas de fase aguda y el tipo de patógeno que las induce. Así, durante la infección bacteriana se alcanzan niveles mucho más elevados que los observados en infecciones víricas (González-Ramón, 1997). Por otro lado, se ha demostrado que estos cambios están más relacionados con el curso de la enfermedad, que con la presencia del agente. Así, en infecciones víricas subclínicas los niveles de proteínas de fase aguda se mantienen basales (Segalés, y cols., 2004); mientras que en infecciones víricas sintomáticas por PRRS se observa un aumento de la haptoglobina y la IL-6, al tiempo que se detectan los virus en sangre; sin embargo, aunque la viremia persista, ambas desaparecen cuando deja de observarse la sintomatología (Asai, T., 1999). Estos hallazgos se repiten en infecciones bacterianas en las que tras la administración de un antibiótico, con la consiguiente reducción de la intensidad del cuadro clínico y la carga bacteriana, se observa que los niveles de SSA y HPT en los animales tratados, con respecto a los no tratados, empiezan a aumentar más tarde, no se elevan tanto y su duración es menor (Hultén, C., 2003).

#### 2.1.1.1.3. Función fisiológica de las proteínas de fase aguda

Las funciones de estas proteínas no están

muy claras pero se ha descrito el aumento de la presión osmótica de la sangre, la defensa inmunológica del organismo frente a sustancias extrañas, el transporte de sustancias liposolubles y la homeostasis. En el caso de la CRP, se ha señalado que participa en la activación del complemento y en la inducción de la acumulación de neutrófilos y macrófagos en las zonas dañadas. También está involucrada en la degradación del material nuclear y posee especificidad de unión al DNA libre y a los carbohidratos, de forma similar a las lectinas. La haptoglobina forma complejos estables con la hemoglobina liberada por los eritrocitos, puede prevenir la eliminación del hierro por el aparato urinario al tiempo que le protege de las lesiones derivadas de dicha eliminación y controla la proporción de hemoglobina circulante. La transferrina está implicada en el control de los niveles de hierro disponibles para los microorganismos. La  $\alpha$ -1 antitripsina inhibe las proteasas liberadas por las células (elastasa) y las absorbidas a nivel intestinal en los primeros días de vida del animal. La pig MAP se podría considerar que pertenece a la familia del inhibidor de proteasas plasmático. Su actividad podría estar relacionada con la regulación y modulación de la migración y proliferación celular (González-Ramón y cols., 1997; Piñeiro, 1999); también se ha considerado una proteína antiinflamatoria porque inhibe la polimerización de la actina y la fagocitosis de PMN. Existe una asociación estadística entre el aumento de pig MAP y de HPT, con el aumento de células rojas en sangre, de la IL-10 en el timo y con la disminución del hierro libre en sangre (Segalés y cols., 2004).

### 2.1.1.2. Activación del complemento

El complemento está constituido por un conjunto de proteínas plasmáticas y de membrana cuyas funciones efectoras se inician por tres vías: la clásica, la alternativa y la de las lectinas. La vía clásica se activa por la unión del anticuerpo al antígeno. La vía alternativa se inicia cuando el fragmento C3b, espontáneamente activado, se une a la superficie de un agente patógeno. Finalmente la vía de las lectinas se activa tras la unión de una lectina de unión a manosa, con carbohidratos que contienen este azúcar, presentes en la superficie de bacterias y virus. Su activación desencadena la opsonización de microorganismos para favorecer la fagocitosis, la atracción de los fagocitos a la zona de infección, el incremento del flujo sanguíneo de la zona y el aumento de la permeabilidad de los capilares. En cualquier caso, la consecuencia fundamental de la activación del complemento es la activación del complejo de ataque a la membrana (C5-C9), que produce poros en la membrana de las bacterias o de las células infectadas por virus, originando su lisis.

### 2.1.1.3. Activación de los fagocitos

Los fagocitos se activan gracias a sus receptores del complemento, son capaces de unirse al fragmento C3b cuando éste se ha depositado en la superficie del agente infeccioso, para luego introducirlo en el interior de la célula donde destruye el microorganismo. Al mismo tiempo, producen citocinas, radicales libres, prostaglandinas y leucotrienos que actúan como mediadores de la inflamación.

### 2.1.3. Fase de actuación lenta

En la fase de actuación lenta tiene lugar la activación de las células NK en respuesta a citocinas, como el IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  y la IL-12, producidas por los fagocitos y fibroblastos. Una vez activadas liberan citocinas proinflamatorias, como el IFN- $\gamma$ , que a su vez estimula a los fagocitos a la producción de más citocinas.

El conjunto de estas citocinas proinflamatorias, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16, TNFs e IFNs, dan lugar a una respuesta inflamatoria local y cuando pasan a nivel sistémico, estimulan la atracción de nuevas células inmunes a la zona e inducen la aparición de una serie de alteraciones fisiológicas.

La respuesta inflamatoria se regula por citocinas como la IL-10, que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias por los fagocitos y células NK, y como la IL-6, que disminuye la síntesis de la IL-1, del TNF- $\alpha$  y la respuesta de los macrófagos.

La IL-8 forma parte de un grupo de citocinas con propiedades quimiotácticas sobre fagocitos y células T, cuya función es atraer más células al foco de la infección. Se han dividido en dos grupos las CXC, o quimiocinas  $\alpha$ , y las CC, o quimiocinas  $\beta$ . Las CXC actúan principalmente sobre los neutrófilos, mientras que las CC, entre las que se encuentran la proteína de inflamación de macrófagos (MIP, “*Macrophage inflammatory protein*”) y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP, “*Monocyte chemotactic protein*”), lo hacen sobre los macrófagos, las células T y, en menor medida, sobre basófilos y eosinófilos. En la actualidad, se ha incluido un tercer grupo

(grupo C), formado por otra quimiocina llamada linfotactina que, a diferencia de los anteriores, tiene como productores y células diana los linfocitos T. Otras poblaciones celulares que intervienen en la respuesta innata son los linfocitos  $\gamma\delta$  epiteliales que reconocen

el antígeno sin necesidad de presentación por el SLA, y las células B  $CD5^+$ , localizadas en el peritoneo, que reconocen antígenos de tipo T-independientes y producen IgM en las primeras etapas de la infección.

Figura 4. Citocinas inflamatorias: efectos locales y sistémicos

IL-1	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-8	IL-12	IFN- $\gamma$
<b>Efectos locales</b>					
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Activa el endotelio Vascular</li> <li>-Aumenta el diámetro vascular</li> <li>-Aumenta el acceso de células eectoras</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Activa linfocitos y fagocitos</li> <li>- Incrementa la producción de anticuerpos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activa el endotelio vascular</li> <li>-Aumenta la permeabilidad vascular</li> <li>-Aumenta la entrada de células y sus mediadores al tejido afectado.</li> <li>- Activa linfocitos, fagocitos y fibroblastos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Factor quimiotáctico de neutrófilos.</li> <li>-Factor quimiotáctico de linfocitos.</li> <li>-Activa la unión al endotelio por medio de integrinas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Activa células NK</li> <li>- Induce la diferenciación de células TCD4 a Th1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Favorece la presentación antigénica y citotoxicidad</li> <li>- Activación de fagocitos y células NK</li> </ul>
<b>Efectos Sistémicos</b>					
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fiebre</li> <li>-Producción de IL-6</li> <li>-Induce la respuesta de fase aguda</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fiebre</li> <li>-Producción citoquinas</li> <li>-Induce la respuesta fase aguda</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fiebre</li> <li>-Induce la respuesta fase aguda</li> <li>-C.I.D.</li> </ul>			

## 2.2. Respuesta adaptativa

Cuando la respuesta natural fracasa se produce la respuesta adaptativa (inmunidad adquirida específica).

### 2.2.1. Presentación del antígeno, activación y diferenciación de los linfocitos T

Los antígenos son procesados por las células presentadoras de antígeno (cpAg) que

migran a los ganglios linfáticos próximos al foco de infección. Cuando están presentes en el torrente circulatorio, son capturados y procesados por las células presentadoras residentes en el bazo y, cuando el agente patógeno penetra a través de las mucosas, estos procesos se producen principalmente en las placas de Peyer y en las tonsilas.

En estos órganos linfoides tiene lugar la presentación del antígeno a los linfocitos T vírgenes circulantes. Inicialmente, se produce



una unión transitoria entre el linfocito y la cpAg, que proporciona el tiempo necesario para que la célula T pueda reconocer su antígeno específico unido al SLA. Cuando lo reconoce, se produce un cambio conformacional en la integrina LFA-1 de los linfocitos T, que estabiliza su unión con la célula presentadora de antígeno. La célula T virgen comienza a expresar los genes que codifican la IL-2 y su receptor y se activa de tal forma que se produce su expansión clonal, dando lugar a un clon de células T efectoras. Para que las células T se diferencien, además de la unión del CD4 y CD8 al SLA de la célula presentadora, es necesario que las cpAg produzcan moléculas coestimuladoras como las B7 (CD80, CD86), que se unen al CD28 de los linfocitos, y citocinas como la IL-1. Por su parte, las células T efectoras expresan un receptor, el CTLA-4 ó CD152, que se une con gran afinidad al receptor B7. El control de esta respuesta proliferativa se realiza gracias a la señal inhibitoria, resultante a la unión del receptor CTLA-4 ó CD152 de los células T efectoras con el receptor B7.

En el caso de los linfocitos CD4<sup>+</sup> vírgenes, cuando contactan con la célula presentadora de antígeno, esta prolifera y madura secretando citocinas que determinarán la diferenciación de los linfocitos en dos subpoblaciones: los LTh1 y los LTh2, que estimulan macrófagos y linfocitos B, respectivamente. En esta diferenciación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> intervienen diversos factores:

**1. Naturaleza del agente infeccioso:** infecciones por virus y bacterias intracelulares inducen a la producción de citocinas como la IL-12 y el IFN- $\gamma$ , que determinan la diferenciación en linfocitos LTh1, entre otras

razones porque la IL-12 inhibe la diferenciación de los LTh2. Por el contrario, si el agente infeccioso es extracelular, las citocinas secretadas son la IL-4 y la IL-6, que inducen principalmente los LTh1, inhibiéndose los LTh2.

**2. Regulación mutua:** ambas subpoblaciones de linfocitos tienen capacidad de regularse: así, los LTh1 producen IFN- $\gamma$ , que inhibe la activación de los LTh2, y los LTh2 producen TGF- $\beta$  e IL-10, que actúan sobre células dendríticas, inhibiendo su capacidad de activar la diferenciación y proliferación de los LTh1.

**3. Cantidad de péptido antigénico:** las grandes cantidades de péptido, que alcanzan una densidad elevada en la superficie de la cpAg, tienden a estimular la respuesta de tipo Th1, mientras que una presentación de menor densidad tiende a inducir respuestas de tipo Th2.

### 2.2.2. Función efectora de los LT.

Los linfocitos T efectores expresan altos niveles de moléculas de adhesión, como el CD2, que permiten el contacto con sus células diana: los macrófagos o las células B, en el caso de los linfocitos LTCD4<sup>+</sup> y las células infectadas, en el caso de los LTCD8<sup>+</sup>. Otra de las características de los linfocitos T efectores es que dejan de expresar L-selectina, que les permitía circular por los ganglios linfáticos, y expresan la integrina VLA-4 con la que se unen al endotelio vascular para migrar a los focos de infección. Una vez allí, cuando reconocen el antígeno, liberan TNF- $\alpha$  que incrementa la expresión de adhesinas en el

endotelio, favoreciendo la penetración de nuevas células T efectoras.

Los  $LTCD8^+$  producen  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  y  $TNF-\beta$ . La más importante es el  $IFN-\gamma$ , que aumenta la expresión del SLA-I y puede bloquear la replicación vírica e incluso, provocar la eliminación del virus de las células infectadas, programándolas para la apoptosis o estimulando la liberación de sus gránulos líticos. Otra de las funciones del  $IFN-\gamma$  es la activación de macrófagos, que son reclutados a los sitios de infección como células efectoras y como células presentadoras de antígeno. El  $TNF-\alpha$  y el  $TNF-\beta$  establecen sinergia con  $IFN-\gamma$  en la activación de los macrófagos.

Las células Th2 secretan IL-4 e IL-5, que activan las células B, así como la IL-10 que inhibe la activación de los macrófagos, la IL-3, que es un factor de crecimiento de células hematopoyéticas, el GM-CSF, que aumenta la producción de granulocitos, macrófagos y células dendríticas, a partir de sus precursores en la médula ósea y el  $TGF-\beta$ , que inhibe la activación de los macrófagos.

Las células Th1 secretan  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\beta$  y  $LT-\alpha$ , que además de activar macrófagos, inhiben las células B, así como la producción de IL-3, GM-CSF y  $TNF-\alpha$ .

### 2.2.3. Respuesta mediada por anticuerpos

A los 5 días de la inmunización primaria, en las proximidades de la zona T del ganglio, se inicia la proliferación de las células B, que posteriormente migran al folículo primario, donde son atrapadas y estimuladas por células LTh2 activadas, que reconocen en las células B el SLA-II unido a su antígeno específico y

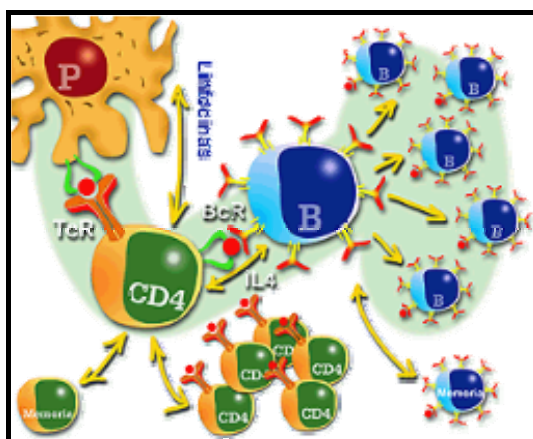
unen su ligando CD40 al CD40 de los linfocitos B. Esta unión, junto con la producción de IL-4 por los linfocitos LTh2 e IL-1 por las células dendríticas, determina la expansión clonal de las células B con la formación de focos primarios de proliferación, en los que una proporción de células B se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos, debido a las IL-5 e IL-6 liberadas por células T.

Algunos de estos blastos B activados migran a los cordones medulares o a la pulpa roja, donde se dividen dando células plasmáticas de vida corta que secretan anticuerpos. Otras células B migran, junto con las células T que las activaron, a la zona B de un folículo cercano, donde forman centros germinales en los que se produce una rápida proliferación y mutación somática durante dos o tres días, dando lugar a blastos B llamados centroblastos. Estas células experimentan otra hipermutación somática para transformarse en centrocitos, que aparecen rodeados por las células dendríticas foliculares. Durante estos procesos se produce un aumento gradual de la afinidad por el antígeno o maduración de la afinidad, como consecuencia de la hipermutación somática de los genes de las inmunoglobulinas de superficie de los linfocitos B.

Las células B que abandonan el centro germinal como plasmatoblastos, migran a través de la linfa y la sangre a las superficies epiteliales, la lámina propia del intestino o la médula ósea, donde se diferencian en células de memoria o plasmáticas. Las células plasmáticas presentan menor cantidad de SLA-II, de forma que ya no pueden interactuar con el antígeno o con células Th. A diferencia

de las células B vírgenes, que expresan IgM e IgD en su superficie, las células plasmáticas expresan IgG. Este cambio de isotipo de la inmunoglobulina de superficie, depende de la unión del CD40 y del efecto de las citocinas liberadas por los linfocitos LTh1, como la IL-4, que estimula la expresión de IgG1 e IgE, e inhibe la de IgM, IgG3 e IgG2; y la IL-5, que induce la secreción de IgA, responsable de la inmunidad en las mucosas. Por otro lado, los LTh1 producen IFN- $\gamma$ , que inhibe la expresión de IgM, IgG1, e IgE, y en cambio induce la de IgG3 e IgG2.

Figura 5. Esquema de la cooperación celular durante la respuesta adaptativa



En ocasiones, la producción de anticuerpos por las células B en respuesta a los antígenos no es dependiente de la acción de los linfocitos T. El anticuerpo producido es principalmente la IgM y su afinidad por el antígeno no aumenta con el tiempo. Es el caso de los antígenos timo-independientes de tipo 1 y de tipo 2. Los primeros (LPS), a concentraciones elevadas, producen activación policlonal de las células B y a concentraciones bajas, una respuesta de anticuerpos específicos de antígeno. Los antígenos de tipo 2, como los polisacáridos bacterianos extracelulares,

inducen la producción de anticuerpos que recubren las bacterias, favoreciendo su ingestión y destrucción.

### 3. Memoria inmunológica

La memoria inmunológica es la capacidad que tiene el sistema inmune de responder más rápida y eficazmente a los agentes patógenos con los que se había enfrentado anteriormente. Se han propuesto dos teorías, la primera considera que los linfocitos de memoria se originan tras la exposición original al antígeno y persisten en estado de reposo hasta un segundo encuentro con el mismo. La segunda defiende que los linfocitos son reestimulados repetidamente, aún en ausencia de reinfección, por pequeñas cantidades de antígeno que persisten en complejos inmunes unidos a las células dendríticas foliculares o por nuevos antígenos con reacción cruzada con los anteriores.

#### 3.1. Células T de memoria

Las células T de memoria alcanzan un nivel máximo 5 días después de la exposición al antígeno y son capaces de producir mayores cantidades de IFN- $\gamma$ , de vital importancia para que monocitos y macrófagos puedan ejercer su función de células presentadoras de antígeno.

En las células TCD4<sup>+</sup>, la diferenciación de las células efectoras y de memoria es muy difícil, porque ambas sufren modificaciones similares en sus antígenos de superficie durante la respuesta inmune; sin embargo, en algunos casos se observa como los linfocitos CD4<sup>+</sup>, con antígenos de activación, presentan también

características similares a los linfocitos en reposo. Esto podría sugerir que los linfocitos CD4<sup>+</sup> vírgenes podrían diferenciarse en linfocitos efectoras o linfocitos de memoria.

Las células TCD8<sup>+</sup> específicas de antígeno aumentan de forma espectacular tras un segundo contacto con el mismo y después descienden unas 100 veces. A pesar de todo, el nivel es más alto que antes de la sensibilización primaria.

En el cerdo, como se vio con anterioridad, los linfocitos dobles positivos podrían representar una subpoblación de linfocitos implicados en la memoria inmunológica.

### **3.2. Células B de memoria**

Alcanzan un nivel máximo un mes después del contacto con el antígeno, puesto que necesitan que estén disponibles las células Th. Los linfocitos B de memoria aumentan su porcentaje en el organismo entre 10 y 100 veces tras la primera sensibilización y la afinidad de sus anticuerpos se irá incrementando gradualmente en los sucesivos contactos con el antígeno. Otra de las características de estas células es que presentan una elevada expresión del SLA-II, por lo que se facilita la captura y presentación del antígeno y de esta forma, las interacciones con las células Th activadas, se producirán a dosis antigénicas menores.

Los anticuerpos producidos por las células plasmáticas en la respuesta primaria desempeñan un papel importante en la maduración de la afinidad por el antígeno, característica de la memoria inmunológica, porque pueden formar complejos antígeno-

anticuerpo que son transportados por las células presentadoras de antígeno a los folículos linfoides. Una vez allí, se localizan en la superficie de las células dendríticas foliculares, donde son reconocidos por las células B de alta afinidad por el antígeno, de los centros germinales, que los procesan y los unen al SLA-II para presentárselo a las células T efectoras.

## **4. Respuesta inmune celular y humoral**

### **4.1. Respuesta celular**

Como su nombre indica, es la mediada por células, durante la respuesta innata, principalmente por células fagocíticas, y en la adquirida, por los linfocitos CD4 y CD8, como se ha descrito previamente.

### **4.2. Respuesta humoral**

La respuesta humoral es la mediada por moléculas, el complemento durante la respuesta natural y las inmunoglobulinas durante la respuesta adquirida. Es una respuesta policlonal porque cada epitopo antigénico estimula la transformación de un linfocito B en un clon de células plasmáticas, para que produzcan inmunoglobulinas específicas frente al mismo.

#### **4.2.1. Inmunoglobulinas**

Las inmunoglobulinas pueden reaccionar con el antígeno unidas al linfocito B, ya que forman parte del complejo BCR y también cuando se encuentran libres en los tejidos y fluidos biológicos. Los isotipos principales de

inmunoglobulinas, así como algunas de sus características se describen en la Tabla 7.

La afinidad de un anticuerpo es la fuerza con la que se une a su determinante antigénico, mientras que la avidéz es la fuerza de unión de un anticuerpo multivalente con un antígeno multivalente. La afinidad depende de la dosis antigénica; así las dosis elevadas desencadenan menos afinidad. Además los anticuerpos reconocen la configuración completa de un antígeno mejor que su estructura química.

Sus principales funciones biológicas son la **activación del complemento** por la vía

clásica mediante la unión de sus fragmentos Fc con la bacteria o células infectadas; **la aglutinación** (principalmente por la IgM cuya estructura pentámerica le permite unirse a varios antígenos al mismo tiempo), **la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos**, en la que intervienen tanto los fragmentos Fab que se unen al antígeno, como los Fc, que son reconocidos por macrófagos y células NK; **la neutralización** de virus, toxinas y otros factores de virulencia, **la opsonización** que tiene como finalidad envolver el antígeno para que este sea fagocitado, y **la inmunidad de las mucosas** (tabla 8)

Tabla 7. Características de los principales isotipos de inmunoglobulinas descritos en el ganado porcino.

IgM	IgG	IgA	IgE
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Forma de pentámero</li> <li style="text-align: center;">↓</li> <li>Antígenos multivalentes</li> <li>▪ Vida media corta (10 días).</li> <li>▪ 10-20 % de las Igs en suero</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Forma de monómero</li> <li>▪ Elevada afinidad antigénica</li> <li>▪ 80-85 % de las Igs en suero</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Isotipo principal a nivel de mucosas</li> <li>▪ Concentración en suero de 0,5–5 mg/ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fracción Fc con gran afinidad por basófilos</li> <li>▪ Menos del 0,01% de las Igs en suero</li> </ul>

Tabla 8. Principales funciones biológicas mediadas por las inmunoglobulinas.

IgM	IgG	IgA	IgE
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activación del complemento</li> <li>▪ Aglutinación</li> <li>▪ Neutralización</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activación del complemento</li> <li>▪ Citotoxicidad mediada por anticuerpos</li> <li>▪ Neutralización</li> <li>▪ Opsonización</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inmunidad de mucosas</li> <li>▪ Neutralización</li> <li>▪ Opsonización</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sensibilidad de mastocitos</li> <li>▪ Citotoxicidad mediada por anticuerpos.</li> </ul>

## 5. Inmunidad de mucosas

La primera barrera de la denominada inmunidad de mucosas la constituyen las células epiteliales, que secretan mucus, que protege el epitelio, fija bacterias comensales, interacciona con la IgA y diversos tipos de citocinas e interviene en la reparación del epitelio y en el mantenimiento del Ph (Oswald, 2006). En las mucosas se han establecido dos zonas de acción:

**1. Zona inductora.** En ella tiene lugar el procesamiento del antígeno e inicio de la respuesta inmune. Las células estimuladas en esta zona inductora se desplazan por el torrente sanguíneo a las diferentes zonas efectoras.

En el GALT la presentación del antígeno a los linfocitos T tiene lugar en las Placas de Peyer o en los ganglios mesentéricos (Bimczok y Rothkötter, 2006), y la activación de los linfocitos B se realiza en los linfonódulos y en las placas de Peyer, desde donde migran a los ganglios mesentéricos, la lamina propia o el torrente circulatorio (Snoek y cols., 2006).

En el aparato respiratorio, los linfocitos entran en BALT y migran a los nódulos linfoides por los vasos aferentes, una vez que ha tenido lugar el contacto con el antígeno. Otra alternativa es que el primer encuentro con el antígeno se produzca en los linfonódulos regionales (Bimczok y Rothkötter, 2006).

**2. Zona efectora.** Está constituida principalmente por los linfocitos T que se localizan entre las células epiteliales, en el interior del epitelio, en la lámina propia y en los ganglios linfáticos regionales. Fundamentalmente se trata de linfocitos CD8<sup>+</sup>,

CD4<sup>+</sup> y linfocitos  $\lambda\delta$ , pero también aparecen linfocitos B y algunas células plasmáticas. Las células plasmáticas producen IgA para que induzca la activación del complemento y la llegada de más células fagocíticas a la zona. (Snoek y cols., 2006).

## 6. Respuesta inmune primaria y secundaria

La respuesta primaria se produce durante el primer contacto con el antígeno. Tiene lugar en los ganglios linfáticos y en el bazo, es de corta duración, y está mediada principalmente por IgM y, en menor medida, por IgG.

La respuesta primaria consta de una fase de latencia, en la que no se detectan anticuerpos; una fase logarítmica, en la que el título de anticuerpos aumenta exponencialmente hasta alcanzar un valor máximo; una fase estacionaria en la que el título de anticuerpos se estabiliza (7-10 días para la IgM y 14-15 para la IgG) y una fase de declinación, en la que los anticuerpos son catabolizados (Fig. 6). Durante esta respuesta se desarrollan los linfocitos de memoria, que son los que participarán en los futuros contactos con el antígeno.

Cuando se produce un segundo contacto con el antígeno tiene lugar una respuesta secundaria que presenta las siguientes características:

**1. Título de anticuerpos:** los niveles de anticuerpos que se alcanzan durante la fase estacionaria son considerablemente superiores a los observados en la respuesta primaria.

**2. Isotipo de inmunoglobulina:** está mediada principalmente por las IgG.

**3. Afinidad de los anticuerpos:** la afinidad durante la respuesta secundaria es generalmente superior, fenómeno que se conoce como “maduración de la afinidad”. Su intensidad aumenta durante los sucesivos contactos con el antígeno.

**4. Células efectoras:** en esta respuesta intervienen los linfocitos de memoria que se generaron durante el primer contacto con el antígeno.

**5. Cinética de la respuesta:** se instaura de forma más rápida y duradera que la respuesta primaria.

**6. Localización:** se desarrolla principalmente en la médula ósea, aunque también en el bazo y los ganglios linfáticos.

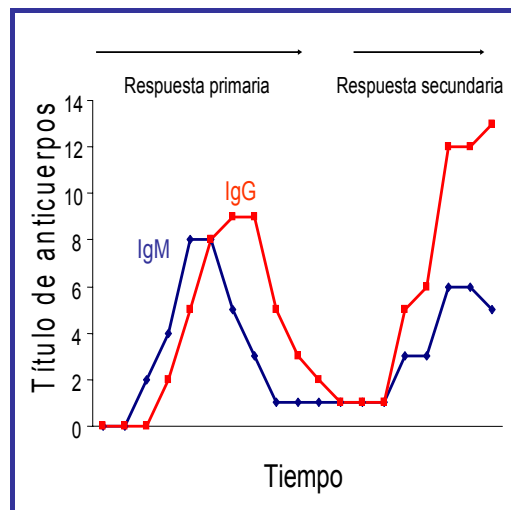
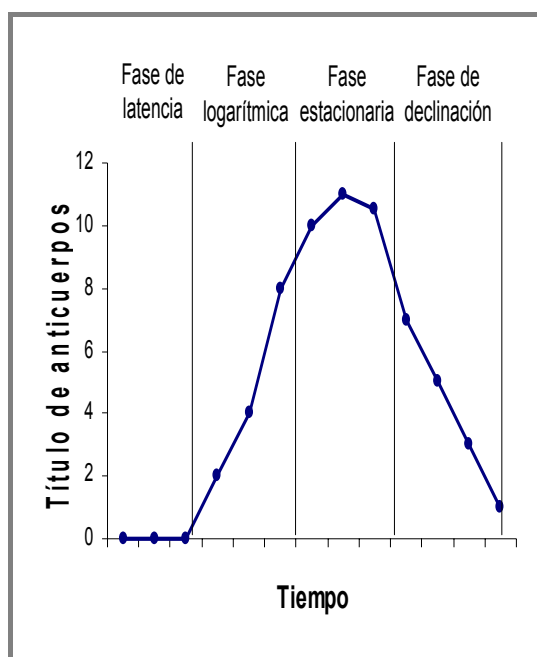


Figura. 6. Cinética de la aparición, mantenimiento y desaparición de los tipos de inmunoglobulinas



## 7. Respuesta inmune frente a bacterias

La inmunidad frente a bacterias depende de la estructura de la superficie bacteriana y de los mecanismos por los que inducen su patogenicidad. Para destruir la membrana de las bacterias Gram positivas, el mecanismo más eficaz es la fagocitosis, y para las Gram negativas, micobacterias y espiroquetas, la citotoxicidad mediada por células junto con la activación del complemento. Frente a las toxinas bacterianas los anticuerpos son tremendamente útiles, mientras que para neutralizar y destruir la bacteria, la citotoxicidad es el procedimiento más eficaz.

### 7.1. Respuesta innata

Cuando la bacteria supera las barreras físico-químicas se produce la activación del complemento por la vía alternativa, con el depósito de C3b en la superficie bacteriana, lo que promueve su opsonización por PMN, que también liberan lactoferrina, que capta el hierro del ambiente, reduciendo así el disponible para la bacteria. Se activa la coagulación vascular y los depósitos de fibrina, para inhibir la

movilización bacteriana y se forma el fragmento C5 a partir del C3b, que es quimiotáctico para macrófagos. Finalmente, también se favorece la desgranulación de los mastocitos con la liberación de mediadores de la inflamación, que favorecen la llegada de más células inflamatorias a la zona. Los fagocitos atraídos al foco de infección se unen a las bacterias por varios mecanismos y se produce la fagocitosis, resultando en la muerte bacteriana.

Las bacterias pueden evitar el daño mediado por el complemento y los fagocitos mediante la presencia de cápsulas externas, mediante conformaciones estructurales que evitan que los receptores de los fagocitos se unan al complemento depositado sobre las mismas, mediante estructuras que evitan la unión del complemento, mediante enzimas que lo degradan, o secretando proteínas señuelo, que se unen al complemento y evitan su unión con la bacteria. En otros casos, como sucede en los procesos septicémicos, el exceso de bacterias puede desencadenar una sobreestimulación de la respuesta inmune, lo que permitirá la diseminación de la bacteria y un aumento de las lesiones en el hospedador.

## 7.2. Respuesta adquirida

En cuanto a la respuesta adquirida también existen diferencias en función del tipo de bacteria. Las bacterias intracelulares,

estimulan la producción de citocinas por cpAg que estimulan a los LTCD4<sup>+</sup> de tipo Th1, que a su vez estimulan los macrófagos. Las células infectadas por estas bacterias también estimulan a los linfocitos T citotóxicos que contribuirán a la eliminación del patógeno, bien actuando directamente sobre las células infectadas o produciendo mediadores que activarán los macrófagos. Las bacterias extracelulares y toxinas bacterianas determinan la producción de citocinas por las cpAg, que darán una respuesta de tipo Th2.

La actividad antibacteriana de los anticuerpos originados en la respuesta Th2, incluye varios efectos:

**1. Disminución de la capacidad de adherencia a la célula o tejido diana** por la presencia de anticuerpos frente a fimbrias, ácidos lipoteicóicos o cápsulas bacterianas.

**2. Inhibición de la proliferación de los microorganismos** al favorecer el daño mediado por el complemento a las bacterias Gram negativas y al bloquear funciones bacterianas vitales, como los anticuerpos frente a los mecanismos de captación y transporte de hierro.

**3. Promoción de fagocitosis** mediante anticuerpos que se unen a cápsulas o proteínas de membrana, opsonizándolas.

**4. Inhibición de la invasión tisular** mediante anticuerpos que neutralizan toxinas y factores que permiten la diseminación bacteriana.



# PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS



Durante las últimas décadas, el aumento de la población, junto con la creciente demanda de productos alimentarios, han provocado cambios sustanciales en el sector porcino, surgiendo el concepto de producción intensiva, con el que se pretende aumentar el rendimiento mediante la reducción del tiempo de producción y los costes, lo que implica una serie de medidas de manejo que llevan asociadas un aumento del estrés en los animales. Todos estos factores, unidos a la mejora sanitaria de las explotaciones, con un menor contacto con los agentes microbianos, han comprometido el estado inmunitario de los animales, dando lugar a la aparición de enfermedades emergentes, por lo general debidas a microorganismos considerados hasta entonces oportunistas comensales, como es el caso de *H. parasuis*.

Desde el año 1910, en el que Glässer describió por primera vez esta enfermedad, ha sido diagnosticada prácticamente en todo el mundo (Rapp-Gabrielson y cols., 1992; Blackhall y Pahoff, 1995; Rubies y cols., 1999) y se ha puesto en evidencia la existencia de gran cantidad de animales portadores nasales (Segalés, 1996; Rodríguez Ferri y cols., 2001), así como un elevado porcentaje de cerdos seropositivos (Moller, 1993). Los estudios de inmunidad realizados con bacterinas han puesto de manifiesto una protección homóloga adecuada, mientras que la protección heteróloga obtenida ha sido parcial o nula (Rapp-Gabrielson y cols., 1997; Takahashi y cols., 2001; Back y Riising, 2002). Esto plantea un problema importante, debido a la gran variabilidad serológica encontrada entre las distintas cepas de la bacteria, muchas de las cuales no se pueden tipificar por los métodos

rutinarios (Kielstein y Rapp- Gabrielson, 1992; Oliveira y cols., 2003; Olvera y cols., 2006). Como estrategia alternativa de inmunización, se ha planteado la colonización nasal con cepas sistémicas; sin embargo, su eficacia depende de muchos factores como, por ejemplo el estado sanitario de las granjas o las prácticas de manejo (Oliveira y cols., 2001).

Los trabajos realizados en nuestro laboratorio sobre los mecanismos de captación de hierro (en concreto, sobre las proteínas de unión a la transferrina porcina) han abierto líneas de investigación interesantes en relación con la utilización de estas proteínas como posibles candidatos vacunales, ya que se trata de moléculas muy conservadas entre los distintos serotipos, presentan una situación extracelular de fácil acceso para sistema inmune del hospedador y además resultan esenciales para la supervivencia bacteriana (del Río, 2004).

En este contexto surge el planteamiento de esta Tesis Doctoral, considerando la importancia de la búsqueda de nuevas estrategias de inmunización, y del esclarecimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad, en concreto, de la respuesta inmune del hospedador, un tema en el que apenas se ha profundizado hasta la fecha con la excepción de algunas menciones acerca de la existencia de inmunidad humoral (Minitats y cols., 1991; Nielsen 1993; Segalés, 1996; Solano-Aguilar y cols., 1999; Takahaschi y cols., 2001), lo que supone una gran desventaja a la hora de desarrollar protocolos eficaces para el control y prevención de esta enfermedad.

## **Objetivos**

- Puesta a punto de un modelo animal adecuado para el desarrollo de la enfermedad, que permita el estudio de la patogenia y la respuesta inmune.
- Desarrollo de nuevas estrategias de inmunización para el control de la enfermedad, y potenciación de la eficacia de las ya existentes.
- Estudio de la respuesta humoral frente a la inmunización y frente a la infección con una dosis letal de la bacteria.
- Análisis del efecto de la inmunización y la infección sobre las poblaciones leucocitarias sanguíneas.
- Caracterización de la respuesta de fase aguda tras la infección y valoración de la influencia de inmunización previa sobre su desarrollo.
- Estudio de la expresión de citocinas en respuesta a la infección en órganos diana para la bacteria o en aquellos en los que tiene lugar el desarrollo de la inmunidad.
- Valoración de la capacidad de la bacteria y sus antígenos de inducir una proliferación leucocitaria en ausencia de inmunidad previa.



# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. Cepas bacterianas

Tabla 9. Relación de cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Espece y cepa	Descripción	Procedencia
<i>Haemophilus parasuis</i> Cepa Nagasaki.	Serotipo 5 Referencia	Colección. Dpt. Sanidad Animal. Universidad de León.
<i>Haemophilus parasuis</i> Cepa 19 M-2.	Serotipo 2. Clínica	Colección. Dpt. Sanidad Animal. Universidad de León.
<i>Haemophilus parasuis</i> Cepa 19 M-3.	Serotipo 2 Clínica.	Colección. Dpt. Sanidad Animal. Universidad de León.
<i>Haemophilus parasuis</i> Cepa 13253.	Serotipo 2 Clínica	Colección. Dpt. Sanidad Animal. Universidad de León..
<i>Haemophilus parasuis</i> Cepa 12605.	Serotipo 2. Clínica.	Colección. Dpt. Sanidad Animal. Universidad de León.
<i>Haemophilus parasuis</i> Cepa 13 Pericardio-1.	Serotipo 4 Clínica.	Colección. Dpt. Sanidad Animal. Universidad de León.
<i>Haemophilus parasuis</i> Cepa 12689.	Serotipo 4 Clínica.	Colección. Dpt. Sanidad Animal. Universidad de León.
<i>Haemophilus parasuis</i> Cepa 12287.	Serotipo 4 Clínica.	Colección. Dpt. Sanidad Animal. Universidad de León
<i>Haemophilus parasuis</i> Cepa 12540.	Serotipo 4 Clínica.	Colección. Dpt. Sanidad Animal. Universidad de León.
<i>Haemophilus parasuis</i> Cepa 11261.	Serotipo 5 Clínica.	Colección. Dpt. Sanidad Animal. Universidad de León.
<i>Haemophilus parasuis</i> Cepa 11781.	Serotipo 5 Clínica.	Colección. Dpt. Sanidad Animal. Universidad de León

## 2. Medios de cultivo

En este apartado se describen los diferentes medios de cultivos bacterianos y celulares.

### 2.1. Bacterianos

#### 2.1.1. Agar chocolate (BioMérieux)

Se utilizaron placas de ágar chocolate enriquecidas con Polyvitex<sup>®</sup>, cuya fórmula, por litro de agua, además del enriquecimiento mencionado, contiene:

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

#### 2.1.2. Caldo Columbia (Difco)

Contiene, por litro de agua, los siguientes componentes:

➤ Peptona	10 g
➤ Biopeptona	10 g
➤ Extracto de corazón de ternera	3 g
➤ NaCl	5 g
➤ Tris HCl 2 M (Sigma)	86 g
➤ Tris amino metano	0,83 g
➤ Carbonato sódico	0,6g
➤ L-Cisteína dihidroclorada	0,1 g
➤ Sulfato de Magnesio	0,1 g
➤ Sulfato ferroso	0,02 g

El caldo se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante, disolviendo 35 g en 1 l de agua bidestilada. La disolución se esterilizó en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### 2.1.3. Agar Sangre (BioMérieux)

Contiene agar columbia suplementado con un 5% de sangre de cordero.

#### 2.1.4. Medio Actino

La composición del medio es la siguiente:

➤ Extracto de carne	10 g
➤ Extracto de levadura	10 g
➤ Peptona bacteriológica	5 g
➤ NaCl	5 g
➤ Infusión cerebro-corazón	1,25g
➤ Agua bidestilada	1l

Se disolvieron todos los componentes en agua bidestilada y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Una vez atemperado (aproximadamente a 50 °C) se añadieron 5 ml de Glucosa al 50% y 1 ml de NAD (20mg/ml).

#### 2.1.5. Caldo de Triptona y soja (TSB, Biolife)

Contiene, por litro de agua, los siguientes componentes

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



Se preparó según las instrucciones del fabricante, se pesaron 30 g de la mezcla comercial y se disolvieron en un litro de agua bidestilada. Se esterilizó en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

#### 2.1.6. Caldo de tioglicolato (FTM, “fluid thioglycollate medium”)

- Triptona 15 g
- Extracto de levadura 5 g
- Tioglicolato sódico 0,5 g
- L Cisterna clorhidrato 0,5 g
- Glucosa 5,5g
- NaCl 2,5 g
- Resazurina 0,001g

Se mezcló la L-Cisteína, con el cloruro sódico, el extracto de levadura, la glucosa y la triptona y se añadió un litro de agua. La mezcla se disolvió por agitación en calor y se ajustó a pH 7,1. Finalmente se añadió la resazurina y se autoclavó 15 minutos a 121°C.

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

Contiene, por litro, los reactivos que se detallan a continuación:

- Triptona 10 g
- NaCl 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- Agua destilada 1 l.

Para preparar el medio sólido, se añadieron 15 g de agar. El pH final se ajustó a 7,3 y la esterilización se llevó a cabo en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

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

Se preparó añadiendo por litro, los siguientes reactivos:

- Extracto de corazón de ternera 5 g
- Triptona 10 g
- NaCl 5 g

En el caso del medio sólido, se añadieron 15 gramos de agar. El pH final se ajustó a 7.6. Se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

## 2.2. Celulares

### 2.2.1. Medio cultivo

Contiene, por litro, los reactivos que se detallan a continuación.

- RPMI 1640 (Invitrogen) 500 ml
- Tampón HEPES 200Mm (Merck) 10 ml
- Penicilina 220 UI/ml (Sigma) 5ml
- L-glutamina 2Mm (Sigma) 5ml
- Suero bovino fetal sin complemento 50 ml
- 2-mercaptoetanol ( $5 \times 10^{-5}$  M) 250  $\mu$ l

El medio se preparó en cabina de flujo laminar, mezclando los cuatro primeros componentes y se conservó hasta su uso a 4 °C, momento en el cual se añadieron el suero bovino fetal y el 2-mercaptoetanol.

### 2.2.2. Medio de congelación

Contiene, por litro, los reactivos que se detallan a continuación:

- DMSO (Sigma) 100 ml
- Suero fetal bovino sin complemento 900 ml

El medio se preparó en cabina de flujo laminar y para su esterilización se filtró con filtros de 0,22 µm (Millipore).

## 3. Soluciones de antibióticos y suplementos

### 3.1. Ampicilina

Se preparó una solución stock a una concentración de 100 mg/ml de ampicilina (Sigma) en agua. Se esterilizó por filtración y se conservó a -20°C.

### 3.2. Isovitalex

Contiene, por litro, los reactivos que se detallan a continuación:

- L-Glutamina (Sigma) 1 g
- L-Cisteína dihidroclorada (Sigma) 26 g
- L-Cistina dihidroclorada (Sigma) 1 g
- NAD en 10% de Glucosa Monohidrato 1 g

Se esterilizó por filtración y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -20°C.

### 3.3 Glucosa

La solución stock se preparó a una concentración del 50% (p/v) de glucosa (Sigma) en agua bidestilada. Se esterilizó por filtración y se conservó a 4°C.

### 3.4. NAD

Se preparó a una concentración de 20 mg/ml. Se esterilizó con filtros de 0,22 µm y se conservó en viales de 1 ml a -20°C.

## 4. Productos y reactivos

### 4.1. Inactivación bacteriana

#### 4.1.1. Formol

Se utilizó formaldehído comercial (Sigma) con una pureza del 90%

#### 4.1.2. Thimerosal

Se preparó una solución stock de thimerosal (Sigma) al 1% (p/ v), se filtró y se almacenó a 4°C hasta su uso.

### 4.2. Extracción de sobrenadantes con proteínas de membrana externa enriquecidos en TbpB

#### 4.2.1. Solución de 2,2 Dipiridilo (Sigma)

Se preparó una solución stock a una concentración de 0,1 M en etanol (Panreac) y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -20°C.

#### 4.2.2. Deoxicolato Sódico (Sigma)

Se preparó una solución stock de Deoxicolato Sódico (Sigma) a una concentración del 1% en agua bidestilada y se esterilizó por filtración.

#### 4.2.3. Tris HCl 1M, pH 8

Se disolvieron 121,1 gramos de Trizma<sup>®</sup> base (Sigma) en 800 ml de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 8 y se añadió agua hasta alcanzar un volumen final de 1 litro.

#### 4.2.4. Cloruro sódico (5M)

Se preparó disolviendo 29,22 g de cloruro sódico (Sigma) en 100 ml de agua bidestilada.

### 4.3. Precipitación de proteínas con ácido-tricloroacético (TCA)

Se utilizó TCA (Sigma), con una pureza del 100%, para la precipitación proteica, y acetona (Sigma) para realización de los lavados de las proteínas después de su precipitación.

### 4.4. Proteína de fusión (PBAD-Thio-TbpB-V5-His)

#### 4.4.1. Arabinosa

Se preparó una solución al 20%, con 20 g de arabinosa en 100 ml de agua destilada.

#### 4.4.2. Tampón de lisis

Se preparó añadiendo:

➤ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M (Sigma)	0,3 ml
➤ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M (Sigma)	4,7 ml
➤ NaCl 400 mM (Sigma)	2,3 g
➤ KCl 100Mm (Sigma)	0,75 g
➤ Triton X-100 al 0,5% (Sigma)	0,5ml
➤ Imidazol 10 mM (Sigma)	68 mg
➤ Glicerol al 10% (Sigma)	10 ml
➤ Inhibidor de proteasas (Sigma)	1ml
➤ Agua destilada	Hasta 100ml

#### 4.4.3. Tampón de unión y lavado

Su composición es la siguiente:

➤ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,0, 50 Mm (Sigma)	0,006g
➤ NaCl 0,3 M (Sigma)	0,17 g
➤ Imidazol 10 mM (Sigma)	0,007g
➤ Agua destilada	10 ml

#### 4.4.4. Tampón de elución

Se preparó añadiendo:

➤ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8, 0,50 mM	0,06 g
➤ NaCl 0,3 M (Sigma)	0,17g
➤ Imidazol 250 mM (Sigma)	0,007g
➤ Agua destilada	10ml

### 4.5. Valoración de la concentración de proteína total (Método de Bradford 1976)

Se empleó un reactivo que contiene azul de Comassie, metanol y ácido fosfórico (*Dye reagent concentrate*, Biorad). Está basado 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, hace que su

absorbancia vire de 465 a 595 nm. Para realizar los estándares, con concentraciones conocidas de proteína, se empleo albúmina sérica bovina (Sigma).

#### 4.6. SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico)

Se utilizaron geles de poliacrilamida (solución al 29% de arcilamida + 1% de bisacrilamida, Sigma), a una concentración del 5% en el gel concentrador, y del 12% en el gel separador. A continuación se detallan los productos empleados en la preparación de los geles y tampones necesarios para la electroforesis:

##### 4.6.1. Gel separador

- Agua bidestilada 3 ml
- Trizma<sup>®</sup> base, pH 8,8  
1,5 M (Sigma) 2,5 ml
- SDS al 10% (Panreac) 100 µl
- Solución de Acrilamida/  
Bisacrilamida (Sigma) 4 ml
- Persulfato amónico 10%  
(Sigma) 100 µl
- TEMED (Sigma) 4 µl

##### 4.6.2. Gel concentrador (5%)

- Agua bidestilada 1,4 ml
- Trizma<sup>®</sup> base, pH 6,8, 0,5 M  
(Sigma) 0,3 ml
- SDS al 10% ( Panreac) 20 µl
- Solución de Acrilamida /  
bisacrilamida (Sigma) 0,6 ml
- Persulfato amónico al 10% 20 µl

- TEMED (Sigma) 2 µl

##### 4.6.3. Tampón de electroforesis (5x)

- Trizma<sup>®</sup> base, 25 mM (Sigma) 15 g
- Glicina, pH 8,3, 192mM (Sigma) 72 g
- SDS al 0,1 % (Sigma) 5 g
- Agua destilada 1 l

Para la realización de la electroforesis se diluyeron 300 ml del tampón de carga 5x en 1,2 l de agua destilada. Se conservó a 4°C.

##### 4.6.4. Tampón de carga de proteínas

- Trizma<sup>®</sup> base (Sigma) 0,6 g
- SDS (Panreac) 1 g
- Azul de bromofenol (Sigma) 5 g
- Agua destilada 100 ml

#### 4.7. Tinción con azul de Comassie

##### 4.7.1. Tinción de geles de poliacrilamida

Se empleó un método comercial (*Comassie Brilliant Blue R-250 staining solution kit*, Biorad) que contenía la solución de teñido y desteñido, ya preparadas para su uso.

##### 4.7.2. Tinción de geles de agarosa al 1%.

###### 4.7.2.1. Solución de teñido

Para preparar 1 litro de la solución se necesitaron:

- Azul de Coomasie (Sigma) 0,5g

- 45% de Metanol (Sigma) 45 ml
- 6% de Ácido Acético Glacial (Sigma) 60 ml
- Agua destilada hasta 1 l

#### 4.7.2.2. Solución de desteñido

Se preparó 1 l de la solución que contenía:

- 25% de Metanol (Sigma) 250 ml
- 10% de Ácido Acético Glacial (Sigma) 100 ml
- 2% de Glicerol (Sigma) 20 ml
- Agua destilada hasta 1 l

### 4.8. Inmunobloting

#### 4.8.1. Tampón de transferencia

Estaba compuesto por los siguientes productos:

- Tris HCl, pH 9,2 48mM
- SDS (Panreac) 1,3mM
- Glicina (Sigma) 39mM
- Metanol (Sigma) 20%

#### 4.8.2. Tampón TBS

Se preparó un litro de solución a una concentración de 25 mM, con los siguientes reactivos:

- NaCl (Sigma) 8 g
- KCl (Sigma) 0,2 g
- Trizma<sup>®</sup> base (Sigma) 3g
- Agua destilada 800 ml

El pH se ajustó a 8 con una solución de HCl 2M y se enrasó con agua destilada hasta 1

litro. Para su esterilización se autoclavó durante 15 minutos a 121 °C.

#### 4.8.3. Tampón de bloqueo

Se preparó una disolución al 10% (p/v) de leche descremada en agua que contenía:

- Leche descremada (Pronadisa) 10 g
- Agua destilada 100 ml

#### 4.8.4. Tampón TBS-Tween 20 (TTBS)

Al tampón TBS se le añadió un 0,05% de Tween 20 (Sigma).

### 4.9. Obtención y conservación de leucocitos sanguíneos

#### 4.9.1. Dextrano

Se preparó una solución de dextrano (Amhersham) al 6% en tampón fosfato (PBS) de pH 7,2-7,4 (Gibco, Invitrogen); sin calcio ni magnesio.

#### 4.9.2. Tampón fosfato (PBS) con suero bovino fetal

La solución preparada contenía PBS sin calcio ni magnesio, de pH 7,2-7,4, con suero bovino fetal estéril (Gibco, Invitrogen), sin complemento y al 2% (v/v).

#### 4.9.3. RPMI con EDTA

Se preparó una solución de EDTA 2,5 mM en RPMI 10%. Se partió de una solución

stock de EDTA 200 mM (Sigma) y se añadieron 625 µl de la misma y el resto, hasta 50 ml, de RPMI al 10% (Gibco, Invitrogen).

#### 4.9.4. Solución de Percoll®

Se empleó un gradiente de Percoll® al 62,5%. Para su preparación se añadieron 9 partes (v/v) de Percoll (Amherham) por 1 parte de solución de Hanks 10x (Sigma). Una vez realizado el gradiente, se diluyeron 62,5 ml del mismo con 37,5 ml de PBS con suero bovino fetal, hasta alcanzar la concentración final del 62,5%.

#### 4.9.5. Tinción con azul de tripán

Se empleó el azul de tripán a una concentración del 0,4% (Sigma). Para la tinción de las células se diluyeron diez veces en el colorante y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos.

### 4.10. Extracción y cuantificación del RNA

#### 4.10.1. Etanol 70%

Se preparó una dilución de etanol absoluto (Panreac) que contenía por litro 700 ml de etanol y 300 ml de agua libre de RNAsas y DNAsas (Sigma).

#### 4.10.2. Tris H-Cl 10mM

Se añadieron 12,1 g de Trizma® base (Sigma) que se disolvieron en 800 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7,8 y se añadió agua hasta alcanzar un volumen final de 1 litro.

#### 4.10.3. Tampón MOPS 10x (Eppendorf)

La composición del tampón es la siguiente:

➤ MOPS	200mM
➤ Acetato de sodio	0,2 g
➤ EDTA, pH 8	10 mM

#### 4.10.4. Gel desnaturante de agarosa para el RNA

Para la preparación de un gel con unas dimensiones de 10x 14 x 0,7 cm, se mezclaron 1,2 gramos de agarosa con 10 ml de tampón MOPS 10x (Eppendorf), y se ajustó hasta un volumen final de 100 ml, añadiendo agua libre de RNAsas. Se calentó la mezcla en un microondas hasta que la agarosa se diluyó completamente, después se dejó enfriar hasta una temperatura de 60°C y finalmente se añadieron 1,8 ml de formaldehído al 37% (Panreac) y 1µl de bromuro de etidio (Biorad) a una concentración de 10 mg/ml.

Antes de utilizarlo se mantuvo durante 30 minutos sumergido en tampón MOPS 1x para su equilibrado.

#### 4.10.5. Tampón de carga del ARN (Eppendorf)

El tampón comercial presentaba la siguiente composición:

➤ Solución acuosa saturada de azul de bromofenol	16 µl
➤ EDTA (0,5M), pH 8	80 µl
➤ Formaldehído al 37%	720 µl
➤ Glicerol al100%	2ml
➤ Formamida	3 ml

- MOPS Buffer 10x 4ml
- Agua libre de RNAsas Hasta 10 ml

## 4.11. ELISA

### 4.11.1. Tampón fosfato (PBS)

Su composición por litro es la siguiente:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma) 1,15 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma) 0,2 g
- NaCl 8,18 g
- KCl 0,2 g

Se disolvieron las cuatro sales en 800 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7,2-7,4 y se enrasó hasta un volumen final de 1 l.

### 4.11.2. Tampón carbonato

Se preparó mezclando los siguientes productos:

- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Sigma) 3,18g
- $\text{NaHCO}_3$  (Sigma) 5,86 g
- $\text{NaN}_3$  (Sigma) 0,4 g

Se añadieron 100 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 9,6 con HCl 1M y se añadió agua hasta que el volumen final fuera de 200 ml.

### 4.11.3. Tampón de lavado

Se preparó añadiendo al tampón fosfato Tween-20 (Sigma) a una concentración del 0,05%.

### 4.11.4. Tampón de bloqueo

Está compuesto por tampón de lavado y suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen) a una concentración del 5%.

### 4.11.5. Tampón de dilución del conjugado

Se preparó añadiendo al tampón de lavado un 0,1% de albúmina bovina (Sigma).

### 4.11.6. Sustrato TMB (3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina)

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

### 4.11.7. Isotiocianato de amonio 4M

Se pesaron 30,5 g de isotiocianato de amonio (Sigma) y se disolvieron en 100 ml de agua bidestilada.

## 4.12. Inmunofluorescencia indirecta

### 4.12.1. Tampón FACS

Está compuesto por PBS sin Calcio ni Magnesio (Gibco, Invitrogen), con un 0,01% de BSA (Sigma) y un 0,01% de azida sódica.

### 4.12.2. Tampón FACS fijador

La composición era similar a la del tampón FACS, con la adición de

paraformaldehído (Sigma) hasta una concentración final del 0,1%.

#### 4.13. Electroforesis en gel de agarosa

##### 4.13.1. Tampón de carga ADN (6x)

Se compone de:

- Azul de bromofenol al 0,25% 0,25 g
- Xilencioanol al 0,25% 0,25 g
- Sacarosa al 40% 40 g
- Agua libre de DNasa 100 ml

Todos los productos utilizados proceden de Sigma.

##### 4.13.2. Tampón Tris-Borato-EDTA 5x (TBE)

Contiene los siguientes reactivos:

- Trizma<sup>®</sup> base (Sigma) 54 g
- Ácido bórico (Sigma) 27,5 g
- EDTA 0,5 M, pH 8 2 ml
- Agua destilada hasta 1l

Se utilizó a una concentración del 1x, por lo que se diluyó cinco veces en el momento de su uso.

Todos los reactivos para la electroforesis se conservaron a 4°C hasta su posterior uso.

#### 5. Laboratorios e instalaciones utilizadas

Los trabajos experimentales se llevaron a cabo en las dependencias de la Unidad de Microbiología e Inmunología del Departamento Sanidad Animal (Facultad de Veterinaria, Universidad de León). Los

ensayos con ratones y cobayas se realizaron en el Animalario, los análisis por citometría de flujo en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales y el estudio anatomopatológico en la Unidad de Citología y Anatomía Patológica e Histología (Departamento de Sanidad Animal), siempre en la Universidad de León. Las pruebas de inmunización e infección de los cerdos privados de calostro y de los cerdos criados de forma natural se desarrollaron en una unidad aislada, instalada en una granja experimental dependiente de Laboratorios SYVA S.A. El estudio de la respuesta de fase aguda se realizó en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza). Por último, los análisis de la respuesta inmune *in vitro* se llevaron a cabo en el Departamento de Biología Molecular y Virología, del *Biomedical Center*, Uppsala, Suecia.

#### 6. Animales

##### 6.1. Ratones

Se emplearon ratones hembra NMRI, de 12 y 17 g, que permanecieron en grupos de 6 animales en jaulas aisladas, en las instalaciones del animalario de la Universidad de León, con comida y bebida *ad-libitum*.

##### 6.2. Cobayas

Se emplearon cobayas albinos de pelo corto, de 300-500 g que se mantuvieron en jaulas aisladas con bebida y alimento *ad-libitum*.



### 6.3. Cerdos

#### 6.3.1. Cerdos convencionales, criados en forma natural

Se utilizaron cerdos de raza (*Large White-Landrace*), de 5 a 6 semanas de edad y con un peso entre 20 y 30 kg, procedentes de una granja situada en Cimanes de la Vega, en la provincia de León. La explotación carecía de antecedentes de enfermedades respiratorias y habitualmente había sido utilizada como suministradora de animales en experiencias previas.

#### 6.3.2. Cerdos privados de calostro

Se utilizaron cerdos de 6 semanas de edad, nacidos de madres (*Large White-Landrace*) procedentes de una granja situada en Recas (Toledo), que fueron trasladadas a León, en el último mes de gestación. Se indujeron los partos mediante la administración de prostaglandinas (Planate, Schering-Plough) y se inyectó oxitocina (Boehringer Ingelheim) una vez nacido el primer lechón, para controlar la velocidad del parto. Se extrajeron los lechones evitando cualquier contacto con la madre. Estos lechones se trasladaron a las instalaciones aisladas de la granja donde se iba a llevar a cabo el estudio experimental, donde se lavaron con etanol al 70% para evitar futuras infecciones por coronavirus y rotavirus; se cortaron y desinfectaron los cordones umbilicales y se les administró gentamicina (Gentavetina, Schering-Plough) durante una semana y una única dosis hierro dextrano (Calidex 100, Calier) por vía intramuscular. Durante los cinco primeros días fueron alimentados con calostro bovino *ad-libitum*,

cada 3 horas, por medio de un biberón y entre cada toma se les suministró un rehidratante, vía oral (Biodiet 50, Pfizer).

Además, la aparición de animales con diarrea y el aislamiento de *E. coli* en las heces a partir del tercer día, obligó a la administración de una dieta a base de Glucosal (Divasa-Farmavic) y calostro diluido (en los casos más graves se administró únicamente Glucosal durante las primeras 24 horas), junto con el tratamiento de todos los animales con florfenicol (Nuflor, Schering-Plough), por vía intramuscular, durante 10 días. La diarrea fue remitiendo progresivamente y el día 8º se empezó a suprimir el Glucosal.

La alimentación se suplementó con una papilla preparada con Kwickstart (SCA Ibérica). La proporción de agua de la papilla y el contenido de calostro de cada ración se fueron reduciendo progresivamente. Los animales más pequeños presentaron problemas para aceptar el cambio de alimentación, lo que determinó una disminución en su peso. La situación se fue agravando y entre los días 11 y 12, se observó la presencia de animales con síntomas de desnutrición, caquexia, apatía y postración. Ante ello, se les administró un complejo vitamínico (Duphalyte, Fort-Dodge) por vía oral y en los casos más graves también por vía subcutánea.

A los 15 días, los intervalos entre cada toma se ampliaron a 4 horas y comenzó a utilizarse un segundo reemplazante lácteo a modo de papilla (Startrite 100, SCA Ibérica), mezclado inicialmente con el Kwickstart. De nuevo, el porcentaje de agua de la ración se fue reduciendo paulatinamente hasta que la alimentación fue prácticamente sólida. Para

favorecer la aceptación de este tipo de alimentación, se proporcionaba a los animales platos con pienso seco en las salas durante toda la noche.

En los días siguientes se empezaron a producir bajas entre los animales que no habían tolerado el cambio de ración y el día 22 aparecieron nuevos brotes de diarrea. Se aisló de nuevo *E. coli* y en este caso se administró amoxicilina y ácido clavulánico con el agua de bebida durante 6 días, junto con el rehidratante oral. Los episodios diarreicos fueron desapareciendo y a los 30 días se les suministró un pienso para animales en crecimiento (INZA, España), mezclándolo inicialmente con Startrite. A los 40 días, todos los animales comían pienso seco, por lo que se empezó a emplear un segundo pienso en crecimiento (INZA, España), hasta que los animales alcanzaron el peso apropiado (25-35 kg) para iniciar los experimentos de infección y vacunación, momento en que se les administró un pienso de mantenimiento (Lab. SYVA, S.A.).

## 7. Protocolo de infección de ratones

Todas las pruebas se realizaron por duplicado, en dos semanas consecutivas.

### 7.1. Cálculo de la $DL_{50}$

#### 7.1.1. Cultivo y crecimiento bacteriano

Se utilizó el serotipo 5 de referencia de *Haemophilus parasuis*. A partir de un vial congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se inocularon 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana en placas en agar chocolate y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , en atmósfera

microaerófila (5% de  $\text{CO}_2$ ), durante 24-48 horas. Los cultivos se resuspendieron en RPMI sin glutamina (GIBCO, Invitrogen) hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nanómetros ( $DO_{600}$ ) superior o igual a 2. Se mantuvieron a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### 7.1.2. Recuento de UFC (Unidades formadoras de colonias)

A partir de la suspensión bacteriana anterior, se realizaron diluciones decimales en RPMI. Con cada una de las diluciones se realizaron medidas de la  $DO_{600}$  y se sembraron 100  $\mu\text{l}$  de las mismas en placas de agar chocolate, incubándose durante 48 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera microaerófila (5% de  $\text{CO}_2$ ). Una vez finalizado el proceso de incubación, se llevó a cabo el recuento en cada una de las diluciones decimales (sólo se consideraron como representativas las placas con un número de colonias entre 40 y 100) para calcular las UFC/ml de la suspensión inicial.

#### 7.1.3. Inoculación de los ratones

Se utilizaron dos vías para la inoculación: la intranasal y la intraperitoneal. En ambos casos se establecieron 8 grupos de 6 ratones cada uno, siete de los cuales fueron inoculados con distintas dosis de la bacteria mientras que el grupo restante se mantuvo como control y fue inoculado con RPMI estéril. Las concentraciones bacterianas que se utilizaron para las inoculaciones fueron  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^8$  y  $2 \times 10^9$  UFC. Antes de la inoculación, los ratones se anestesiaron mediante la inhalación de

isofluorano (Forano®, Abbott Laboratorios, S.A.) en una campana de vidrio.

Mediante la vía intranasal se introdujeron 50 µl de la suspensión bacteriana en forma de pequeñas gotas en las fosas nasales, aprovechando el movimiento de inspiración. Para la inoculación en la cavidad peritoneal, se dispuso al ratón en posición vertical, con la cabeza inclinada hacia abajo, y se inocularon 200 µl con jeringa estéril de tipo insulina.

Los animales fueron observados durante cinco días, anotándose los cambios en su comportamiento, en su conducta alimentaria, así como cualquier otro síntoma indicativo de enfermedad. Tanto a los animales que murieron durante el transcurso de la prueba, como a los que se sacrificaron al finalizar la misma, se les realizó la necropsia y se les extrajo el pulmón y el bazo para su análisis microbiológico. Éste consistió en una siembra en agar chocolate y en agar sangre con una estria nodriza de un estafilococo productor de NAD, imprescindible para el crecimiento de *H. parasuis*.

#### 7.1.4. Cálculo de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>)

Se empleó el método de Reed y Munch (1938). Cinco días después de la inoculación, se llevó a cabo el recuento del número de animales vivos y muertos, y se estableció el porcentaje de mortalidad para cada vía de inoculación, con cada una de las dosis bacterianas empleadas. La DL<sub>50</sub> se calculó aplicando las siguientes fórmulas:

$\log(1/DL_{50}) = \log(1/\% \text{mortalidad superior al } 50\%) + Df \log(\text{diferencia de log}).$

$Df \log = [ (\% \text{ mortalidad superior al } 50\% - 50\%) / (\% \text{ mortalidad superior al } 50\% - \% \text{ mortalidad inferior al } 50\%) ] \times \log \text{ del factor de dilución}$

## 7.2. Pruebas de colonización y supervivencia bacteriana

Se inocularon los ratones por vía intranasal con 50 µl de una suspensión bacteriana que contenía  $2 \times 10^9$  UFC. A las 4, 6, 8, 12 y 24 horas post-infección, se sacrificaron grupos de tres ratones, y se recogió el bazo y el pulmón de cada uno de ellos. Estas vísceras se maceraron en RPMI, se centrifugaron durante 5 minutos a 200 x.g. y se tomaron 100 µl del sobrenadante; con este volumen se sembraron placas de agar chocolate, que se incubaron durante 36-48 horas a 37 °C, en atmósfera microaerófila (5% de CO<sub>2</sub>). Transcurrido ese tiempo, se subcultivaron todas las colonias sospechosas en agar sangre con una estria de estafilococo productor de NAD.

## 8. Protocolo de infección de cobayas

Se empleó la cepa de referencia Nagasaki, del serotipo 5 de *H. parasuis*. El cultivo y el recuento de las UFC se realizaron de forma similar al descrito en el protocolo de infección para los ratones. Se realizaron dos ensayos: en el primero se emplearon las vías intranasal e intraperitoneal y en el segundo, además de estas dos vías, también se inoculó la bacteria en la cavidad torácica. Los animales se

anestesiaron con 200  $\mu$ l de ketamina (Clorketarn®, Vetoquinol), por vía intramuscular, para facilitar su manipulación.

### **8.1. Infección experimental de cobayas. Inoculación intranasal e intraperitoneal**

Para cada una de las vías se utilizaron 4 animales dispuestos en jaulas individuales, tres de los cuales fueron infectados con distintas dosis de *H. parasuis*:  $10^{10}$ ,  $10^9$  y  $10^8$  UFC. El cuarto animal se inoculó con el mismo volumen de RPMI que los anteriores pero sin las bacterias, actuando como control. La inoculación se realizó de forma similar a la descrita para los ratones, aunque el volumen empleado en la vía intranasal fue de 100  $\mu$ l y en la vía intraperitoneal, de 300  $\mu$ l. La duración de las infecciones experimentales fue de 5 días, durante los que se anotaron las incidencias ocurridas (cambios en el comportamiento, alteración de la temperatura corporal, falta de apetito...), inicialmente cada dos horas y, a partir del segundo día, cada 12 horas. Todos los animales fueron sacrificados con un eutanásico (T-61, Intervet) intracardiaco.

Se realizó la necropsia de todos los animales y para el análisis microbiológico, mediante siembra en agar sangre con estría nodriza de un estafilococo productor de NAD, se tomaron muestras de ganglios, pulmón, hígado, bazo, cerebro, corazón, sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido articular, líquido peritoneal y líquido de las cavidades torácica y pericárdica.

### **8.2. Infección experimental en cobayas. Inoculación vía intranasal, vía intraperitoneal y vía intratorácica**

Para cada una de las vías se emplearon 4 animales: dos animales fueron inoculados con una dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC, uno con  $1 \times 10^9$  UFC y el último (control de infección) se inoculó con el mismo volumen de RPMI estéril. Para la inoculación en la cavidad torácica, se introdujeron 200  $\mu$ l de la suspensión bacteriana entre dos costillas con ayuda de una aguja conectada a una jeringa, aspirando previamente para comprobar que no se había incidido en el pulmón. Al igual que en la prueba anterior, la infección experimental duró 5 días y también se anotaron las incidencias, inicialmente cada dos horas, y luego cada 24 horas. Se sacrificaron los animales mediante la administración intracardiaca de T-61 (Intervet) y se les practicó la necropsia tomando las mismas muestras que las descritas en el apartado 8.1 (pulmón, hígado, bazo, cerebro, corazón, sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido articular, líquido peritoneal y líquido de las cavidades torácica y pericárdica), para su análisis microbiológico.

## **9. Desarrollo de una bacterina frente a la enfermedad de Glässer**

Se realizó una selección de serotipos y cepas de *H. parasuis* que, de acuerdo con sus características de prevalencia, virulencia y crecimiento *in vitro*, fueran apropiadas para formar parte de una bacterina. Se analizó el proceso de inactivación bacteriana por agentes químicos, como el formol y el thimerosal, para establecer las condiciones de inactivación (concentración del inactivante, junto con el

tiempo y temperatura de inactivación) y finalmente se valoró si los procesos de inactivación podrían producir una alteración en la estructura de los antígenos, para elegir así el procedimiento más apropiado.

## 9.1. Antígenos. Selección de cepas bacterianas: pruebas de crecimiento

### 9.1.1. Curvas de crecimiento y cálculo del tiempo de generación

Se determinó incluir en la bacterina cepas de los serotipos 2, 4, y 5, puesto que son los más prevalentes en España (Rubies y cols, 1999) y además presentan una virulencia muy elevada (Rapp-Gabrielson y cols, 1992 y 1995). Para cada serotipo se seleccionó una de las cepas de mejor crecimiento. Estas cepas procedían de aislamientos de campo (Tabla 10), de los que había sido confirmada su adscripción a la especie mediante PCR con el gen *TbpA* (de la Puente y cols, 2001 y 2003).

Tabla 10. Cepas de *H. parasuis* utilizadas en el diseño de una bacterina.

Serotipo 2	Serotipo 4	Serotipo 5
19 M-2,	13 Pericardio-1	11261
19 M-3	12689	11781
13253	12287	12851
12605	12540	13167

El serotipo se estableció por medio de inmunodifusión radial y de hemaglutinación indirecta (del Río y cols., 2003).

### 9.1.1.1. Establecimiento de la densidad óptica a diferentes tiempos de incubación estática hasta alcanzar la fase logarítmica

A partir de viales congelados de cada una de las cepas se sembraron 50 µl de la suspensión bacteriana en placas de agar chocolate y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se recogió el crecimiento y se preparó un pre-*starter* en caldo Columbia, al que se había añadido previamente NAD (3 µl/ ml), que se incubó durante toda la noche a 37 °C en un agitador orbital. A partir del pre-*starter*, se realizó un segundo cultivo en caldo Columbia con NAD, que se incubó a 37°C, de forma estática, en una estufa, hasta alcanzar la fase logarítmica. Durante el proceso se determinó la densidad óptica del cultivo bacteriano a diferentes tiempos de incubación.

### 9.1.1.2. Establecimiento de la densidad óptica a diferentes tiempos de incubación dinámica.

La técnica empleada fue la misma que en el caso anterior, pero la incubación del segundo cultivo se realizó de forma dinámica en un agitador orbital. Únicamente se emplearon las cepas que alcanzaron las mayores densidades ópticas en la prueba anterior.

### 9.1.1.3. Realización de curvas de crecimiento y cálculo del tiempo de generación.

La técnica empleada fue la descrita en el apartado 9.1.1.2, pero se empleó como caldo de cultivo el medio ACTINO. Se determinó la

densidad óptica y se calculó el número de UFC a las 0, 2, 6, 9, 23 y 31 horas de incubación. Con los datos obtenidos se realizaron curvas de crecimiento que relacionaban el tiempo de incubación con la DO y el número de UFC. Los valores de UFC/ml se transformaron a logaritmos y se obtuvo la ecuación que relacionaba estos valores con el tiempo de incubación, para así poder extrapolar el tiempo de generación o tiempo que tarda un microorganismo en duplicar su población.

### 9.1.2. Cultivo bacteriano y recuento del número de UFC

Una vez seleccionadas las cepas, de cada una se sembraron tres placas de agar chocolate, tomando el inóculo de viales congelados a -80 °C. Se incubaron 48 horas a 37 °C y, transcurrido ese tiempo, se añadieron 3 ml de solución salina estéril (SSE) por placa para recoger el crecimiento bacteriano. Se midió la DO<sub>600</sub> de cada una de las suspensiones bacterianas obtenidas a partir del crecimiento de las tres placas y se ajustó a 1,4 -1,5. Para realizar el recuento del número de UFC, de cada una de las suspensiones se realizaron diluciones decimales y se sembraron 100 µl de las mismas en agar chocolate. Finalmente, se incubaron a 37 °C, en atmósfera microaerófila (5% de CO<sub>2</sub>), durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se contaron las colonias según lo explicado en el apartado 7.1.2.

## 9.2. Pruebas de inactivación de bacterias

Se eligieron el formol y el thimerosal debido a su interés industrial (ver apartados 4.1.1 y 4.1.2 de este capítulo). La acción de los

inactivantes origina que ciertas proteínas y estructuras bacterianas se degraden, disminuyendo su capacidad inmunógena. Por ello, es necesario buscar la mínima dosis con la que se consigue el efecto deseado, y elegir el inactivante que provoque un menor efecto degradante sobre los antígenos

### 9.2.1. Establecimiento de las condiciones de inactivación

#### 9.2.1.1. Formol

Las pruebas de inactivación se llevaron a cabo con la cepa de referencia del serotipo 5 de *H. parasuis*, combinando diferentes concentraciones del inactivante (5‰, 3‰, 1‰, 0,5‰, 0,25‰, 0,2‰, 0,15‰, 0,1‰, 0,05‰ y 0,025‰), con dos tiempos de inactivación (6 y 7 horas) y con dos temperaturas de incubación (37 °C y 40 °C).

Por cada cepa se sembraron 3 placas de agar chocolate y se incubaron a 37 °C durante 36 horas. Se recogió el crecimiento bacteriano añadiendo 3 ml de SSE por placa, se ajustó la DO<sub>600</sub> a un valor de 1,4 y se tomó una alícuota para el cálculo del número de UFC/ml. A continuación, se recogió 1 ml de la suspensión bacteriana, se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto y se eliminó un volumen de sobrenadante equivalente al que se añadiría de cada una de las concentraciones de formol en estudio, de forma que el volumen final se mantuviera en 1 ml y el número de UFC no sufriera modificación. Una vez añadidas las distintas concentraciones de formol, empezó el proceso de inactivación, que se realizó a ambas temperaturas, y tiempos. La eficacia de cada prueba se determinó mediante la siembra en

agar chocolate de una alícuota de la suspensión bacteriana, una vez finalizado el proceso de inactivación, para comprobar la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano.

Concluida la concentración óptima del inactivante, se procedió a fijar el tiempo exacto de inactivación, tomando muestras de la suspensión bacteriana a distintos tiempos durante la prueba de inactivación, que fueron posteriormente sembradas en agar chocolate para comprobar la presencia o ausencia de crecimiento. Todas las pruebas se realizaron por duplicado, y se repitieron como mínimo tres veces para asegurar su reproducibilidad.

#### 9.2.1.2. Thimerosal

Se emplearon las siguientes concentraciones de thimerosal: 0,1%, 0,02%, 0,01%, 0,005%, 0,002% y 0,001%. La temperatura de incubación fue de 37 °C y se probaron dos tiempos de inactivación: 6 y 7 horas. El protocolo utilizado fue el mismo que para la inactivación con formol: inicialmente, se trató de establecer una concentración mínima inhibitoria, incubando las suspensiones bacterianas con las distintas concentraciones de thimerosal durante 6 y 7 horas a 37 °C, y, una vez fijada ésta, se determinó el tiempo exacto necesario para la inactivación.

#### 9.2.2. Análisis de la degradación antigénica en procesos de inactivación

Se comparó el efecto degradante del formol y thimerosal en los antígenos bacterianos tras el proceso de inactivación (con la concentración, tiempo de inactivación y

temperatura de incubación establecidos en los ensayos anteriores para cada uno de los agentes inactivantes). Se tomó 1 ml de la suspensión de *H. parasuis* inactivado y se centrifugó a 11.000 x.g. durante 10 minutos, resuspendiéndose el pellet en agua destilada. Con la suspensión bacteriana obtenida, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) y los resultados se visualizaron tras la realización de un *immunoblotting* y una tinción con azul de Coomassie.

#### 9.2.2.1. Immunoblotting

Se empleó el equipo MINI-PROTEAN II™ de Biorad. Los reactivos utilizados se describen en el apartado 4.8.

##### 9.2.2.1.1. Electroforesis

La preparación de los geles de poliacrilamida y los reactivos empleados se han descrito en el apartado 4.6. Se añadió la misma concentración de proteína en todos los pocillos. Primero se preparó la mezcla con la que se obtendría el gel separador y se añadió entre dos vidrios de soporte. Cuando se produjo la polimerización, se añadieron los componentes del gel concentrador, colocando un peine para que definiera los pocillos de carga. Una vez que tuvo lugar la polimerización en el gel concentrador, el soporte se dispuso en la cubeta con el tampón de electroforesis.

Las muestras se incubaron 5 minutos con el tampón de carga (se añade ¼ del volumen total) a 100° C y se colocaron en el gel concentrador. A continuación, se aplicó un

voltaje de 50 V, hasta que todas las muestras se alinearon, y seguidamente un voltaje de 100-120 V hasta el final de la electroforesis.

#### 9.2.2.1.2 Transferencia a membranas de nitrocelulosa.

Se empleó el protocolo descrito por Pyle & Schill (1985) y Horejsi & Hilbert (1983). Una vez concluida la electroforesis, el gel se equilibró en tampón de transferencia durante 30 minutos, en agitación. A continuación se preparó el *sándwich* de transferencia, cuya composición desde la parte superior a la inferior es la siguiente:

- Cátodo de color negro
- Cuatro pliegos de papel de Whatman (Whatman, Internacional, LTD)
- Gel procedente de la electroforéisis
- Membrana de nitrocelulosa (Biorad)
- Cuatro pliegos de papel Whatman
- Anodo de color rojo

La transferencia se realizó durante 1 hora a 100 mV.

#### 9.2.2.1.3. Bloqueo de la membrana

Se sumergió la membrana en tampón TBS con un 5% de leche descremada (Pronadisa) y se incubó en agitación a 4 °C durante una noche o durante 2 horas a 37° C. Posteriormente se lavó tres veces en TTBS, durante 5 minutos.

#### 9.2.2.1.4. Incubación con el anticuerpo primario.

La membrana se incubó con un anticuerpo primario procedente del suero de un cerdo convaleciente infectado con la cepa Nagasaki del serotipo 5 de *Haemophilus parasuis*, a una dilución 1:1000. Como control negativo se utilizaron anticuerpos procedentes de cerdos no infectados.

Para comprobar el efecto de la degradación sobre la proteína TbpB, la membrana se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo obtenido frente a la proteína de fusión pGEX-6P-1-GST-TbpB, en una concentración 1:1000. Como control negativo se empleó un suero de conejo normal, no inmunizado.

En ambos casos, las incubaciones se llevaron a cabo en agitación a 37° C y tras las mismas, se lavaron las membranas con TTBS.

#### 9.2.2.1.5. Incubación con el anticuerpo secundario

Cuando el anticuerpo primario era de origen porcino, se añadía un antisuero de ratón frente a las IgG porcinas marcado con peroxidasa (HRP-mouse anti-pig IgG, Dako Cytomation), a una concentración 1:1000.

En el caso de los anticuerpos de conejo, el conjugado empleado fue un antisuero de cabra frente a las IgG de conejo (*anti rabbit-IgG* (H+L), Sigma), a una concentración de 1:1000.

Las dos incubaciones se realizaron a 37 °C durante 1 hora, en agitación y una vez finalizadas, la membrana se lavó otras tres veces en TTBS durante 5 minutos.



#### 9.2.2.1.6. Revelado de las membranas de nitrocelulosa

Se detectó la actividad peroxidasa mediante la adición de un sustrato quimioluminiscente (ECL-plus Western Blotting Detection System, Amhersam), compuesto por dos reactivos, A y B. Las membranas se incubaron durante dos minutos con la solución del sustrato quimioluminescente, y posteriormente se envolvieron en papel de plástico transparente. Se depositaron junto con una película fotográfica en un *cassette* de 24 x 18 cm, modelo RPN 1642 (Amhersham) y se expusieron en oscuridad durante 5-10 minutos. Las películas se revelaron mediante su inmersión en un revelador (Rodinal, AGFA) hasta que aparecieron las bandas, se lavaron en agua destilada, y se fijaron con Agefix (AGFA). Finalmente se lavaron con agua y se dejaron secar al aire.

#### 9.2.2.2. **Tinción con azul de Coomassie**

Se emplearon las mismas muestras y el mismo protocolo de electroforesis que en el apartado 9.2.2.2.1. Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la tinción del gel con el colorante azul de Coomassie (*Coomassie Brilliant blue R-250 staining solution kit*, Biorad). El gel se lavó tres veces, sumergiéndolo en 200 ml de agua destilada durante 5 minutos. Se retiró el agua, se añadieron 50 ml de colorante (*Stain solution*) y se incubó a temperatura ambiente en agitación durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se añadieron 50 ml de una solución decolorante (*Destain solution*) y se mantuvo en

agitación a temperatura ambiente durante 24 horas.

### 9.3. **Formulación vacunal**

Se estableció una dosis vacunal de 2 ml. La composición porcentual de la vacuna es la que se refleja en la tabla a continuación.

Tabla 11. Formulación vacunal

Componentes de las vacunas	Composición porcentual
Antígeno	X%
Adyuvante (Montanide)	20%
PBS	(X+20)-100 %.

#### 9.3.1. **Antígenos**

Se emplearon las tres cepas seleccionadas correspondientes a los serotipos 2, 4 y 5 y se inactivaron según los resultados obtenidos en las pruebas de inactivación bacteriana. Por dosis vacunal se estableció una concentración para cada una de las cepas de  $10^9$  UFC.

#### 9.3.2. **Adyuvante**

Se empleó un adyuvante oleoso, Montanide IMS 2215 (Seppic), en una proporción por dosis vacunal del 20%.

#### 9.3.3. **PBS**

Se empleó PBS estéril con un pH 7,2-7,4, como diluyente de los preparados antigénicos y

como componente adicional de la vacuna cuando la suma del volumen de los antígenos y los adyuvantes era inferior al de la dosis vacunal (2 ml).

#### 9.4. Elaboración de la vacuna

##### 9.4.1. Adición de los componentes

En un vaso de precipitado estéril, se añadía el PBS y a continuación el adyuvante, dejando la mezcla en agitación durante 20-30 minutos. Pasado este tiempo, se añadían los antígenos diluidos en PBS a la concentración establecida y se volvía a agitar otros 20-30 minutos hasta obtener una emulsión estable. En ese momento se ajustaba el pH a 7,1-7,3. Todos estos pasos se realizaban a temperatura ambiente. Finalmente, el preparado se mantuvo a 4 °C en agitación durante toda la noche.

##### 9.4.2. Envasado

Se realizó en frascos estériles cerrados con un tampón y una cápsula. Antes del envasado se realizó un último control para verificar que el pH permanecía entre 7,1 y 7,3.

##### 9.4.2. Control de esterilidad

Se realizó un control durante el preenvasado. Se tomó 1 ml de la emulsión con los antígenos, el adyuvante y el PBS y se cultivó en los caldos TSB y FTM. Dichos medios se incubaron respectivamente a 25 y 37 °C durante 14 días. Una vez envasada la vacuna, se llevó a cabo un nuevo control de esterilidad para cada uno de los viales, de igual forma que en el caso anterior.

## 10. Desarrollo de una vacuna con proteínas de membrana externa (TbpB) frente a la enfermedad de Glässer

Entre los factores de virulencia de *H. parasuis* se han descrito las proteínas de membrana externa (OMPs), entre las que se incluyen las proteínas de unión a transferrina como la TbpB (Rapp-Gabrielson y cols., 1992; Ruiz y cols., 2001). Son proteínas que por su situación externa son muy accesibles al sistema inmune; además, se ha puesto de manifiesto que presentan regiones muy conservadas. En el caso concreto de TbpB, su extremo carboxilo apenas presenta variabilidad genética (del Río, 2004). Todas estas características, junto con el hecho de que muchas de ellas son de gran importancia para la supervivencia de la bacteria dentro del hospedador, hacen que se les considere buenas candidatas para el desarrollo de una vacuna. Por todo ello, se puso a punto un protocolo de extracción de sobrenadantes proteicos enriquecidos en TbpB, teniendo en cuenta que la expresión de dicha proteína aumenta en condiciones restrictivas de hierro (del Río, 2004) y que el empleo de detergentes en concentraciones adecuadas puede solubilizar las proteínas de membrana externa sin alterar su estabilidad; de esta forma, se evitaría la liberación de otras proteínas integrales de membrana como la TbpA o de proteínas periplásmicas y citoplasmáticas (Goethe y cols, 2001). Los productos y reactivos utilizados se describen en el apartado 4.2 de este capítulo.

## 10.1. Antígenos. Obtención de sobrenadantes proteicos: OMPs, enriquecidas en TbpB

### 10.1.1. Cultivo de *H. parasuis* en condiciones restrictivas de hierro

Se empleó la cepa Nagasaki del serotipo 5 de *H. parasuis*. Se cultivó en caldo PPLO (Pronadisa), enriquecido con la adición por ml de 5  $\mu$ l de glucosa estéril al 50 %, 2  $\mu$ l de NAD (20 mg NAD/ml de agua), y 4  $\mu$ l de Isovitalax. La incubación se llevó a cabo en agitación y a 37 °C hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,3. En ese momento, se añadió un quelante, el dipiridilo (2,2'-Dipyridyl, Sigma), a una concentración final de 100  $\mu$ M, para restringir la cantidad de hierro presente en el medio y se incubó hasta alcanzar una  $DO_{600}$  superior a 1 (Goethe y cols., 2001).

### 10.1.2. Extracción de OMPs mediante la adición de detergentes (deoxicolato sódico, DOC)

Se estableció una concentración óptima de detergente que permitiera una máxima solubilización de las OMPs sin alterar la estabilidad. De esta forma, se probaron diferentes concentraciones de deoxicolato sódico (0,01%, 0,015%, 0,025%, 0,05%, 0,075%, 0,1%, 0,15% y 0,25%) que se añadieron al caldo de cultivo de *H. parasuis* con Tris-HCl 10 mM y NaCl 50 mM. Las muestras con las distintas concentraciones de detergente se incubaron a 37 °C y en agitación durante media hora. Después se centrifugaron a 8000 x.g. durante 15 minutos a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes, y se conservaron

a -80° C, en alícuotas de 100 $\mu$ l, hasta su uso posterior.

### 10.1.3. Precipitación de proteínas con ácido Tricloracético (TCA)

Con objeto de obtener una mayor concentración de proteínas, los sobrenadantes, obtenidos tras la adición de deoxicolato sódico a los cultivos de *H. parasuis* en condiciones restrictivas de hierro, fueron sometidos a un proceso de precipitación proteica. Así, se añadió un volumen de TCA al 100 % (Sigma) por cada 4 volúmenes de sobrenadante. Se incubaron durante 10 minutos a 4 °C y se centrifugaron a 12.000 x.g. durante 5 minutos. El pellet que contenía las proteínas se lavó mediante la adición de 200  $\mu$ l de acetona a 4 °C y posteriormente se volvió a centrifugar otros 5 minutos. Se realizaron dos lavados con acetona para cada pellet. Finalmente, se dejó en un bloque de calor a 95 °C durante 5 minutos, para evaporar los restos de acetona.

### 10.1.4. Concentración de proteínas por ultrafiltración

Se emplearon filtros Amicon<sup>R</sup> Ultra 15 de 10 kDa (Millipore). Estos filtros tienen la capacidad de concentrar hasta 80 veces proteínas de un peso molecular superior a 10 kDa sin alterar su estructura. Se añadieron 15 ml de los sobrenadantes por filtro y se centrifugaron a 5000 xg durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se recogió la solución concentrada con ayuda de una pipeta.

#### 10.1.5. Determinación de la concentración proteica

Se empleó el método de Bradford (BioRad), de acuerdo con las instrucciones del producto (ver apartado 4.5 de Material y Métodos). Se midió la concentración proteica de los sobrenadantes tras la adición del detergente y después de haber sido sometidos a procesos de ultrafiltración y precipitación con TCA. De esta forma pudo establecerse una relación entre la concentración de detergente y la solubilización de proteínas, y valorar el efecto de la ultrafiltración y precipitación en la concentración proteica final.

#### 10.1.6. Análisis de los sobrenadantes por *immunoblotting*

Los sobrenadantes extraídos con las diferentes concentraciones de deoxicolato sódico se analizaron por *immunoblotting* (apartado 9.2.2.1). También se analizaron los sobrenadantes antes y después de haber sido sometidos a procesos de concentración proteica mediante ultrafiltración y precipitación. Como fuente de anticuerpos primarios se empleó el mismo antisuero de conejo frente a la proteína TbpB, que se describió en el apartado 9.2.2.1.4 y como fuente de anticuerpos secundarios, el antisuero de cabra obtenido frente a las IgG del conejo, descrito en el apartado 9.2.2.1.5. Las concentraciones de ambos anticuerpos, así como los tiempos de incubación fueron similares a los descritos en el apartado 9.2.2.

#### 10.1.7. Análisis de la estabilidad de la membrana externa por *immunoblotting*

El protocolo y las muestras analizadas fueron las mismas que en el caso anterior, pero utilizando como fuente de anticuerpos primarios un suero producido en conejo, el pGEX-5X-GST-TbpA, frente a la proteína TbpA de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. El conjugado fue el mismo que el descrito en el apartado 9.2.2.1.5. La presencia de la TbpA, una proteína integral de membrana, en los sobrenadantes, denotaría la alteración de la estructura de esta membrana (Goethe y cols., 2001).

### 10.2. Inactivación

Los sobrenadantes proteicos se filtraron mediante un sistema de baja afinidad por proteínas (Millex™, Millipore). Posteriormente, se inactivaron con agentes químicos, según los resultados obtenidos en las pruebas de inactivación bacteriana (ver apartado 9.2 de Material y Métodos) y se analizaron de nuevo por *immunoblotting* para comprobar el efecto de la inactivación en las distintas proteínas, según lo explicado en el apartado 10.1.6.

### 10.3. Formulación vacunal

La dosis vacunal, el adyuvante y la composición porcentual de la vacuna fueron los mismos que los descritos para la bacterina. Únicamente se modificaron los antígenos, representados en esta ocasión por sobrenadantes proteicos enriquecidos en TbpB, extraídos e inactivados en las condiciones que

se detallan en los apartados 10.1 y 10.2. Cada dosis vacunal se preparó con 200 µg de estos sobrenadantes.

#### 10.4. Elaboración de la vacuna

El proceso de elaboración de la vacuna con OMPs, en el que se incluye la adición de los componentes, el envasado y los controles de esterilidad, fue el mismo que el descrito en el desarrollo de una bacterina frente a la enfermedad de Glässer.

### 11. Desarrollo de una vacuna recombinante frente a la enfermedad de Glässer. Proteína TbpB

#### 11.1. Antígenos

##### 11.1.1 Protocolo de expresión y purificación de la proteína TbpB en el vector de expresión PBA-Thio-V5-His

Se partió de un vial congelado de *E. coli* TOP10 con la construcción PBAD-Thio-TbpB-V5-His, que codificaba la expresión de una proteína de fusión, que contenía los 102 primeros aminoácidos de la TbpB de la cepa de referencia Nagasaki, del serotipo 5 de *H. parasuis* (del Río, 2004). Se sembraron 50 µl en una placa de LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37°C durante 24 horas (del Río, 2004).

##### 11.1.2. Condiciones de expresión

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* en caldo LB con 100 µg/ml de ampicilina y se mantuvo toda la noche a 37°C, en agitación. Al

día siguiente se inocularon 1/100 volúmenes del caldo, que se cultivado toda la noche en caldo LB con ampicilina fresco; y se incubaron a 37° C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,6. A partir de este momento, se añadió un inductor de la expresión de dicha proteína, la arabinosa (Sigma), a una concentración del 0,075% (p/v) y se incubó durante otras dos horas.

##### 11.1.3. Condiciones de solubilización y purificación

###### 11.1.3.1 Condiciones de solubilización

Después del crecimiento y la inducción, se procedió a la centrifugación del caldo a 8000 xg durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en tampón de lisis, a razón de 500 µl de tampón de lisis (ver apartado 4.4.2) por cada 10 ml de medio de cultivo. A continuación, se colocó la muestra en hielo y se sonicó con 3 ciclos de 20 segundos cada uno, a una potencia máxima del 40% (sonicador tipo *Bandelin Sonoplus, Germany*. Modelo HD, sonda MS-73). Posteriormente, se centrifugó la muestra a 12.000 xg durante 5 minutos y a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se mantuvo en hielo picado.

###### 11.1.3.2 Condiciones de purificación

Se empleó un sistema de bolitas de agarosa unidas a níquel (*HIS-Select™ HC Nickel affinity gel*, Invitrogen). Por cada 300 µl de lisado crudo, se utilizaron 50 µl de bolitas. Las bolitas se lavaron con tampón de unión, para su equilibrado, añadiendo 300 µl de tampón de unión por cada 50 µl de las bolitas y

se centrifugaron a 5000 xg durante 1 minuto, para eliminar el exceso de PBS. El sobrenadante se aspiró con una pipeta, añadiéndose entonces el lisado que contenía la proteína de fusión PBAD-Thio-TbpB-V5-His. Se centrifugó a 5000 xg durante 1 minuto, aspirándose el sobrenadante de la misma forma que en el caso anterior. La columna se lavó dos veces con 500 µl de tampón de unión (ver apartado 4.4.3), eliminándose el sobrenadante que constituía la fracción no unida. Finalmente, se añadieron 75 µl de tampón de elución (apartado 4.4.4) y se centrifugó a 5000 xg durante 1 minuto, recuperándose el sobrenadante que contenía la proteína PBAD-Thio-TbpB-V5-His. Se efectuó una segunda elución, en las mismas condiciones que la primera.

#### 11.1.4. Determinación de la concentración proteica

Las concentraciones proteicas de las dos eluciones se establecieron con el método Bradford, según las instrucciones del producto.

#### 11.1.5. Concentración de proteínas por ultrafiltración

El protocolo empleado fue el mismo que el descrito durante el desarrollo de la vacuna con OMPs.

#### 11.1.6. Análisis del perfil protéico por inmunoblotting

Las muestras del sobrenadante, antes y después de la ultrafiltración, fueron analizadas

por *immunoblotting* para comprobar la presencia de la proteína PBAD-Thio-TbpB-V5-His, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-V5 que reconocía el epitopo GKPIP NLPLLGLDST (Invitrogen). El anticuerpo estaba marcado con peroxidasa, por lo que no fue necesario añadir un conjugado ni un anticuerpo secundario.

### 11.2. Inactivación

Las muestras de proteína eluida se filtraron con un sistema de baja afinidad proteica (Millex<sup>TM</sup>, Millipore), y, a continuación, se inactivaron con productos químicos, conforme a los resultados obtenidos en las pruebas de inactivación descritas en el desarrollo de una bacterina frente a la enfermedad de Glässer. Una vez hubo finalizado la inactivación, se analizaron las muestras mediante *immunoblotting* (apartado 11.1.6), para comprobar que este proceso no había producido una alteración en la proteína de fusión.

### 11.3. Formulación vacunal

El adyuvante, la dosis vacunal y la composición porcentual de la vacuna fueron los mismos que para la bacterina. El antígeno consistió en este caso en el eluido con la proteína de fusión, a una concentración de 200 µg por dosis.

### 11.4. Elaboración de la vacuna

El proceso fue el mismo que el descrito para la bacterina y la vacuna con OMPs.

## 12. Protocolos de inmunización e infección de cerdos con *Haemophilus parasuis*

Se desarrollaron diferentes pruebas de inmunización-infección con cerdos privados de calostro, empleando distintos protocolos, seguidos de un desafío con una dosis letal (DL) de *H. parasuis*, para poder comparar el efecto de las distintas inmunizaciones en la respuesta del animal al desafío. Paralelamente, se utilizaron cerdos criados de forma natural, que no presentaban anticuerpos frente a *H. parasuis*. Estos animales, fueron inmunizados con bacterinas comerciales y posteriormente infectados con una DL, para tratar de reproducir las condiciones normales de una explotación porcina vacunada, tras la entrada de una cepa del serotipo 5 de *H. parasuis*. Como experimento control se realizó una infección con una DL a un grupo de cerdos privados de calostro, sin inmunizar. La dosis de la bacteria empleada y las condiciones en las que se administró fueron las mismas que para los animales inmunizados. Los distintos métodos de inmunización empleados se describen en la tabla 12.

Todas las inmunizaciones se iniciaron simultáneamente y 37 días después, todos los animales fueron sometidos a una infección con una DL de la cepa de referencia Nagasaki, del serotipo 5 de *H. parasuis*. La recogida de sangre y el registro de los signos clínicos se llevaron a cabo durante los mismos días en todos los animales, incluido el grupo control con cerdos no inmunizados. Los animales que sobrevivieron a la infección se sacrificaron 15 días después mediante la inoculación intracardiaca de un eutanásico (T-61, Intervet). Previamente, todos los animales habían sido

tranquilizados con azaperona (Stresnil, Esteve), por vía intramuscular. Tanto a los animales que se sacrificaron, como a los que murieron como consecuencia de la infección se les practicó la necropsia, realizando un examen macroscópico de los órganos y tejidos, con especial atención a la tráquea, pulmón, serosas, sistema nervioso central y articulaciones. Al mismo tiempo, se tomaron muestras de diferentes tejidos y fluidos para el análisis microbiológico (mediante siembra en placas de agar chocolate y de agar sangre con estría nodriza de un estafilococo productor de NAD), histológico y de expresión de citocinas.

Tabla 12. Protocolos de inmunización empleados en cerdos privados de calostro y en cerdos criados de forma convencional

Cerdos privados de calostro	Cerdos criados de forma natural
Bacterina con cepas pertenecientes a los serotipos 2, 4 y 5.	Bacterina comercial A (Porcilis Glässer®, Intervet)
Vacuna con OMPs	Bacterina comercial B (Hiprasuis-Glässer®, Hipra).
Vacuna recombinante	
Infección con una dosis subletal.	

### 12.1. Infección de cerdos privados de calostro, no inmunizados, con una DL de *H. parasuis*

Se estableció un grupo de 4 animales privados de calostro (Grupo I), que se mantuvo en una sala aislada durante el desarrollo de la prueba.

### 12.1.1. Preparación del inóculo con una DL de *Haemophilus parasuis*

El inóculo estaba constituido por  $5 \times 10^9$  UFC de la cepa Nagasaki, del serotipo 5 de *H. parasuis*, resuspendidas en 3 ml de RPMI (Invitrogen). A partir de un vial congelado, se sembraron tres placas de agar chocolate, que se incubaron a 37 °C en atmósfera microaerófila (5% CO<sub>2</sub>) durante 36 horas. Este crecimiento se recogió mediante la adición de 3 ml de RPMI por placa, se midió la DO de la suspensión bacteriana obtenida, y se realizaron diluciones decimales que fueron sembradas en agar chocolate, con el fin de efectuar un recuento a las 48 horas de incubación. Una vez obtenido este número, la suspensión bacteriana se diluyó en RPMI hasta alcanzar la concentración establecida.

### 12.1.2. Protocolo de infección

La vía elegida fue la intratraqueal. Se emplearon agujas desechables (20G, 0,90-40 mm) y jeringas de 5 ml. Se sujetó la cabeza de los animales con un lazo, de tal forma que el cuello se mantuviera estirado para que resultara posible la palpación de los anillos traqueales. Una vez localizados, se introdujo la aguja a través de la zona membranosa situada entre dos anillos cartilagosos. Después de aspirar para comprobar que salía aire, se inocularon lentamente 3 ml de la suspensión bacteriana, aprovechando los movimientos de inspiración del animal. Previamente, se había desinfectado la zona de punción con detergente y tintura de yodo. En los días siguientes se vigiló la evolución de la herida quirúrgica.

### 12.2. Inmunización y posterior infección de cerdos privados de calostro, con una DL de *H. parasuis*

Se establecieron cuatro grupos de 5 animales, que se sometieron a diferentes protocolos de inmunización frente a *H. parasuis*: inmunización con una bacterina (Grupo II), con una vacuna formulada con OMPs (Grupo III), con una vacuna recombinante (Grupo IV) y por exposición a una dosis subletal de *H. parasuis* (grupo V). Tal y como se explicó anteriormente, 37 días después del inicio de la inmunización, se llevó a cabo el desafío, en el que se infectaron los cerdos con una DL de la bacteria, en las mismas condiciones que para los cerdos privados de calostro no inmunizados ( apartado 12.1.1).

#### 12.2.1. Inmunización con una bacterina con cepas de los serotipos 2, 4 y 5 de *Haemophilus parasuis*

Todos los animales se vacunaron y revacunaron, tres semanas después, con la bacterina desarrollada en este trabajo (apartado 9). La vacunación se realizó en la parte derecha del cuello del animal, con agujas de 20G y jeringas de 5 ml, tras desinfección de la zona con povidona yodada (Betadine). Durante los 15 días posteriores se observó la zona de inyección, para detectar posibles reacciones de hipersensibilidad.



#### 12.2.2. Inmunización con una vacuna formulada con OMPs

El protocolo de vacunación fue el mismo que se empleó en el apartado 12.2.1. Se empleó la vacuna descrita en el apartado 10.

#### 12.2.3. Inmunización con una vacuna recombinante

La pauta de vacunación se realizó según lo descrito en el apartado 12.2.1. La vacuna recombinante se desarrolló según lo explicado en el apartado 11.

#### 12.2.4. Inmunización por exposición a una dosis subletal

Para la inmunización por exposición a una dosis subletal del agente, se empleó la vía intratraqueal (apartado 12.1.2), pero en este caso, la concentración del inóculo fue de  $10^5$  UFC (Oliveira y cols, 2004) de la cepa Nagasaki, del serotipo 5. Los animales que presentaron sintomatología se trataron con doxiciclina administrada vía intramuscular. En los casos más graves, en los que los animales aparecían postrados, apáticos y sin apetito, se les administró un complejo vitamínico, Duphalyte (Fort-Dodge), por las vías parenteral y oral, hasta su completa recuperación.

### 12.3. Inmunización y posterior infección de cerdos criados de forma natural, con una DL de *H. parasuis*

Se emplearon 6 cerdos de edades y pesos similares a los privados de calostro, que se mantuvieron en una sala aislada durante el

desarrollo de la prueba. Tres de estos animales fueron inmunizados con la bacterina comercial A (Grupo VI), y los otros tres con la bacterina comercial B (Grupo VII); 37 días después de la vacunación, se llevó a cabo la infección con una DL de la cepa Nagasaki, del serotipo 5. Los protocolos de vacunación y posterior infección se realizaron según lo descrito en los apartados 12.2.1 y 12.1., respectivamente.

## 13. Obtención de suero

Una vez obtenidas las muestras de sangre, a partir de los cerdos empleados en los estudios de inmunización e infección (apartado 12), se refrigeraron durante una noche a 4 °C y posteriormente se centrifugaron a 1000 xg durante 15 minutos. El sobrenadante se recogió y se conservó a -80 °C, en alícuotas de 1 ml, hasta su posterior empleo.

## 14. Obtención y conservación de leucocitos de sangre periférica

Los productos y reactivos empleados se describen con detalle en el apartado 4.9.

### 14.1. Sedimentación con Dextrano

Las muestras de sangre con EDTA, obtenidas a partir de los cerdos empleados en los estudios de inmunización e infección (apartado 12), se sedimentaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, mediante la adición de dextrano al 6%. Tras la sedimentación se formaron dos fases: la fase superior, rica en leucocitos, y la inferior, constituida principalmente por los eritrocitos. Se recogió la primera de ellas y se centrifugó durante 15 minutos a 250 xg. El pellet celular

obtenido se resuspendió en 2 ml de RPMI con EDTA 2,5 mM.

#### **14.2. Sedimentación por gradiente de densidad**

Se adoptó el protocolo descrito por González y cols. (1990) con ligeras modificaciones. La suspensión celular en RPMI con EDTA se añadió sobre un gradiente de Percoll al 62,5 % y se centrifugó durante 15 minutos a 370 x g. La interfase (donde se concentraron los leucocitos) se recogió con ayuda de una pipeta y se lavó tres veces en PBS con SFB, centrifugando a 250 xg durante 10 minutos.

#### **14.3. Recuento celular**

Para la realización de los recuentos de células viables se empleó el colorante azul tripán al 0,4 % (Sigma). Se trata de un colorante que penetra únicamente en las células muertas, mientras que las vivas no se tiñen y se observan birrefringentes.

Se tomó una alícuota de la suspensión celular y se añadió el mismo volumen del colorante, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se introdujo por capilaridad en una cámara de Neubauer y se observó al microscopio. Se realizó el recuento del número de células presentes en dos o más, de los cuatro cuadrados grandes, y se obtuvo la media que, multiplicada por el factor de dilución, por  $10^4$  (cada cuadrado tiene un volumen de  $10^{-4}$  ml) y por el volumen de la suspensión celular, proporciona el número de células totales presentes en la suspensión.

#### **14.4. Crioconsecuación de leucocitos**

##### **14.4.1. Procedimiento de congelación**

Los leucocitos se resuspendieron en medio de congelación (ver apartado 2.2) a una concentración final de  $5 \times 10^6$  células/ml. El medio se añadió gota a gota, dejándolo resbalar por las paredes del tubo y agitando al mismo tiempo. Las células fueron congeladas en criotubos (Criotube 1,8 ML SI, Nunc Brand Products), que se dispusieron en una bandeja del depósito Cryo 1° C Freezing Container (Nalgene), que previamente había sido llenado con alcohol isopropílico (Sigma). El alcohol isopropílico permite un proceso de congelación lento, entre -1 °C a -3 °C por minuto, lo que evita la formación de cristales citoplasmáticos. El recipiente se introdujo en el congelador a -80 °C durante 24 horas y, transcurrido ese tiempo, los viales se introdujeron en nitrógeno líquido.

##### **14.4.2. Descongelación**

Los crioviales se descongelaron en un baño a 37 °C en agitación rápida. Las células se pasaron a un tubo Falcon de 50 ml, al que se le añadieron 10 ml de RPMI 1640. Se centrifugó durante 10 minutos a 250 xg, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con 20 ml de medio competo.

#### **15. Conservación de tejidos**

##### **15.1. Para la extracción del RNA total**

Se tomaron piezas de 5 x 15 x 4 mm de cerebro, ganglios retrofaríngeos, bazo y pulmón, procedentes de los cerdos empleados

en los estudios de inmunización e infección, y se dispusieron en criomoldes de plástico (*Crymold standard*, 25 x20 x 5 mm, Tissue-Tek), embebidas en un medio criosolidificable (*OCT-Compound*, Tissue-Tek). Para su conservación se congelaron mediante inmersión en isopentano (Sigma), enfriado hasta su punto de congelación con nitrógeno líquido. Una vez tuvo lugar la solidificación del medio, las muestras posteriormente se almacenaron a -80 °C.

### 15.2. Para el análisis histológico

Se recogieron muestras de 1-3 g de cerebro, ganglios, hígado, bazo, pulmón, corazón y tonsilas y se almacenaron en recipientes con formaldehído al 4 % (Sigma).

## 16. Extracción y cuantificación del RNA total

### 16.1. Extracción del RNA

Se realizó a partir de las piezas de tejidos congeladas a -80 °C (apartado 15.1) con un homogeneizador (Polytron PT 3100, PTDA 3012/2 generator, Kinematica, A.g.) y un sistema comercial para la extracción de RNA (*RNeasy Mini kit for isolation of total RNA from Animal Tissues*, Quiagen).

Antes de iniciar la homogenización, se limpió el aparato con etanol al 70% y con agua, durante 14-15 segundos, a una potencia baja. Esta operación fue repetida entre cada muestra. Se depositaron 30 mg de las muestras congeladas en 2 ml del tampón RLT (Rneasy Mini kit) y se homogenizaron durante 30 segundos a potencia media. El proceso se

repitió otros 30 segundos cuando la muestra no quedaba bien homogenizada. Una vez finalizado el proceso, se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 µl de cloroformo por muestra, se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se centrifugaron a 12000 xg durante 15 minutos a 4 °C y se observó la aparición de dos fases separadas por una interfase blanca. Se recogió la fase superior, se depositó en un tubo eppendorf y se le añadieron 700-800 µl de etanol al 70 %. Se tomaron 700 µl de la mezcla anterior y se pasaron a una columna con un tubo colector de 2 ml. Se centrifugó durante 30 segundos a 8000 xg y se eliminó el precipitado. Se le añadieron 350 µl de tampón RW1 de lavado (Rneasy Mini kit) y las columnas fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se volvió a centrifugar otros 30 segundos a 8000 xg. A continuación, se realizó un tratamiento para eliminar DNA residual mediante la adición de 80 µl de tampón con DNasas (*RNase-free Dnase Set 79254*, Quiagen) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, la columna se volvió a lavar con el tampón RW1, se eliminó el precipitado y se colocó en un nuevo tubo colector de 2 ml. Se añadieron 500 µl de tampón RPE (Rneasy Mini kit) y se volvió a centrifugar. Se eliminó el precipitado y se repitió el paso anterior, pero centrifugando durante 2 minutos. Finalmente, la columna se depositó en un tubo eppendorf colector de 1,5 ml y se le añadieron 35 µl de agua libre de RNasas, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000

xg durante 1 minuto, recogiendo el precipitado que contenía el RNA eluido, que se mantuvo en frío hasta su posterior uso.

## 16.2. Cuantificación y determinación de la pureza del RNA

Se realizó en un espectrofotómetro (*Biophotometer*, Eppendorf).

### 16.2.1. Cuantificación del RNA

Para cuantificar el RNA se midió la absorbancia a 260 nm. Una absorbancia de 1 se corresponde con una concentración de RNA de 44 µg/ml. Sólo se consideraron significativas las absorbancias superiores a 0,15.

### 16.2.2. Determinación de la pureza del RNA

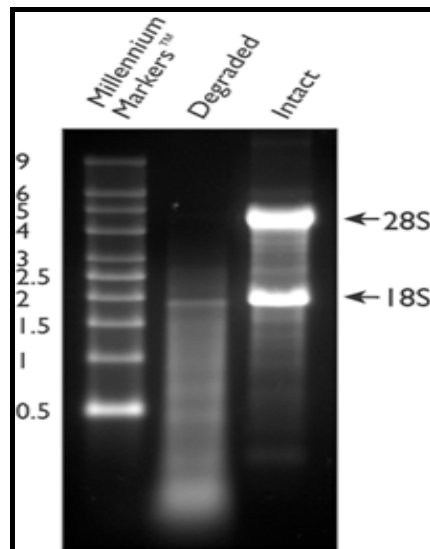
La proporción entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) proporciona una estimación de la pureza del RNA con respecto a los contaminantes que pudieran presentar una absorbancia en ese mismo espectro, como es el caso de las proteínas. Las muestras se diluyeron en Tris HCl 10mM (pH 7,5) y se consideró que el ARN era puro cuando la proporción estaba comprendida entre 1,9 y 2,1.

## 16.3. Análisis del RNA: electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa

Se prepararon geles desnaturizantes de agarosa y se sumergieron en tampón MOPS 1x (Material y métodos 4.10) durante 30 minutos, antes de cargar el RNA. Las muestras de RNA se mezclaron con el tampón de carga (*RNA gel*

*loading buffer*, Eppendorf Iberica), a razón de 2,5 µl de tampón por cada µl de la solución que contenía el RNA. Se incubaron durante 10 minutos a 65 °C, y se pasaron inmediatamente a hielo donde se mantuvieron durante 5 minutos. En cada pocillo se añadió 10 µl de la mezcla de RNA con el tampón de carga y como control, 3 µl del marcador de peso molecular (*RNA Markers*, Promega). Se aplicó una corriente de 5-6 voltios/cm, hasta que la banda de azul de bromofenol hubo migrado dos terceras partes del gel. Los geles se visualizaron en transiluminadores de rayos ultravioleta, para comprobar la existencia de las dos bandas correspondientes al 18 y 28 S. Se consideró que el RNA presentaba un estado apropiado cuando ambas bandas se podían distinguir claramente y el ratio de 28S/ 18S era de 2: 1, tal y como se observa en la figura 7.

Figura 7. Electroforesis del RNA



## 17. Estudio anatomopatológico

Las muestras se fijaron en etanol al 70 % y posteriormente fueron talladas en piezas de un grosor aproximado de 0,3 cm. A continuación, se deshidrataron en un gradiente

creciente de alcohol, se aclararon con xilol, y se realizó la inclusión de las mismas en parafina, con punto de fusión de 56-57 °C (Vogel-Histocomp<sup>R</sup>), mediante un inclusor, modelo Autotechnicon Duo<sup>R</sup> Modelo 2<sup>a</sup> (Technicon Corporation Tarry Town, NY, EEUU). Finalizado este proceso, se realizó el montaje definitivo en parafina en una unidad formadora de bloques (Myr AR 280-2, Meyer, Tarragona, España). Se obtuvieron secciones de parafina de 3µm mediante un microtomo de rotación 1512 (Leitz, Stuttgart, Alemania) y se empleó la técnica de la hematoxilina-eosina para teñir las muestras.

## **18. Estudio de las inmunoglobulinas séricas frente a *Haemophilus parasuis* y sus antígenos durante las pruebas de inmunización e infección**

Para la detección de las inmunoglobulinas producidas frente a *H. parasuis* y sus antígenos se utilizaron muestras de suero de los animales procedentes de los estudios de inmunización y posterior infección. Las muestras se tomaron cada 7 días desde el inicio de las pruebas de inmunización hasta el día del desafío o infección con la DL. Después de éste, se recogieron muestras de suero los días 3, 8 y 13. En el caso de los cerdos que no habían sido inmunizados, se tomaron muestras de sangre antes del desafío en los mismos días que los otros cerdos, para así poder utilizarlos como control negativo.

Para detectar los niveles de inmunoglobulinas séricas se emplearon dos métodos ELISA indirectos, uno que utilizaba como antígeno a la bacteria inactivada y otro que recurría a los sobrenadantes proteicos

enriquecidos en TbpB (apartado 10.1.2) Se valoró la presencia y concentración en el suero de IgM, IgG totales (IgGt), IgG1 e IgG2, junto con la avidéz y maduración de las IgGt, mediante el método de elución con el ión amonio tiocianato. Los reactivos empleados se describen detalladamente en el apartado 4.11 de Material y Métodos.

A continuación se expone una tabla con los antisueros empleados para la realización de ambos ELISA (tabla 13)

### **18.1. ELISA con la bacteria inactivada**

Se empleó el protocolo de Solano-Aguilar (1999), modificado mediante el empleo de otro inactivante, el thimerosal.

#### **18.1.1. Antígenos y tapizado de la placa**

Se sembró la cepa de referencia del serotipo 5 de *H. parasuis* en placas de agar chocolate y se incubó en atmósfera microaerófila (37 °C) durante 36 horas. A continuación se recogió el crecimiento bacteriano y se inactivó mediante Thimerosal al 0,1% durante 2 horas a 37 °C, y posteriormente toda la noche a 4 °C. Se ajustó la concentración de proteína a 13 µg/ml en tampón carbonato y se tapizaron los pocillos de las placas de ELISA (Polysorp Nunc) con un volumen de 100 µl. Se incubó 2 horas a 37 °C y posteriormente durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, se añadieron 300 µl de tampón de bloqueo y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Transcurrido ese tiempo las placas se lavaron con PBST.

### 18.1.2. Desarrollo de la prueba

Se añadieron los sueros, a una dilución 1:100, y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Seguidamente, la placa se lavó tres veces con PBST durante 5 minutos y tras el último lavado se añadieron los antisueros marcados con peroxidasa frente a la IgG (*Anti-pig IgG whole molecule peroxidase conjugated*) y la 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*).

Las placas se incubaron otra hora y se volvieron a lavar con PBST. En el caso de la IgG1 e IgG2, fue necesario añadir otro anticuerpo marcado con peroxidasa frente a las

inmunoglobulinas de ratón (*Polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins: HRP*) e incubar las placas durante otra hora más, antes de revelar la reacción.

El revelado se realizó mediante la adición de TMB (Sigma) con peróxido de hidrógeno al 0,002%. Se bloqueó la reacción con 25 µl de ácido sulfúrico 2M. Las placas se leyeron a una DO<sub>450</sub> en un lector (Dynex Technologies, Inc, USA). En cada placa se incorporó como control negativo, suero de cerdos privados de calostro que no habían estado en contacto con *H. parasuis* y como control positivo, sueros de cerdos infectados. Para todas las reacciones anteriormente descritas, se empleó un volumen de 100 µl por pocillo y las incubaciones se realizaron a 37 °C.

Tabla 13. Antisueros empleados en los ELISA indirectos

Antisuero	Nombre comercial	Casa comercial	Concentración empleada
Igs de cabra frente a IgM porcinas marcadas con peroxidasa.	Goat anti-porcine IgM- HRP	Serotec	1: 5000
Igs de ratón frente a IgG1 de cerdo.	Mouse anti-porcine IgG1	Serotec	1:100
Igs de ratón frente a IgG2 de cerdo.	Mouse anti-porcine IgG2	Serotec	1:100
Igs frente IgG porcina marcado con peroxidasa.	Anti-pig IgG (whole molecule) peroxidase conjugated	Sigma	1:10000
Acs policlonales de cabra frente a inmunoglobulinas de ratón marcadas con peroxidasa.	Polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins: HRP	Dako cytovation	1:5000

### 18.1.3. Interpretación de los resultados

Para cada grupo del estudio se estableció un valor umbral o punto de corte que equivalía al doble del valor medio de las DO, más la desviación estándar de las mismas, en el inicio del estudio.

Se consideró que se había producido seroconversión, cuando la DO del suero era dos veces superior a la media más la desviación estándar, que se habían registrado en el día inicial.

### 18.1.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa informático SAS (versión 8, SAS Institute Inc., 1998, Cary NC, USA). Se empleó el método univariable con la opción normal para determinar que los datos seguían una distribución normal, aplicándose la prueba de Shapiro Wilk. Se utilizó la prueba de Tukey para determinar si existían diferencias significativas en la DO obtenida para cada grupo entre los distintos días del estudio, y además para comparar las DO de los distintos grupos durante todo el estudio.

Se consideró que había diferencias significativas cuando el valor de  $p$  era inferior a 0,005.

## 18.2. ELISA con sobrenadantes proteicos enriquecidos en TbpB

Se empleó el protocolo descrito por Goethe y cols. (2001) para *A. pleuropneumoniae* con algunas modificaciones.

### 18.2.1. Antígenos y tapizado de la placa

Los antígenos empleados fueron sobrenadantes enriquecidos en TbpB, obtenidos mediante la adición de deoxicolato sódico (con una concentración final del 0,075%) a los cultivos de *H. parasuis*, en condiciones restrictivas de hierro, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 10.1. Se tapizaron placas de 96 pocillos con 100  $\mu$ l de los sobrenadantes diluidos en tampón carbonato (pH 9,6), a una concentración de 13  $\mu$ g/ml de antígeno por pocillo. Después de 12 horas de incubación a 4 °C, las placas se lavaron con PBST y se bloquearon mediante la adición de leche descremada al 5 % en PBST (200  $\mu$ l por pocillo), con la posterior incubación de las mismas, durante 2 horas a 37 °C y en agitación. Finalmente, se volvieron a lavar con PBST.

### 18.2.2. Desarrollo de la prueba

El desarrollo de la prueba fue similar al descrito para el ELISA con la bacteria inactivada. La única diferencia se produjo en el tiempo de incubación que se redujo a 20 minutos.

### 18.2.3. Interpretación de los resultados

Se sigue el mismo criterio para la interpretación que en el ELISA con la bacteria inactivada.

### 18.2.4. Análisis estadístico

Se aplicaron las mismas pruebas que para el ELISA con la bacteria inactivada.

### 18.3. Índice de avidéz de las IgG totales

Se calculó la avidéz de las IgGt en los sueros positivos, mediante el método de elución con amonio tiocianato (Appleyard, 1992; Furesz y cols., 1997). La elución depende de la concentración del ión amonio tiocianato, de la fuerza con la que se une el anticuerpo al antígeno y resulta independiente de la concentración de anticuerpo presente. El método está basado en el descenso de la DO ocasionada tras la adición de concentraciones crecientes de ión, que compiten por el antígeno con las inmunoglobulinas séricas. Se emplearon los dos métodos ELISA descritos con anterioridad, pero en este caso, tras la adición de los sueros, se lavaron las placas y se incubaron a 37 °C, durante 20 minutos, con diferentes concentraciones de amonio tiocianato: 0, 0,25, 0,5, 1, 2 y 4M, respectivamente. Transcurrido este proceso se añadió el conjugado, y se reveló la reacción de igual forma que en los ELISA indirectos sencillos.

Las DO obtenidas con cada una de las concentraciones del ión probadas, se expresaron como porcentaje con respecto a la obtenida para una concentración 0 M, que representaría el 100%. De esta forma se pudo calcular una ecuación cuadrática con la DO y la concentración del ión, para lo que fue necesario transformar los porcentajes en logaritmos decimales. Por último para ajustar el origen a cero, a todos los logaritmos se les restó el valor 2, correspondiente al log 100. Se obtuvo una ecuación del tipo  $y = ax^2 + bx + c$ , siendo  $x$  la concentración del ión e  $y$  el logaritmo de la DO menos 2. El índice de avidéz se expresó como la concentración del ión que determinaba un descenso de la DO del

50%. Cuando el suero es seronegativo se acepta que la avidéz presenta un valor de 0.

El análisis estadístico de estos resultados se realizó siguiendo la metodología descrita en los apartados anteriores (18.1.4 y 18.2.4).

## 19. Estudio de las poblaciones leucocitarias durante las pruebas de inmunización e infección. Citometría de flujo

El estudio de las poblaciones leucocitarias se realizó a partir de los leucocitos de sangre periférica obtenidos según lo descrito en el apartado 14. Los anticuerpos empleados para su caracterización fenotípica se exponen en la Tabla 14.

### 19.1. Marcaje con un fluorocromo

Los marcajes con un fluorocromo se realizaron en placas de 96 pocillos con fondo en V (Polysorp, Nunc) y se añadieron  $5 \times 10^6$  células por pocillo. Se centrifugaron durante 6 minutos a 250 xg y se eliminaron los sobrenadantes. Los sedimentos celulares se incubaron durante 30 minutos con los anticuerpos monoclonales recogidos en la tabla 14. Los anticuerpos procedentes del INIA eran sobrenadantes de hibridoma y se añadieron 50 µl por pocillo, con la excepción del SWC3 del que se añadieron 75 µl. Como anticuerpo secundario se utilizó una antiglobulina caprina frente a las inmunoglobulinas de ratón (Goat F(ab')<sub>2</sub> anti mouse Ig (H+L), Southern Biotech), a razón de 1µg de anticuerpo por cada  $10^6$  células, en tampón FACS con un 5% de suero de cerdo. Una vez finalizada la



incubación, las placas se lavaron 6 veces con tampón FACS y finalmente las células se recogieron mediante la adición de 300 µl de tampón FACS fijador por pocillo. Como

control negativo, se incubaron las células con tampón FACS, en lugar de los anticuerpos monoclonales, y después se añadió el conjugado marcado con FITC.

Tabla 14. Anticuerpos monoclonales empleados en la citometría de flujo

ANTÍGENO	LOCALIZACIÓN	PROCEDENCIA
CD45	Panleucocitario	INIA
CD3	Linfocitos T. Timocitos	INIA
CD4	Linfocitos T colaboradores. Linfocitos T dobles positivos (CD4+CD8+).	INIA
CD8α CD8α-PE	Linfocitos T citotóxicos. Linfocitos T γλ. Linfocitos T dobles positivos (CD4+ CD8+). Células NK. Timocitos	INIA SEROTEC
CD8β	Linfocitos T citotóxicos. Células NK. Linfocitos T dobles positivos (CD4+ CD8+) .Linfocitos T γλ Timocitos	VMRD
α-IgM	Linfocitos B.	
SWC3	Monocitos. Macrófagos. Granulocitos.	INIA
2E3	Subpoblaciones de linfocitos T.	INIA
CD25	Subpoblaciones de linfocitos T	INIA

### 19.2. Marcaje con dos fluorocromos

Se realizó un doble marcaje para determinar el porcentaje de linfocitos dobles positivos, o linfocitos T CD4+CD8α+, y analizar la expresión de los dos dímeros del antígeno CD8 en las células CD8+. El desarrollo de la prueba se realizó en placas de 96 pocillos con fondo en V, con la misma concentración de células por pocillo que en el apartado 19.1. Las células se incubaron durante 30 minutos con los sobrenadantes que contenían anticuerpos frente al CD4 (INIA) y frente al CD8β (VMRD). Éste último, se

añadió de acuerdo con las instrucciones del fabricante, así por cada 10<sup>6</sup> células se añadían 50 µl de anticuerpo. Transcurrido este tiempo las placas se lavaron y se añadió el mismo conjugado marcado empleado en el apartado 19.1 (RAM-FITC (F(ab')<sub>2</sub>, Southern Biotech), con el que se volvieron a incubar durante 30 minutos. Para evitar uniones inespecíficas, tras 6 lavados con tampón FACS, las células se bloquearon durante 15 minutos mediante la adición de suero de ratón al 5%. Una vez finalizado el bloqueo, se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo CD8α marcado con ficoeritrina, de tal forma que por cada 10<sup>6</sup> células se añadieron 10 µl del anticuerpo sin

diluir. Finalmente, las células, se recogieron y resuspendieron en tampón FACS fijador, tal y como se indicó en el apartado anterior. Como control negativo, se sustituyeron los sobrenadantes por tampón FACS, y, como controles positivos se realizaron marcajes simples con los antígenos CD4, CD8 $\beta$  y con el anticuerpo frente al CD8 $\alpha$ , siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior, aunque en el caso del CD8 $\alpha$  marcado con ficoeritrina no fue necesario añadir el conjugado.

### 19.3. Análisis por citometría de flujo

Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson), utilizando el programa CELL Quest®. Se empleó el programa WinMDI® para procesar los datos.

#### 19.3.1. Establecimiento de regiones para el análisis de la población total

En la población total obtenida en el gradiente de Percoll se definieron 3 regiones de acuerdo con los parámetros de tamaño (FSC) complejidad (SSC), y con la expresión de determinados marcadores de superficie: región R1 (linfocitos): CD45+, CD3+, SWC3-; regiones R2 (monocitos) y R3 (granulocitos): CD45+, SWC3+, CD3-. Se hicieron dos adquisiciones celulares ( $10^6$  células) en el citómetro de flujo, una para la región R1 y otra para la población total.

Mediante las representaciones bidimensionales del tamaño celular frente a la complejidad, se estudió la distribución de las

poblaciones leucocitarias en estas tres regiones, en el día inicial, en el día del desafío (día 37) y en los días 6 y 13 posteriores a éste. Este estudio se completó con el análisis de la ratio que relacionaba los porcentajes relativos, en la población total, de las células positivas para los antígenos de diferenciación SWC3 (monocitos y granulocitos) y CD3 (linfocitos T), en el día inicial, en los días 7, 21, en el día del desafío y en los días 6 y 13 post-infección.

#### 19.3.2. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en la región 1

En todos los grupos, se calculó el porcentaje relativo de expresión, en la región R1, de los antígenos de diferenciación CD3,  $\alpha$ IgM, CD4, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , 2E3 y CD25 en el día inicial y en los días 7, 15, 21 y 37, anteriores al desafío, así como en los días 6 y 13 posteriores. También se analizó la expresión conjunta de los antígenos CD4 y CD8 $\alpha$  (linfocitos doble positivos) y CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$ . Con objeto de normalizar los resultados, para evitar las posibles alteraciones en la composición de la población total que hubiesen tenido lugar durante los procesos de congelación y descongelación de las muestras, se calcularon los siguientes ratios: CD3/IgM; CD4/CD8 $\alpha$ , 2E3/CD25, CD4CD8 $\alpha$ /CD4, CD4CD8 $\alpha$ /CD8 $\alpha$  y CD8 $\alpha$ CD8 $\beta$ /CD8 $\alpha$

### 19.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa informático SAS (versión, 8 SAS Institute, Inc, 1998, Cary NC, USA). Para determinar si los datos seguían una distribución normal se empleó el método univariable

(univariate procedure) con la opción normal y se aplicó la prueba de Shapiro Wilk. Se empleó la prueba de Tukey para determinar si existían diferencias significativas en las medias obtenidas con cada uno de los marcadores leucocitarios y sus ratios durante los estudios de inmunización y posterior infección con una DL. Así como para comparar los porcentajes de expresión de los antígenos leucocitarios y sus ratios entre los distintos grupos durante todo el estudio.

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

## **20. Estudio la respuesta de fase aguda durante las pruebas de inmunización y posterior infección**

Se analizó la respuesta en todos los grupos de animales después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Se valoraron cuantitativamente y de forma individual, cuatro proteínas: Apolipoproteína I (ApoA-I), Haptoglobina (HPT), pig MAP, y la proteína C reactiva (CRP), por inmunodifusión radial (Mancini y cols, 1965), en las muestras de suero recogidas el día de la infección con la DL y en los días posteriores a la misma.

Para cada una de las proteínas se emplearon geles de agarosa al 1% en tampón barbiturato sódico 0,025 M de pH 8,2, que contenían anticuerpos específicos obtenidos mediante inyección subcutánea en conejos, de estas cuatro proteínas purificadas (gentileza del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza). En todas las placas se

practicaron pocillos de 3 mm de diámetro, separados 2 cm entre sí, y se aplicaron los sueros problema junto con sueros que habían sido calibrados previamente con distintas concentraciones de estas cuatro proteínas, con el fin de trazar la recta estándar. Las placas se incubaron durante 3 días en una cámara húmeda. Posteriormente el gel se lavó, secó y tiñó con azul de Coomassie durante 1 día y los restos de colorante se eliminaron mediante un lavado de 30 minutos con la solución de desteñido (apartado 4.7.2). Finalmente, se midió el diámetro de los halos de difusión con una lupa.

Se realizó una recta patrón con el diámetro al cuadrado obtenido con los sueros estándar y sus concentraciones de proteicas, y se obtuvo una ecuación lineal que relacionaba ambas variables. Las ecuaciones obtenidas para cada una de las proteínas se utilizaron para calcular la concentración proteica en los distintos sueros, una vez establecido el diámetro del halo de precipitación para cada uno de ellos. Para el análisis estadístico de los datos se emplearon las mismas pruebas descritas en el apartado 19.4.

## **21. Análisis de las citocinas presentes en tejidos**

Se estudió la expresión mediante PCR a tiempo real (RT-PCR) de las citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 y de las citoquinas reguladoras IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  a partir del RNA de cerebro, bazo, ganglio y pulmón, obtenidos durante la necropsia de los cerdos en estudio y extraído según lo descrito en el apartado 16. A partir del RNA se obtuvo DNA complementario (cDNA) mediante una

reacción con una retrotranscriptasa (RT) y a continuación se realizó una PCR con los oligonucleótidos de estas citocinas. Para normalizar los datos obtenidos se recurrió a dos genes esenciales que codifican la ciclofilina y la  $\beta$ -2 microglobulina. En la Tabla 15 se señalan los oligonucleótidos empleados para cada caso, su concentración, temperatura de fusión y el tamaño del producto obtenido.

### 21.1. Retrotranscripción (RT)

Las reacción se llevó a cabo utilizando el sistema cMaster® RT kit (Eppendorf), según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron dos mezclas de reacción. La primera (Mastermix 1) contenía el RNA extraído de las muestras de tejido, los dNTPs y los cebadores (Random Hexamers Primers, Applied Biosystems), mientras que la segunda (Mastermix 2) contenía la transcriptasa inversa, el tampón de la reacción y un inhibidor de RNAsas. En las Tablas 16 y 17 se detallan las concentraciones y volúmenes de los distintos componentes de las dos mezclas.

La primera mezcla se incubó a 65 °C durante 5 minutos y después se dejó enfriar en hielo al menos durante otros 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se mezcló con la segunda y se introdujeron ambas en un termociclador (Mastercycler Gradient de

Eppendorf), en donde tuvo lugar la RT. El programa empleado se describe en la Tabla 18.

### 21.2. PCR

Se realizó un ensayo con el colorante verde SYBR (*SYBR Green*) para cuantificar la amplificación del cDNA (*Real Master Mix* de Eppendorf). Para todos los genes, el volumen final de reacción fue de 20  $\mu$ l, que estaba compuesto por cDNA, tampón de PCR 2,5 x, solución de verde SYBR 20x, agua libre de DNAsas y RNAsas y el par de oligonucleotidos correspondientes para cada gen. Las concentraciones y volúmenes empleados de estos componentes se describen en la Tabla 19.

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos (Placas Twin Teck, Eppendorf) que se cerraron térmicamente el sellador “Heat Sealing” (Eppendorf), y se centrifugaron a 200 xg durante 15 segundos, para que la muestra se depositara en el fondo de las placas. Finalmente, se introdujeron en un termociclador (modelo Realplex, Eppendorf), en donde tuvo lugar la reacción de PCR y un análisis del amplicón resultante por curvas de fusión, para poder asegurar de esta forma su especificidad. Los datos concretos del programa se recogen en la Tabla 20

Tabla 15. Oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR a tiempo real

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Referencia	Concentración mM	Temperatura de fusión	Producto (bp)
$\beta$ -2 microglobulina	TCTACCTTCTGGTCCACACTGAG	Hyland y cols., 2006	30	84,8 $\pm$ 0,2	161
	TCATCCAACCCAGATGCA		65		
Ciclofilina A	GCGTCTCCCTTCGAGCTGTT	Hyland y cols., 2006	100	84 $\pm$ 0,2	160
	CCATTATGGCGTGTGAAGTC		100		
IL-1	GTGCTCAAAAACGAAAGACGAACC	Duvigneau y cols., 2006	100	83,9 $\pm$ 0,5	110
	CATATTGCCATGCTTTTCCAGAA		100		
IL-4	GTTCTGTTACTGGCATGTACCA	Duvigneau y cols., 2006	100	83,4 $\pm$ 0,2	118
	GCTCCATGCACGAGTCTTCT		100		
IL-6	ATTAGTACCAAAAGCACTGATCC	Hyland y cols., 2006	100	85,8 $\pm$ 0,3	148
	TGAGAATGATCTTTGTGTTCTTC		100		
IL-10	CGGCGCTGTCAATCAATTTCTG	Duvigneau y cols., 2006	100	84 $\pm$ 0,2	89
	CCCCCTCTTTGGAGCTTGCTA		100		
TNF- $\alpha$	TTCCAGCTGGCCCCCTTGAGC	Hyland y cols., 2006	100	83,78 $\pm$ 0,07	146
	GAGGGCATTTGGCATAACCCAC		100		
FN- $\gamma$	CGATCCTAAAGGACTATTTTAATGCAA	Duvigneau y cols., 2006	100	77,9 $\pm$ 0,2	112
	TTTTGTCACTCTCCCTTTCCAAAT		100		

Tabla 16. Componentes de la primera mezcla (MasterMix)

Master Mix 1 (10 µl)	Volumen por reacción	Concentración final
dNTPs	2 µl	1 mM
Cebadores random hexameros	1 µl	2,5 ng/ml
Agua libre de RNAsas	Hasta 10 µl	
<b>RNA</b>	<b>X µl</b>	<b>1µg</b>

Tabla 17. Componentes de la segunda mezcla (MasterMix 2)

Master Mix 2(10 µl)	Volumen por reacción	Concentración final
Tampón de RT con 25 mM de Mg <sup>2+</sup>	4 µl	2x con 5mM de Mg <sup>2+</sup>
Enzima cMaster RT	1 µl	0,75 U/µl
Inhibidor de RNAsa	0,5 µl	0,025 U/µl
Agua RNasa free	hasta 10 µl	

Tabla 18. Programa de RT

Paso	Temperatura	Tiempo	Descripción
1	25°C	10´	Anillamiento y extensión de los cebadores
2	42°C	90´	Síntesis de cDNA
2	85°C	5´	Inactivación del enzima

Tabla 19. Componentes de la reacción de PCR

Componentes de la reacción	Volumen por reacción	Concentración final
Tampón de PCR 2,5 x	8 µl	1X
Solución de verde SYBR 20x	1 µl	1X
FP		Ver tabla 7.
RP		Ver tabla 7.
cDNA	1 µl	~ ng-pg
Agua libre de DNAsas y RNAsas	hasta 20 µl	

Tabla 20. Condiciones de amplificación y curva de fusión

Ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo	Descripción
1x	1	95°C	2'	Inicio de la desnaturalización del cDNA
50x	2	95°C	15''	Proceso de desnaturalización del cDNA
	3	60°C	1'	Anillamiento de los cebadores y extensión
1x	4	95°C	15''	Análisis por curva de fusión
	5	60°C	20''	
	6	Rampa de 60-90°C	20'	

### 21.3. Análisis de los datos

La PCR a tiempo real determina el ciclo en el que el incremento de la fluorescencia, y por tanto de la concentración del amplicón, es logarítmico. Para cada una de las reacciones de PCR se obtuvo por un lado, un valor denominado ciclo umbral (Ct), que es el ciclo en el que la fluorescencia supera una línea umbral, y, por otro lado, una temperatura de fusión del amplicón. Se descartaron las reacciones cuya temperatura de fusión no coincidían con la establecida para cada gen (ver temperaturas en tabla 7). Se consideró que la expresión relativa de una determinada citocina era igual a 0, cuando no se observaba amplificación en la reacción de PCR.

Para el análisis de los datos se empleó el método descrito por Peirson y cols. (2003), que permitía realizar una cuantificación relativa de la expresión de los genes que codificaban para las citocinas, basándose en uno de los principios claves de la PCR a tiempo real: “la

acumulación de la fluorescencia es proporcional al producto de amplificación”.

Los resultados de cuantificación se expresaban con un valor  $R_0$  que se calculaba en base a la ecuación  $R_0 = R_{Ct} \times (1 + E)^{-Ct}$ , siendo  $R_{Ct}$  la fluorescencia en el ciclo umbral,  $E$  el valor de la eficiencia de la reacción y  $Ct$  el ciclo umbral. Para normalizar los resultados se dividieron por el valor  $R_0$  obtenido para los genes esenciales.

La eficiencia de la reacción se calculó con el programa LinRegPCR (Ramackers C. 2003) que obtenía una ecuación que relacionaba el logaritmo de la intensidad de fluorescencia con el número de ciclos, siendo la eficiencia la pendiente de dicha ecuación. La fluorescencia de los ciclos se obtuvo mediante la aplicación del programa ExtractPCR (Eppendorf).

### 21.4. Análisis estadístico

Se realizaron dos análisis comparativos de la expresión de citocinas en los órganos ya

citados: uno entre los distintos grupos del estudio, y el otro, para comparar la expresión en los cerdos que murieron como consecuencia de la infección con una DL de *H. parasuis*, con la de los cerdos supervivientes.

Los resultados se sometieron al test de Shapiro-Wilk para determinar su ajuste a una distribución normal y al test de Levene para comprobar su homocedasticidad; al no cumplir ninguna de estas dos premisas, se utilizó el test de Kruskal-Wallis para comparar los resultados de los diferentes grupos tratados en su conjunto. Como observamos diferencias entre los grupos, se utilizó la prueba *U* de Mann-Whitney para compararlos de forma pareada.

## 22. Respuesta *in vitro*

Para el estudio de la respuesta *in vitro* frente a *H. parasuis*, se realizaron pruebas de proliferación en sangre completa en respuesta a tres inductores: bacteria inactivada, sobrenadantes enriquecidos en TbpB y la proteína recombinante que contenía los 102 primeros aminoácidos de la TbpB (TbpB-His) (del Río, 2004).

### 22.1. Inactivación bacteriana por calor

La inactivación bacteriana por calor se realizó a partir de diez placas de agar chocolate que habían sido sembradas con 50 µl de la cepa Nagasaki, del serotipo 5 de *H. parasuis* durante 24-36 horas a 37 °C, en atmósfera microaerófila (5 % de CO<sub>2</sub>). El crecimiento de las placas se recogió mediante la adición por placa de 10 ml de RPMI 1640, y se transfirió a un matraz estéril, del que se tomó una alícuota

para efectuar el recuento de UFC. La suspensión obtenida, a partir del crecimiento de estas diez placas, se dividió en alícuotas de 3 ml, que fueron centrifugándose a 1200 xg durante 10 minutos. Se eliminaron los sobrenadantes, los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 1ml de PBS estéril sin calcio ni magnesio, y posteriormente fueron inactivados en un baño a 80 °C durante 5 minutos. Todas las muestras obtenidas se conservaron hasta su uso a 4 °C.

### 22.2. Pruebas de proliferación en sangre completa

#### 22.2.1. Optimización de la concentración de los inductores

Se utilizaron concentraciones diferentes de los inductores. Todas las pruebas se desarrollaron en placas de 96 pocillos con fondo en U (Nunc, Polysorp) y cada muestra de sangre se analizó por triplicado con cada uno de los inductores, añadiéndose, por pocillo, 100 µl de sangre a una dilución 1:30, y 100 µl de cada inductor a diferentes concentraciones (Tabla 13). Todas las diluciones fueron realizadas en medio de cultivo celular (ver apartado 2.2.1). Como control negativo se sustituyeron los inductores por medio de cultivo.

Una vez añadidos los inductores, las placas se incubaron en una estufa a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 3 días. Transcurrido ese tiempo se añadió la timidina marcada con tritio (Amhersam): se partió de un stock a una concentración de 5 mCi, que se diluyó 25 veces en medio completó. Se añadieron 25 µl de esta dilución por pocillo y se incubó durante



24 horas a 37 °C. Finalizada la incubación, las suspensiones celulares se recogieron en un *harvester* de pocillos (*Betaplate® 96 –well harvester*, Wallac, Pharmacia) que absorbía el contenido de cada pocillo, para pasarlo a unos filtros divididos en 96 cuadros, uno para cada pocillo (*Printer Filter Mat A*, Wallac Pharmacia). Los filtros se dejaron secar durante 20 minutos, y luego se introdujeron en bolsas de plástico (*Sample Bag*, Wallac, Pharmacia). Se añadieron 10 ml de líquido de centelleo en cada bolsa (*1205 betaplate liquid scintillation counter*, Amhersham), se sellaron y se dispusieron de forma individual en unos contenedores, que se introdujeron en un contador beta (*1209 Rackbeta Liquid Scintillation Counter*, Pharmacia, Sweeden). Para cada una de las muestras se obtuvo un

valor de cuentas por minuto (c.p.m.). Las pruebas se realizaron por duplicado.

### 22.2.2. Desarrollo de la prueba de proliferación

Una vez establecidas las concentraciones de los inductores, se procedió al desarrollo de la prueba de proliferación con dichas concentraciones. El proceso fue similar al ejecutado para la puesta a punto de la concentración, pero en este caso muestras se incubaron durante 5 días antes de la adición de la timidina marcada con tritio. Se calculó el índice de proliferación para cada inductor, dividiendo la media de las c.p.m. de los triplicados de una muestra en respuesta al inductor por la media de las c.p.m. de esa muestra en respuesta al medio.

Tabla 21. Concentración de los inductores

<b>Bacteria inactivada (UFC/ml)</b>	<b>Sobrenadantes enriquecidos en TbpB (µg/ml)</b>	<b>Proteína recombinante (µg/ml)</b>
6 x 10 <sup>8</sup>	300	210
3x 10 <sup>8</sup>	150	105
1,5 x 10 <sup>8</sup>	75	52,5
7,5 x 10 <sup>7</sup>	37,5	26,2
3,75 x 10 <sup>7</sup>	19	13,1
1,87 x 10 <sup>7</sup>	9,5	6,5
9,3 x 10 <sup>6</sup>	4,8	3,5
4,7 x 10 <sup>6</sup>	2,4	2



# RESULTADOS

# Capítulo I: Infecciones experimentales de ratones y cobayas con *Haemophilus parasuis*

## **1. Infecciones experimentales de ratones con *H. parasuis*.**

- 1.1 Vía intranasal
- 1.2. Vía intraperitoneal
- 1.3. Cálculo de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>)
- 1.4. Prueba de colonización y supervivencia bacteriana.

## **2. Infecciones experimentales de cobayas con *H. parasuis*.**

- 2.1. Vía intranasal e intraperitoneal
- 2.2. Vía intranasal, intraperitoneal e intratorácica

## 1. Infecciones experimentales de ratones con *Haemophilus parasuis*

### 1.1. Vía intranasal

Todos los animales sobrevivieron al desafío tras su inoculación con diferentes dosis de la bacteria, y sólo en el grupo inoculado con la dosis más alta ( $2 \times 10^9$  UFC) se observaron síntomas inespecíficos como el erizamiento del pelo junto con una ligera apatía, durante las primeras 12 horas. No fue posible aislar la bacteria de ninguno de los animales tras el sacrificio de los mismos, y tampoco se observaron lesiones al realizar la necropsia.

### 1.2. Vía intraperitoneal

Todos los animales sobrevivieron al desafío, con la excepción del grupo inoculado con la dosis más alta ( $2 \times 10^9$  UFC), en el que los 6 animales murieron durante las primeras 8 horas que siguieron a la inoculación, presentando una intensa congestión en la cavidad abdominal. El resto de los animales no presentó ninguna sintomatología y tampoco se observaron lesiones al practicarles la necropsia. Sólo se consiguió aislar la bacteria de la cavidad peritoneal de los 6 animales que murieron tras la inoculación con  $2 \times 10^9$  UFC.

### 1.3. Cálculo de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>)

En el caso de la vía intranasal no fue posible calcular la DL<sub>50</sub> debido a la falta de mortalidad tras la infección. Por lo que se refiere a la vía intraperitoneal, sólo murieron los animales inoculados con la dosis más elevada, y la DL<sub>50</sub> fue de  $6,32 \times 10^8$  UFC. El

hecho de que en estos animales la muerte se produjera de forma tan inmediata, podría indicar que las causas de la misma estarían relacionadas, bien con la elevada densidad del inóculo ( $DO_{600} = 3,12$ ) o bien con un shock endotóxico debido a la abundancia de LPS.

### 1.4. Prueba de colonización y supervivencia bacteriana

Cuatro horas después de la inoculación de la bacteria en la cavidad nasal, se consiguió su aislamiento a partir de hisopos pulmonares de los tres animales infectados. Se obtuvo un crecimiento bacteriano abundante, repartido por toda la placa. A las seis horas los resultados fueron similares, pero dos horas más tarde, también se aisló la bacteria en el bazo de dos ratones, aunque en cantidades muy pequeñas (20 y 30 colonias por placa). Estos resultados se repitieron a las diez horas. Doce horas después de su inoculación, la bacteria fue eliminada del bazo, pero persistió en los pulmones, de 2 de los 3 animales aunque sólo se encontraron 30-40 colonias por placa. Finalmente a las 24 horas la bacteria fue eliminada completamente tanto del bazo como del pulmón.

## 2. Infecciones experimentales de cobayas con *Haemophilus parasuis*.

### 2.1. Vía intranasal e intraperitoneal

Se establecieron dos grupos de 4 animales, el primero fue inoculado por vía intraperitoneal (grupo I) y el segundo por vía intranasal (grupo II). En los dos grupos, uno de los animales se marcó como control negativo y

se inoculó con RPMI estéril. Cada uno de los 3 animales de prueba se inoculó con una dosis:  $10^8$ ,  $10^9$  y  $10^{10}$  UFC de *H. parasuis*, serotipo 5 (cepa Nagasaki).

Los animales permanecieron bajo el efecto de la anestesia hasta cuatro horas después de la inoculación. En ese momento, los dos cobayos del grupo I inoculados con las dosis más altas,  $10^{10}$  y  $10^9$  UFC, aparecían letárgicos y sin apetito. Dos horas más tarde, aunque empezaron a comer seguían ligeramente apáticos y febriles, con el pelo erizado. El animal restante del grupo I inoculado con la dosis más baja ( $10^8$  UFC), los tres cobayas del grupo II y los controles negativos no presentaron ninguna sintomatología.

Entre las ocho y las 48 horas post-inoculación, no se observaron síntomas en ninguno de los animales, con la excepción del cobaya del grupo I inoculado con  $10^{10}$  UFC, que persistía con el mismo cuadro. En los tres días siguientes, la sintomatología desapareció también en este animal.

La única lesión observada en la necropsia de los animales del grupo I fue una ligera congestión en los vasos mesentéricos, que en el caso de los inoculados con las dosis más altas, se encontraba acompañada por el depósito de una pequeña cantidad de fibrina en las serosas viscerales. En cualquier caso se trataba de lesiones inespecíficas que probablemente pudieron ser consecuencia de la eutanasia. En el grupo II, el animal inoculado con  $10^{10}$  UFC presentaba una ligera congestión en los vasos mesentéricos. Tampoco se observaron lesiones en los otros dos animales de este grupo, ni en los cobayas controles.

Con el análisis microbiológico el escaso número de colonias obtenido, resultó siempre inespecífico al confirmarse mediante cultivo en agar sangre con una estría nodriza de *Staphylococcus* sp que en ningún caso se trataba de *H. parasuis*.

## **2.2. Vía intranasal, intraperitoneal e intratorácica.**

Se trabajó con tres grupos de 4 animales: el grupo I fue inoculado por vía intranasal; el II, por vía intraperitoneal y el III, por vía intratorácica. En cada uno de los grupos uno de los animales se marcó como control negativo y se inoculó con RPMI estéril, dos se inocularon con  $10^{10}$  UFC y el restante con  $10^9$  UFC.

A las dos horas, todos los animales despertaron de la anestesia, aunque seguían ligeramente aturridos. Cuatro horas después de la inoculación se observaron las siguientes incidencias: en el grupo I, solo los dos animales que recibieron  $10^{10}$  UFC permanecían letárgicos y sin apetito; en el grupo II, los tres animales inoculados, independientemente de la dosis, presentaban un mismo cuadro sintomático caracterizado por postración, apatía, erizamiento del pelo, ausencia de apetito y dolor abdominal; y en el grupo III la sintomatología era similar a la descrita en el grupo II, sin presencia de dolor abdominal. Ninguno de los controles, ni tampoco el cobaya del grupo I inoculado con  $10^9$  UFC presentaron síntomas.

Estos hallazgos se repitieron a las 12 horas, pero a las 24, el cuadro sintomático sólo persistió en los cobayas del grupo II inoculados  $10^{10}$  UFC y en los tres animales

inoculados por vía intratorácica. Dos días después de la inoculación, no se observaron cambios respecto a los días anteriores, salvo por una ligera mejoría en los tres animales del grupo III, que ya empezaron a comer y beber. En los días siguientes, únicamente los animales de los grupos II y III, que fueron inoculados con  $10^{10}$  UFC, permanecían con el pelo erizado, y con una ligera apatía, aunque el apetito era normal. A los cinco días habían desaparecido todos los síntomas en todos los animales.

En la necropsia se puso de manifiesto la ausencia de lesiones en los tres controles negativos, con la excepción de una ligera congestión en la cavidad torácica debida al efecto del eutanásico. En el grupo I, sólo se

encontró un pequeño foco de consolidación en el lóbulo caudal derecho del pulmón de uno de los animales inoculados con  $10^{10}$  UFC, junto con una leve congestión generalizada en los tres animales. En el grupo II, los animales inoculados con la dosis más alta ( $10^{10}$  UFC), presentaban una ligera ascitis acompañada de congestión en el mesenterio. En el grupo III, los tres animales inoculados presentaban una moderada congestión en la cavidad torácica y en el mesenterio. En todos los casos se trataba de lesiones inespecíficas que pudieron ser debidas al efecto del eutanásico

Con el análisis microbiológico, se confirmó la ausencia de *H. parasuis* en todos los animales utilizados en esta prueba.

# C pítulo II: Desarrollo de vacunas frente a *Haemophilus parasuis*

## **1. Desarrollo de una bacterina frente a la enfermedad de Gl sser**

1.1 Selección de cepas bacterianas. Pruebas de crecimiento.

1.1.1. Curvas de crecimiento con incubación est tica

1.1.2. Curvas de crecimiento con incubación dinámica

1.1.3. Curvas de crecimiento y cálculo del tiempo de generación

1.2. Inactivación bacteriana

1.2.1. Condiciones de inactivación

1.2.2. Degradación proteica en procesos de inactivación con formaldehido y thimerosal

1.3. Formulación vacunal

## **2. Desarrollo de una vacuna con OMPs frente a la enfermedad de Gl sser. Proteína TbpB**

2.1. Obtención de sobrenadantes con proteínas de membrana externa enriquecidos en TbpB.

2.2. Concentración de los sobrenadantes enriquecidos en TbpB.

2.2.1. Precipitación con ácido tricloroacético (TCA)

2.2.2. Ultrafiltración.

2.3. Inactivación

2.4. Formulación vacunal

## **3. Desarrollo de una vacuna recombinante frente a la enfermedad de Gl sser**

3.1. Expresión, purificación y concentración de la proteína PBAD-Thio-TbpB-V5-His

3.2. Inactivación

3.4 Formulación vacunal



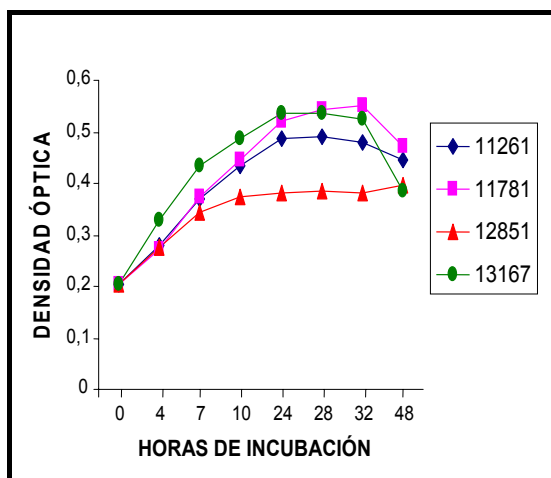
## 1. Desarrollo de una bacterina frente a la enfermedad de Glässer

### 1.1. Selección de cepas bacterianas. Pruebas de crecimiento

#### 1.1.1. Curvas de crecimiento con incubación estática

En el caso de las cepas pertenecientes al serotipo 5 (Figura 8), durante las primeras 4 horas de incubación, el crecimiento se encontraba en su fase de latencia y la DO de los cultivos bacterianos apenas sufrió incremento alguno. A partir de ese momento comenzó la fase logarítmica, con DO crecientes, alcanzándose valores máximos a las 24 horas, que se mantuvieron hasta el final de la prueba. A las 48 horas, los cultivos bacterianos con las DO más elevadas fueron los pertenecientes a las cepas 11261 y 11781 con valores de 0,447 y 0,471, respectivamente.

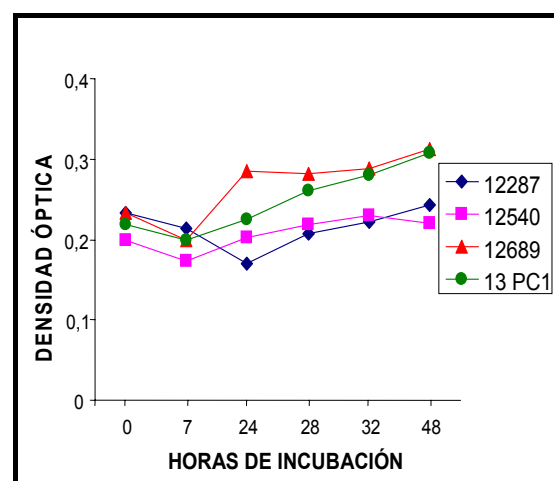
Figura 8. Crecimiento de 4 cepas del serotipo 5 de *H. parasuis*



En el estudio del crecimiento de las cepas del serotipo 4, únicamente en las cepas 12689 y 13 PC1 se observó un incremento de la DO

reseñable, a partir de las 24 horas, momento en el que las dos cepas entraron en la fase logarítmica. Los valores de DO más elevados se alcanzaron a las 48 horas, cuando finalizó la prueba. En el caso de las otras dos cepas, la DO apenas se modificó durante todo el estudio aunque a las 48 horas presentaron valores ligeramente superiores a los del inicio (Figura 9).

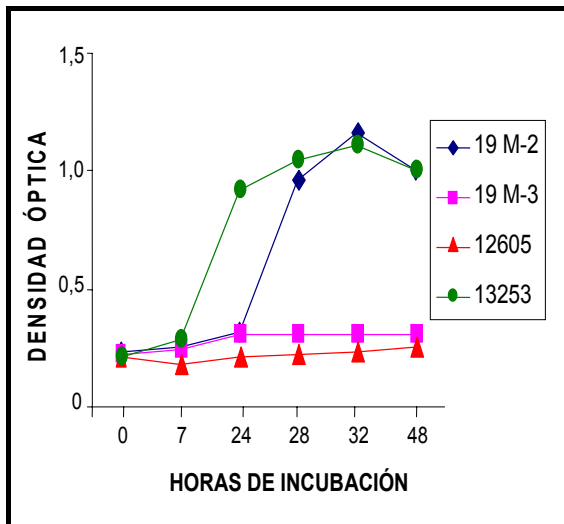
Figura 9. Crecimiento de 4 cepas del serotipo 4 de *H. parasuis*



Con respecto al serotipo 2, las diferencias de crecimiento entre las cepas fueron notables, de tal forma que dos cepas, la 19 M-2 y la 13253, llegaron a alcanzar DO superiores a 1 a las 32 horas de incubación, mientras que los cultivos de las cepas 19 M-3 y la 12605 solo presentaban densidades ópticas de 0,310 y 0,230. A las 7 horas de incubación la DO había aumentado ligeramente en las 4 cepas respecto a la medición inicial, la cepa 13253 entró en fase logarítmica y la cepa 19 M-2 lo hizo a partir de las 24 hasta las 32 horas, momento en el que las dos cepas comenzaron la fase estacionaria. En cambio, en el caso de las cepas 19 M-3 y 12605 apenas se observó

modificación de la DO durante el transcurso de la prueba (Figura 10).

Figura 10. Crecimiento de 4 cepas del serotipo 2 de *H. parasuis*

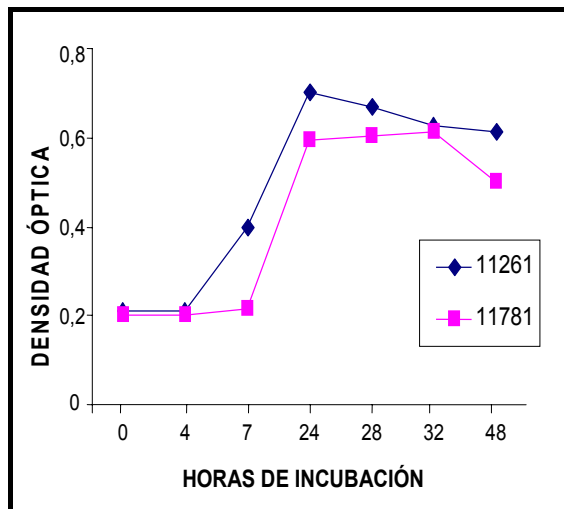


### 1.1.2. Curvas de crecimiento con incubación dinámica.

Se llevaron a cabo con las cepas que alcanzaron los valores de DO más elevados durante la incubación estática: cepas 11261 y 11781 (serotipo 5), cepas 12689 y 13 PC1 (serotipo 4) y cepas 19M-2 y 13253 (serotipo 2). Las DO alcanzadas por las cepas tras el proceso de incubación dinámica fueron superiores a las observadas durante la incubación estática.

Con respecto al serotipo 5, la cepa 11261 alcanzó los valores de DO más elevados durante la fase logarítmica (superiores a 0,6), que comenzó a partir de las 4 horas de incubación, mientras que la 11781 no entró en crecimiento logarítmico hasta a las 7 horas de incubación (Figura 11).

Figura 11. Crecimiento de 2 cepas del serotipo 5 de *H. parasuis*



Las cepas del serotipo 4 presentaron diferencias evidentes en su crecimiento durante los procesos de incubación dinámica, de tal forma que en la cepa 13 PC1 el crecimiento logarítmico se iniciaba de forma muy temprana, antes de las 4 horas de incubación, alcanzando valores de DO máximos a las 7 horas. Entre las 7 y las 10 horas, la DO permaneció constante (fase estacionaria). La fase de declinación comenzó a las 10 horas, con DO que fueron disminuyendo hasta el final de la prueba. Por su parte, la cepa 12689 presentó una fase de latencia de mayor duración (hasta 10 horas), entre las 10 y las 24 horas entró en fase logarítmica (alcanzando valores máximos de DO de 0,4), y finalmente se situó en la fase estacionaria entre las 24 y 34 horas (Figura 12). A partir de las 34 horas comenzó la fase de declinación.

En el estudio de las cepas del serotipo 2 se observó que la cepa 19 M-2 presentaba una fase de latencia de 4 horas, y a partir de ese momento entraba en fase logarítmica, mientras que en la cepa 13253 la fase de latencia se prolongó por espacio de 7 horas. Ambas cepas

alcanzaron valores máximos de DO a las 24 horas, que se mantuvieron hasta el final de la prueba, a las 34 horas de incubación, por lo que los cultivos se encontraban en la fase estacionaria del crecimiento. No obstante, la DO de la cepa 19 M-2 fue superior, con valores próximos a 0,8, mientras que la cepa 13253 sólo alcanzó valores cercanos a 0,7 (Figura 13)

Figura. 12. Crecimiento de 2 cepas del serotipo 4 de *H. parasuis*

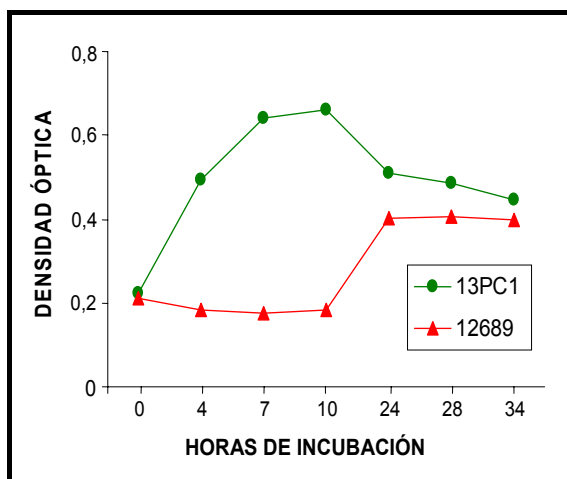
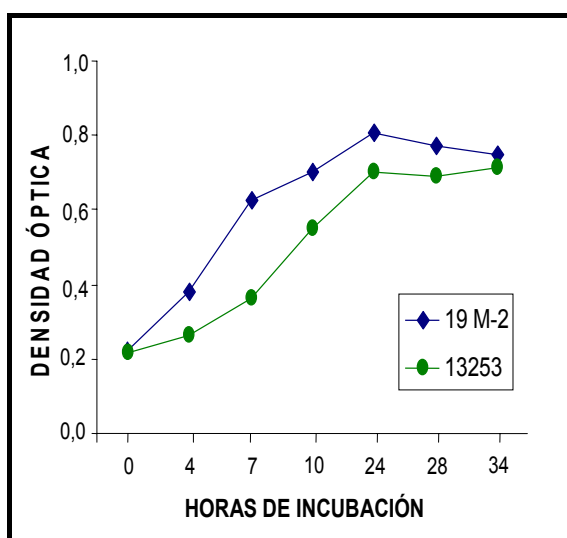


Figura. 13. Crecimiento de 2 cepas del serotipo 2 de *H. parasuis*



### 1.1.3. Curvas de crecimiento y cálculo del tiempo de generación.

Se seleccionaron las cepas 11261 del serotipo 5, 13 PC1 del serotipo 4 y 19 M-2 del serotipo 1, que fueron las que alcanzaron antes la fase logarítmica con los valores de DO más elevados. Para estas tres cepas se trazaron curvas de crecimiento que relacionaban el tiempo de incubación (en abscisas) con el logaritmo del número de UFC (en ordenadas). Para las tres cepas se calculó el tiempo de generación. Los resultados se recogen en la Tabla 22 y en la Figura 14.

De acuerdo con los valores de la Tabla 14, en las tres cepas ya se produce un incremento del número de UFC/ml a las 2 horas de incubación. Las cepas 11261 y 13 PC1 alcanzan los valores máximos a las 6 horas, mientras que la cepa 19 M2 lo hace a las 9 horas. Los tiempos de generación calculados fueron de 3,28 horas para la cepa 11261, de 1,88 horas para la cepa 13 PC 1 y de 1,78 horas para la cepa 19 M-2.

Fig. 14. Curvas de crecimiento de las cepas 11261, 13 PC 1 y 19 M2 de *H. parasuis*

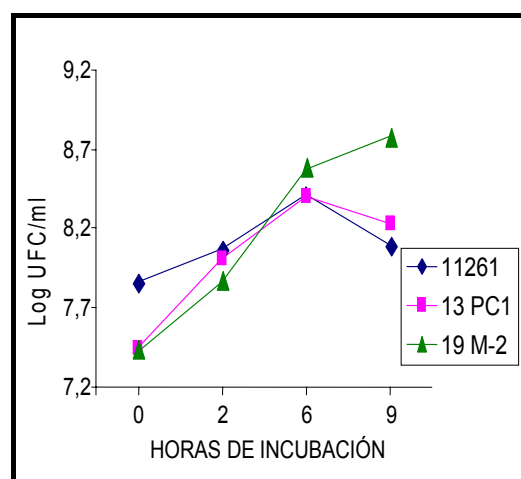


Tabla 22. Valores de UFC/ml ( $\times 10^7$ ) a diferentes tiempos de incubación

Tiempo (horas)	UFC/ ml		
	11261	13 PC1	19 M2
0	7,2	2,77	2,67
2	11,9	10,2	7,33
6	26	25,2	37,2
9	12,3	17	61

## 1.2. Inactivación bacteriana

### 1.2.1. Condiciones de inactivación

Las condiciones de inactivación para cada agente químico en estudio, se fijaron después de realizar las pruebas con la cepa 11261 del serotipo 5 de *H. parasuis*.

#### 1.2.1.1 Formaldehído (formol)

Los resultados obtenidos en las pruebas de inactivación con diferentes concentraciones de formaldehído a dos temperaturas y dos tiempos de incubación se resumen en las páginas siguientes, en las Tablas 23 A y B.

Se comprobó que con una concentración del 0,15 ‰ y un periodo de incubación de 6 horas a 37 °C, se obtenía crecimiento bacteriano (presencia de una o más colonias de *H. parasuis* por placa de ágar chocolate). Por encima de esta concentración la inactivación era total, con independencia de la temperatura y del tiempo de incubación (Tabla 23 A). Teniendo en cuenta estos resultados, se trató de fijar el tiempo mínimo de inactivación para las concentraciones inmediatamente superiores: 0,2, 0,25 y 0,5‰ (Tabla 23B). De esta forma se pudo deducir que con una concentración del 0,5 ‰, el límite de inactivación se sitúa en 2

horas a una temperatura de 40 °C, y en 5 horas a 37 °C. Cuando la concentración de formol es de 0,25 ‰ y la temperatura de 40 °C sólo se precisa de 3 horas para inactivar la totalidad de bacterias, mientras que a 37 °C se requieren más de 7 horas. Finalmente si la concentración es del 0,2 ‰, el límite de inactivación se sitúa en 4 horas a 40 °C y en más de 7 horas a 37 °C (Tabla 23 B).

#### 1.2.1.2. Thimerosal

En este caso, las pruebas de inactivación se realizaron con una única temperatura, la de 37 °C, la utilizada para el crecimiento óptimo de la bacteria, de esa forma se eliminaría el posible efecto degradante del calor. Los resultados se recogen en las páginas siguientes, en las tablas 24 A y B.

Resultaron necesarias concentraciones superiores al 0,01 ‰ que para que tuviera lugar la inactivación (Tabla 24 A), por lo que se estudió el efecto de estas concentraciones a diferentes tiempos de tratamiento. Estos resultados figuran en la Tabla 24 B, en la que se puede observar que el límite de inactivación con una concentración del 0,1 ‰ es de 2 horas, frente a las 3 necesarias cuando la concentración es del 0,02 ‰.

Tabla 23 A. Ensayos de inactivación de *H. parasuis* (serotipo 5) con formaldehído (I).

Concentración	Temperatura	Tiempo	Crecimiento bacteriano
5‰	37°C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
	40 °C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
3‰	37°C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
	40 °C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
1‰	37°C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
	40 °C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
0,5‰	37°C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
	40 °C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
0,25‰	37°C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
	40 °C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
0,2‰	37°C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
	40 °C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
0,15‰	37°C	6 h	Presente
		7 h	Ausente
	40 °C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
0,1‰	37°C	6 h	Presente
		7 h	Ausente
	40 °C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
0,05‰	37°C	6 h	Presente
		7 h	Presente
	40 °C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
0,025‰	37°C	6 h	Presente
		7 h	Presente
	40 °C	6 h	Presente
		7 h	Ausente

Resultados

Tabla 23 B. Ensayos de inactivación de *H. parasuis* (serotipo 5) con formaldehído (II).

Concentración →	0,5‰		0,25‰		0.2‰	
	37°C	40°C	37°C	40°C	37°C	40°C
Tiempo						
1 h	+++	+++	++++	++++	++++	++++
2 h	++	-	+++	++	++++	+++
3 h	+	-	+++	-	++++	1
4 h	3	-	++	-	+++	-
5 h	-	-	+	-	++	-
6 h	-	-	19	-	+	-
7 h	-	-	1	-	4	-

Las cruces representan la cantidad de crecimiento, los valores numéricos, el número de colonias aisladas por placa y el signo -, la ausencia de crecimiento bacteriano

Tabla 24 A. Ensayos de inactivación de *H. parasuis* (serotipo 5) con Thimerosal (I).

Concentración	Temperatura	Tiempo	Crecimiento
0,1‰	37°C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
0,02‰	37°C	6 h	Ausente
		7 h	Ausente
0,01‰	37°C	6 h	Presente
		7 h	Presente
0,005‰	37°C	6 h	Presente
		7 h	Presente
0,002‰	37°C	6 h	Presente
		7 h	Presente
0,001‰	37°C	6 h	Presente
		7 h	Presente

Tabla 24 B. Ensayos de inactivación de *H. parasuis* (serotipo 5) con Thimerosal (II).

Concentración →	0,1‰	0,02‰
Tiempo		
1 h	+	++
2 h	-	2 colonias
3 h	-	-
4 h	-	-
5 h	-	-
6 h	-	-
7 h	-	-

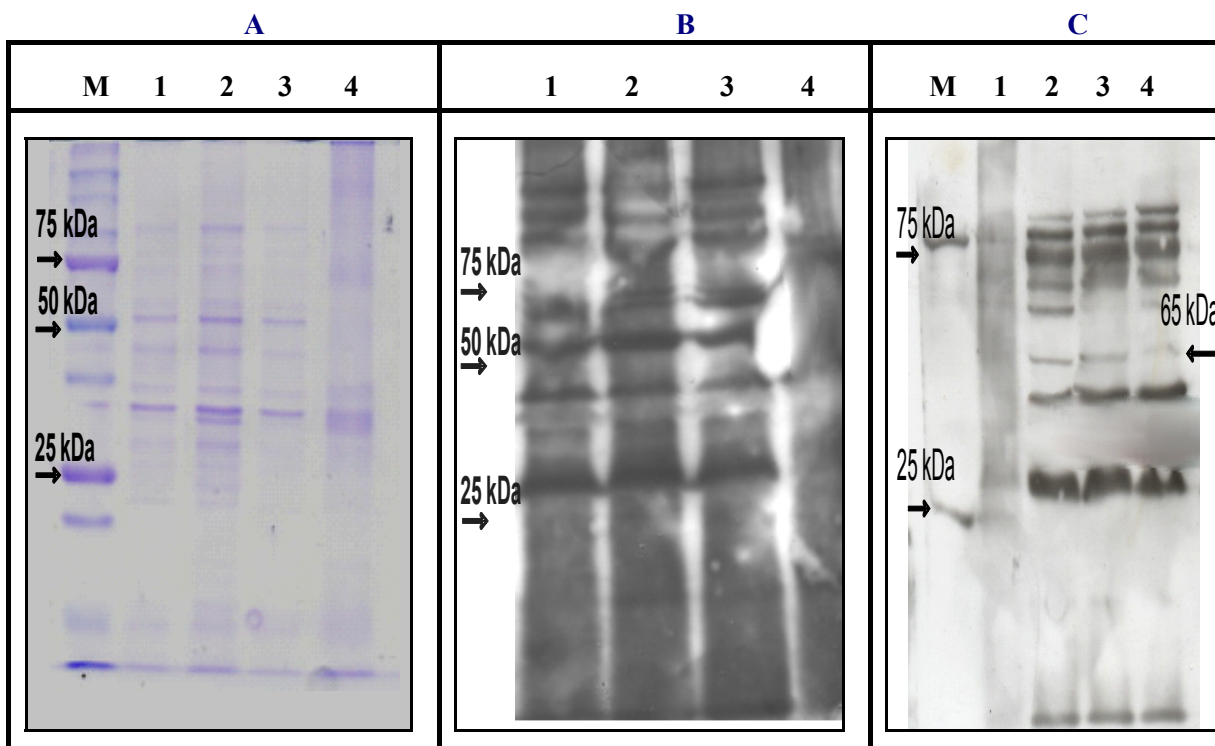
Las cruces representan la cantidad de crecimiento, los valores numéricos, el número de colonias aisladas por placa y el signo - la ausencia de crecimiento bacteriano

### 1.2.2. Degradación proteica en procesos de inactivación con formaldehído y thimerosal

Se comparó el efecto que producen los inactivantes, formol al 0,5 ‰ y el thimerosal al 0,1 ‰ y al 0,02‰, en la composición proteica de la bacteria. Se eligieron estas concentraciones en función de los resultados obtenidos en los ensayos de inactivación.

Un cultivo estándar de *H. parasuis* (serotipo 5) fue inactivado a 37°C durante 5 horas con formaldehído, 3 horas con thimerosal al 0,02 ‰ y 2 horas con thimerosal al 0,1 ‰. Transcurridos estos tiempos, se mantuvieron a 4 °C durante toda la noche. El efecto de los inactivantes sobre las proteínas se comparó con una muestra del sedimento bacteriano sin tratar.

**Figura 15. SDS-PAGE con sedimentos bacterianos.** **A)** Tinción con azul de Coomassie: M, marcador de peso molecular; **1**, sedimento bacteriano sin tratar; **2**, tratado con thimerosal al 0,1‰; **3**, tratado con thimerosal al 0,02‰; **4**, tratado con formol al 0,5‰. **B)** Immunoblotting con suero cerdo convaleciente: **1**, sedimento bacteriano sin tratar; **2**, tratado con thimerosal 0,1‰; **3**, tratado con thimerosal 0,02‰; **4**, tratado con formol al 0,5‰. **C)** Immunoblotting con antisuero policlonal-TbpB: M, marcador de peso molecular; **1**, tratado formol al 0,5‰; **2** y **3**, tratado con thimerosal 0,1‰; y **4**, sedimento bacteriano sin tratar.



## Resultados

Los resultados se pueden observar en las Figuras 15 A, B y C. En la primera de ellas aparecen la totalidad de las proteínas del sedimento bacteriano teñidas con azul de Coomasie y se aprecia cómo después del tratamiento con formol (carril 4) las bandas de proteínas aparecen difuminadas y sólo se logra distinguir más nítidamente las correspondientes a los 35 y 50 kDa, en torno a los 75 kDa y por encima de los 75 kDa. El efecto degradante del thimerosal sobre las proteínas resultó menor, de tal forma que si se comparan los carriles 2 y 3 (contienen las muestras inactivadas con thimerosal al 0,1 ‰ y 0,02 ‰, respectivamente) con el carril 1 (contiene la muestra sin tratar), se aprecia cómo los perfiles proteicos resultaron similares, especialmente en el caso de la concentración 0,1 ‰, puesto que con 0,02 ‰ de thimerosal las bandas por debajo de 37 kDa, no se distinguen con tanta nitidez.

El análisis de las muestras con suero de cerdo convaleciente (Figura. 15.B), puso de manifiesto de nuevo que en el sedimento inactivado con formol (carril 4) no se observaba el mismo perfil proteico que en aquel otro sin inactivar (carril 1), y sólo aparecían algunas bandas muy difuminadas. En cambio, las muestras tratadas con thimerosal al 0,1 ‰ (carril 2) y al 0,02 ‰ (carril 3) presentaban un patrón de proteínas muy similar al del sedimento sin tratar (carril 1). Finalmente cuando se analizaron con el antisuero policlonal frente a la proteína TbpB (Figura. 15 C), la banda de 65 kDa, correspondiente a esta proteína, aparecía tanto en las muestras tratadas con thimerosal

(carriles 2 y 3) como en aquellas sin inactivar (carril 4), mientras que apenas se pudieron distinguir bandas de proteínas en los sedimentos inactivados con formol (carril 1).

### 1.3. Formulación vacunal

En virtud de los resultados obtenidos en las pruebas de crecimiento se emplearon las cepas 11261, 13 PC1 y 19 M2 cultivadas mediante incubación dinámica. Una vez alcanzada la fase logarítmica, se tomaron alícuotas que se sembraron en agar chocolate. Se prepararon suspensiones bacterianas en PBS estéril y se inactivaron con thimerosal al 0,1 ‰, durante 2 horas a 37 °C, y posteriormente durante toda la noche a 4 °C, según los resultados obtenidos en las pruebas de inactivación.

## 2. Desarrollo de una vacuna con proteínas de membrana externa frente a la enfermedad de Glässer. Proteína TbpB

Para la obtención de los antígenos que constituirían esta vacuna, fue necesario optimizar las condiciones de extracción de los sobrenadantes proteicos enriquecidos en TbpB. Se determinó la concentración de detergente (deoxicolato sódico, DOC) que permitía la solubilización de la totalidad de las proteínas de membrana externa (OMPs) sin alterar su estructura. Finalmente, fue preciso comprobar que la proteína TbpB no se degradaba durante los procesos de filtración, ultrafiltración e inactivación a los que fue sometida.



## 2.1. Obtención de sobrenadantes con OMPs enriquecidos en TbpB

Para visualizar la concentración de la TbpB en los sobrenadantes proteicos, se empleó un antisuero policlonal generado frente a la proteína pGEX-6P-1-GST-TbpB, de tal forma que se obtuvo una banda de 65 kDa correspondiente a la proteína TbpB, cuyo grosor aumentaba de forma directamente proporcional a la concentración de DOC añadida. No obstante a partir de una concentración del 0,075 %, la cantidad de TbpB permaneció constante, por lo que se consideró que con esta concentración se liberaría la totalidad de esta proteína (Figuras 16 y 17).

Para comprobar la estabilidad de la membrana externa tras la adición de DOC, se analizó la presencia o ausencia de proteínas integrales de membrana como la TbpA, en los sobrenadantes obtenidos con las concentraciones de DOC que permitían la solubilización de la totalidad de la TbpB (0,075 %, 0,1 %, 0,15 %, 0,05 %). A tal efecto, los sobrenadantes se analizaron por *immunoblotting* con el anticuerpo policlonal el pGEX-5X-GST-

TbpA, frente a la proteína TbpA de *A.pleuropneumoniae* y como controles positivos de expresión de esta proteína se utilizaron sedimentos bacterianos. Tal y como se observa en la Figura 18, en los sobrenadantes extraídos con concentraciones de detergente superiores al 0,075 %, aparece una banda de 106 kDa, correspondiente a la proteína TbpA, similar a la que se observa en los sedimentos bacterianos, lo que pone de manifiesto una alteración en la membrana externa. Por lo tanto, estas concentraciones se descartaron a la hora de obtener sobrenadantes constituidos exclusivamente por proteínas de la membrana externa.

Estos resultados se completaron con la medición de la concentración proteica en los sobrenadantes, que como era de esperar, aumentaba conforme se incrementaba la concentración de detergente añadida, especialmente cuando se utilizaban concentraciones superiores al 0,075 %, con las que, como se vio con anterioridad, también se liberaban proteínas integrales de membrana, como la TbpA. Las concentraciones obtenidas en  $\mu\text{g/ml}$  se resumen en la Tabla 25.

Tabla 25. Concentración proteica en los sobrenadantes extraídos con concentraciones de DOC (en  $\mu\text{g/ml}$ )

<b>DOC</b>	<b>0%</b>	<b>0,01%</b>	<b>0,015%</b>	<b>0,025%</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,075%</b>
<b>Proteína</b>	30,75	63,17	66,71	88,16	105,48	140,9
<b>DOC</b>	<b>0,1%</b>	<b>0,15%</b>	<b>0,25%</b>			
<b>Proteína</b>	202,3	240,8	289,78			

## Resultados

Figura 16. *Immunoblotting* con antisuero policlonal de conejo frente a la proteína de fusión pGEX-6P-1-GST-TbpB del serotipo 5 de *H. parasuis*. Se muestra la concentración de la proteína TbpB tras la adición de diferentes concentraciones de detergente. **1**: sin DOC; **2**: con DOC al 0,01%; **3** con DOC al 0,015%; **4** con DOC al 0,025%; **5** con DOC al 0,05%, **6** con DOC al 0,075% y **7** con DOC 0,1%.

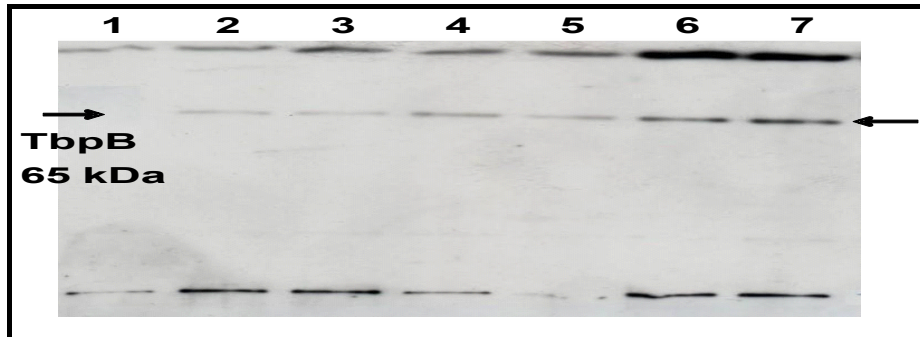


Figura 17. *Immunoblotting* con el antisuero policlonal de conejo frente a la proteína de fusión pGEX-6P-1-GST-TbpB del serotipo 5 de *H. parasuis*. Se muestra la concentración de la proteína TbpB tras la adición de diferentes concentraciones de detergente. **1**: con DOC 0,075%; **2** con DOC al 0,1%; **3** con DOC al 0,15% y **4** con DOC al 0,05%.

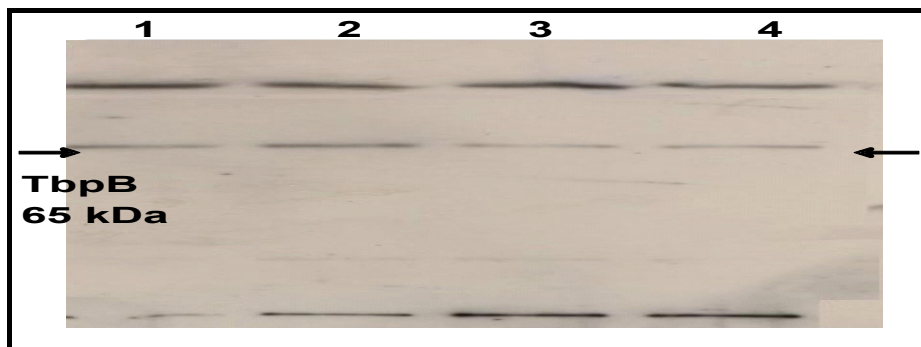
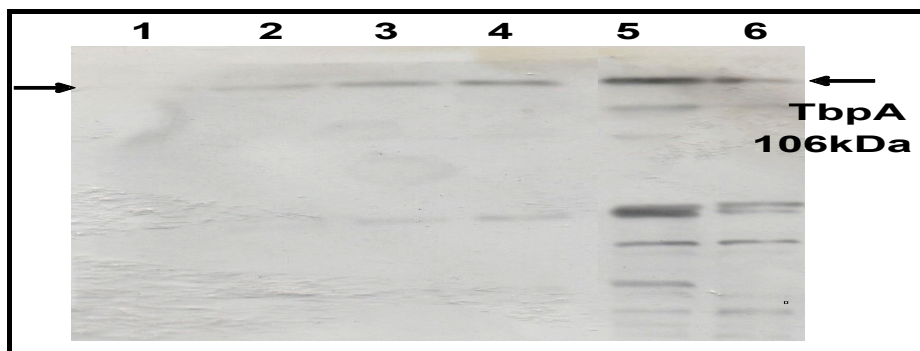


Figura 18. *Immunoblotting* con el antisuero policlonal anti-TbpA de *A. pleuropneumoniae*. Muestra la expresión de la proteína TbpA de *H. parasuis* en sedimentos bacterianos y en los sobrenadantes obtenidos tras la adición de diferentes concentraciones de DOC. **1**: con DOC al 0,075%, **2**: con DOC al 0,1%, **3**: con DOC al 0,15%, **4**: con DOC al 0,05%, **5** y **6**: Sedimentos bacterianos



## 2.2. Concentración de los sobrenadantes con OMPs

Con objeto de aumentar la concentración proteica de los sobrenadantes enriquecidos en TbpB, se sometieron a procesos de precipitación con ácido tricloroacético y de ultrafiltración. Los resultados de ambos procesos se valoraron con un ensayo de Bradford, y mediante un *immunoblotting* con el anticuerpo policlonal pGEX-6P-1-GST-TbpB.

### 2.2.1. Precipitación con ácido tricloroacético (TCA)

La concentración de proteínas en los sobrenadantes tras la adición del TCA se duplicaba, pasando de 98  $\mu\text{g/ml}$  a 188  $\mu\text{g/ml}$ . El análisis por *immunoblotting* puso de manifiesto que la banda de 65 kDa, correspondiente a la TbpB, aumentaba después

del proceso de precipitación, pero además aparecían bandas correspondientes a otras proteínas que previamente no se habían detectado (Figura 19); por tanto la presencia de estas proteínas también contribuía al incremento de la concentración observado.

### 2.2.2. Ultrafiltración

Tras realizar los procesos de ultrafiltración se observó un incremento notable en la concentración, con valores más de 10 veces superiores, pasando de una concentración inicial de 90  $\mu\text{g/ml}$  a otra de 970  $\mu\text{g/ml}$ . Estos resultados se corroboraron mediante *immunoblotting* (Figura 20), en el que se observaba cómo el grosor de la banda correspondiente a la TbpB (65 kDa) era claramente superior una vez realizada la ultrafiltración.

Figura 19. *Immunoblotting* con el antisuero policlonal de conejo frente a la proteína de fusión pGEX-6P-1-GST-TbpB del serotipo 5 de *H. parasuis*. Muestra la expresión de la proteína **TbpB** de *H. parasuis* en los sobrenadantes antes (1) y después (2) del proceso de precipitación con ácido tricloroacético

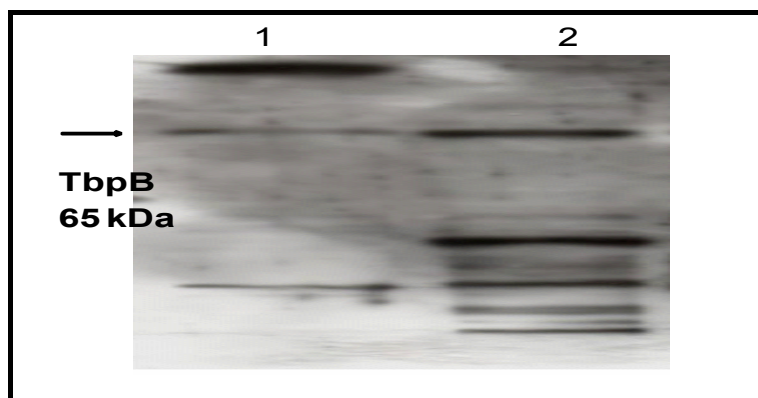
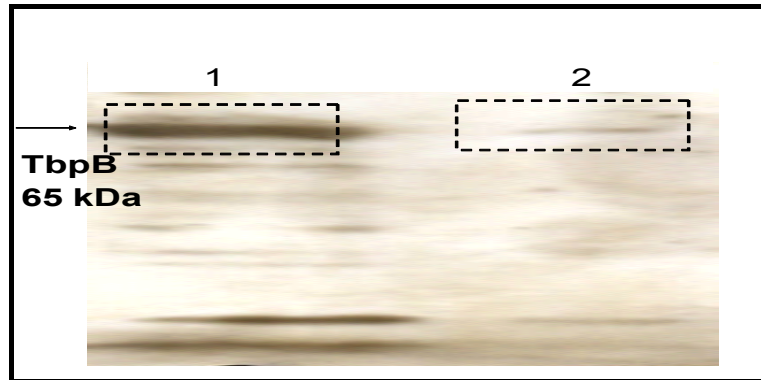


Figura 20. *Immunoblotting* con el antisuero policlonal de conejo frente a la proteína de fusión pGEX-6P-1-GST-TbpB del serotipo 5 de *H. parasuis*. Muestra la expresión de la proteína **TbpB** de *H. parasuis* en sobrenadantes antes (1) y después (2) del proceso de ultrafiltración.



### 2.3. Inactivación

La inactivación bacteriana comenzó con la filtración inicial de los sobrenadantes una vez concentradas las proteínas mediante ultrafiltración y finalmente se procedió a la inactivación química mediante la adición de thimerosal a la misma concentración y en las mismas condiciones que se describieron en el desarrollo de la bacterina (apartado 3.3 de Resultados). El análisis por *immunoblotting* de los sobrenadantes con el anticuerpo policlonal pGEX-6P-1-GST-TbpB puso de manifiesto

que la proteína TbpB no se alteraba tras la realización de estos procesos (Figura 21).

### 2.4. Formulación vacunal

Según lo expuesto en los apartados anteriores, la vacuna se formuló con los sobrenadantes enriquecidos en TbpB, extraídos con DOC al 0,075 %, concentrados por ultrafiltración y convenientemente inactivados con thimerosal.

Figura 21. *Immunoblotting* con el antisuero policlonal de conejo frente a la proteína de fusión pGEX-6P-1-GST-TbpB del serotipo 5 de *H. parasuis*. 1: Inactivación con thimerosal; 2: Filtración; 3. Ultrafiltración y 4. Sobrenadante sin inactivar.



### 3. Desarrollo de una vacuna recombinante frente a la enfermedad de Glässer

#### 3.1. Expresión, purificación y concentración de la proteína PBAD-Thio-TbpB-V5-His

Utilizando el anticuerpo monoclonal anti-V5, se analizó por *immunoblotting*, la presencia de la proteína recombinante TbpB, en los extractos eluidos de la cepa de *E. coli* con la construcción PBAD-Thio-TbpB-V5-His, tras la inducción de la expresión de la proteína recombinante con arabinosa y la posterior purificación de la misma con bolitas de agarosa unidas a níquel. En todos los extractos eluidos se comprobó la presencia de una banda de 27,3 kDa correspondiente a la proteína de fusión, y se conservó a -80 °C hasta la elaboración de la vacuna, momento en el cual se volvió a analizar por *immunoblotting* para comprobar que la proteína no se había degradado

Debido a la baja concentración obtenida en los extractos fue necesario someterlos a un proceso de ultrafiltración con el que se consiguió aumentar la concentración hasta 10

veces: así pues, concentraciones iniciales con una media de 70 µg/ml ± 30 se incrementaron hasta 773 µg/ml ± 150. Los productos de ultrafiltración también se analizaron por *immunoblotting*, comprobando que la proteína de fusión no se perdía o alteraba durante este proceso (Figura 22).

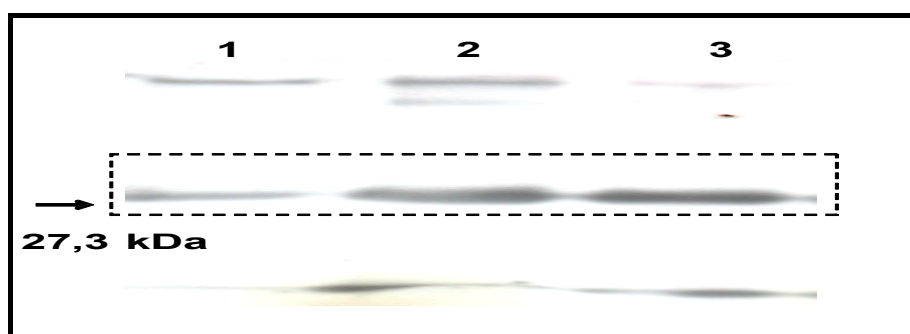
#### 3.2. Inactivación

Los procesos de inactivación se realizaron de la misma forma que con los sobrenadantes enriquecidos en TbpB (apartado 4.3 de Resultados) aunque en este caso se empleó el anticuerpo anti V5 en el análisis por *immunoblotting*. Los resultados fueron similares a los descritos en el apartado 4.3, de tal forma que la proteína no se degradó durante ninguno de los procesos de inactivación (Figura 18.)

#### 3.3. Formulación de la vacuna

La vacuna se preparó con los extractos eluidos, concentrados por ultrafiltración y debidamente inactivados.

Figura 22. *Immunoblotting* con el anticuerpo monoclonal anti-V5 que identifica el epítipo V5 presente en la proteína de fusión pBAD-Thio-TbpB-V5-His. **1.** Extracto eluido, **2.** Extracto eluido y concentrado por ultrafiltración, **3.** Extracto concentrado e inactivado



# Capítulo III: Estudios de inmunización e infección con *H. parasuis* en cerdos: hallazgos clínicos, microbiológicos y anatomopatológicos

## **1. Inmunización e infección de cerdos con *H. parasuis***

1.1 Cerdos privados de calostro.

1.1.1. Infección con DL de  $5 \times 10^9$  UFC (grupo I)

1.1.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL.

1.1.3. Inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL

1.1.4. Inmunización con una vacuna recombinante y posterior infección con una DL

1.1.5. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL

1.2. Cerdos criados de forma convencional

1.2.1. Inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL

1.2.2. Inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL

## **2. Análisis microbiológico**

2.1 Cerdos privados de calostro.

2.1.1. Infección con DL de  $5 \times 10^9$  UFC (grupo I)

2.1.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL.

2.1.3. Inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL

2.1.4. Inmunización con una vacuna recombinante y posterior infección con una DL

2.1.5. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL

2.2. Cerdos criados de forma convencional

2.2.1. Inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL

2.2.2. Inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL

## **3. Estudio anatomopatológico**

2.1 Cerdos privados de calostro.

2.1.1. Infección con DL de  $5 \times 10^9$  UFC (grupo I)

2.1.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL.

2.1.3. Inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL

2.1.4. Inmunización con una vacuna recombinante y posterior infección con una DL

2.1.5. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL

2.2. Cerdos criados de forma convencional

2.2.1. Inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL

2.2.2. Inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL

## 1. Inmunización e infección de cerdos con *H. parasuis*

Todas las pruebas se realizaron con la cepa Nagasaki (referencia del serotipo 5 de *H. parasuis*). En el Anexo I se recogen las temperaturas de cada animal durante todo el estudio.

### 1.1. Cerdos privados de calostro

#### 1.1.1. Infección con DL de $5 \times 10^9$ UFC (grupo I)

Transcurridas seis horas después de la inoculación de las bacterias, se observaron los primeros síntomas: los animales comenzaron a toser, a emitir secreción, y dos de los cinco cerdos aparecieron postrados. A las 12 horas todos los animales permanecían postrados, con apatía, hipertermia y graves problemas respiratorios (disnea). A las 24 horas, se produjo la muerte de dos cerdos y los dos que sobrevivieron continuaron con el mismo cuadro clínico. Uno de estos animales murió a los 3 días, mientras que el otro presentó una ligera recuperación, puesto que recuperó el apetito, pero murió a los seis días después del desafío.

#### 1.1.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL (grupo II)

Tras la administración de la bacterina no se observaron reacciones adversas en los animales, ni tampoco de hipersensibilidad en el punto de administración. Los cinco animales pertenecientes a este grupo sobrevivieron al desafío y fueron sacrificados 15 días después.

Ninguno de ellos presentó sintomatología, salvo una ligera apatía e hipertermia que comenzaron 12 horas después de la inoculación y desaparecieron a las 24 horas.

#### 1.1.3 Inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL (grupo III)

La administración de la vacuna con OMPs no produjo ninguna reacción adversa en los animales. Uno de los cerdos (cerdo nº 6), 5 días antes del desafío, apareció apático, postrado, con hipertermia y presentaba un descenso notable del peso corporal, pero no se le administró ningún tratamiento para que no interfiriese con el desafío. La respuesta de los animales al desafío presentó diferencias individuales (independientemente del cerdo nº 6, que murió a las 48 horas post-inoculación) y sólo la mitad de los animales sobrevivieron al mismo. Así pues, seis horas después del desafío, dos de los animales (los cerdos nº 6 y 7), aparecían postrados con dificultad respiratoria. Esta situación también se observó a las 12 horas, y además todos los animales presentaban hipertermia, no tan marcada en el caso de los dos cerdos que sobrevivieron. A las 24 horas aparece un nuevo animal postrado (cerdo nº 9), con problemas respiratorios similares a los observados previamente en los cerdos nº 6 y 7, que murieron al día siguiente, un día después murió el cerdo nº 9. Por el contrario, los cerdos que sobrevivieron, transcurridas 24 horas después de la inoculación de la bacteria, no presentaban ninguna sintomatología y la temperatura descendió a valores normales.

#### 1.1.4 Inmunización con una vacuna recombinante y posterior infección con una DL (grupo IV)

La vacunación y revacunación se realizaron sin incidencias dignas de mención y ninguno de los animales presentó reacciones adversas. Tras la infección con la dosis letal, se observó un cuadro clínico sobreagudo en todo el grupo, que se resolvió con la muerte de los 5 animales, entre las 12 y 24 horas post-inoculación. Así, a las seis horas, empezaron a observarse las primeras reacciones en los animales, que aparecían postrados, con toses, vómitos, y una grave dificultad respiratoria. Esta sintomatología se mantuvo a las 12 horas acompañada de una hipertermia acusada.

#### 1.1.5. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL (grupo V)

La exposición a una dosis subletal de  $10^5$  UFC/ml del agente no desencadenó ninguna sintomatología durante los diez días posteriores. Fue a partir de ese momento cuando cuatro de los cinco animales (cerdos n° 11, 12, 13, y 15), presentaron hipertermia, a lo que se unió la postración y falta de apetito de los tres primeros. Además, en el caso del cerdo n° 12 también se observaron convulsiones, ausencia de respuesta a estímulos e inflamación de las articulaciones, especialmente las del lado derecho. Se inició un tratamiento a todos los animales con una duración de 7 días, que consistió en la administración de doxaciolina (Calierdoxina®, Calier), junto con un antiinflamatorio (Tolfedine®, Vetoquinol). En el caso del cerdo n° 12, el tratamiento se suplementó con la

administración de un suero glucosado (Glucosal®, Divasa-Farmavic) y un complejo vitamínico (Duphalyte®, Fort- Dodge), para evitar la deshidratación. La eficacia del tratamiento se puso de manifiesto a las 24 horas, con la desaparición de las convulsiones en el cerdo n° 12 y la mejoría en los otros tres animales que recuperaron el apetito. Dos días después el cerdo n° 12 se levantó para empezar a comer, aunque su peso corporal había disminuido considerablemente. La administración del antiinflamatorio se suspendió a medida que se producía la desaparición de la sintomatología. Todos los animales se encontraban en condiciones normales sin sintomatología aparente el día del desafío. La infección con la DL de  $5 \times 10^9$  UFC, desencadenó diferentes respuestas entre los animales, y sólo tres de los cinco (cerdos n° 11, 12 y 15) sobrevivieron, sin apenas sintomatología salvo una ligera hipertermia, acompañada de tos y una leve dificultad respiratoria durante las primeras 24 horas post-infección, más acusada en el caso del cerdo n° 11 que además aparecía postrado. Por el contrario los animales que murieron tras el desafío (cerdos n° 13 y 14), sí presentaban un cuadro sintomático, más agudo en el caso del cerdo n° 14, que a las 12 horas apareció postrado, con hipertermia y una grave dificultad respiratoria, acompañada de incoordinación y ataxia. Este animal murió a las 24 horas post-inoculación. El cerdo n° 14 inicialmente (primeras 12 horas) presentó síntomas similares a los descritos para el cerdo n° 11, pero a diferencia de éste no se recuperó a las 24 horas, sino que permaneció postrado y murió a los 3 días post-infección.



## 1.2. Cerdos criados de forma convencional

### 1.2.1. Inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL (grupo VI)

No se observó ninguna incidencia derivada de la vacunación digna de mención, pero la aparición de lesiones de mal rojo a los ocho días de la primera vacunación, en uno de los animales del grupo inmunizado con la bacterina comercial B (se encontraban en la misma sala que estos animales) obligó a la administración de penicilina a todos los cerdos, con carácter preventivo, aunque ninguno de los tres cerdos de este grupo llegó a presentar las lesiones características de esta enfermedad. Tras el desafío con la DL, los animales presentaron sintomatología inespecífica, leve y poco duradera (12-24 horas), consistente únicamente en hipertermia y ligera apatía.

### 1.2.2. Inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL (grupo VII)

La vacunación tampoco provocó ninguna reacción adversa, pero uno de estos animales apareció con lesiones de mal rojo (como ya se ha indicado) por lo que se les administró penicilina. Las lesiones desaparecieron tras el tratamiento, y por tanto, en el momento del desafío ninguno de los animales presentaba sintomatología. La sintomatología derivada de la infección con una DL fue similar a la del grupo anterior.

## 2. Análisis microbiológico

Se realizó a partir de los hisopos procedentes de los cerdos que se utilizaron en las pruebas de inmunización y posterior infección con una DL y en la prueba de infección con una DL.

### 2.1. Cerdos privados de calostro

#### 2.1.1. Infección con una DL (grupo I)

Los aislamientos bacterianos fueron diferentes en los animales que murieron, de forma sobreaguda, a las 24 horas, respecto de los que sobrevivieron hasta dos y siete días post-infección. En el caso de los primeros se recuperó la bacteria diseminada por todo el organismo y en una concentración elevada (crecimiento en toda la placa de agar chocolate utilizada para sembrar el hisopo). Así, se confirmó la presencia de *H. parasuis* tanto en los fluidos corporales (sangre y líquidos pericárdico, peritoneal, torácico, cefalorraquídeo y articular) como en los diferentes órganos analizados (pulmón, corazón, bazo, hígado, cerebro y riñón). En los otros dos animales que permanecieron vivos más tiempo, la bacteria se aisló casi exclusivamente de los hisopos de los líquidos pericárdico, peritoneal y torácico, en una concentración similar a la observada en los otros dos cerdos; además en el caso del animal que murió a los dos días, también se aisló de cerebro, hígado y pulmón, con rendimientos de entre 1 y 4 colonias por placa.

### 2.1.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL (grupo II)

No se consiguió aislar *H. parasuis* de ninguno de los 5 animales de este grupo cuando se les sacrificó 15 días después de la infección.

### 2.1.3. Inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL (grupo III)

Sólo se pudo aislar *H. parasuis* de las muestras procedentes de los tres animales que murieron como consecuencia de la infección. Resultaron positivas las muestras procedentes del líquido pericárdico, torácico, ascítico y cefalorraquídeo, con crecimiento en masa distribuido por toda la placa de agar chocolate. En menor número, de 3 a 5 colonias por placa, se recuperaron de otros órganos como el bazo, pulmón, corazón, hígado, o riñones. La concentración bacteriana en estos aislamientos (al igual que lo descrito en el grupo I) disminuyó con el tiempo, siendo mayor en los dos cerdos que murieron a los dos días post-infección, que en el cerdo que murió a los tres días. En este último animal, los aislamientos se localizaron principalmente en las serosas, en la cavidad torácica sólo se consiguió aislar la bacteria a partir de la sangre obtenida por punción cardíaca; en la cavidad abdominal, a partir del hígado y, a diferencia de los otros dos cerdos, también se aisló del líquido articular (alrededor de 100 colonias por placa) y del cerebro (5 colonias por placa).

### 2.1.4. Inmunización con una vacuna recombinante y posterior infección con una DL (grupo IV)

Los resultados revelaron la abundante colonización de *H. parasuis* (crecimiento en toda la placa de agar chocolate) en la mayoría de los órganos, tejidos y fluidos de los 5 animales de este grupo. De forma general, se aisló la bacteria a partir de hisopos de sangre, líquidos pericárdico, torácico, peritoneal y cefalorraquídeo, así como de corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones y cerebro. En dos de los cinco animales también se aisló a partir de hisopos traqueales, mientras que en el resto no resultó posible su identificación debido al elevado número de bacterias contaminantes que crecieron en las placas. En uno de los animales, se aisló la bacteria en una concentración elevada a partir de los hisopos obtenidos del líquido articular.

### 2.1.5. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con DL (grupo V)

Al igual que lo descrito en los cerdos que habían sido inmunizados con la vacuna con OMPs, no se pudo aislar la bacteria en ninguno de los animales que sobrevivieron al desafío, pero si en cambio en los animales que murieron tras el mismo. La concentración bacteriana obtenida se reducía con el tiempo, siendo mayor en el animal que murió a las 24 horas post-infección con respecto al que lo hizo a las 48 horas. De nuevo las serosas se convirtieron en la principal localización de *H. parasuis*, de modo que la mayor cantidad de crecimiento se correspondía con las siembras efectuadas a partir de los líquidos torácico,

pericárdico y peritoneal. En menor número también se aisló la bacteria de sangre, pulmón y corazón, con una media de más de 100 colonias por placa. En la cavidad abdominal la bacteria se localizó en bazo, riñones e hígado, con un promedio de 1 y 10 colonias por placa. Sólo en uno de los animales fue posible confirmar la presencia de la bacteria en cerebro y líquido cefalorraquídeo, puesto que en el otro, el excesivo crecimiento de microorganismos contaminantes impidió la identificación de *H. parasuis*.

## 2.2. Cerdos criados de forma convencional.

No se identificó la presencia de *H. parasuis* en ninguna de las muestras procedentes de los grupos de cerdos criados de forma convencional inmunizados con bacterinas comerciales.

## 3. Estudio anatomopatológico

Se realizó un estudio de las lesiones macroscópicas y microscópicas de todos los animales que participaron en las pruebas de inmunización y posterior infección con una DL y en la prueba de infección.

Los resultados con los hallazgos macroscópicos y microscópicos encontradas en cada grupo, se recogen en la tabla 26 al final de este apartado.

En el Anexo II se recogen las imágenes con las lesiones más relevantes.

Con carácter general, en los animales que sobrevivieron al desafío los hallazgos anatomopatológicos relacionados por la

infección con *H. parasuis* fueron infrecuentes. En cambio en todos los animales que murieron como consecuencia de la infección (grupos I, III, cerdos nº 6, 7 y 9 del grupo II y cerdos nº 13 y 14 del grupo IV) se observaron lesiones similares, compatibles con un proceso septicémico:

**-Poliserositis fibrinosa** que se puso de manifiesto en forma de depósitos de fibrina sobre las serosas o bien flotando en el líquido que ocupaba las cavidades. Histológicamente se caracterizó por la presencia de fibrina con un exudado inflamatorio mixto, constituido por macrófagos, neutrófilos y linfocitos.

**-Congestión visceral generalizada** con presencia de hemorragias en diversas localizaciones como el surco coronario, pulmón, serosas o cerebro.

**-Presencia de microtrombos de fibrina** en diferentes órganos, así como **trombosis vasculares**, en las que la fibrina aparecía mezclada con neutrófilos y células redondas.

**-Depleción del tejido linfoide periarterial y de los corpúsculos esplénicos**, con hemorragias y depósito de fibrina en la zona del manto que se extendía también a la pulpa roja del bazo

**-Linfadenitis aguda**, con ganglios tumefactos e hiperémicos, lo que se correspondía histológicamente con una marcada hiperemia, con los vasos de pequeño calibre muy prominentes en las áreas corticales.

-En las regiones cráneo-ventrales de los lóbulos apicales del pulmón, junto a una **congestión** más o menos acusada, se observó la presencia de áreas de **neumonía exudativa**,

por lo general de reducido tamaño, que se caracterizaban histológicamente por la presencia de edema en los tabiques y luces alveolares, en los cuales se mezclaba una escasa cantidad de fibrina y numerosas células inflamatorias, predominantemente neutrófilos y, en menor proporción, macrófagos.

Además de las lesiones explicadas previamente, se describen a continuación otros hallazgos anatomopatológicos exclusivos de determinados grupos o presentes sólo en algunos animales.

### **3.1. Cerdos privados de calostro**

#### **3.1.1. Infección con una DL (grupo I)**

Junto con las lesiones características de un proceso septicémico, podemos destacar otros hallazgos patológicos:

-Procesos degenerativos en túbulos renales que ocasionaban necrosis celulares con calcificación y nefritis intersticial no purulenta en los cerdos que sobrevivieron por más tiempo.

-Hemorragias, focos purulentos y manguitos perivasculares en el cerebro del cerdo que murió a las 48 horas.

-Presencia de líquido articular y congestión muscular en el cerdo que sobrevivió durante más tiempo (una semana).

-Congestión en los senos nasales y paranasales con mucosidad abundante en los dos animales que murieron durante las primeras 24 horas.

Por otro lado se observó como la poliserositis fibrinosa que presentaban los cuatro animales era más grave en el animal que sobrevivió durante más tiempo después del desafío, seguida por el que vivió dos días, con respecto a la observada en los dos animales que murieron de forma inmediata a las 24 horas.

#### **3.1.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL (grupo II)**

En general, todos los animales de este grupo apenas mostraron alteraciones de relevancia. Únicamente, cabe citar en tres de ellos la presencia de áreas de consolidación en las regiones craneo-ventrales del pulmón, una lesión inflamatoria de tipo exudativo que se puede asociar a la infección por bacterias, incluyendo micoplasmas. Aunque también se observaron áreas sin lesiones (Figura 94).

#### **3.1.3. Inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL (grupo III)**

Los dos animales que sobrevivieron a la infección no mostraban alteraciones reseñables, salvo telangiectasias hepáticas y una pequeña cantidad de fibrina en la cavidad abdominal que, dada la escasa cantidad, se puede asociar a un fenómeno de estrés.

Por otro lado, en los otros tres animales que murieron presentando un proceso septicémico con las lesiones descritas al inicio de este apartado, también se pudo observar congestión encefálica junto con hemorragias y meningitis purulenta en uno de los cerdos. Finalmente, otro cerdo presentó nefritis

intersticial no purulenta, con acúmulos de neutrófilos en las luces de los túbulos renales.

#### 3.1.4. Inmunización con una vacuna recombinante y posterior infección con una DL (grupo III)

Los cinco animales de este grupo, murieron durante las primeras 24 horas que siguieron a la infección mostrando las lesiones características de un proceso septicémico, que hemos explicado al inicio de este apartado. Pero además en uno de los animales de este grupo se observaron lesiones a nivel articular, caracterizadas por un incremento de líquido con flóculos de fibrina.

#### 3.1.5. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL (grupo V)

En este grupo, como hemos explicado al inicio de este apartado, los dos animales, que murieron a las 24 y 48 horas post-infección respectivamente, presentaron lesiones compatibles con un proceso septicémico. Pero además también se encontraron otros hallazgos anatomopatológicos en los tres cerdos supervivientes:

-En dos de ellos se observó una linfadenitis purulenta en el ganglio submaxilar derecho, caracterizada histológicamente por la presencia de gran cantidad de fibrina sobre tejido linfoide, que se entremezclaba con restos celulares y neutrófilos, lesión que se suele relacionar con infecciones agudas. Los ganglios regionales aparecían tumefactos. En el ganglio submaxilar del cerdo nº 12 se observó

una elevada presencia de eosinófilos y cuerpos acidófilos que se pueden asociar con parasitaciones, procesos alérgicos o de hipersensibilidad, en general.

-Meningitis purulenta, junto con la presencia de manguitos perivasculares, fenómenos de gliosis y satelitismo, así como hemorragias situadas en la sustancia blanca de uno de los animales.

-Engrosamiento moderado de los tabiques alveolares de dos de los cerdos, debido a la presencia de fibrina y células inflamatorias.

### 3.2. Cerdos criados de forma convencional

Todos los cerdos criados de forma convencional fueron sacrificados y serológicamente resultaron positivos frente a PRRS.

#### 3.2.1. Prueba de inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL (grupo VI)

Ninguno de los animales presentó lesiones macroscópicas en las serosas, ni en el sistema nervioso central, las articulaciones o los órganos de la cavidad abdominal, pero histológicamente dos de los cerdos presentaban hepatitis y nefritis intersticial de tipo no purulento, distribución multifocal y carácter leve, lesiones que se han descrito, entre otros procesos, en infecciones por virus como el de PRRS o circovirus, que suelen asociarse con *H. parasuis* al disminuir las defensas del animal y favorecer la infección bacteriana.

## Resultados

En los tres animales se comprobó, de forma más o menos acusada, la presencia de lobulillos pulmonares de color oscuro, que profundizaban en el parénquima y alternaban con otros normales, lo que daba a este órgano un aspecto parcheado, que se correspondía histológicamente con una neumonía intersticial de distribución lobulillar, caracterizada por un engrosamiento de los tabiques interalveolares provocado por el depósito de células inflamatorias, principalmente macrófagos y en menor medida, neutrófilos, que podía relacionarse con infecciones por PRRS y circovirus. Dos de los cerdos presentaban un elevado número de polimorfonucleares neutrófilos maduros en los vasos sanguíneos

En dos de los animales se observó neumonía exudativa, en el primero con áreas de hepatización en la región craneoventral de

los lóbulos apicales e intermedio, mientras que en el segundo se localizaban en el lóbulo apical izquierdo.

### 3.2.2. Inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con DL (grupo VII)

Al igual que con el grupo anterior, no se observaron ninguna de las lesiones descritas en la enfermedad de Glässer y tampoco se confirmó la presencia de *H. parasuis* en el análisis microbiológico (apartado 7.2).

Los tres animales de este grupo presentaban lesiones en el pulmón, hígado y riñón similares a las descritas en el apartado anterior y, por tanto, relacionadas con infecciones por PRRS o circovirus.

Tabla 26 Resumen de las lesiones macroscópicas y microscópicas de los ensayos de inmunización y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII
<b>Serosas</b>	Poliserositis fibrinosa (Figura 88 A, B, C)		Idem. grupo I (Figura 97) (cerdos n° 6, 7 y 9)	Idem grupo I	Idem grupo I (cerdos n° 13 y 14)		
<b>Alteraciones de la coagulación</b>	Congestión visceral generalizada (Figura 89) Hemorragias en diferentes localizaciones Microtrombos de fibrina (Figura 90) Trombosis vasculares		Idem grupo I (Fig 8) (cerdos n° 6, 7 y 9)	Idem grupo I (Figuras 101 y 102)	Idem grupo I (Figura 105) (cerdos n° 13 y 14)		
<b>Bazo</b>	Depleción del tejido linfoide periarterial y de corpúsculos esplénicos. Hemorragias y depósito de fibrina en zona del manto y pulpa roja (Figura 91) (cerdos n° 21 y 22)	Figura 95	Idem grupo I (cerdos n° 6, 7 y 9)	Idem grupo I (Figuras 103 )	Idem grupo I (cerdos n° 13 y 14)		
<b>Ganglio</b>	Linfadenitis aguda Presencia de trombosis y neutrófilos (Figura 92) (cerdo n° 24)	Figura 96	Linfadenitis aguda (cerdos n° 6, 7 y 9)	Idem grupo I	Idem grupo I (Figura 106) (cerdos n° 13 y 14) Linfadenitis purulenta (cerdos n° 11 y 15)	Figura 107	

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VI
<b>Articulaciones</b>	Presencia de fióculos de fibrina (cerdos n° 24)		Idem grupo I (cerdo n° 17)				
<b>Riñones</b>	Procesos degenerativos de túbulos renales (cerdos n° 24 y 25)		Nefritis intersticial no purulenta (cerdo n° 7)			Nefritis intersticial no purulenta (PRRS) (Figura 108) (cerdos n° 30 y 31)	Idem grupo VII (cerdos n° 26 y 27)
<b>Cerebro</b>	Congestión  Meningitis purulenta y manguitos perivasculares (cerdo n° 25)		Congestión  Meningitis purulenta (Figuras 98 y 99) (cerdo n° 9)	Congestión	Congestión (cerdos n° 13 y 14) Meningitis purulenta, gliosis y satelitismo (cerdo n° 11)		
<b>Pulmones</b>	Lesiones vasculares sobreáguas: congestión, edema alveolar y hemorragias (cerdos n° 21 y 22)  Focos de consolidación y neumonía exudativa (Figura 93) (cerdos n° 24 y 25)	Neumonía exudativa en lóbulos apicales	Idem grupo I (Fig 100) (cerdos n° 6, 7 y 9)	Idem grupo I. (Fig 104)	Idem grupo I (cerdos n° 13 y 14)	Neumonía intersticial lobulillar (Figura 109)	Idem grupo VI (Figura 110)
						Neumonía exudativa en lóbulos apicales e intermedio	





# Capítulo IV: Estudio de las inmunoglobulinas séricas frente a *Haemophilus parasuis* y sus antígenos

## 1. Cerdos privados de calostro

### 1.1 Infección con una DL de *H. parasuis*

#### 1.1.1. IgM

#### 1.1.2. IgGt

##### 1.1.2.1 IgG1

##### 1.1.2.2. IgG2

### 1.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

#### 1.2.1. IgM

#### 1.2.2. IgGt

##### 1.2.2.1 IgG1

##### 1.2.2.2. IgG2

##### 1.2.2.3. Avidéz y afinidad de las IgG

### 1.3. Inmunización con una vacuna recombinante y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

#### 1.3.1. IgM

#### 1.3.2. IgGt

##### 1.3.2.1 IgG1

##### 1.3.2.2. IgG2

### 1.4. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

#### 1.3.1. IgM

#### 1.3.2. IgGt

##### 1.3.2.1 IgG1

##### 1.3.2.2. IgG2

##### 1.3.2.3. Avidéz y afinidad de las IgG

## 2. Cerdos criados de forma natural

### 2.1 Inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

#### 2.1.1. IgM

#### 2.1.2. IgGt

##### 2.1.2.1 IgG1

##### 2.1.2.2. IgG2

##### 2.1.2.3. Avidéz y afinidad de las IgG

### 2.2. Inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

#### 2.2.1. IgM

#### 2.2.2. IgGt

##### 2.2.2.1 IgG1

##### 2.2.2.2. IgG2

##### 2.2.2.3. Avidéz y afinidad de las IgG

## 3. Comparación entre los grupos del estudio

La caracterización de la respuesta de las inmunoglobulinas séricas frente a *H. parasuis* y sus antígenos se llevó a cabo a partir de las muestras de sangre procedentes de los grupos de animales descritos en el capítulo anterior. Se utilizaron dos ELISAs indirectos, uno para valorar las inmunoglobulinas frente a la célula bacteriana completa de la cepa de referencia Nagasaki, del serotipo 5, inactivada con thimerosal (**ELISA-in**); mientras que el otro se preparó con sobrenadantes que contenían proteínas de membrana externa enriquecidos en TbpB (**ELISA-sb**), obtenidos a partir de esta misma cepa. Los resultados se analizaron de forma conjunta, estableciendo para cada grupo un punto de corte (**Pc**) o valor umbral que equivalía al doble de la media de las DO más la desviación estándar de las mismas en el inicio del estudio; y de forma individual, considerando que había seroconversión cuando la DO de un animal era superior al doble de la que presentaba en el día inicial más la desviación estándar.

Los resultados obtenidos para cada animal de forma individual se recogen en el Anexo III, mientras que los resultados globales de cada grupo se recogen en los gráficos siguientes.

## 1. Cerdos privados de calostro

### 1.1. Infección con una DL de *H. parasuis* (grupo I)

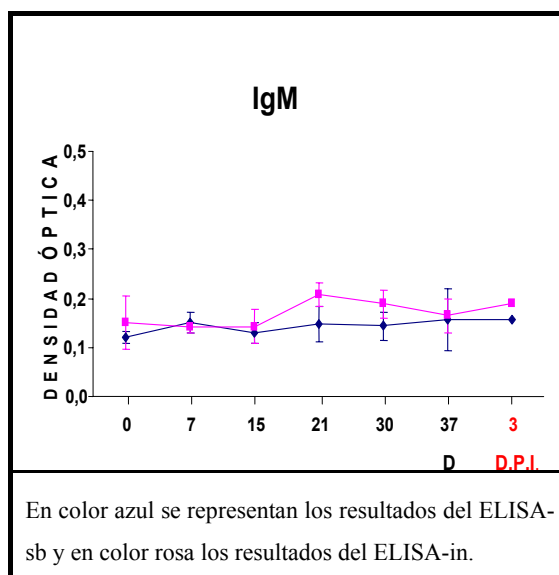
#### 1.1.1. IgM

Los resultados con los dos ELISAs fueron similares: los niveles medios de la IgM no superaron el punto de corte en ninguno de los días previos a la infección y no se observó

seroconversión en ninguno de los cerdos, ni tampoco tres días después de la infección en el único cerdo que sobrevivió a la misma (Figura 23)

Al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los días del estudio.

Figura 23. Evolución de las IgM en el grupo I, infectado con una DL de *H. parasuis*. **D**, desafío; **DPI**, días post-infección

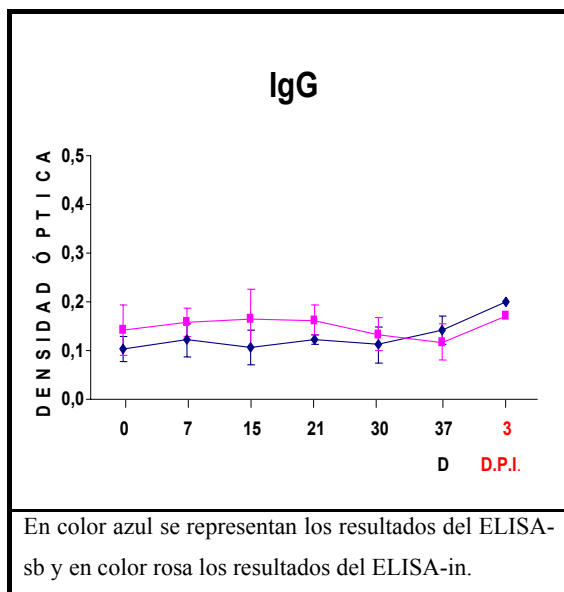


#### 1.1.2. IgGt.

Los resultados para ambos ELISAs fueron similares a los descritos para la IgM (Figura 24). Tampoco se observó seroconversión en ninguno de los animales antes del desafío, ni diferencias significativas entre los distintos días del estudio. En el único cerdo que sobrevivió al mismo los niveles de IgGt se incrementaron ligeramente a los 3 días post-infección (Tabla 24).

## Resultados

Figura 24. Evolución de las IgGt en el grupo I, infectado con una DL de *H. parasuis*. **D**, desafío; **DPI**, días post-infección



### 1.1.2.1. IgG1

Al igual que lo descrito para las IgGt, con ninguno de los dos ELISAs se observó seroconversión en los cerdos de este grupo durante todo el estudio, a pesar de que a los 37 días se encontrasen valores máximos en ambas pruebas, con DO superiores a las de los días 0 y 7, en el caso del ELISA-sb ( $p = 0,0179$  y  $p = 0,0124$ ) y a las del día 15, en el ELISA-in ( $p = 0,0170$ ) (Figura 25)

### 1.1.2.2 IgG2

Los resultados de ambos ensayos para las IgG2 fueron similares a los descritos para las IgGt, aunque con el ELISA-in se observó un descenso significativo de los niveles de IgG2 a los 37 días con respecto a los días 15, 21 y 30, que presentaban los valores más elevados ( $p =$

$0,0017$ ,  $p = 0,0048$  y  $p = 0,0076$ , respectivamente) (Figura 26)

Figura 25. Evolución de las IgG1 en el grupo I, infectado con una DL de *H. parasuis*. **D**, desafío; **DPI**, días post-infección

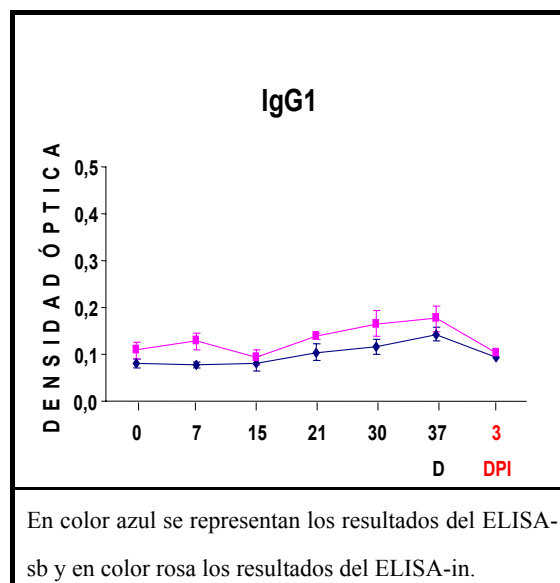
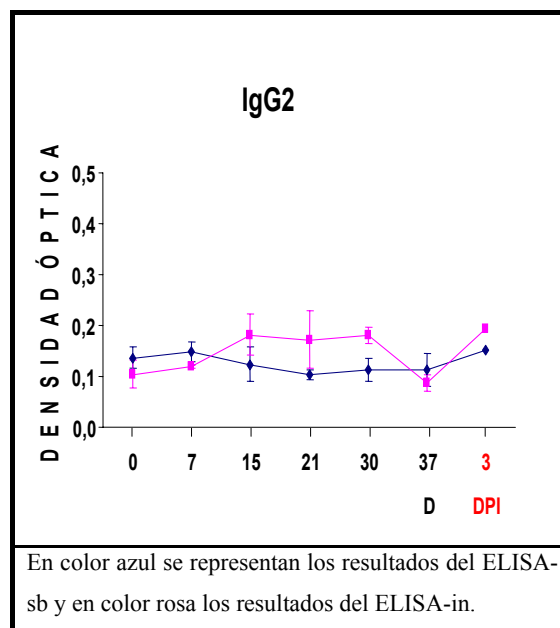


Figura 26. Evolución de las IgG2 en el grupo I, infectado con una DL de *H. parasuis*. **D**, desafío; **DPI**, días post-infección



## 1.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo II)

Los resultados obtenidos con el ELISA-sb y con el ELISA-in se resumen al final de este subapartado en las Tablas 31 A y B.

### 1.2.1. IgM

En respuesta a la primera vacunación se observó un incremento de la DO con ambos ELISAs, especialmente notable a los 7 días, momento en el que se encontraron diferencias significativas con el día inicial y se produjo la seroconversión de los cerdos nº 1 y 2. Después

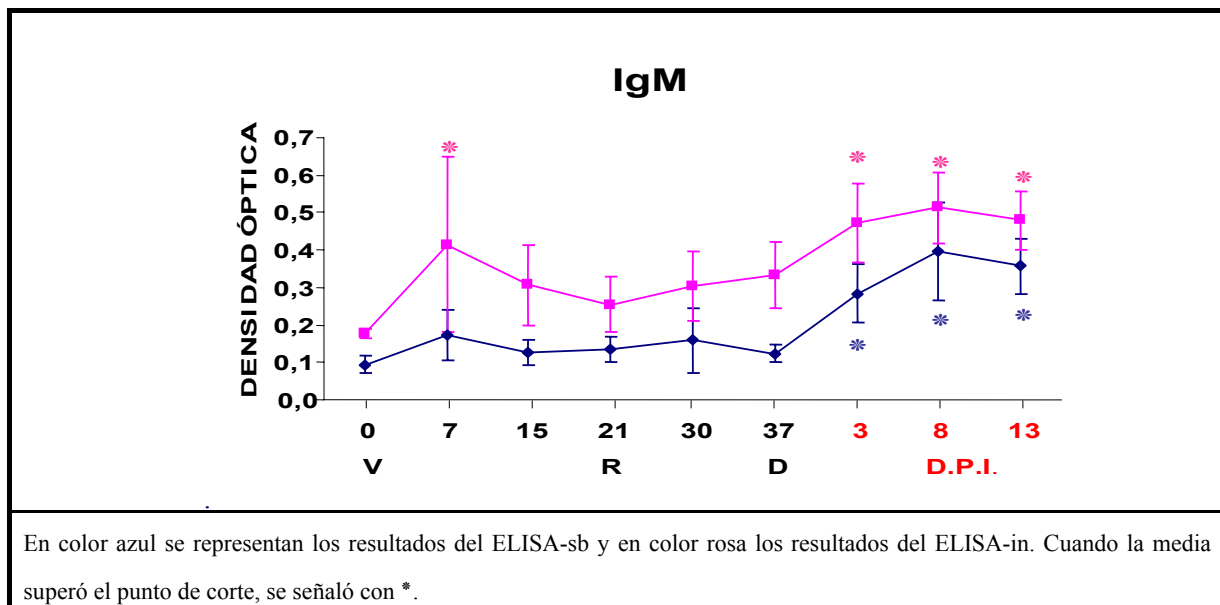
de la revacunación se indujo un nuevo incremento significativo en las IgM a los 30 días y la seroconversión de los cerdos nº 1 y 2. En el momento del desafío (día 37), sólo continuó encontrándose seroconversión frente a la célula completa, junto con unos niveles de IgM significativamente superiores a los del día inicial (Tabla 27) (Figura 27)

Finalmente, desde el día 3 al día 13 post-infección, los resultados para ambos ELISAs se caracterizaron por un incremento significativo de la DO respecto a todos los días anteriores. De esta forma, la media del grupo alcanzó valores superiores al punto de corte, y se produjo la seroconversión de todos cerdos (Tabla 27) (Figura 27)

Tabla 27 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA-in, de la respuesta de las IgM durante la inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo II

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 7	Día 0	p = 0,0028	Día 7	Día 0	p = 0,0002
Día 30	Día 0	p = 0,0255	Día 15	Día 0	p = 0,0095
Día 3	Día 0	p < 0,0001	Día 30	Día 0	p = 0,0093
Día 3	Día 7	p = 0,0107	Día 37	Día 0	p = 0,0019
Día 3	Días 15 y 21	p < 0,0001	Día 3, 8 y 13	Día 0	p < 0,0001
Día 3	Día 30	p = 0,0110	Día 3	Día 15	p = 0,0178
Día 3	Día 37	p < 0,0001	Día 3	Día 21	p = 0,0012
Día 8	Día 0-Día 37	p < 0,0001	Día 3	Día 30	p = 0,0181
Día 13	Día 0-Día 37	p < 0,0001	Día 8	Día 15	p = 0,0044
			Día 8	Día 21	p = 0,0002
			Día 8	Día 30	p = 0,0044
			Día 8	Día 37	p = 0,0192
			Día 13	Día 15	p = 0,0118
			Día 13	Día 21	p = 0,0007
			Día 13	Día 30	p = 0,0120
			Día 13	Día 37	p = 0,0449

Figura 27. Evolución de las IgM en el grupo II, inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío; **D.P.I.**, días post-infección



### 1.2.2. IgGt

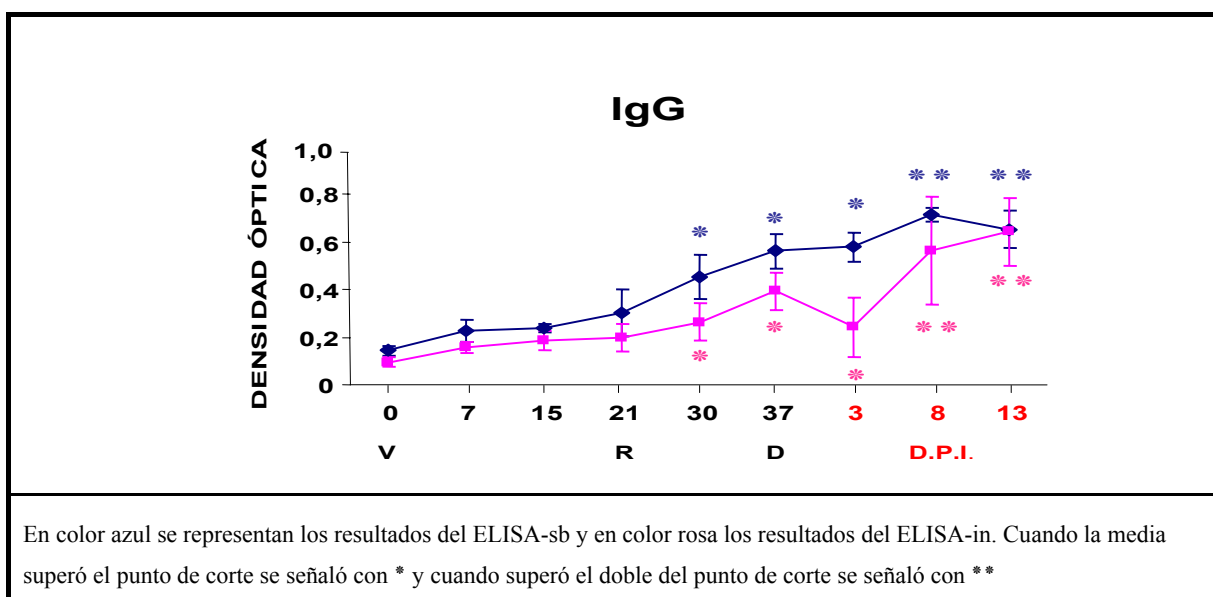
Los niveles de las IgGt en respuesta a la primera vacunación se elevaron significativamente a partir del día 15, según los resultados del ELISA-sb y del día 7, según los resultados del ELISA-in, observándose la seroconversión de algunos cerdos del grupo. A partir de la revacunación se puso de manifiesto la seroconversión de todos los cerdos y el aumento de la DO media por encima del punto de corte. La concentración de las IgGt, medida con ambos ELISAs, fue creciendo progresivamente, de tal forma que el día del desafío resultó significativamente superior a la de todos los días anteriores, incluido el día 30 (Tabla 28)

Los resultados de ambos ELISAs pusieron de manifiesto que la respuesta a la infección con una DL se producía a partir de los 8 días, con valores superiores al doble del punto de corte, que diferían significativamente de todos los días anteriores al desafío; mientras que en el día 3 post- infección las DOs no se habían modificado (ELISA-sb) o incluso habían descendido (ELISA-in). Para las IgGt frente a los sobrenadantes proteicos, el valor máximo (incluso significativamente superior al día del desafío) se observó a los 8 días, mientras que frente a la célula bacteriana inactivada esto no se produjo hasta los 13 días (Tabla 28) (Figura 28).

Tabla 28. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA-in, de la respuesta de las IgGt durante la inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo II

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 15	Día 0	p = 0,0387	Día 7	Día 0	p = 0,0161
Día 21	Día 0	p < 0,0001	Día 15	Día 0	p = 0,0017
Día 30	Día 0-Día 15	p < 0,0001	Día 21	Día 0	p = 0,0009
Día 30	Día 21	p = 0,0012	Día 30	Día 0	p < 0,0001
Día 37	Día0-Día 21	p < 0,0001	Día 30	Día 7	p = 0,0216
Día 37	Día 30	p = 0,0209	Día 37	Día 0 y día 7	p < 0,0001
Día 3	Día0-Día 21	p < 0,0001	Día 37	Día 15	p = 0,0003
Día 3	Día30	p = 0,0071	Día 37	Día 21	p = 0,0005
Día 8	Día0-D30	p < 0,0001	Día 37	Día 30	p = 0,03
Día 8	Día 37	p = 0,001	Día 3	Día 0	p = 0,0001
Día 8	Día 3	p = 0,0036	Día 8	Día0-D30	p < 0,0001
Día 13	Día0-D30	p < 0,0001	Día 8	Día 3	p < 0,0001
			Día 13	Día0-D30	p < 0,0001
			Día 13	Día 37	p = 0,0163
			Día 13	Día 3	p < 0,0001

Figura 28. Evolución de las IgGt en el grupo II, inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. V, vacunación; R, revacunación; D, desafío; D.P.I., días post-infección



**1.2.2.1. IgG1**

La respuesta de las IgG1 frente a las inmunizaciones, observada por medio de ambos ELISAs, se indujo principalmente una vez que tuvo lugar la revacunación, puesto que después de la primovacunación sólo se produjo un incremento de la DO a los 21 días y la seroconversión de los cerdos nº 2 y nº 3. En cambio en los días 30 y 37, posteriores a la revacunación, la media del grupo superó el punto de corte, con valores significativamente superiores a los de los días previos y con seroconversión en todos los animales (Tabla 29) (Figura 29)

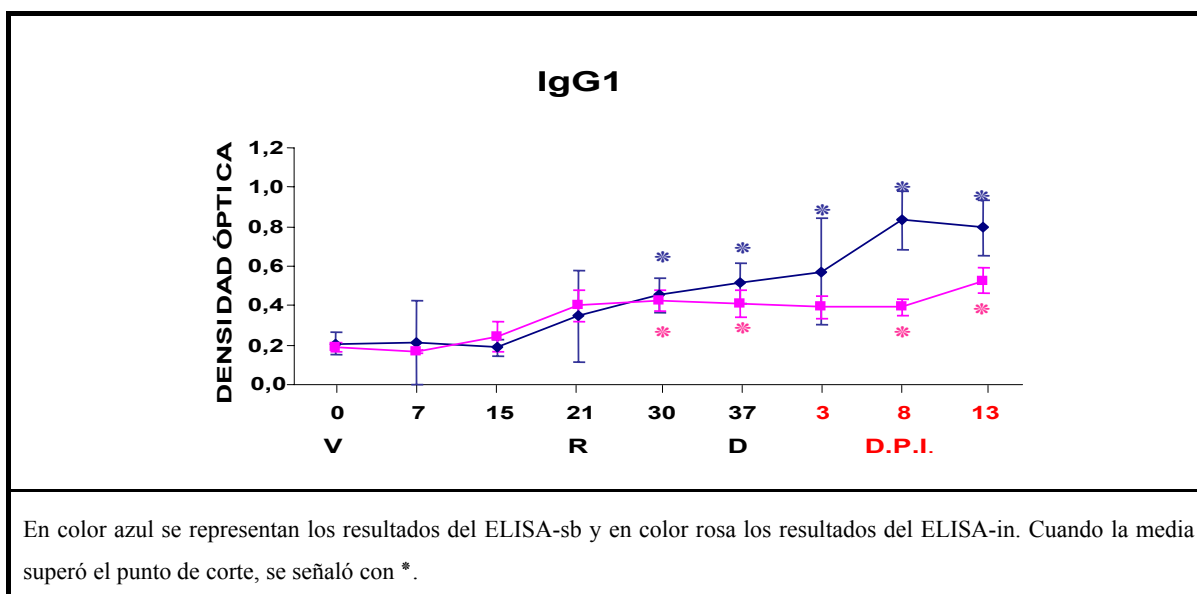
El desafío con una DL determinó un aumento de los niveles de IgG1 frente a los sobrenadantes con OMPs en los días 8 y 13, alcanzándose las DO más elevadas de todo el estudio y significativamente superiores a las de todos los días previos (incluso en algunos animales presentaron valores 4 veces superiores a los del inicio). En cambio, las IgG1 frente a la célula completa, a pesar de que se incrementasen ligeramente en el día 13, no se modificaron significativamente con respecto a los días que siguieron a la revacunación y sólo presentaron diferencias con los días anteriores a ésta (Tabla 29) (Figura 29)

Tabla 29. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG1 durante la inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo II.

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 30	Día 0-Día 15	p < 0,0001	Día 21	Día 0	p = 0,0005
Día 30	Día 21	p = 0,0214	Día 21	Día 7	p < 0,0001
Día 37	Día 0- Día 15	p < 0,0001	Día 21	Día 21	p = 0,0177
Día 37	Día 21	p = 0,0059	Día 30	Día 0 y Día 7	p < 0,0001
Día 3	Día 0-Día 15	p < 0,0001	Día 30	Día 15	p = 0,0025
Día 3	Día 21	p = 0,0132	Día 37	Día 0 y Día 7	p < 0,0001
Día 8	Día 0-Día 21	p < 0,0001	Día 37	Día 15	p = 0,0016
Día 8	Día 30	p = 0,0047	Día 3	Día 0 y Día 7	p < 0,0001
Día 8	Día 37	p = 0,0177	Día 3	Día 15	p = 0,0121
Día 8	Día 3	p = 0,0081	Día 8	Día 0 y Día 7	p < 0,0001
Día 13	Día 0-Día 21	p < 0,0001	Día 8	Día 15	p = 0,0074
Día 13	Día 30	p = 0,003	Día 13	Día 0-Día 15	p < 0,0001
Día 13	Día 37	p = 0,0124			
Día 13	Día 3	p = 0,0051			



Figura 29. Evolución de las IgG1 en el grupo II, inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. V, vacunación; R, revacunación; D, desafío; D.P.I., días post-infección



### 1.2.2.2 IgG2

Los resultados del ELISA-sb mostraron un incremento significativo de las IgG2 a los 7 días, seguido de un descenso a los 15 días, para volver a incrementarse significativamente el día 21, en el que se observó la seroconversión de tres cerdos del grupo. En cambio con ELISA-in, no se puso de manifiesto un incremento significativo de la DO, hasta los días 15 y 21 (Tabla 31) (Figura 30).

La revacunación indujo un incremento significativo de la DO con respecto a los días anteriores, alcanzándose valores medios superiores al punto de corte (Tabla 30) (Figura 30). También se produjo la seroconversión de

todos los animales, tanto frente a los sobrenadantes con OMPs como frente a la célula bacteriana completa (Tabla 30) (Figura 30)

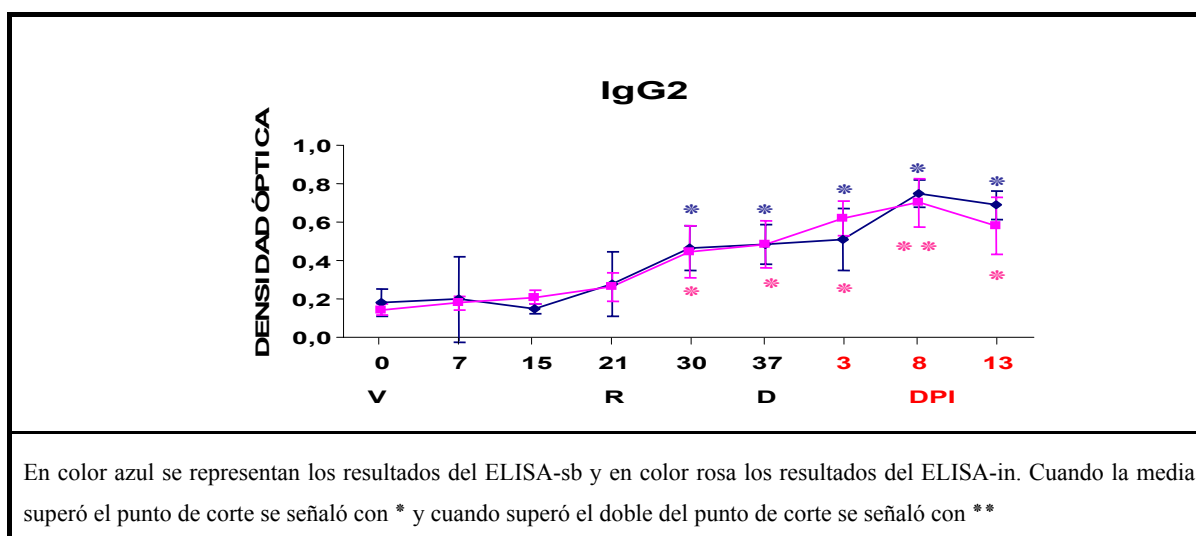
Finalmente, después del desafío, los resultados de ambos ELISAs pusieron de manifiesto que la respuesta de las IgG2 se inducía principalmente en los días 8 y 13, puesto que en el día 3 apenas se habían modificado las DO. A los 8 días todos los cerdos presentaban unas DO superiores al cuádruplo de la del inicio, con valores significativamente superiores a los de todos los días anteriores a este momento (Tabla 30) (Figura 30)

Resultados

Tabla 30 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG2 durante la inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo II

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 7	Día 0	p = 0,0105	Día 15	Día 0	p = 0,0320
Día 7	Día 15	p = 0,0076	Día 21	Día 0	p = 0,0034
Día 21	Día 0	p = 0,007	Día 30	Día 0 y Día 7	p < 0,0001
Día 21	Día 15	p = 0,0076	Día 30	Día 15	p = 0,0005
Día 30	Día 0-Día 15	p < 0,0001	Día 30	Día 21	p = 0,0068
Día 30	Día 21	p = 0,0002	Día 37	Día 0-Día 21	p < 0,0001
Día 37	Día 0-Día 21	p < 0,0001	Día 3	Día 0-Día 21	p < 0,0001
Día 3	Día 0-Día 15	p < 0,0001	Día 8	Día 0-Día 21	p < 0,0001
Día 3	Día 21	p = 0,0002	Día 8	Día 30	p = 0,0009
Día 8	Día 0-Día 21	p < 0,0001	Día 13	Día 0-Día 21	p < 0,0001
Día 8	Día 30	p = 0,0022	Día 13	Día 30	p = 0,0017
Día 8	Día 37	p = 0,0162			
Día 8	Día 3	p = 0,0036			
Día 13	Día 0-Día 21	p < 0,0001			
Día 13	Día 30	p = 0,0122			
Día 13	Día 3	p = 0,0146			

Figura 30. Evolución de las IgG2 en el grupo II, inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío; **D.P.I.**, días post-infección



### 1.2.2.3. Aidez y afinidad de las IgGt

Para determinar la aidez y afinidad de las IgGt se utilizaron los sueros obtenidos desde el día 30 hasta el final del experimento, puesto que en ese momento se observó la seroconversión de los 5 cerdos del grupo con ambos ELISAs. Los resultados se recogen en la

Figura 27, donde se representa el valor medio de aidez del grupo.

La aidez de las IgGt en ambos ELISAs permaneció constante, con valores medios comprendidos entre 1,02 y 1,6 para el ELISA-sb y 1,09 y 1,35 para el ELISA-in. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos días del estudio (Figura 31).

Figura 31. Evolución del índice de aidez medio de las IgG en el grupo II, inmunizado con una bacteria y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **D**, desafío; **D.P.I.**, días post-infección

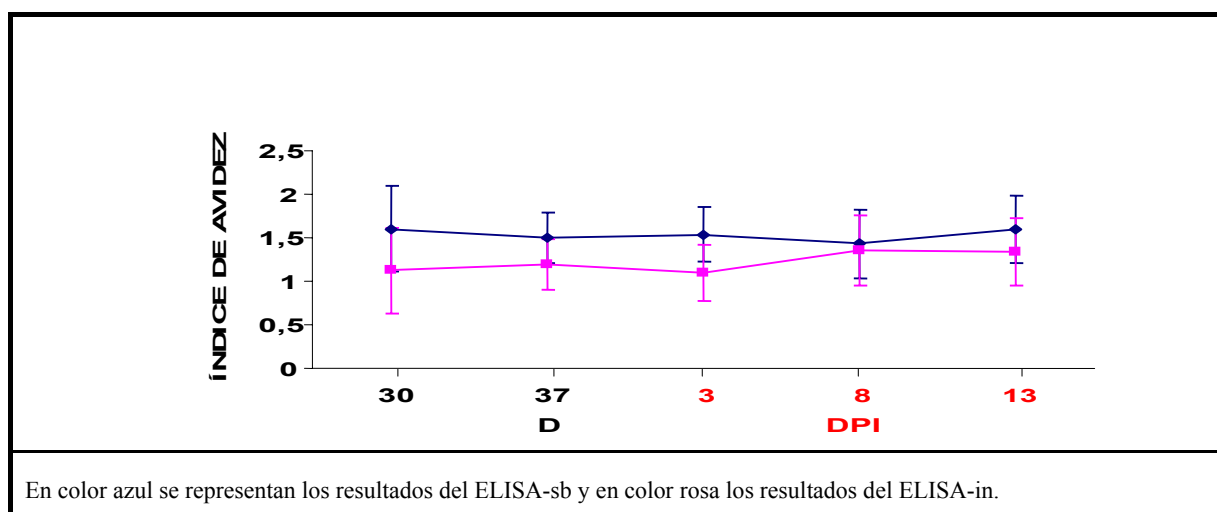


Tabla 31. A. **ELISA-sb**. Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

	Día 7 (D7)	Día 15 (D15)	Día 21 (D21)	Día 30 (D30)	Día 37 (D37)	Día 3 (D3)	Día 8 (D8)	Día 13 (D13)	
<b>IgM</b>	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 1 y 2	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑ sig. respecto D0 Seroconversión cerdos n° 1, 2 y 3	↑ sig. respecto D0 Seroconversión cerdos n° 2	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0-D37 $\mu > Pc$	↑ sig. respecto D0-D37 Seroconversión todos los cerdos	Idem D8
<b>IgGt</b>	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 1, 2 y 3	↑ sig respecto D0-D21 $\mu > Pc$	↑ sig respecto D0-D30 $\mu > Pc$	Idem D37	↑ sig respecto D0-D3 $\mu > 2x Pc$	↑ sig respecto D0-D30 $\mu > 2x Pc$	
<b>IgG1</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig. Seroconversión cerdos n° 2 y 3	↑ sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	Idem D30	Idem D30 y D37	↑ sig respecto D0-D3 Seroconversión todos los cerdos	Idem D8	
<b>IgG2</b>	↑ sig respecto D0	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0 y D15 Seroconversión cerdos n° 2 y 3	↑ sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	Idem D30	Idem D30 y D37	↑ sig respecto D0-D3 $\mu > Pc$	Idem D8	

Tabla 31. B. **ELISA-in**. Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

	Día 7 (D7)	Día 15 (D15)	Día 21 (D21)	Día 30 (D30)	Día 37 (D37)	Día 3 (D3)	Día 8 (D8)	Día 13 (D13)
<b>IgM</b>	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 1 y 2	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdo n° 2	Sin diferencias sig. respecto D0 Seroconversión cerdo n° 2	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 1 y 2	Idem D30	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0-D30 Seroconversión todos los cerdos	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0-D37 Seroconversión todos los cerdos	Idem D8
<b>IgGt</b>	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 3 y 5	Idem D15	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0 y D7 Seroconversión todos los cerdos	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0-D30 Seroconversión todos los cerdos	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0 y ↓ sig D37 Seroconversión todos los cerdos	$\mu > 2x Pc$ ↑ sig respecto D0-D30 y D3 Seroconversión todos los cerdos	$\mu > 2x Pc$ ↑ sig respecto D0-D3 Seroconversión todos los cerdos
<b>IgG1</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig. respecto D0	↑ sig respecto D0-D15 Seroconversión cerdos n° 2 y 3	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0 -D15 Seroconversión todos los cerdos	Idem D30	Idem D30 y D37	Idem D30, D37 y D3	Idem D30, D37, D3, D8
<b>IgG2</b>	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0 -D21 Seroconversión todos los cerdos	Idem D30	Idem D30 y D37	$\mu > 2x Pc$ ↑ sig respecto D0-D30 Seroconversión todos los cerdos	Idem D8

$\mu$  Valor medio. **Pc**. Punto de corte. ↑ Incremento. **2x**, Doble. **Sig**. Significativo

### 1.3. Inmunización con una vacuna con OMPs e infección con una DL de *H. parasuis* (grupo III)

Los resultados se resumen al final de este subapartado en las tablas 36 A y B. Sólo los cerdos n° 8 y 10 sobrevivieron al desafío

#### 1.3.1. IgM

Los resultados de ambos ELISAs mostraron cómo los niveles de las IgM se incrementaban significativamente durante los 21 días que siguieron a la primera vacunación. En el caso del ELISA-sb se observó la seroconversión, aunque de forma temporal, de todos los animales del grupo: en los cerdos n° 8 y 10 a los 7 días y en los cerdos n° 6, 7 y 9 a los 15 días. En cambio, en el ELISA-in sólo se puso de manifiesto en tres animales: en el cerdo n° 8 desde el día 7 al 21, y en los cerdos n° 9 y 10 a los 15 y 21 días, respectivamente (Tabla 32) (Figura 32)

La respuesta inducida por la revacunación frente a la célula bacteriana completa y frente a los sobrenadantes con OMPs se observó principalmente el día 30, con el incremento de la DO media por encima del punto de corte y la seroconversión de todos los animales, salvo por uno de los cerdos que no sobrevivió a la posterior infección. Este aumento fue más notable en el caso del ELISA-in, puesto que los valores de este día superaron significativamente a los de todos los días previos; mientras que sólo fueron significativamente superiores a los del día inicial en el caso del ELISA-sb. En el momento del desafío se observó un descenso de la DO, y sólo frente a la célula bacteriana

completa continuó observándose seroconversión, aunque exclusivamente en los cerdos que sobrevivieron a la infección.

La infección con una DL determinó un incremento de la DO en ambos ELISAs, con valores significativamente elevados respecto a los de los días previos y además superiores al punto de corte, junto con la seroconversión de los dos únicos cerdos supervivientes. Aunque sólo con el ELISA-sb, a los 8 y 13 días, se observó un nuevo aumento de los niveles de IgM alcanzándose un valor medio 4 veces superior al punto de corte, debido al notable incremento de la DO observada en el cerdo n° 10 (Tabla 33) (Figura 32).

#### 1.3.2. IgGt

La respuesta de IgGt no se puso de manifiesto hasta después de la revacunación, pero sólo se observó seroconversión en los dos cerdos supervivientes. Así, la DO media no superó significativamente a la correspondiente al día inicial hasta los días 30 y 37 del estudio. Además, en el caso del ELISA-in, los valores alcanzados en el día 37 fueron significativamente más elevados que los de todos los días previos, incluido el 30 (Tabla 33) (Figura 33).

La respuesta a la infección con una DL, tanto frente a las OMPs, como frente a la célula bacteriana completa, se caracterizó por un incremento progresivo de la DO: a los 3 días ya se había superado el punto de corte, y a los 8 y 13 días el doble de este valor. Los dos animales supervivientes seguían presentando seroconversión, además los niveles de las IgGt en el cerdo n° 8 resultaron 4 veces superiores a

los iniciales, a partir de los 3 días, y los del cerdo nº 10 desde los 8 días. Los resultados de ambos ELISAs mostraron diferencias significativas entre los días post-infección y los anteriores a ésta, incluido el día del desafío,

pero sólo con el ELISA-sb. También se encontraron diferencias entre los valores de los tres días post- infección; así las DO de los días 8 y 13 eran superiores a los del día 3 y las de día 13 a las del día 8 (Tabla 34) (Figura 33).

Figura 32. Evolución de las IgM en el grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección

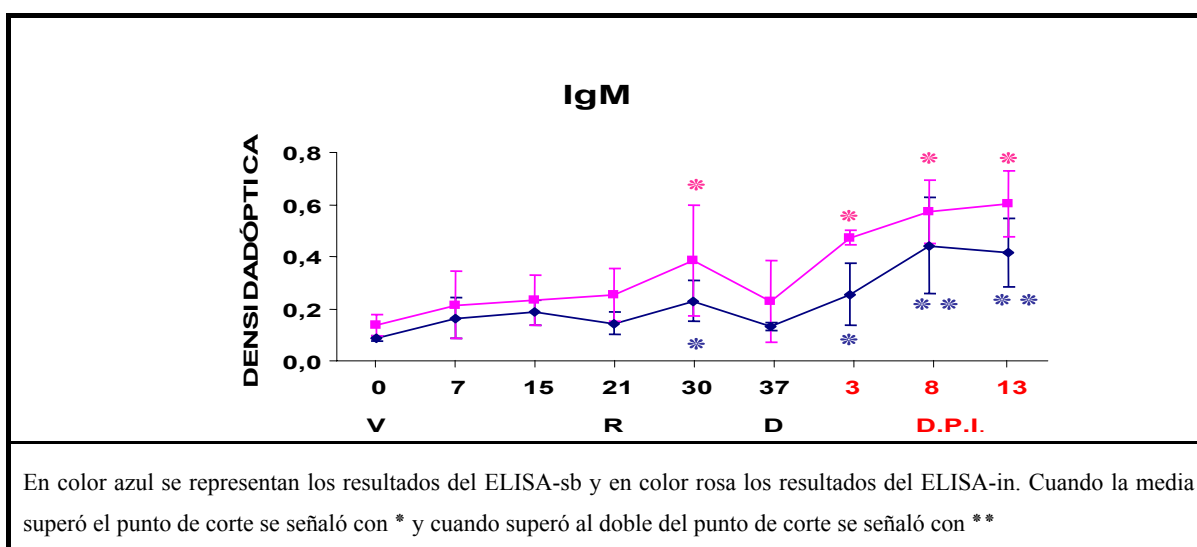
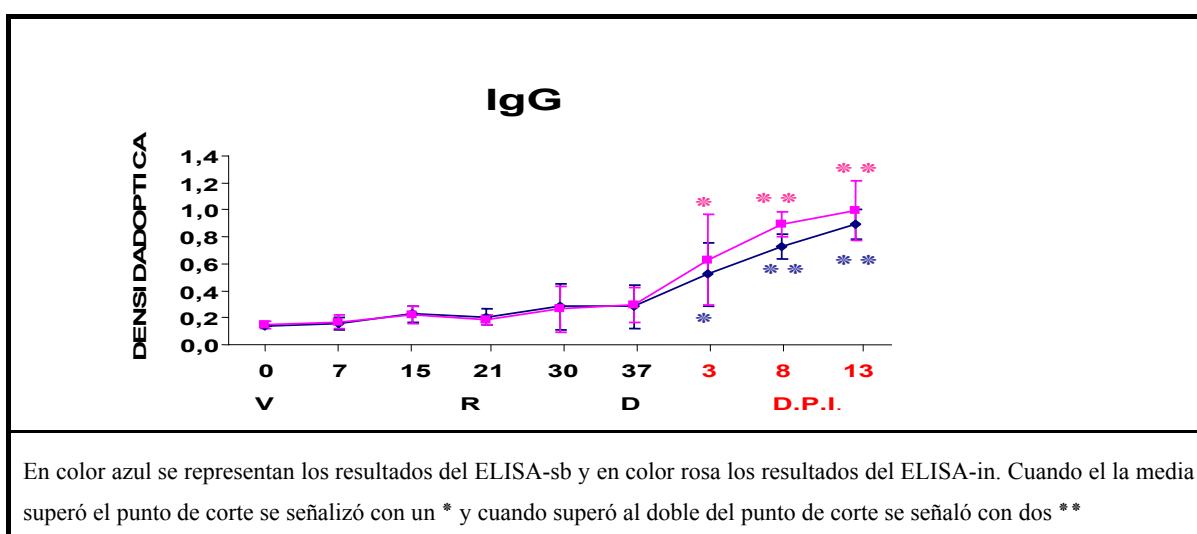


Fig 33. Evolución de las IgGt en el grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección



Resultados

Tabla 32 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgM durante la inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo III

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 7	Día 0	p = 0,0052	Día 15	Día 0	p = 0,0092
Día 15	Día 0	p = 0,0002	Día 21	Día 0	p = 0,0022
Día 21	Día 0	p = 0,0141	Día 30	Día 0	p < 0,0001
Día 30	Día 0	p = 0,0001	Día 30	Día 7	p = 0,0012
Día 37	Día 0	p = 0,0356	Día 30	Día 15	p = 0,0149
Día 37	Día 30	p = 0,0104	Día 30	Día 21	p = 0,0456
Día 3	Día 0	p < 0,0001	Día 37	Día 0	p < 0,0001
Día 3	Día 21	p = 0,0355	Día 37	Día 30	p = 0,0018
Día 3	Día 37	p = 0,0178	Día 3	Día 7	p = 0,0003
Día 8	Día 0 y Día 7	p < 0,0001	Día 3	Día 15	p = 0,0024
Día 8	Día 15	p = 0,0011	Día 3	Día 21	p = 0,0070
Día 8	Día 21	p < 0,0001	Día 3	Día 37	p = 0,0004
Día 8	Día 30	p = 0,011	Día 8	Día 0-Día 15	p < 0,0001
Día 8	Día 37	p < 0,0001	Día 8	Día 21	p = 0,0007
Día 13	Día 0	p < 0,0001	Día 8	Día 37	p = 0,0020
Día 13	Día 7	p = 0,0002	Día 13	Día 0-Día 21	p < 0,0001
Día 13	Día 15	p = 0,0019	Día 13	Día 30	p = 0,0350
Día 13	Día 21	p < 0,0001	Día 13	Día 37	p = 0,0013
Día 13	Día 30	p = 0,0155			
Día 13	Día 37	p < 0,0001			

Tabla 33 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgGt durante la inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo III.

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 30	Día 0	p = 0,0017	Día 30	Día 0	p = 0,0346
Día 30	Día 0	p = 0,0075	Día 37	Día 0 y Día 7	p < 0,0001
Día 37	Día 0	p = 0,0045	Día 37	Día 15	p = 0,0014
Día 37	Día 0	p = 0,0172	Día 37	Día 21	p < 0,0001
Día 3	Día 0-Día 37	p < 0,0001	Día 37	Día 30	p = 0,0018
Día 8	Día 0-Día 37	p < 0,0001	Día 3	Día 0-Día 21	p < 0,0001
Día 8	Día 3	p = 0,0054	Día 3	Día 30	p = 0,0005
Día 13	Día 0-Día 3	p < 0,0001	Día 8	Día 0-Día 30	p < 0,0001
Día 13	Día 8	p = 0,0197	Día 8	Día 37	p = 0,0054
			Día 13	Día 0-Día 30	p < 0,0001
			Día 8	Día 37	p = 0,0018



### 1.3.2.1. IgG1

Al igual que lo descrito para la IgGt, los resultados de los dos ELISAs pusieron de manifiesto que la respuesta de las IgG1 frente a los antígenos de *H. parasuis* se inducía principalmente a partir de la revacunación, el día 37, al alcanzarse una DO que difería significativamente de las de los días previos. De nuevo se observó seroconversión en los dos cerdos que sobrevivieron a la posterior infección (Tabla 34) (Figura 34)

La respuesta a la infección con una DL se caracterizó por un incremento significativo de la DO respecto a todos los días anteriores, incluido el desafío. Este aumento fue especialmente notable frente a los

sobrenadantes con OMPs, puesto que ya desde los 3 días (post-infección) el valor medio de los dos cerdos supervivientes superaba al doble del punto de corte, y siguió creciendo progresivamente hasta el final del estudio; de tal forma que a los 13 días resultó significativamente superior a la del día 3. Además los dos cerdos presentaron, a partir del día 8, DO cuatro veces superiores a la del día inicial. En cambio en el ELISA-in, aunque a los 3 días la media superó el valor del punto de corte, sólo en los días 8 y 13 se alcanzaron DO superiores al doble de este valor y hasta los 13 días las DO de los dos animales no llegaron a elevarse por encima del cuádruplo de las del día inicial (Tabla 34) (Figura 34).

Figura 34. Evolución de la IgG1 en el grupo III inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección

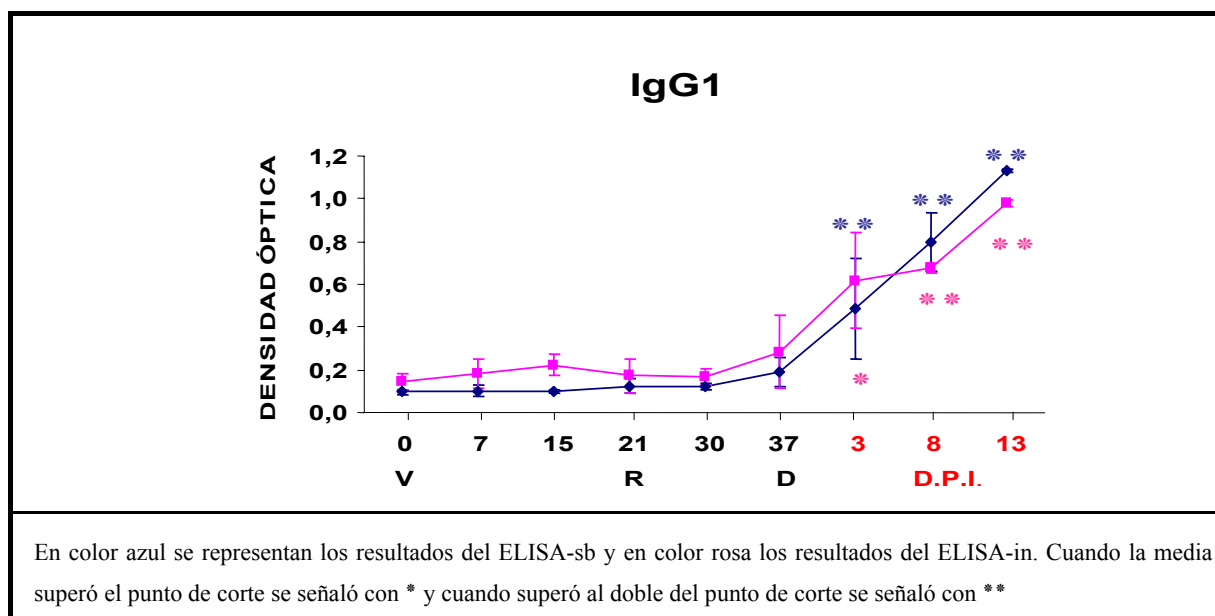


Tabla 34. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG1 durante la inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo III

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 37	Día 0	p = 0,0015	Día 15	Día 0	p = 0,0158
Día 37	Día 7	p = 0,0023	Día 37	Día 0	p = 0,0029
Día 37	Día 15	p = 0,0028	Día 37	Día 21	p = 0,0262
Día 37	Día 21	p = 0,0442	Día 37	Día 30	p = 0,0265
Día 3	Día 0- Día 30	p < 0,0001	Día 3	Día 0-Día 30	p < 0,0001
Día 3	Día 37	p = 0,0003	Día 3	Día 37	p = 0,0005
Día 8	Día 0- Día 37	p < 0,0001	Día 8	Día 0-Día 37	p < 0,0001
Día 13	Día 0- Día 37	p < 0,0001	Día 13	Día 0-Día 37	p < 0,0001
Día 13	Día 3	p = 0,0049			

### 1.1.3.2. IgG2

Los resultados de ambos ELISAs fueron diferentes en los días previos al desafío. En el caso del ELISA-sb no se produjeron cambios significativos; en cambio, mediante el ELISA-in se observó un incremento significativo de la DO a partir del día 15 que desapareció en el momento del desafío. Además, en el día 30, la media del grupo superó el punto de corte y se observó seroconversión en los cerdos nº 7 y 8.

El desafío con una DL indujo una elevación de los niveles de IgG2 frente a la célula bacteriana completa y a las OMPs a los 8 y 13 días, alcanzándose los valores más elevados de todo el estudio que diferían de los días previos, incluidos los del día 3 post-infección. La media del grupo superó el punto de corte en los dos días, pero además, en el cerdo nº 8, la DO llegó a presentar valores más de 4 veces superiores a los del día inicial (Tabla 36) (Figura 35).

Figura 35. Evolución de las IgG2 en el grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección

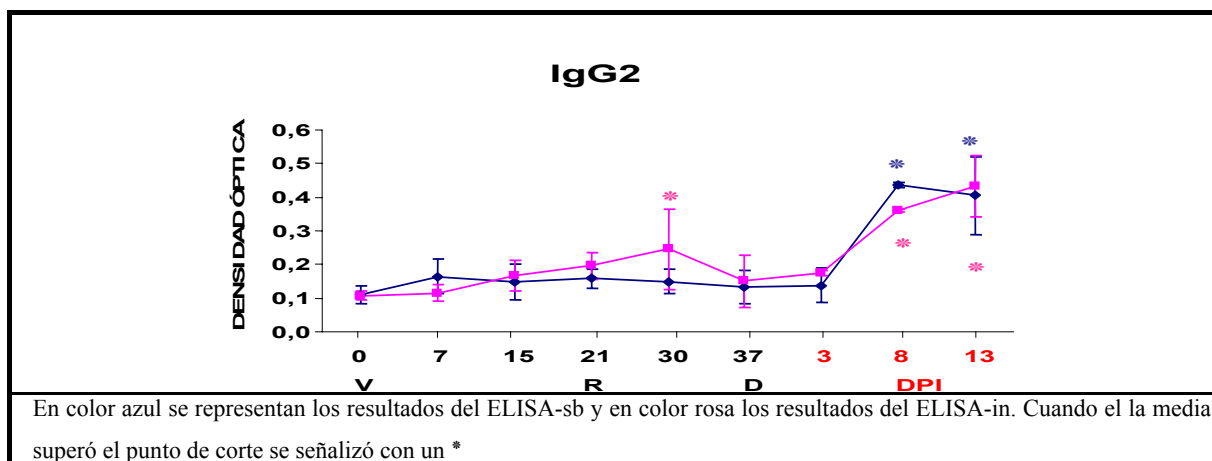


Tabla 35 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA-in, de la respuesta de las IgG2 durante la inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo III

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 8	Día 0- Día 3	p < 0,0001	Día 15	Día 0	p = 0,0175
Día 13	Día 0- Día 3	p < 0,0001	Día 15	Día 7	p = 0,0343
			Día 21	Día 0	p = 0,0008
			Día 21	Día 7	p = 0,002
			Día 30	Día 0- Día 7	p < 0,0001
			Día 37	Día 30	p = 0,0043
			Día 3	Día 0	p = 0,0387
			Día 8	Día 0-Día 21	p < 0,0001
			Día 8	Día 37	p < 0,0001
			Día 8	Día 3	p = 0,0086
			Día 13	Día 0- Día 21	p < 0,0001
			Día 13	Día 30	p = 0,0062
			Día 13	Día 37	p < 0,0001
			Día 13	Día 3	p = 0,012

### 1.3.2.3. Avidéz y afinidad de las IgGt

Para calcular la avidéz se emplearon los sueros de los dos animales supervivientes al desafío, que con ambos métodos ELISAs presentaron seroconversión en el día 30. No se

encontraron diferencias significativas entre los distintos días del estudio, y los valores medios estaban comprendidos entre 0,9 y 1,24 para el ELISA-sb y entre 1,03 y 1,24 para el ELISA-in (Figura 36).

Figura 36. Evolución de índice de avidéz medio de las IgGt en el grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL de *H.parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección

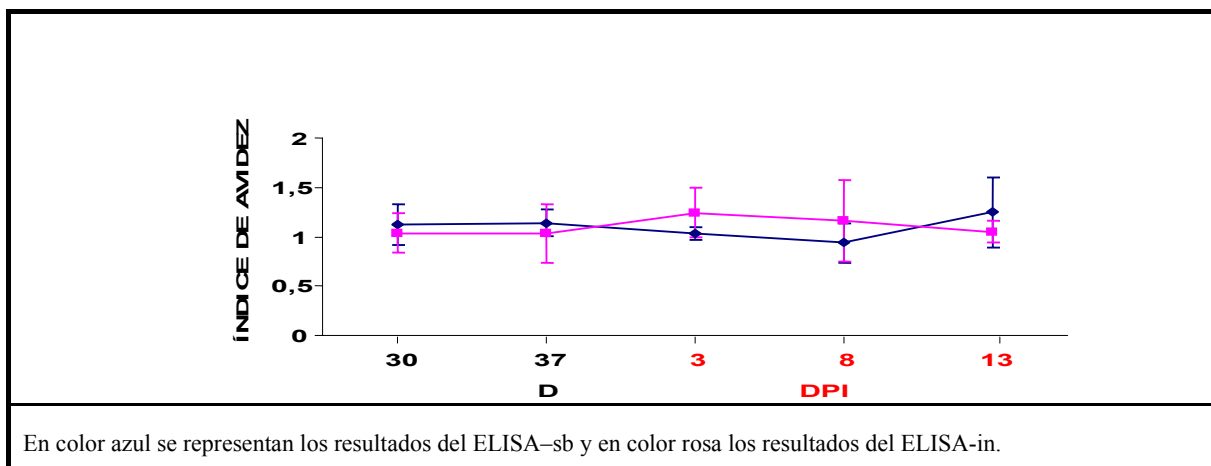


Tabla 36. A. **ELISA-sb**. Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

	Día 7 (D7)	Día 15 (D15)	Día 21 (D21)	Día 30 (D30)	Día 37 (D37)	Día 3 (D3)	Día 8 (D8)	Día 13 (D13)
<b>IgM</b>	↑sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	↑sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 6, 7 y 9.	↑sig respecto D0	↑sig respecto D0 <b><math>\mu &gt; Pc</math></b> ↑sig respecto D0	↑sig respecto D0 ↓sig respecto D30	<b><math>\mu &gt; Pc</math></b> ↑sig respecto D0, D21 y D37 Seroconversión cerdo n° 8	<b><math>\mu &gt; 2x Pc</math></b> ↑sig respecto D0-D37 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	Idem D8
<b>IgGt</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	Idem D30	<b><math>\mu &gt; Pc</math></b> ↑sig respecto D0-D37 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	Seroconversión cerdos n° 8 y 10	<b><math>\mu &gt; 2x Pc</math></b> ↑sig respecto D0-D8 Seroconversión cerdos n° 8 y 10
<b>IgG1</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0-D21 Seroconversión cerdos n° 8 y 10.	<b><math>\mu &gt; 2x Pc</math></b> ↑sig respecto D0-D37 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	Idem D8	<b><math>\mu &gt; 2x Pc</math></b> ↑sig respecto D0-D3 Seroconversión cerdos n° 8 y 10
<b>IgG2</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0-D3 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	Idem D8

Tabla 36. B. **ELISA-in**. Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

	Día 7 (D7)	Día 15 (D15)	Día 21 (D21)	Día 30 (D30)	Día 37 (D37)	Día 3 (D3)	Día 8 (D8)	Día 13 (D13)
<b>IgM</b>	Sin diferencias sig. Seroconversión cerdo n° 8	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 8 y 9	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	↑ sig respecto D0-D21 Seroconversión cerdos n° 6, 8, 9 y 10	↑ sig respecto D0 ↓ sig respecto D30 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	↑ sig respecto D0-D21 y D37 Seroconversión cerdos n° 8, y 10	Idem D3	↑ sig respecto D0-D37 Seroconversión cerdos n° 8, y 10
<b>IgGt</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	↑ sig respecto D0-D30 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	↑ sig respecto D0-D30 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	↑ sig respecto D0-D37 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	Idem D8
<b>IgG1</b>	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0, D21 y D30 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	↑ sig respecto D0-D37 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	↑ sig respecto D0-D37 Seroconversión cerdos n° 8 y 10	Idem D8
<b>IgG2</b>	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0 y D7	↑ sig respecto D0 y D7	↑ sig respecto D0 y D7 <b>μ &gt; Pc</b>	↓ sig respecto D30 Seroconversión cerdo n° 8	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0-D3 <b>μ &gt; Pc</b>	Idem D8

**μ** Valor medio. **Pc**. Punto de corte. **↑** Incremento. **2x**, Doble. **Sig.** Significativo

#### 1.4. Inmunización con una vacuna recombinante y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo IV)

Todos los animales murieron durante las 24 horas posteriores a la infección, por lo que sólo se pudo disponer de las DO hasta el día del desafío.

##### 1.4.1. IgM

Con ninguno de los dos ELISAs se observó seroconversión, y los valores medios no superaron el punto de corte. No obstante, el análisis estadístico de los resultados del ELISA-sb puso de manifiesto la existencia de un incremento significativo de la DO en el día 15 ( $p = 0,0069$ ) con respecto al día inicial. También se encontraron diferencias significativas en los resultados del ELISA-in: entre el día 30, con el valor medio más elevado de todo el estudio, y los días 15 y 37, con las DO más bajas ( $p = 0,0191$ , y  $p = 0,0253$ ) (Figura 37)

##### 1.4.2. IgGt

En ninguno de los animales del estudio se observó seroconversión antes del desafío. Los niveles de las IgGt se mantuvieron en todo momento por debajo del punto de corte. En el caso del ELISA-sb, durante los días 15 y 21, las DO se elevaron, resultando significativamente superiores a la del día 30 en el que los valores descendieron por debajo de los iniciales ( $p = 0,0168$  y  $p = 0,0042$ , respectivamente) (Figura 38)

Figura 37. Evolución de las IgM en el grupo IV, inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío

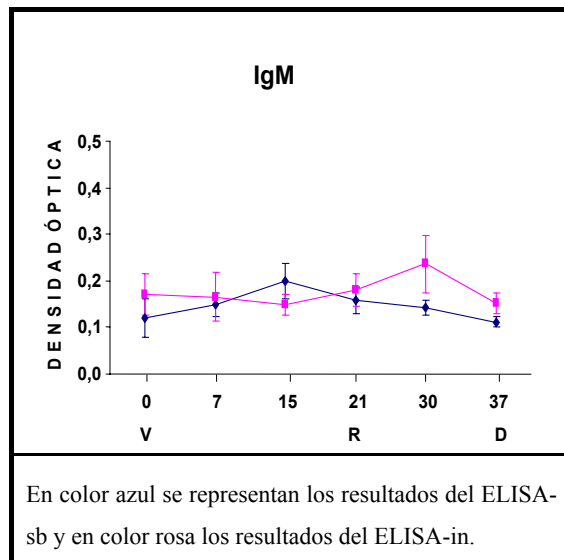
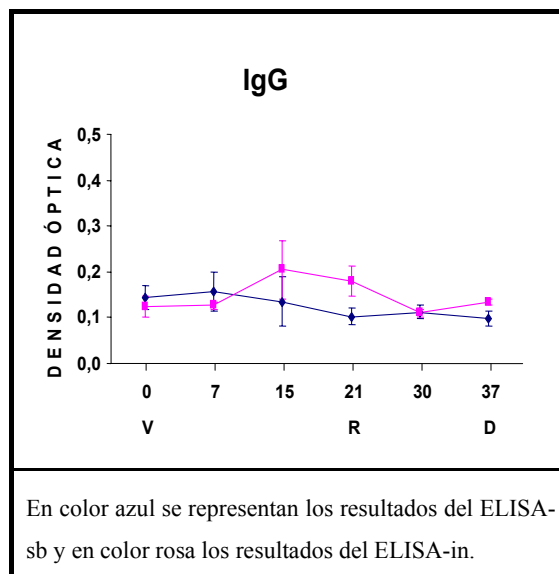


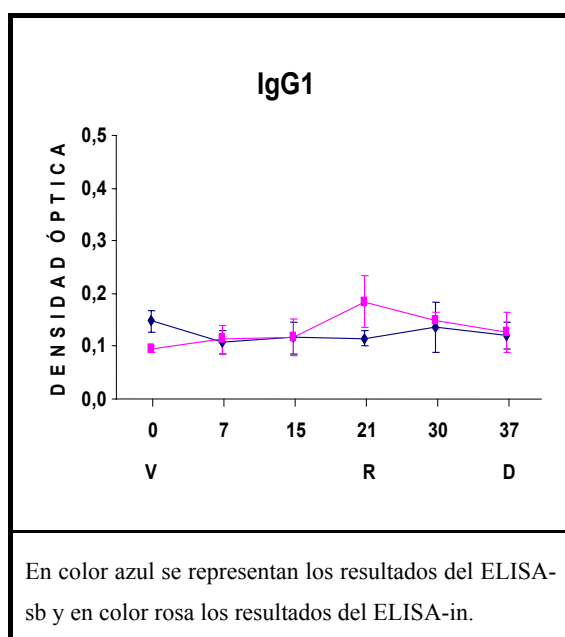
Figura 38. Evolución de las IgGt en el grupo IV, inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío



### 1.4.2.1. IgG1

La DO media del grupo, establecida con ambos ELISAs, se mantuvo siempre por debajo del punto de corte. Sólo se observó seroconversión en un animal, el cerdo nº 17 a los 21 días, y exclusivamente frente a la célula bacteriana completa. De tal forma que en este día, los niveles de IgG1 resultaron significativamente superiores a los del inicio y a los de los días 7 y 37 ( $p = 0,0019$ ,  $p = 0,0108$  y  $p = 0,0405$ , respectivamente) (Figura 39)

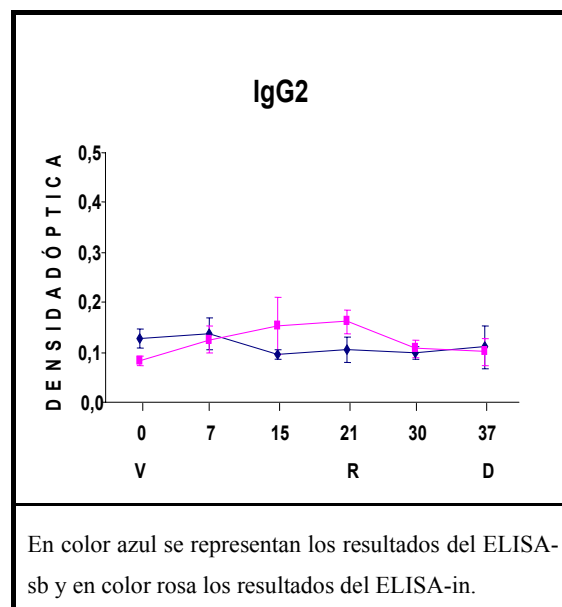
Figura 39. Evolución de la IgG1 en el grupo IV, inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío



### 1.4.2.2. IgG2

La respuesta de las IgG2 frente a los sobrenadantes con OMPs y frente a la bacteria inactivada después de la inmunización con una vacuna recombinante, se caracterizó por la ausencia de seroconversión en los animales, así como por una DO media inferior al punto de corte. No obstante, mediante el ELISA-in, se llegó a observar un incremento significativo de la DO en los días 15 y 21 respecto al día inicial ( $p = 0,001$  y  $p = 0,0009$ , respectivamente), y en el caso del día 21, también respecto a los días 30 y 37 ( $p = 0,013$  y  $p = 0,0078$ , respectivamente) (Figura 40).

Figura 40. Evolución de la IgG2 en el grupo IV, inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío



### **1.5. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo V)**

Los resultados obtenidos con el ELISA-sb y con el ELISA-in se resumen al final de este subapartado en las tablas 41 A y B.

Sólo los cerdos n° 11, 12 y 15 consiguieron sobrevivir después del desafío con una DL de *H. parasuis*, por lo que los valores de los días 3, 8 y 13 post-infección corresponden exclusivamente a esos tres cerdos.

#### **1.5.1. IgM**

La inmunización con una dosis subletal de *H. parasuis* determinó un incremento significativo de la DO frente a la bacteria inactivada a partir de los 7 días, y a partir de los 15 días frente a los sobrenadantes con OMPs. A los 21 días, la media del gupo superó al punto de corte, se indujo la seroconversión de todo el grupo en respuesta a la bacteria inactivada, y de los cerdos supervivientes frente a los sobrenadantes con OMPs. El incremento más notable de la DO se produjo en el cerdo n° 15, que a partir de los 15 días presentó valores más de cuatro veces superiores a los iniciales (Tabla 37) (Figura 41).

A los 30 días, los resultados del ELISA-sb mostraron una disminución de la DO, aunque continuó siendo significativamente superior a la del día inicial, al igual que siguió observándose la seroconversión en los tres cerdos supervivientes; siete días después, en el momento del desafío, la DO media volvió a superar el punto de corte debido al aumento de los niveles de IgM en el cerdo n° 11, que llegaron a cuadruplicar los del día inicial. En cambio, con el ELISA-in se puso de manifiesto una disminución de la DO tanto el día 30 como el 37, de tal forma que en este último, la seroconversión sólo se observó en los tres cerdos supervivientes (Tabla 37) (Figura 41).

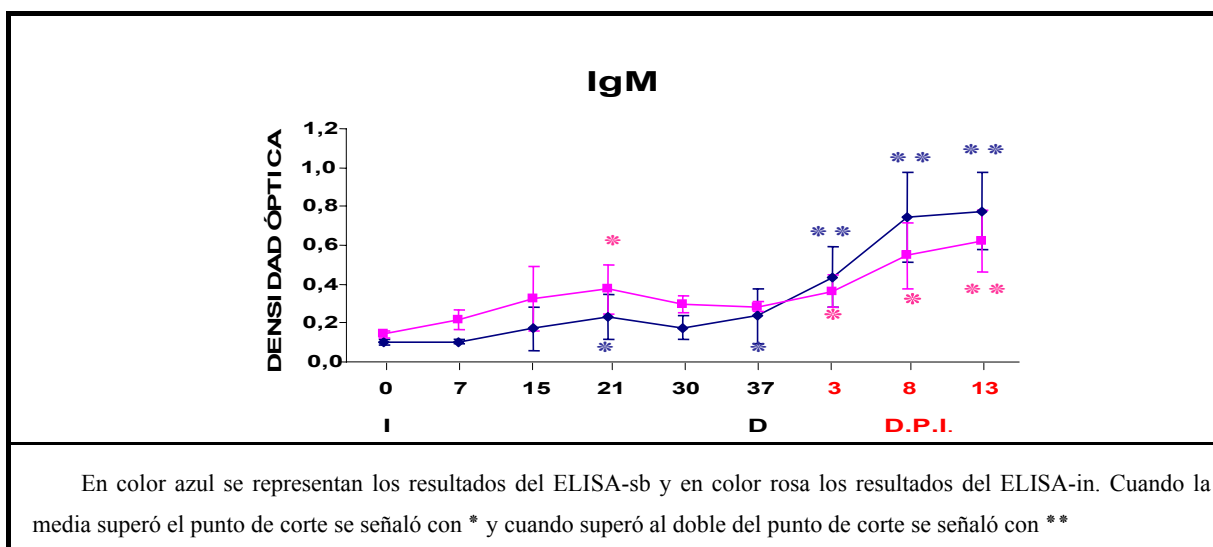
Una vez realizada la infección, se observó un aumento progresivo de la DO media, especialmente frente a los sobrenadantes con OMPs. Así, a partir de los 3 días ya se había superado el doble del punto de corte, con valores que diferían significativamente de los correspondientes a los días previos; en los días siguientes los valores continuaron con esta tendencia, por lo que las DO los días 8 y 13 resultaron significativamente superiores a las del día 3. En el caso de la célula completa, aunque a los 3 días la DO se había incrementado ligeramente por encima del punto de corte, fue posteriormente, en los días 8 y 13, cuando se superó el doble de este valor, presentando diferencias significativas con todos los días previos (Tabla 37) (Figura 41).



Tabla 37. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA-in, de la respuesta de las IgM durante la inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo V

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 15	Día 0	p = 0,0333	Día 7	Día 0	p = 0,0389
Día 21	Día 0	p = 0,0002	Día 15	Día 0	p = 0,0002
Día 21	Día 7	p = 0,0006	Día 21	Día 0	p < 0,0001
Día 30	Día 0	p = 0,0066	Día 21	Día 7	p = 0,0050
Día 30	Día 7	p = 0,0134	Día 30	Día 0	p = 0,0002
Día 37	Día 0	p = 0,0002	Día 37	Día 0	p = 0,0003
Día 37	Día 7	p = 0,0004	Día 3	Día 0	p < 0,0001
Día 3	Día 0-Día 15	p < 0,0001	Día 3	Día 7	p = 0,0167
Día 3	Día 21	p = 0,0015	Día 8	Día 0- Día 7	p < 0,0001
Día 3	Día 30	p < 0,0001	Día 8	Día 15	p = 0,0084
Día 3	Día 37	p = 0,0019	Día 8	Día 30	p = 0,0087
Día 8	Día 0- Día 37	p < 0,0001	Día 8	Día 37	p = 0,0053
Día 8	Día 3	p = 0,0318	Día 13	Día 0- Día 7	p < 0,0001
Día 13	Día 0- Día 37	p < 0,0001	Día 13	Día 15	p = 0,0012
Día 13	Día 3	p = 0,0189	Día 13	Día 30	p = 0,0184
			Día 13	Día 37	p = 0,0007
			Día 13	Día 3	p = 0,0130

Fig 41. Evolución de las IgM en el grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL de *Haemophilus parasuis*. V, vacunación; R, revacunación; D, desafío y D.P.I., días post-infección



### 1.5.2. IgGt

Los resultados de ambos ELISAs mostraron la existencia de diferencias significativas a los 21 días respecto al día inicial, además de la seroconversión del cerdo nº 12 con el ELISA-sb y del nº 15 con el ELISA-in. Un mes después de la inmunización, todos los animales del grupo presentaron seroconversión frente a las OMPs y la media superó el punto de corte, difiriendo significativamente de todos los días anteriores. En cambio, en lo referente a la bacteria inactivada, sólo se observaron diferencias significativas con los 7 primeros días de estudio, y la seroconversión se presentó exclusivamente en tres animales (cerdo nº 11, 13 y 15) (Tabla 38) (Figura 42).

En el momento del desafío, los resultados de ambos ELISAs mostraron un incremento

significativo de la DO media respecto a la de los días anteriores, junto con la seroconversión de todo el grupo. Tres días después, los dos ELISAs pusieron de manifiesto un incremento significativo de los niveles medios de las IgGt respecto a los de los 30 primeros días de este estudio. Esta tendencia creciente continuó a los 8 y 13 días post-infección, encontrándose diferencias significativas incluso con el día 37. En lo referente a las OMPs, ya desde el día 8 post-infección, la media del grupo alcanzó valores por encima del doble del punto de corte y dos de los tres cerdos supervivientes presentaron DO superiores al cuádruple de las del inicio (en el restante se produjo a los 13 días). Frente a la célula bacteriana completa, estos hallazgos se observaron el día 13; pero sólo en el cerdo nº 15, la DO media resultó superior al cuádruple de la inicial (Tabla 38) (Figura 42).

Figura 42. Evolución de las IgGt en el grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección

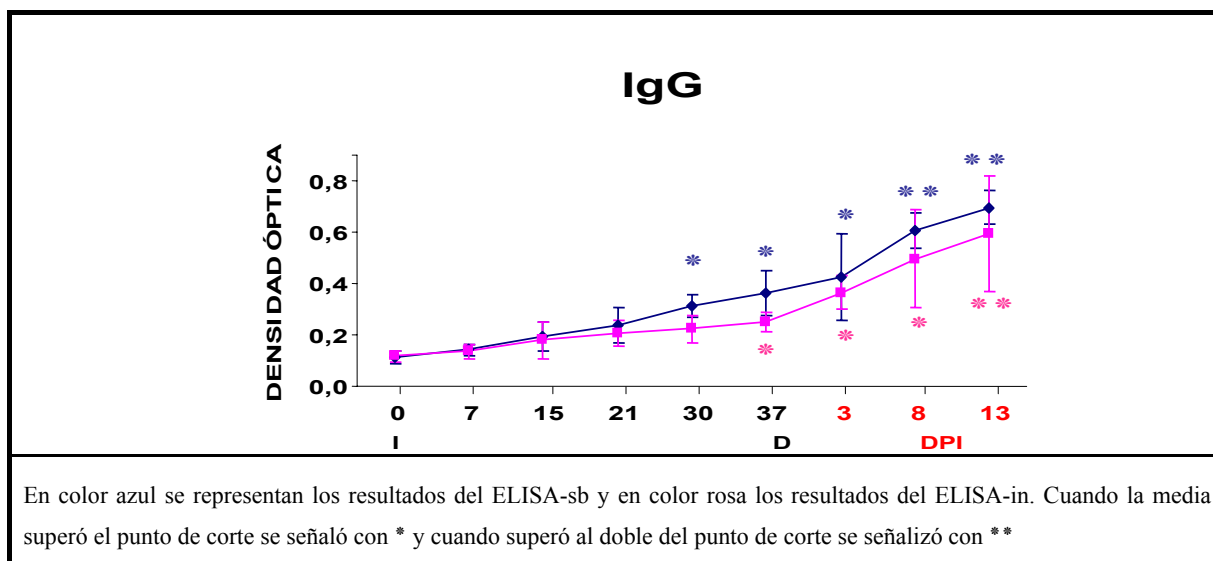


Tabla 38. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgGt durante la inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. GrupoV

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 21	Día 0	p = 0,0076	Día 21	Día 0	p = 0,0077
Día 21	Día 7	p = 0,0387	Día 30	Día 0	p = 0,0019
Día 30	Día 0	p < 0,0001	Día 30	Día 7	p = 0,0159
Día 30	Día 7	p = 0,0003	Día 37	Día 0	p = 0,0002
Día 30	Día 15	p = 0,0118	Día 37	Día 7	p = 0,0019
Día 37	Día 0 y Día 7	p < 0,0001	Día 37	Día 15	p = 0,0480
Día 37	Día 15	p = 0,0004	Día 3	Día 0	p < 0,0001
Día 37	Día 21	p = 0,0068	Día 3	Día 7	p = 0,0019
Día 3	Día 0- Día 15	p < 0,0001	Día 3	Día 15	p = 0,0013
Día 3	Día 21	p = 0,0005	Día 3	Día 21	p = 0,012
Día 3	Día 30	p = 0,0350	Día 3	Día 30	p = 0,0309
Día 8	Día 0- Día 37	p < 0,0001	Día 8	Día 0- Día 15	p < 0,0001
Día 8	Día 3	p = 0,0023	Día 8	Día 21	p = 0,0003
Día 8	Día 0- Día 3	p < 0,0001	Día 8	Día 30	p = 0,001
			Día 8	Día 37	p = 0,0069
			Día 13	Día 0- Día 37	p < 0,0001

### 1.5.2.1. IgG1

Los niveles de las IgG1 establecidos mediante el ELISA-sb fueron aumentando progresivamente después de la inmunización, pero hasta el desafío no se observó seroconversión (únicamente en los animales que sobrevivieron a la infección). Tampoco se superó el punto de corte o se encontraron diferencias significativas con el día inicial. En cambio, los resultados del ELISA-in mostraron como la DO media se incrementaba significativamente a los 15, 30 y 37 días, llegando a superar el punto de corte. En estos dos últimos días, también se observó la seroconversión de los tres cerdos que sobrevivieron a la posterior infección.

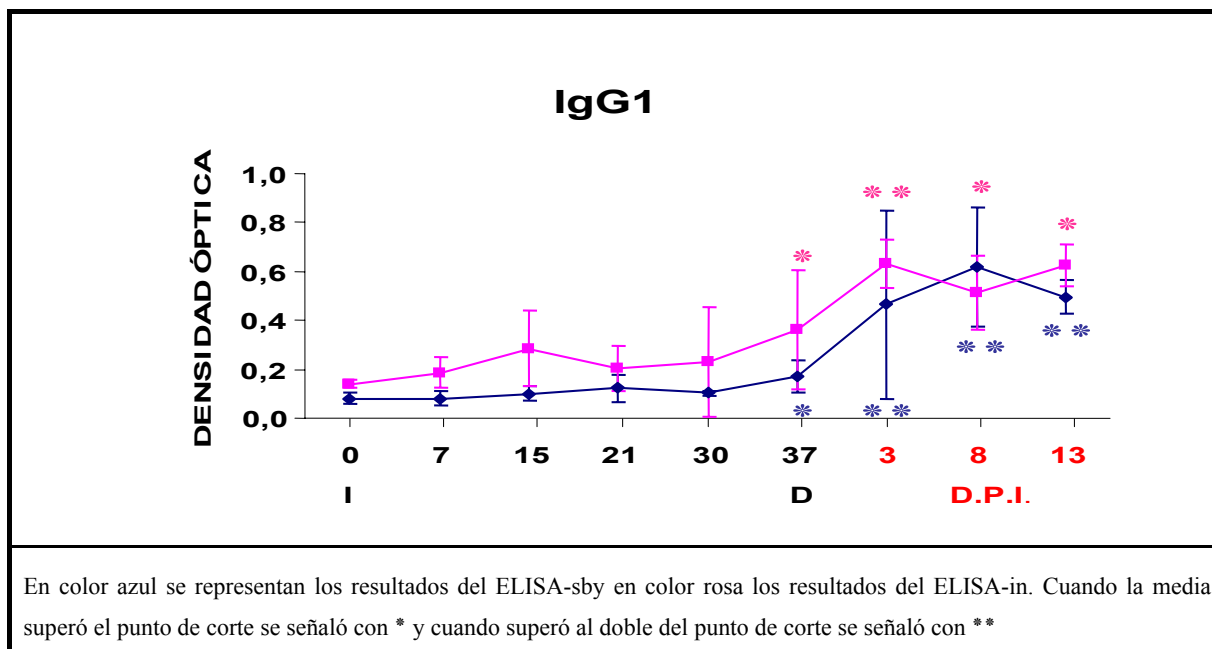
Una vez tuvo lugar el desafío, los niveles medios de las IgG1 frente a las OMPs se elevaron significativamente respecto a los días anteriores, superando el doble del punto de corte. A los 3 días el incremento más notable se presentó en los cerdos nº 12 y 15, con DO más de cuatro veces superiores a las del día inicial, y a los 8 días en el cerdo nº 11. Por lo que se refiere a la célula bacteriana completa, a partir de los tres días post-infección las DO fueron significativamente superiores en comparación con los días previos, presentando valores máximos (superiores al doble del punto de corte) en los días 3 y 13. Con el ELISA-in se observó cómo a los 3 días post-infección los niveles de IgG1 de los cerdos nº 12 y nº 15 superaban al cuádruple de los del día inicial; mientras que los del cerdo nº 11 lo hacían a los 13 días (Tabla 39) (Figura 43).

Resultados

Tabla 39 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG1 durante la inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. GrupoV

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 37	Día 0	p = 0,0006	Día 15	Día 0	p = 0,0014
Día 37	Día 7	p = 0,0004	Día 30	Día 0	p = 0,0370
Día 37	Día 15	p = 0,002	Día 37	Día 0	p = 0,0003
Día 37	Día 21	p = 0,0121	Día 37	Día 21	p = 0,0364
Día 37	Día 30	p = 0,0233	Día 3	Día 0- Día 30	p < 0,0001
Día 3	Día 0-Día 37	p < 0,0001	Día 3	Día 37	p = 0,0003
Día 8	Día 0-Día 37	p < 0,0001	Día 8	Día 0- Día 30	p < 0,0001
Día 13	Día 0-Día 37	p < 0,0001	Día 8	Día 37	p = 0,0078
			Día 13	Día 0- Día 30	p < 0,0001
			Día 13	Día 37	p = 0,0004

Figura 43. Evolución de las IgG1 en el grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío **D.P.I.**, días post-infección



### 1.5.2.2. IgG2

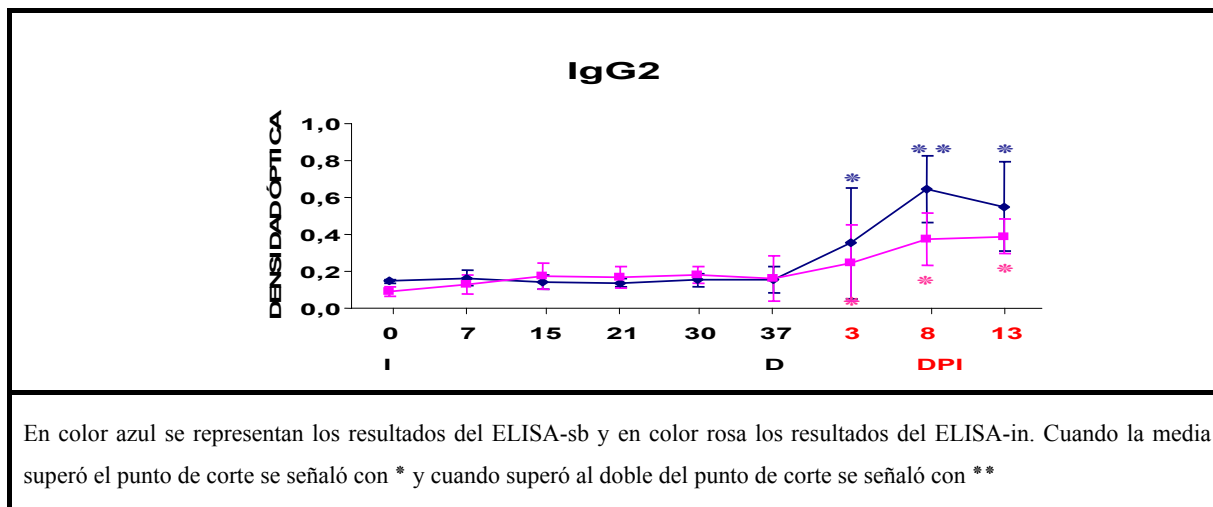
La respuesta de las IgG2 frente a los sobrenadantes con OMPs se observó después del desafío con una DL, puesto que en los días previos no se observaron cambios significativos respecto al día inicial, ni tampoco seroconversión. A los 3 días post-infección, la DO media del grupo se elevó por encima del punto de corte y se observó seroconversión en el cerdo nº 15, con valores que cuadruplicaban a los del inicio. En los días siguientes, el incremento fue más acusado y la media superó al doble del punto de corte (día 8), encontrándose diferencias con todos los días previos a la infección. Los tres cerdos alcanzaron niveles de IgG2 por encima del cuádruplo de los iniciales (Tabla 40) (Figura 44).

Los resultados del ELISA-in, mostraron cómo las IgG2 también se inducían principalmente en respuesta al desafío, aunque en este caso, ya se había observado un incremento significativo de la DO a partir de los 15 días y la seroconversión de los tres supervivientes en el día del desafío. En los días que siguieron a éste, la media del grupo superó el punto de corte, presentando una tendencia creciente a medida que transcurría el tiempo. De esta forma, a los 8 y 13 días post-infección, (con los valores más elevados de todo el estudio), además de diferencias con el día inicial, también se apreciaron incrementos significativos respecto a todos los días anteriores, incluido el día 3 post-infección. Esta acusada respuesta fue debida a que la DO del cerdo nº 15 alcanzó valores máximos, siendo más de cuatro veces superiores a los del inicio, a los 8 y 13 días post-infección (Tabla 40) (Figura 44).

Tabla 40 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG2 durante la inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. GrupoV

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 3	Día 0	p = 0,001	Día 15	Día 0	p = 0,008
Día 8	Día 0- Día 37	p < 0,0001	Día 21	Día 0	p = 0,0033
Día 13	Día 0- Día 37	p < 0,0001	Día 30	Día 0	p = 0,0015
			Día 37	Día 0	p = 0,0004
			Día 3	Día 0	p < 0,0001
			Día 3	Día 7	p = 0,0031
			Día 8	Día 0-Día 30	p < 0,0001
			Día 8	Día 37	p = 0,0004
			Día 13	Día 0-Día 37	p < 0,0001
			Día 13	Día 3	p = 0,0213

Figura 44. Evolución de las IgG2 en el grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección



### 1.5.2.3. Avidéz y afinidad de las IgG

Se realizó con los sueros de los animales que sobrevivieron al desafío. Se observó la seroconversión a partir del día 30, por lo que la determinación de este parámetro se llevó a

cabo en los sueros recogidos desde ese momento hasta el final del estudio, sin hallarse diferencias significativas. En el caso del ELISA-sb, los valores medios estaban comprendidos entre 1,02 y 1,32, y entre 1,09 y 1,36 para el ELISA-in. (Figura 45)

Figura 45. Evolución de índice de avidéz medio de las IgGt en el grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección

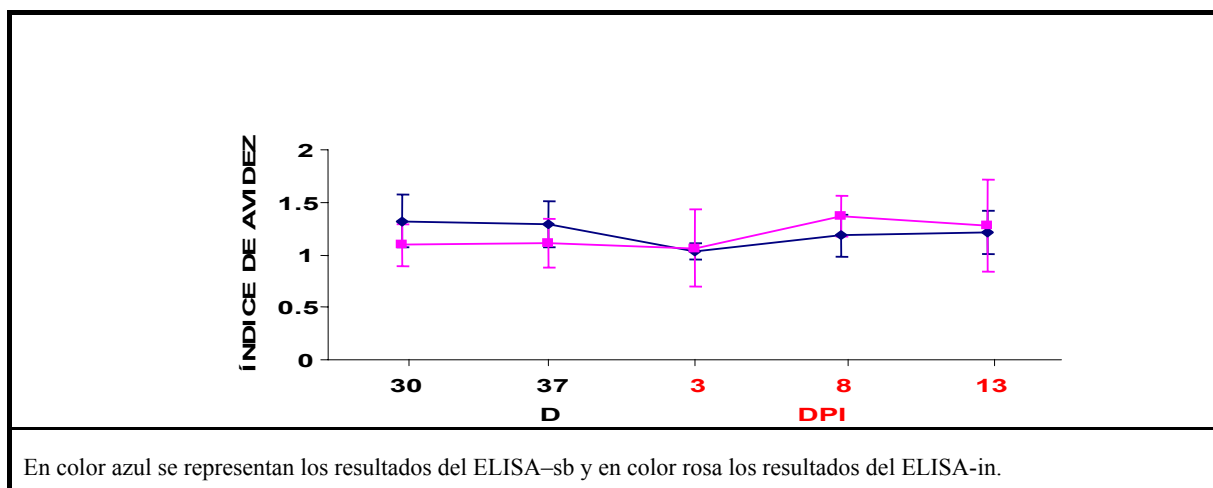


Tabla 41. A. **ELISA-sb**. Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

	Día 7 (D7)	Día 15 (D15)	Día 21 (D21)	Día 30 (D30)	Día 37 (D37)	Día 3 (D3)	Día 8 (D8)	Día 13 (D13)
<b>IgM</b>	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0 Seroconversión cerdo nº 15	↑sig respecto D0 y D7 $\mu > Pc$ Seroconversión cerdos nº 11, 12 y 15	↑sig respecto D0 y D7 Seroconversión cerdos nº 11, 12 y 15	↑sig respecto D0 y D7 $\mu > Pc$ Seroconversión cerdos nº 11, 12 y 15	↑sig respecto D0-D37 $\mu > 2x Pc$ Seroconversión cerdos nº 11, 12 y 15	↑sig respecto D0-D3 $\mu > 2x Pc$ Seroconversión cerdos nº 11, 12 y 15	Idem D8
<b>IgGt</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0 y D7 Seroconversión cerdo nº 12	↑sig respecto D0-D15 $\mu > Pc$ Seroconversión de todos los cerdos	↑sig respecto D0- D21 $\mu > Pc$ Seroconversión de todos los cerdos	↑sig respecto D0- D30 $\mu > Pc$ Seroconversión cerdos nº 11, 12 y 15	↑sig respecto D0-D3 $\mu > 2x Pc$ Seroconversión cerdos nº 11, 12 y 15	Idem D8
<b>IgG1</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0- D30 $\mu > Pc$ Seroconversión cerdos nº 11, 12 y 15	↑sig respecto D0-D37 $\mu > 2x Pc$ Seroconversión cerdos nº 11, 12 y 15.	Idem D3	Idem D3 y D8
<b>IgG2</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0 $\mu > Pc$ Seroconversión cerdo nº 15	↑sig respecto D0-D37 $\mu > 2x Pc$ Seroconversión cerdos nº 11, 12 y 15	↑sig respecto D0-D37 $\mu > Pc$ Seroconversión cerdos nº 11, 12 y 15

Tabla 41. B. **ELISA-in**. Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

	Día 7 (D7)	Día 15 (D15)	Día 21 (D21)	Día 30 (D30)	Día 37 (D37)	Día 3 (D3)	Día 8 (D8)	Día 13 (D13)
<b>IgM</b>	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdo n° 14 y 15	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0 y D7 Seroconversión todos los cerdos	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 11, 12, 13 y 15	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0 y D7 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0, D7, D15 y D37 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15	$\mu > 2x Pc$ ↑ sig respecto D0-D3 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15.
<b>IgGt</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig. Seroconversión cerdo n° 15	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdo n° 15	↑ sig respecto D0 y D7 Seroconversión cerdos n° 11, 13 y 15.	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0-D15 Seroconversión cerdos n° 11, 12, 13 y 15	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0-D30 Seroconversión cerdos n° 11, 12, y15	$\mu > 2x Pc$ ↑ sig respecto D0-D37 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15	Idem D8
<b>IgG1</b>	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdo n° 15	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0 y D21 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15.	$\mu > 2x Pc$ ↑ sig respecto D0-D37 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0-D37 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15	Idem D3
<b>IgG2</b>	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15.	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0 y D7 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0- D37 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0- D3 Seroconversión cerdos n° 11, 12 y 15

$\mu$  Valor medio. **Pc**. Punto de corte. ↑ Incremento. **2x**, Doble. **Sig.** Significativo



## 2. Cerdos criados de forma convencional

### 2.1. Inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una dosis letal de *H. parasuis* (grupo VI)

Los resultados obtenidos se resumen al final de este subapartado en las tablas 46 A y B.

#### 2.1.1. IgM

Mediante el ELISA-in, la respuesta a la vacunación con la bacterina A se caracterizó por un aumento significativo de la DO media desde el día 15 hasta el 37, así como por la seroconversión de los cerdos nº 26 y 27. Resultados similares se observaron con el ELISA-sb a los 30 días, ya que en los días anteriores, no se anotaron diferencias significativas con el día inicial, y sólo se observó la seroconversión del cerdo nº 26.

En los días que siguieron a la infección se puso de manifiesto un incremento de la DO media, con valores significativamente más elevados que los observados al inicio del estudio. En el caso del ELISA-sb, también se anotaron diferencias significativas respecto a los días posteriores a la revacunación. En este ELISA, la seroconversión de los tres animales se observó en el día 8 post-infección, en el que también se incrementaron los niveles de IgM de los cerdos nº 26 y nº 27 por encima del cuádruplo de los registros del día inicial. En el ELISA-in, la seroconversión de todos los cerdos del grupo se indujo a partir de los 3 días y los valores fueron decreciendo a partir de ese momento, de tal forma que sólo en este día y en el día 8 post-infección, además de hallarse diferencias con los siete primeros días del estudio, también se observaron con respecto a los días 15 y 21 (Tabla 46) (Figura 23).

Figura 46. Evolución de las IgM en el grupo VI, inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección

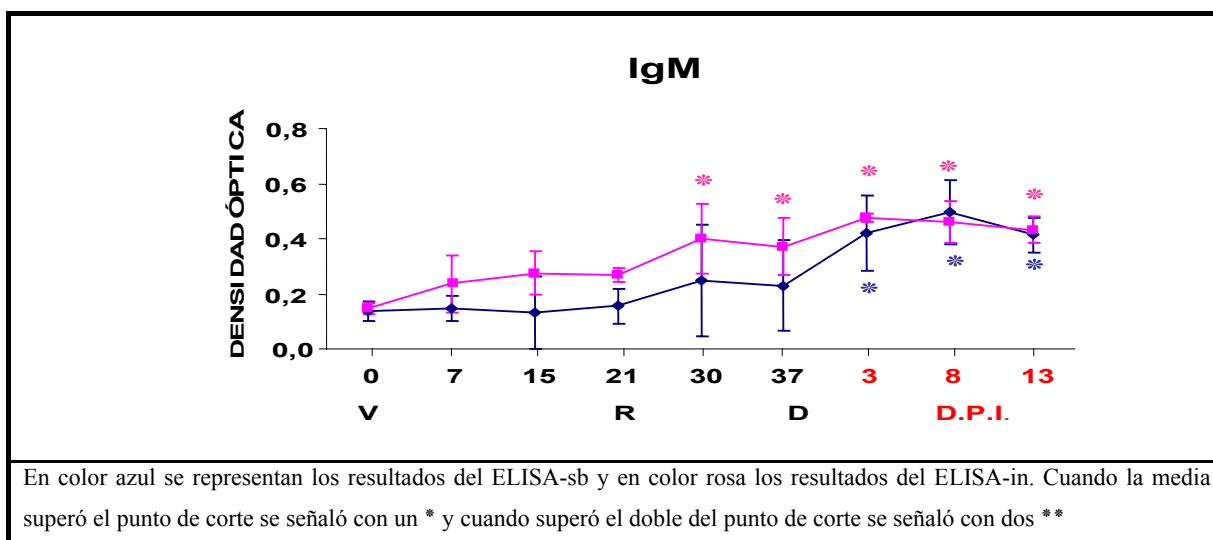


Tabla 42 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA-in, de la respuesta de las IgM durante la inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. GrupoVI

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 30	Día 0	p = 0,0424	Día 15	Día 0	p = 0,0134
Día 30	Día 15	p = 0,0102	Día 21	Día 0	p = 0,0143
Día 37	Día 15	p = 0,0162	Día 30	Día 0	p < 0,0001
Día 3	Día 0-Día 15	p < 0,0001	Día 30	Día 7	p = 0,0239
Día 3	Día 21	p = 0,0004	Día 37	Día 0	p < 0,0001
Día 3	Día 30	p = 0,0304	Día 37	Día 7	p = 0,0470
Día 3	Día 37	p = 0,0199	Día 3	Día 0	p < 0,0001
Día 8	Día 0-Día 21	p < 0,0001	Día 3	Día 7	p = 0,0021
Día 8	Día 30	p = 0,0042	Día 3	Día 15	p = 0,0208
Día 8	Día 37	p = 0,0025	Día 3	Día 21	p = 0,0317
Día 13	Día 0-Día 21	p < 0,0001	Día 8	Día 0	p < 0,0001
Día 13	Día 30	p = 0,0161	Día 8	Día 7	p = 0,0036
Día 13	Día 37	p = 0,0102	Día 8	Día 15	p = 0,0317
			Día 8	Día 21	p = 0,03
			Día 13	Día 0	p < 0,0001
			Día 13	Día 7	p = 0,0072

### 2.1.2. IgGt

Los resultados de ambos ELISAs antes del desafío mostraron un incremento significativo de los niveles de las IgGt en los días 30 y 37 respecto a los días previos, así como la seroconversión de los tres animales frente a la célula bacteriana inactivada, y de los cerdos n° 26 y n° 27 frente a los sobrenadantes con OMPs (Tabla 43) (Figura 47)

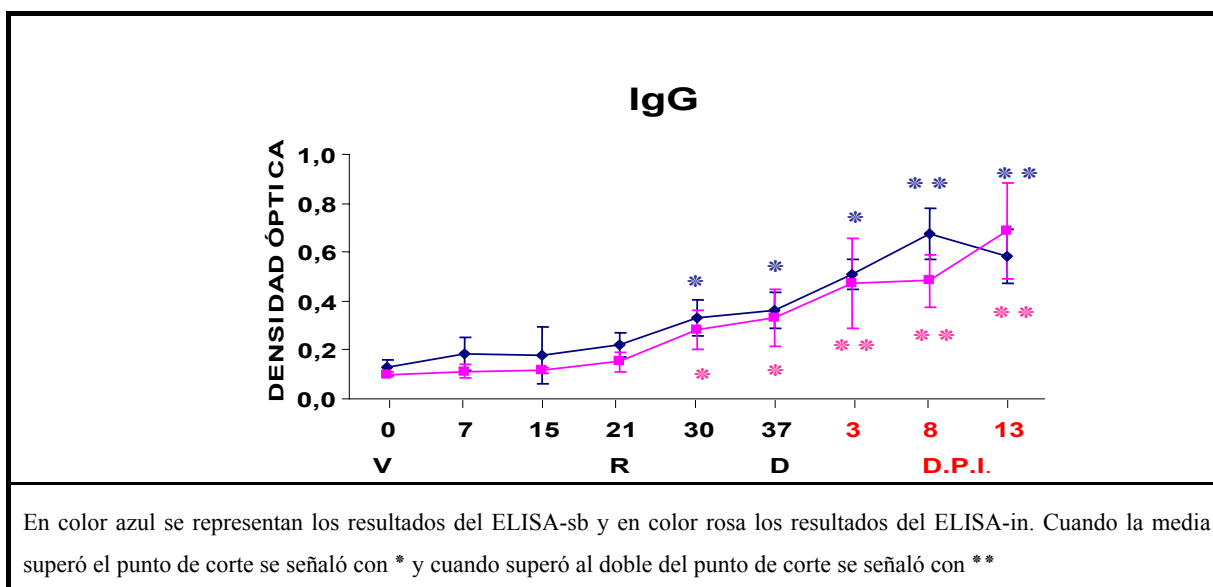
Después del desafío la DO continuó creciendo y presentó valores superiores al doble del punto de corte: a los 3, 8 y 13 días post-infección en el ELISA-in y sólo en los dos últimos días en el ELISA-sb. Los niveles de las

IgGt frente a los sobrenadantes con OMPs en estos tres días post-infección difirieron de forma significativa con los de los días comprendidos entre el inicio del estudio y el desafío; además en los cerdos n° 26 y n° 27, a partir los 8 días, las DO cuadruplicaron a las del día inicial, y a los 13 días en el cerdo n° 28. En cambio, frente a la bacteria inactivada, hasta el día 13 no se apreciaron diferencias significativas con los días posteriores a la revacunación; aunque ya desde el día 3 post-infección, dos de los animales presentaron una DO superior al cuádruple de la del inicio, y a partir del día 8 los tres cerdos (Tabla 43) (Figura 47).

Tabla 43 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA-in, de la respuesta de las IgGt durante la inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VI

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 30	Día 0	p = 0,001	Día 30	Día 0	p = 0,0002
Día 30	Día 7	p = 0,015	Día 30	Día 7	p = 0,0005
Día 30	Día 15	p = 0,0063	Día 30	Día 15	p = 0,0012
Día 30	Día 21	p = 0,0107	Día 30	Día 21	p = 0,0178
Día 37	Día 0	p = 0,0001	Día 37	Día 0 y Día 7	p < 0,0001
Día 37	Día 7	p = 0,0003	Día 37	Día 15	p = 0,0002
Día 37	Día 15	p = 0,017	Día 37	Día 21	p = 0,0040
Día 37	Día 21	p = 0,002	Día 3	Día 0- Día 21	p < 0,0001
Día 3	Día 0- Día 21	p < 0,0001	Día 8	Día 0- Día 21	p < 0,0001
Día 3	Día 30	p = 0,0028	Día 13	Día 0- Día 21	p < 0,0001
Día 3	Día 30	p = 0,015	Día 13	Día 30	p = 0,0008
Día 8	Día 0- Día 37	p < 0,0001	Día 13	Día 37	p = 0,0042
Día 8	Día 3	p = 0,0053			
Día 13	Día 0- Día 37	p < 0,0001			

Fig 47. Evolución de las IgGt en el grupo VI, inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una dosis letal de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección



### 2.1.2.1. IgG1

A partir de los resultados de los dos ensayos, se pudo observar que después de la revacunación se inducía la seroconversión de todo el grupo, y cómo desde ese momento y hasta el final del estudio, la DO media se incrementó progresivamente, presentando en todos los muestreos valores superiores al punto de corte. Con el ELISA-sb, se encontraron valores muy similares en los días 30, 37 y 3 post-infección, significativamente superiores a los observados en los días previos; no obstante tanto en el día 37 como en el 3, a diferencia del 30, sólo se observó seroconversión en dos cerdos (nº 27 y nº 28). Respecto al ELISA-in, destacar que además del incremento observado

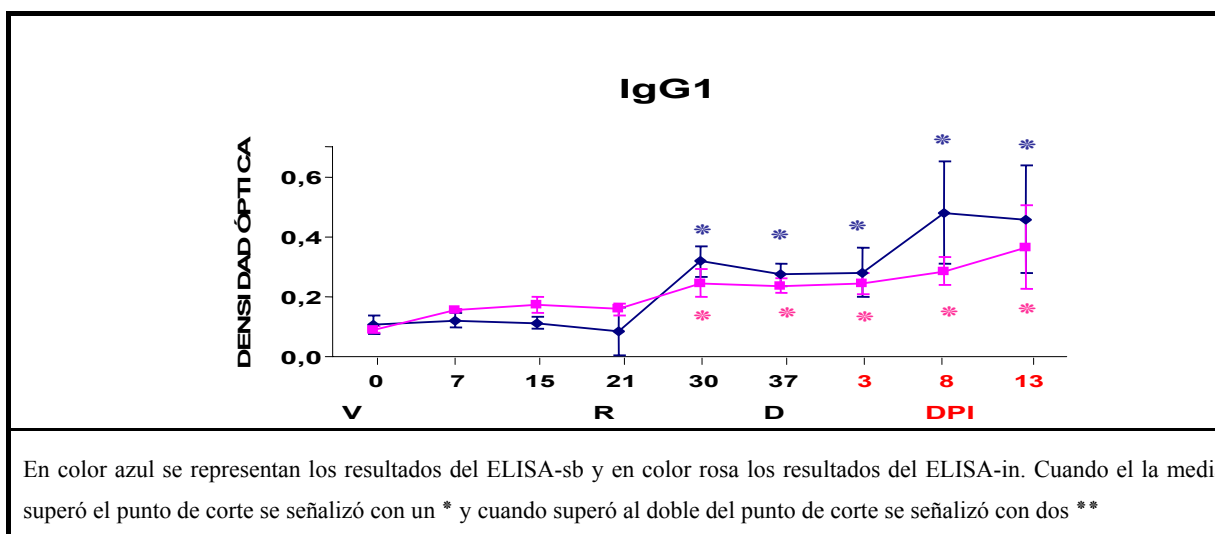
después de la revacunación, los niveles de IgG1 ya se habían elevado significativamente, en comparación con el día inicial, a los 7, 15 y 21 días (Tabla 44) (Figura 48)

Finalmente, en los días 8 y 13 post-infección, se alcanzaron los valores más elevados del estudio para ambos ensayos y en algunos casos, como el del cerdo nº 28 frente a las OMPs, o el del nº 27 frente a las OMPs y la célula bacteriana completa, las DO llegaron a superar el cuádruple de los registros iniciales. No obstante, en ninguno de estos días, los niveles de las IgGt llegaron a superar significativamente a los de los días posteriores a la revacunación, aunque sí a los anteriores (Tabla 44) (Figura 48).

Tabla 44. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG1 durante la inmunización con la bacterina comercial A y infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VI

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 30	Día 0- Día 21	p < 0,0001	Día 7	Día 0	p = 0,0274
Día 37	Día 0	p = 0,0003	Día 15	Día 0	p = 0,0087
Día 37	Día 7	p = 0,0009	Día 21	Día 0	p = 0,0226
Día 37	Día 15	p = 0,0006	Día 30	Día 0	p < 0,0001
Día 37	Día 21	p < 0,0001	Día 37	Día 0	p < 0,0001
Día 3	Día 0	p = 0,0003	Día 3	Día 0	p < 0,0001
Día 3	Día 7	p = 0,0008	Día 8	Día 0	p < 0,0001
Día 3	Día 15	p = 0,0006	Día 8	Día 7	p = 0,0139
Día 37	Día 21	p < 0,0001	Día 8	Día 15	p = 0,0411
Día 8	Día 0- Día 21	p < 0,0001	Día 8	Día 21	p = 0,017
Día 13	Día 0- Día 21	p < 0,0001	Día 13	Día 7	p = 0,011
			Día 13	Día 15	p = 0,0043
			Día 13	Día 21	p = 0,0013

Fig 48. Evolución de las IgG1 en el grupo VI, inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección



### 2.1.2.2 IgG2

Al igual que lo descrito para las IgG1, no se empezó a observar seroconversión en los cerdos del grupo hasta después de la revacunación, a los 30 días frente a las OMPS y a los 37 frente a la bacteria inactivada y fue a partir de esos dos días cuando la media superó el punto de corte. De nuevo, en el caso del ELISA-in, las DO se incrementaron significativamente de forma más temprana que en ELISA-sb (a partir de los 15 días en el ensayo con la bacteria inactivada y de los 30 en el otro ELISA); de tal forma que sólo en este último ensayo se observó como las DO de los días 30 y 37, además de ser significativamente superiores respecto a las del día inicial, también lo eran respecto a los días 7, 15 y 21 (Tabla 45) (Figura 49).

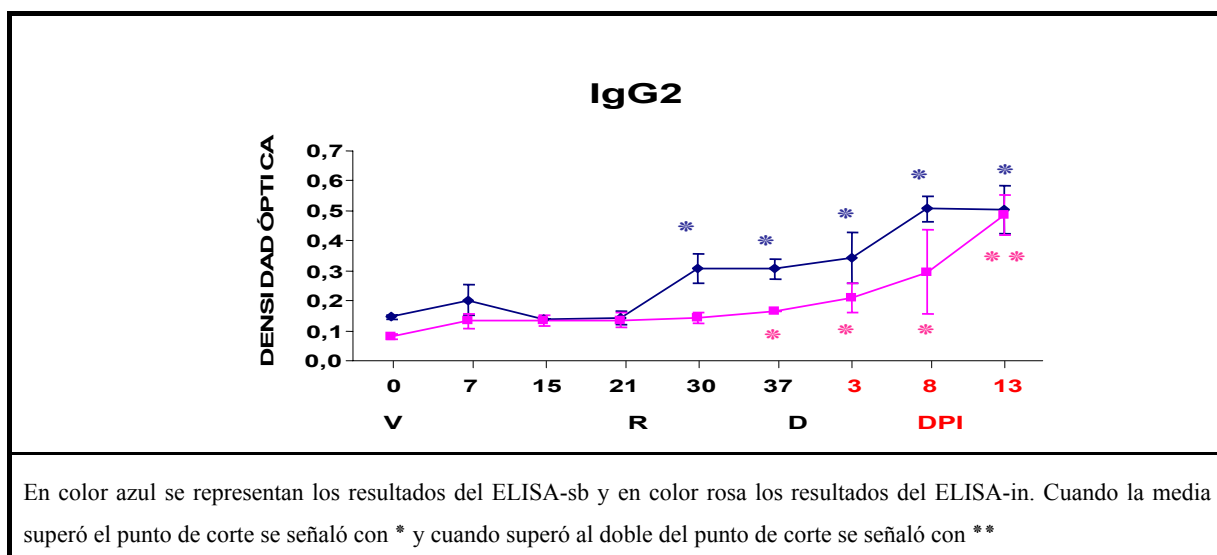
Los cambios inducidos en los niveles de las IgG2 después de la infección con una DL, tanto frente a los sobrenadantes con OMPs, como frente a la célula inactivada, no se empezaron a poner de manifiesto hasta los 8 días. Así mientras que en el día 3 post-infección los valores eran similares a los de los días 30 y 37, en los días 8 y 13 post-infección se alcanzaron valores significativamente superiores a los de esos dos días. Además, los resultados del ELISA-in mostraron cómo en el día 13, incluso se llegaba a superar el doble del punto de corte, y los niveles de las IgG2 de los tres cerdos del grupo presentaban valores más de cuatro veces superiores a los iniciales, lo que explicaría las diferencias halladas entre este día y los días 3 y 8 post-infección (Tabla 45) (Figura 49).

Resultados

Tabla 45. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA-in, de la respuesta de las IgG2 durante la inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VI

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 30	Día 0	p = 0,0011	Día 15	Día 0	p = 0,0312
Día 30	Día 7	p = 0,0343	Día 21	Día 0	p = 0,0271
Día 30	Día 15	p = 0,0005	Día 30	Día 0	p = 0,0167
Día 30	Día 21	p = 0,0008	Día 15	Día 0	p = 0,0012
Día 37	Día 0	p = 0,0011	Día 3	Día 0	p < 0,0001
Día 37	Día 7	p = 0,0412	Día 8	Día 0	p < 0,0001
Día 37	Día 15	p = 0,0005	Día 8	Día 7	p = 0,0010
Día 37	Día 21	p = 0,0009	Día 8	Día 15	p = 0,0012
Día 3	Día 0	p = 0,0002	Día 8	Día 21	p = 0,0015
Día 3	Día 7	p = 0,0177	Día 8	Día 30	p = 0,0027
Día 3	Día 15	p = 0,0001	Día 8	Día 37	p = 0,0310
Día 3	Día 21	p = 0,0002	Día 13	Día 0- Día 37	p < 0,0001
Día 8	Día 0- Día 21	p < 0,0001	Día 13	Día 3	p = 0,0022
Día 8	Día 30	p = 0,0254	Día 13	Día 37	p = 0,0141
Día 8	Día 37	p = 0,0290			
Día 13	Día 0- Día 21	p < 0,0001			
Día 13	Día 30	p = 0,0255			
Día 13	Día 37	p = 0,0295			

Figura 49. Evolución de las IgG2 en el grupo VI, inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección



### 2.1.2.3 Aidez y afinidad de las IgGt

La determinación de la aidez se llevó a cabo desde el día 30 hasta el día 13 post-infección, puesto que según los resultados de ambos ELISAs, en esos días se observó la seroconversión de los tres cerdos del grupo. No

se encontraron diferencias significativas entre los distintos días del estudio, y los valores obtenidos oscilaron entre 1,24 y 1,7 para el ELISA-sb y entre 1,33 y 1,85 para el ELISA-in, siendo los más elevados los correspondientes al día 8 post-infección (Figura 50).

Figura 50. Evolución de índice de aidez medio de las IgGt en el grupo VI inmunizado con la bacteria comercial A y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección

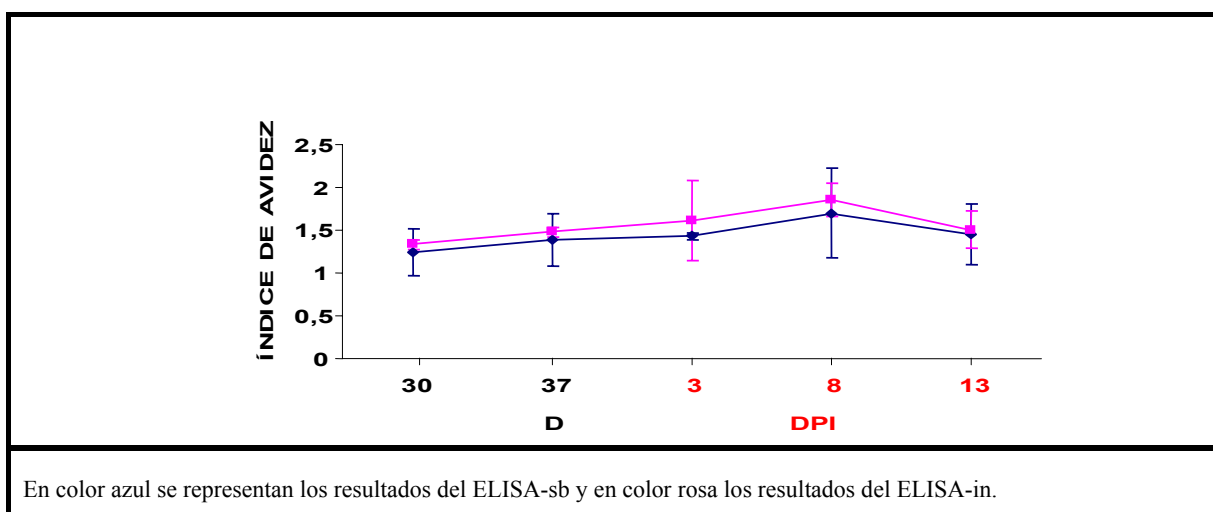


Tabla 46. A. **ELISA-sb**. Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

	Día 7 (D7)	Día 15 (D15)	Día 21 (D21)	Día 30 (D30)	Día 37 (D37)	Día 3 (D3)	Día 8 (D8)	Día 13 (D13)
<b>IgM</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig. Seroconversión cerdo n° 26	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0 y D15 Seroconversión cerdos n° 26 y 27	↑sig respecto D15 Seroconversión cerdos n° 27	↑sig respecto D0-D37 Seroconversión cerdos n° 26 y 27	↑sig respecto D0-D37 Seroconversión todos los cerdos	Idem D8
<b>IgGt</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig. Seroconversión cerdo n° 26	Sin diferencias sig. Seroconversión cerdo n° 27	↑sig respecto D0-D21 Seroconversión cerdos n° 26 y 27	Idem D30	↑sig respecto D0-D37 Seroconversión todos los cerdos	↑sig respecto D0-D37 Seroconversión todos los cerdos	↑sig respecto D0-D37 Seroconversión todos los cerdos
<b>IgG1</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	↑sig respecto D0-D21 Seroconversión cerdos n° 27 y 28	Idem D37	Idem D30	Idem D30 y D8
<b>IgG2</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	Idem D30	Idem D30 y D37	↑sig respecto D0-D37 Seroconversión todos los cerdos	Idem D8



Tabla 46. B. **ELISA-in**. Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

	Día 7 (D7)	Día 15 (D15)	Día 21 (D21)	Día 30 (D30)	Día 37 (D37)	Día 3 (D3)	Día 8 (D8)	Día 13 (D13)
<b>IgM</b>	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 26 y 27	Idem D15	↑ sig respecto D0 y D7 Seroconversión cerdos n° 26 y 27	Idem D30	↑ sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	↑ sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	↑ sig respecto D0 y D7 Seroconversión todos los cerdos
<b>IgGt</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	Idem D30	↑ sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	Idem D3	↑ sig respecto D0-D37 Seroconversión todos los cerdos
<b>IgG1</b>	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0 Seroconversión todos los cerdos	Idem D30	Idem D30 y D37	↑ sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	Idem D8
<b>IgG2</b>	Sin diferencias sig.	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0	↑ sig respecto D0 Seroconversión todos los cerdos	Idem D37	↑ sig respecto D0-D37 Seroconversión todos los cerdos	↑ sig respecto D0-D8 Seroconversión todos los cerdos

μ Valor medio. Pc. Punto de corte. ↑ Incremento. 2x, Doble. Sig. Significativo

## 2.2. Inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una dosis subletal (grupo VII)

Los resultados se resumen al final de este subapartado en las tablas 51 A y B.

### 2.2.1. IgM

Los dos ensayos ofrecieron resultados diferentes, especialmente en los días previos al desafío. Mientras que con el ELISA-sb no se hallaron diferencias significativas entre el inicio del estudio y el desafío, con el otro ensayo se detectaron incrementos significativos en los días 7, 15, 30 y 37 del estudio. Además, con este último ensayo también se observó seroconversión en los cerdos nº 31, 29 y 30, a los 7, 15 y 37 días, respectivamente; mientras que frente a los sobrenadantes con OMPs, sólo se observó en el cerdo nº 31, en los días 30 y 37.

Una vez realizado el desafío se detectó un incremento progresivo de la DO. Los niveles de las IgM frente a las OMPs se incrementaron de forma significativa a los 3 días respecto a los días previos a la revacunación, pero el incremento más destacado se produjo en los siguientes muestreos. Así, a los 8 y 13 días post-infección, los tres cerdos presentaron seroconversión, con valores superiores al punto de corte y que diferían significativamente, incluso de los días posteriores a la revacunación. En cambio con el ELISA-in, a partir de los 3 días post-infección ya se observó seroconversión en todos los animales y una DO media superior al punto de corte. Los valores de los días 8 y 13 también fueron los más elevados y además de diferencias con el día inicial, también se encontraron respecto a los días 7 y 21 del estudio (Tabla 47) (Figura 51).

Figura 51. Evolución de las IgM en el grupo VII, inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección

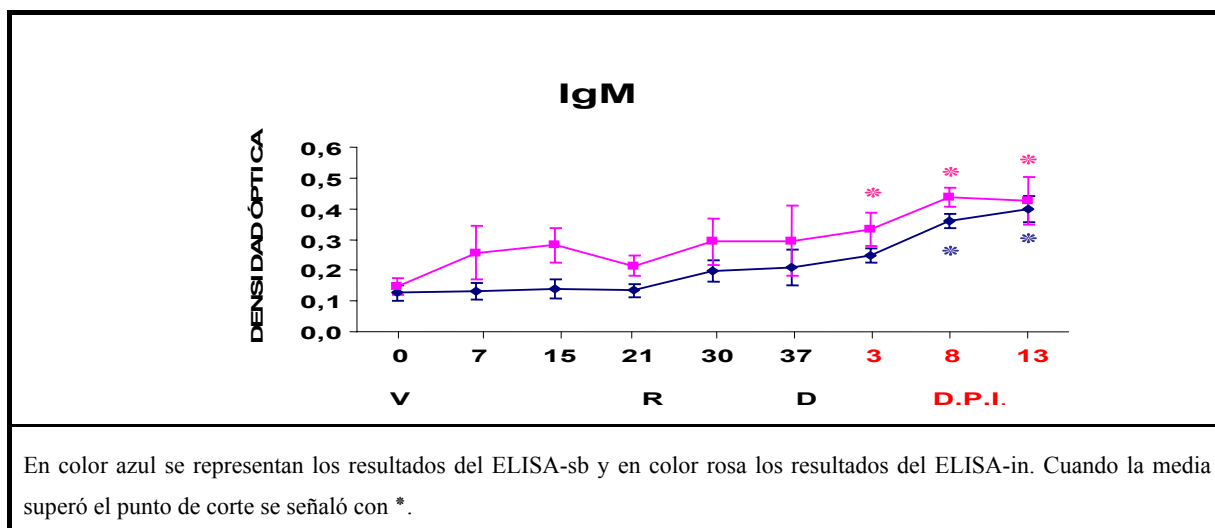


Tabla 47. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA-in, de la respuesta de las IgM durante la inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. GrupoVII

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 3	Día 0	p = 0,0072	Día 7	Día 0	p = 0,0322
Día 3	Día 7	p = 0,0118	Día 15	Día 0	p = 0,0092
Día 3	Día 15	p = 0,0193	Día 30	Día 0	p = 0,0063
Día 3	Día 21	p = 0,0150	Día 37	Día 0	p = 0,0077
Día 8	Día 0- Día 21	p < 0,0001	Día 3	Día 0	p = 0,0011
Día 8	Día 30	p = 0,0142	Día 8	Día 0	p < 0,0001
Día 8	Día 37	p = 0,0249	Día 8	Día 7	p = 0,0210
Día 13	Día 0- Día 21	p < 0,0001	Día 8	Día 21	p = 0,0036
Día 13	Día 30	p = 0,0047	Día 13	Día 0	p < 0,0001
Día 13	Día 37	p = 0,0087	Día 13	Día 7	p = 0,0036
			Día 8	Día 21	p = 0,0055

### 2.2.2. IgGt

Al igual que lo descrito para las IgM, se observaron diferencias entre los resultados de ambos ELISAs durante los días previos al desafío. Las primeras divergencias se advirtieron después la primera vacunación, puesto que sólo frente a las OMPs se pudo observar una respuesta de las IgGt. Así, se produjo un incremento significativo de la DO a partir del día 7, la seroconversión de todo el grupo a los 15 días, y de los cerdos n° 29 y n° 30 a los 21 días (Tabla 48) (Figura 36).

Después de la revacunación las DO se elevaron significativamente respecto a los días anteriores, superando el punto de corte; bien a partir de los 30 días, en el caso del ELISA-sb o de los 37, en el caso del ELISA-in. Al mismo tiempo, se advirtió la seroconversión de los tres cerdos del grupo, que en algunos casos

llegaron a presentar valores más de cuatro veces superiores a los iniciales (Tabla 48) (Figura 52)

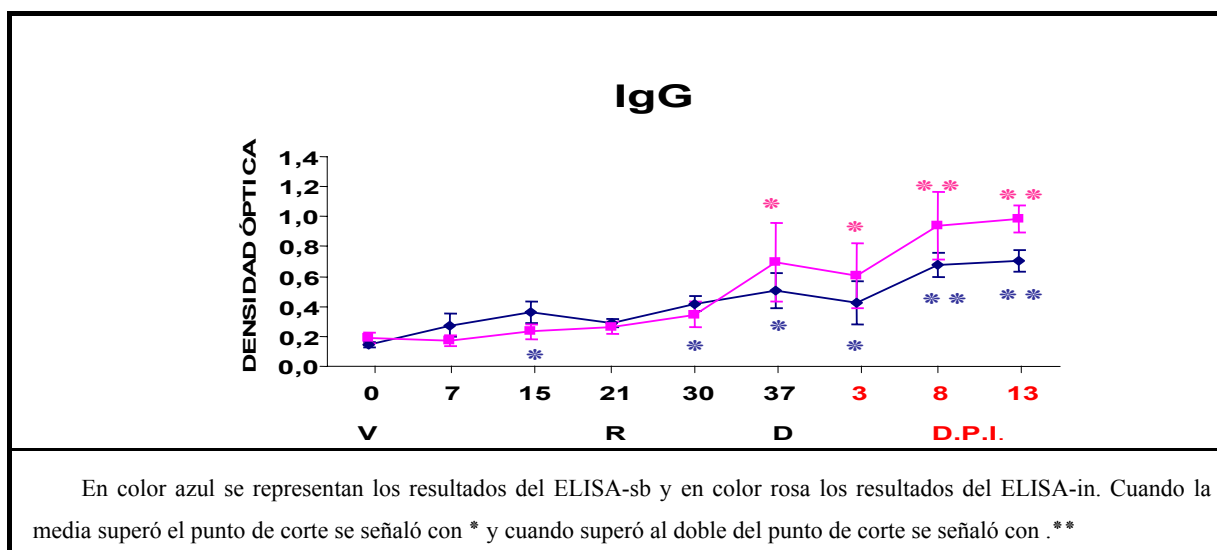
En respuesta al desafío las DO apenas sufrieron modificaciones a los tres días post-infección; pero sí a los 8 y 13 días, alcanzándose valores superiores al doble del punto de corte, que diferían significativamente de todos los días anteriores, incluidos el desafío y el día 3 post-infección. Todos los cerdos del grupo presentaron unos niveles de IgGt frente a las OMPs más de cuatro veces superiores a los del inicio. En cambio, frente a la bacteria inactivada, estos hallazgos no se observaron hasta los 13 días (a los 8 días sólo se observó en los cerdos n° 29 y n° 30) (Tabla 48) (Figura52).

Resultados

Tabla 48 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgGt durante la inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. GrupoVII

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 7	Día 0	p = 0,0327	Día 30	Día 0	p = 0,0073
Día 7	Día 0	p = 0,0003	Día 30	Día 7	p = 0,0095
Día 21	Día 0	p = 0,015	Día 37	Día 0- Día 15	p < 0,0001
Día 30	Día 0	p < 0,0001	Día 37	Día 21	p = 0,0005
Día 30	Día 7	p = 0,013	Día 37	Día 30	p = 0,0124
Día 30	Día 21	p = 0,0297	Día 3	Día 0- Día 15	p < 0,0001
Día 37	Día 0 y Día 7	p < 0,0001	Día 3	Día 21	p = 0,0025
Día 37	Día 15	p = 0,0141	Día 3	Día 30	p = 0,0449
Día 37	Día 21	p = 0,0003	Día 8	Día 0- Día 30	p < 0,0001
Día 3	Día 0	p < 0,0001	Día 8	Día 37	p = 0,0002
Día 3	Día 7	p = 0,0107	Día 13	Día 0- Día 37	p < 0,0001
Día 3	Día 21	p = 0,0240	Día 13	Día 3	p = 0,0420
Día 8	Día 0-Día 30	p < 0,0001			
Día 8	Día 37	p = 0,0038			
Día 8	Día 3	p < 0,0001			
Día 13	Día 0-Día 30	p < 0,0001			
Día 13	Día 37	p = 0,0011			
Día 13	Día 3	p < 0,0001			

Figura 52 Evolución de las IgGt en el grupo VII, inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una dosis letal de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección



### 2.2.2.1. IgG1

Los resultados de ambos ELISAs mostraron la seroconversión de todo el grupo después de la revacunación: a los 30 días frente a las OMPs y una semana después frente a la célula bacteriana completa; aunque en este caso, a los 30 días dos animales ya presentaron seroconversión. Los valores de ambos días difirieron significativamente respecto a todos los días anteriores, aunque en el caso del

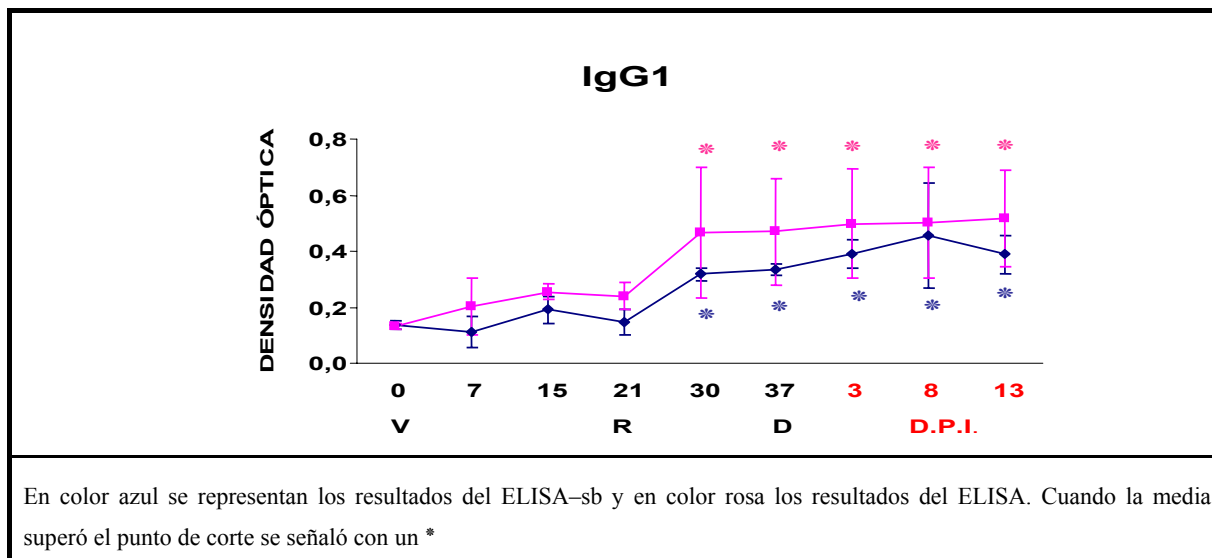
ELISA-in, previamente se habían encontrado diferencias significativas con el día inicial, a los 15 y 21 días (Tabla 49) (Figura 53)

La infección con una DL, tal y como se observó con ambos ensayos, dio lugar a un incremento muy pequeño de la DO en los días 3, 8 y 13 post-infección, por lo que sólo se observaron diferencias con los días anteriores a la revacunación, pero no con los días posteriores (Tabla 49) (Figura 53)

Tabla 49. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA- in, de la respuesta de las IgG1 durante la inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VII

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 15	Día 7	p = 0,0204	Día 15	Día 0	p = 0,01
Día 30	Día 0 y Día 7	p < 0,0001	Día 21	Día 0	p = 0,0189
Día 30	Día 15	p = 0,0424	Día 30	Día 0	p < 0,0001
Día 30	Día 21	p = 0,0022	Día 30	Día 7	p = 0,0016
Día 37	Día 0 y Día 7	p < 0,0001	Día 30	Día 15	p = 0,0466
Día 37	Día 15	p = 0,025	Día 30	Día 21	p = 0,0214
Día 37	Día 21	p = 0,0011	Día 37	Día 0	p < 0,0001
Día 3	Día 0 y Día 7	p < 0,0001	Día 37	Día 7	p = 0,0008
Día 3	Día 15	p = 0,051	Día 37	Día 15	p = 0,0269
Día 3	Día 21	p = 0,0001	Día 37	Día 21	p = 0,0116
Día 8	Día 0 y Día 7	p < 0,0001	Día 3	Día 0	p < 0,0001
Día 8	Día 15	p = 0,0014	Día 3	Día 7	p = 0,0003
Día 8	Día 21	p < 0,0001	Día 3	Día 15	p = 0,01
Día 13	Día 0 y Día 7	p < 0,0001	Día 3	Día 21	p = 0,0057
Día 13	Día 15	p = 0,0060	Día 8	Día 0	p < 0,0001
Día 13	Día 21	p = 0,0002	Día 8	Día 7	p = 0,0003
			Día 8	Día 15	p = 0,022
			Día 8	Día 21	p = 0,0049
			Día 13	Día 0	p < 0,0001
			Día 13	Día 7	p = 0,0001
			Día 13	Día 15	p = 0,0072
			Día 13	Día 21	p = 0,0027

Figura 53. Evolución de las IgG1 en en el grupo VII, inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección



### 2.2.2.2. IgG2

Los resultados de ambos ELISAs presentaron divergencias en los días previos al desafío. En respuesta a la primera vacunación, sólo se observaron cambios en los niveles de las IgG2 frente a la célula bacteriana completa, con incrementos significativos desde los 7 días post-infección. A partir de ese momento las DO presentaron una tendencia creciente hasta el día 21, en el que se superó el punto de corte y se observó seroconversión en los cerdos nº 29 y nº 30.

Después, en los días que siguieron a la revacunación, los niveles de IgG2 descendieron de forma significativa, especialmente en el momento del desafío (día 37). (Tabla 50) (Figura 54). Todo lo contrario

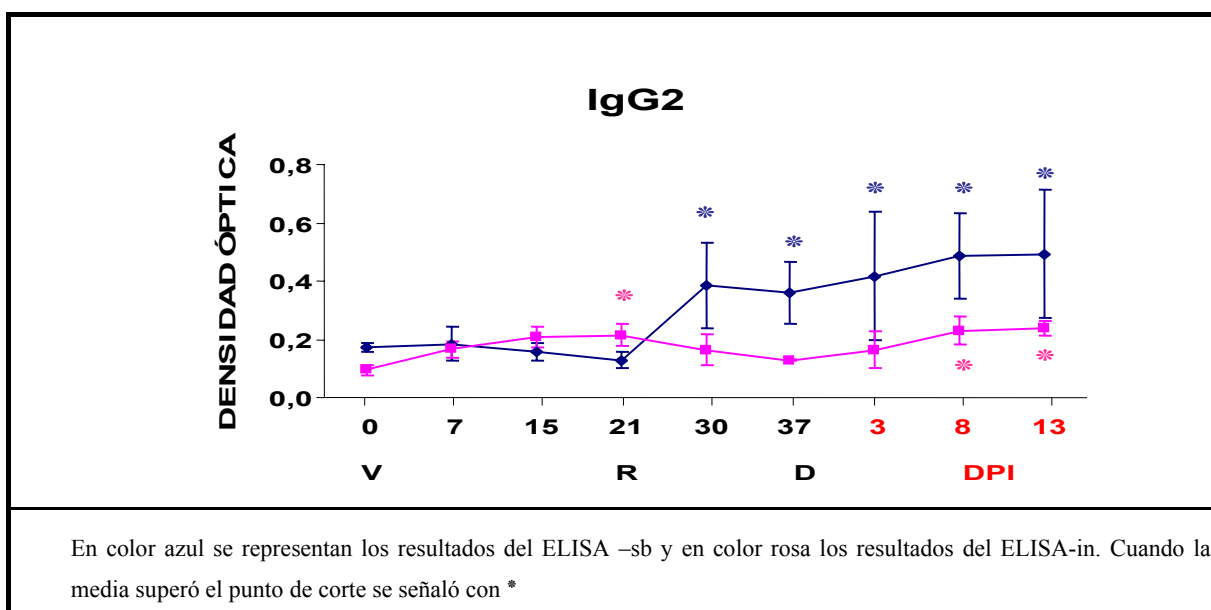
que lo observado con el ELISA-sb, que mostró cómo los niveles medios de las IgG2 se incrementaban significativamente después de la revacunación, al tiempo que se producía la seroconversión de los tres cerdos del grupo (Tabla 50) (Figura 54).

La infección con una DL determinó un incremento moderado de los niveles de IgG2, cuyos valores apenas presentaron diferencias con los observados en respuesta a las vacunaciones. De esta forma, en estos tres días post-infección, los resultados del ELISA-sb sólo presentaron diferencias significativas con los días previos a la revacunación, y los del ELISA-in con el día inicial y el día 37 (Tabla 50) (Figura 54).

Tabla 50. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas en el estudio, mediante ELISA-sb y ELISA-in, de la respuesta de las IgG2 durante la inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VII

ELISA -sb			ELISA-in		
Día 30	Día 0	p = 0,0006	Día 7	Día 0	p = 0,0131
Día 30	Día 7	p = 0,0014	Día 15	Día 0	p = 0,0006
Día 30	Día 15	p = 0,0002	Día 21	Día 0	p = 0,0004
Día 30	Día 21	p < 0,0001	Día 30	Día 0	p = 0,0207
Día 37	Día 0	p = 0,0012	Día 37	Día 15	p = 0,0356
Día 37	Día 7	p = 0,0012	Día 37	Día 21	p = 0,0267
Día 37	Día 15	p = 0,0004	Día 3	Día 0	p = 0,0240
Día 37	Día 21	p < 0,0001	Día 8	Día 0	p < 0,0001
Día 3	Día 0	p = 0,0005	Día 8	Día 37	p = 0,0117
Día 3	Día 7	p = 0,0012	Día 13	Día 0	p < 0,0001
Día 3	Día 15	p = 0,0001	Día 13	Día 37	p = 0,0066
Día 3	Día 21	p < 0,0001			
Día 8	Día 0- Día 21	p < 0,0001			
Día 13	Día 0- Día 21	p < 0,0001			

Figura 54. Evolución de las IgG2 en el grupo VII, inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección



### 2.2.2.3. Avidéz y afinidad de las IgG

El índice de avidéz se determinó en los sueros obtenidos desde el día 30, sin observarse diferencias significativas entre los

distintos días para ninguno de los dos ensayos. Los valores obtenidos para el ELISA-sb oscilaban entre 1, 18 y 1, 23, y para el ELISA-in entre 2,07 y 2, 42 (figura 55).

Figura 55. Evolución del índice de avidéz medio de las IgGt en el grupo VII inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis.* , desafío y **D.P.I.**, días post-infección

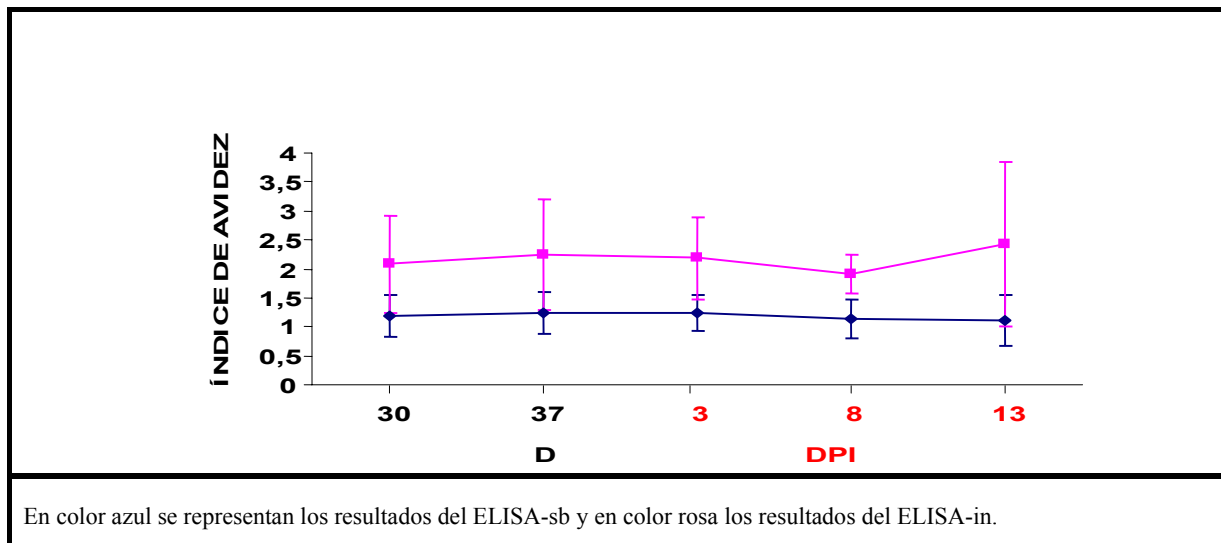




Tabla 51. A. **ELISA-sb**. Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

	Día 7 (D7)	Día 15 (D15)	Día 21 (D21)	Día 30 (D30)	Día 37 (D37)	Día 3 (D3)	Día 8 (D8)	Día 13 (D13)
<b>IgM</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0-D21 Seroconversión cerdo n° 31	↑sig respecto D0-D37 Seroconversión todos los cerdos	Idem D8
<b>IgGt</b>	↑sig respecto D0 Seroconversión cerdo n° 30	↑sig respecto D0 $\mu > Pc$ Seroconversión todos los cerdos	↑sig respecto D0 Seroconversión cerdo n° 29 y 30	↑sig respecto D0, D7 y D21 Seroconversión todos los cerdos	↑sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	Idem D30	↑sig respecto D0-D3 $\mu > 2x Pc$ Seroconversión todos los cerdos	Idem D8
<b>IgG1</b>	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D7 Seroconversión cerdo n° 30	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	Idem D37	Idem D30 y D37	Idem D30, D37 y D3	Idem D30, D37, D3 y D8
<b>IgG2</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	Idem D30	Idem D30 y D37	Idem D30, D37 y D3	↑sig respecto D0-D21 $\mu > Pc$ Seroconversión cerdos n° 29 y 31

Tabla 51. B. **ELISA-in**. Resultados de la evolución de las inmunoglobulinas séricas durante la inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

	Día 7 (D7)	Día 15 (D15)	Día 21 (D21)	Día 30 (D30)	Día 37 (D37)	Día 3 (D3)	Día 8 (D8)	Día 13 (D13)
<b>IgM</b>	↑sig respecto D0 Seroconversión cerdo n° 31	↑sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 29 y 31	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0 Seroconversión cerdo n° 30	Idem D30	↑sig respecto D0 Seroconversión todos los cerdos	↑sig respecto D0, D7 y D21 Seroconversión todos los cerdos	Idem D8
<b>IgGt</b>	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0 y D7 Seroconversión cerdos n° 29 y 30	↑sig respecto D0-D30 Seroconversión todos los cerdos	Idem D37	↑sig respecto D0-D37 Seroconversión todos los cerdos	↑sig respecto D0-D3 Seroconversión todos los cerdos
<b>IgG1</b>	Sin diferencias sig.	↑sig respecto D0	↑sig respecto D0	↑sig respecto D0-D21 Seroconversión cerdos n° 30 y 31	↑sig respecto D0-D21 Seroconversión todos los cerdos	Idem D37	Idem D37 y D3	Idem D37, D3 y D8
<b>IgG2</b>	↑sig respecto D0	↑sig respecto D0 Seroconversión cerdos n° 29 y 30	↑sig respecto D0 Seroconversión cerdo n° 29 y 30	↑sig respecto D0 ↓sig con D21	↓sig respecto D15 y D21	↑sig respecto D0 Seroconversión cerdo n° 30	↑sig respecto D0 y D37 Seroconversión todos los cerdos	Idem D13

μ Valor medio. Pc. Punto de corte. ↑ Incremento. 2x, Doble. Sig. Significativo

### 3. Comparación entre los grupos del estudio

Para poder comparar los niveles de las inmunoglobulinas entre los distintos grupos, se realizó un análisis estadístico de las DO obtenidas para cada grupo durante todo el estudio. Este análisis excluyó los lotes I y IV, puesto que en ambos todos los animales murieron después del desafío, por lo que faltaron los valores correspondientes a los días post-infección.

Los resultados de la respuesta de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 para cada grupo, se resumen y comparan en las tablas 52-55. En la última columna de cada tabla se recogen las diferencias significativas encontradas con el análisis estadístico de los datos, junto con el valor de “p” correspondiente.

Con respecto al índice de avidéz y afinidad de las IgGt, el análisis estadístico de los resultados obtenidos con el ELISA-sb puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ( $p = 0,0229$ ) entre los dos lotes de cerdos criados en condiciones naturales. Por lo que se refiere a los privados de calostro, no

se observaron entre los grupos III y V, inmunizados con una vacuna con OMPs y por exposición a una dosis subletal, respectivamente; pero ambos sí diferían significativamente del grupo inmunizado con una bacterina ( $p = 0,0008$  y  $p = 0,0139$ , respectivamente). Finalmente, cuando se compararon los cerdos convencionales con los privados de calostro se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos II y VII así como y entre los lotes III y VI ( $p = 0,0017$  y  $p = 0,0095$ , respectivamente).

Con el ELISA-in no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de cerdos privados de calostro, pero sí con respecto a los lotes criados de forma natural. El grupo VII, inmunizado con la bacterina comercial B presentó diferencias con los tres grupos de cerdos privados de calostro ( $p < 0,0001$ , en todos los casos), lo que también sucedió entre el grupo VI, inmunizado con la vacuna A ( $p = 0,0088$ ,  $p = 0,0116$  y  $p = 0,0105$ , respectivamente). Por último estos dos grupos de cría convencional también difirieron significativamente entre sí ( $p = 0,0153$ ).

Tabla 52.A. **ELISA-sb**. Resumen y comparación de la evolución de las IgM entre los grupos de estudio

Dias	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grup IV	Grup V	Grupo VI	Grupo VI	Diferencias sig.
<b>D0- D21</b>	Sin diferencias sig Sin seroconv.	<b>D7:</b> †sig respecto D0 Seroconv.. cerdos n° 1 y 2	†sig respecto D0 <b>D7:</b> Seroconv.. cerdos n° 8 y 10	<b>D7 y D21:</b> Sin diferencias sig. <b>D15:</b> †sig respecto D0	<b>D7:</b> Sin diferencias sig. <b>D15:</b> †sig respecto D0	Sin diferencias sig. <b>D15:</b> Seroconv. cerdo n° 26	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Grupos <b>II-V:</b> p < 0,0001 Grupos <b>III-V:</b> p = 0,0069 Grupos <b>V-VII:</b> p = 0,0180
<b>D30- D37</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D30:</b> †sig respecto D0 Seroconv. cerdo n° 2 <b>D37:</b> Sin diferencias sig. Sin seroconv	<b>D30:</b> <b>μ &gt; Pc</b> †sig respecto D0 Seroconv. cerdos n° 7, 8, 9 y 10 <b>D37:</b> †sig respecto D0	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>μ &gt; Pc</b> †sig respecto D0 Seroconv. cerdos n° 11, 12 y 15	<b>D30:</b> † sig respecto D0 y D15 Seroconv cerdos n° 26 y 27 <b>D37:</b> †sig con D15 Seroconv. cerdo n° 27	Sin diferencias sig. Seroconv. cerdo n° 31	
<b>D3-D8 post-infección</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>μ &gt; Pc</b> †sig respecto D0-D37 Seroconv. todos los cerdos	†sig respecto D0-D37 <b>D3:</b> <b>μ &gt; Pc</b> Seroconv. cerdo n° 8 <b>D8 y D13:</b> <b>μ &gt; 2x Pc</b> Seroconv cerdos n° 8 y 10		<b>μ &gt; 2x Pc</b> †sig respecto D0-D37 Seroconv. cerdos n° 11, 12 y 15	<b>μ &gt; Pc</b> †sig respecto D0-D37 Seroconv. todos los cerdos	<b>D3:</b> †sig respecto D0-D21 Seroconv. cerdo n° 31 <b>D8 y D13:</b> <b>μ &gt; Pc</b> †sig respecto D0-D37 Seroconv todos los cerdos	

**μ** Valor medio. **Pc**. Punto de corte. † Incremento. **2x**, Doble. **Sig.** Significativo. **Seroconv.** Seroconversión

Tabla 52. B. ELISA-in. Resumen y comparación de la evolución de las IgM entre los grupos de estudio

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Group IV	Group V	Grupo VI	Grupo VI	Diferencias sig.
<b>D0- D21</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D7 y D15:</b> ↑sig respecto D0 Seroconv. cerdos n° 1 y 2	<b>D7:</b> Sin diferencias sig. Seroconv. cerdo n° 8	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	↑sig respecto D0 <b>D15:</b> Seroconv. cerdo n° 14 y 15 <b>D21:</b> $\mu > Pc$ Seroconv todos los cerdos	<b>D7:</b> Sin diferencias sig. <b>D15 y D21:</b> ↑sig respecto D0 Seroconv. cerdos n° 26 y 27	<b>D7 y D15:</b> ↑sig respecto D0 Seroconv. cerdos n° 29 y 31	
<b>D30- D37</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	↑sig respecto D0 Seroconv. cerdos n° 1 y 2	↑sig respecto D0 <b>D30:</b> $\mu > Pc$ Seroconv. cerdo n° 6, 8, 9 y 10 <b>D37:</b> Seroconv. cerdos n° 8 y 10	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	↑sig respecto D0 Seroconv. cerdos n° 11, 12 y 15	$\mu > Pc$ ↑sig respecto D0 y D7 Seroconv. cerdos n° 26 y 27	↑sig respecto D0 Seroconv. cerdo n° 30	Grupos II-III: p < 0,0433
<b>D3-D8 post-infección</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	$\mu > Pc$ ↑sig respecto D0-D37 Seroconv. todos los cerdos	$\mu > Pc$ ↑sig respecto D0-D30 Seroconv. cerdos n° 8 y 10		Seroconv. cerdos n° 11, 12 y 15 <b>D3 y D8:</b> $\mu > Pc$ ↑sig respecto D0-D7 <b>D13:</b> $\mu > 2x Pc$ ↑sig respecto D0-D3	$\mu > Pc$ ↑sig respecto D0-D21 Seroconv. todos los cerdos	$\mu > Pc$ ↑sig respecto D0, D7 y D21 Seroconv. todos los cerdos	Grupos II-VIII: p = 0,0170

$\mu$  Valor medio. **Pc**. Punto de corte. ↑ Incremento. **2x**, Doble. **Sig**. Significativo. **Seroconv.** Seroconversión

Tabla 53. A. **ELISA-sb**. Resumen y comparación de la evolución de las IgGt entre los grupos de estudio

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII	Diferencias sig.	
<b>D0- D21</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D7</b> : Sin diferencias sig. <b>D15 y D21</b> : ↑sig respecto D0 Seroconv. cerdos n° 1, 2 y 3	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D7 y D15</b> : Sin diferencias sig. <b>D21</b> : ↑sig respecto D0 y D7 Seroconv. cerdo n° 12	Sin diferencias sig. <b>D15</b> : Seroconv. cerdo n° 26 <b>D21</b> : Seroconv. cerdo n° 27	↑sig respecto D0 <b>D7 y D21</b> : Seroconv. cerdo n° 29 y 30	↑sig respecto D0 <b>D15</b> : $\mu > Pc$ Seroconv. todos los cerdos	Grupos <b>II-III, V, VI</b> : p=0,0051
<b>D30- D37</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	$\mu > Pc$ ↑sig respecto D0-D21 Seroconv. todos los cerdos	↑sig respecto D0 Seroconv. cerdos n° 8 y 10	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	$\mu > Pc$ ↑sig respecto D0- D21 Seroconv. de todos los cerdos	$\mu > Pc$ ↑sig respecto D0- D21 Seroconv. cerdos n° 26 y 27	$\mu > Pc$ ↑sig respecto D0-D21 Seroconv. todos los cerdos	Grupos <b>III-V, VIII</b> : p = 0,03	
<b>D3-D8 post-infección</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D3</b> : Idem D37 <b>D8 y D13</b> : $\mu > 2x Pc$ ↑sig respecto D0-D3 Seroconv. todos los cerdos	↑sig respecto D0-D37 <b>D3</b> : $\mu > Pc$ Seroconv. cerdo n° 8 <b>D8 y D13</b> : $\mu > 2x Pc$ Seroconv supervivientes	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Seroconv. cerdos n° 11, 12 y 15 <b>D3</b> : $\mu > Pc$ ↑sig respecto D0-D30 <b>D8 y D13</b> : $\mu > 2x Pc$ ↑sig respecto D0-D3	↑sig respecto D0- D37 Seroconv. todos los cerdos <b>D3</b> : $\mu > Pc$ <b>D8 y D13</b> : $\mu > 2x Pc$	<b>D3</b> : Idem D37 <b>D8 y D13</b> : $\mu > 2x Pc$ ↑sig respecto D0-D3 Seroconv. todos los cerdos	Grupos <b>V-VIII</b> : p < 0,0001  Grupos <b>VI-VIII</b> : p < 0,0001	

$\mu$  Valor medio. **Pc**. Punto de corte. ↑ Incremento. **2x**, Doble. **Sig**. Significativo. **Seroconv.** Seroconversión

Tabla 53 B. **ELISA-in**. Resumen y comparación de la evolución de las IgGt entre los grupos de estudio

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grup IV	Grup V	Grupo VI	Grupo VI	Diferencias sig.
<b>D0- D21</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	↑sig respecto D0 Seroconv. cerdos nº 3 y 5	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D7 y D15:</b> Sin diferencias sig. Sin seroconv. <b>D21:</b> ↑sig respecto D0 Seroconv cerdo nº 15	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Grupos II-III, VI: p<0,0001
<b>D30- D37</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>μ &gt; Pc</b> ↑sig respecto D0-D21 Seroconv. todos los cerdos	↑sig respecto D0-D30 Seroconv. cerdo supervivientes	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Seroconv. cerdos nº 11, 12, 13 y 15 <b>D30:</b> ↑sig respecto D0 y D7 <b>D37:</b> <b>μ &gt; Pc</b> ↑sig respecto D0-D15	↑sig respecto D0-D21 Seroconv. todos los cerdos	<b>D30:</b> ↑sig respecto D0 Seroconv. cerdos nº 29 y 30 <b>D37:</b> <b>μ &gt; Pc</b> ↑sig respecto D0-D30 Seroconv. todos los cerdos	Grupos III-V, VI: p<0,0001
<b>D3-D8 post-infección</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Seroconv. todos los cerdos <b>D3:</b> <b>μ &gt; Pc</b> ↑sig respecto D0 <b>D8 y D13:</b> <b>μ &gt; 2x Pc</b> ↑sig respecto D0-D3	Seroconv. cerdo nº 8 y 10 <b>D3:</b> Idem D37 <b>D8 y D13:</b> <b>μ &gt; 2x Pc</b> ↑sig respecto D0-D37		Seroconv. cerdos nº 11, 12 y 15 <b>D3:</b> <b>μ &gt; Pc</b> ↑sig respecto D0-D30 <b>D8 y D13:</b> <b>μ &gt; 2x Pc</b> ↑sig respecto D0-D37	Seroconv. todos los cerdos <b>μ &gt; 2x Pc</b> <b>D3 y D8:</b> ↑sig respecto D0-D21 <b>D13:</b> ↑sig respecto D0-D37	<b>D3:</b> Idem D37 <b>D8 y D13:</b> <b>μ &gt; 2x Pc</b> ↑sig respecto D0-D3 Seroconv. todos los cerdos	Grupos VI-VII: (p<0,0001)

μ Valor medio. Pc. Punto de corte. ↑ Incremento. 2x, Doble. Sig. Significativo. Seroconv. Seroconversión

Tabla 54. A. **ELISA-sb**. Resumen y comparación de la evolución de las IgG1 entre los grupos de estudio

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VI	Diferencias sig.	
<b>D0- D21</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. <b>D21</b> : Seroconv. cerdos n° 2 y 3	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Grupos II-III, V, VI, VII p < 0,0001	
<b>D30- D37</b>	Sin seroconv. <b>D30</b> : Sin diferencias sig.	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0-D21 Seroconv. todos los cerdos	<b>D30</b> : Idem D21 <b>D37</b> : ↑ sig respecto D0-D21 Seroconv. cerdos n° 8 y 10.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D30</b> : Idem D21 <b>D37</b> : $\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0-D30 Seroconv. cerdos n° 11, 12 y 15	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0- D21 Seroconv. todos los cerdos	$\mu > Pc$ ↑ sig respecto D0-D21 Seroconv. todos los cerdos		Grupos III-V p = 0,0027
<b>D3-D8 post-infección</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D3</b> : Idem D30 y D37 <b>D8 y D13</b> : $\mu > 2x Pc$ ↑ sig respecto D0-D3 Seroconv. todos los cerdos	$\mu > 2x Pc$ ↑ sig respecto D0-D37 Seroconv. cerdos n° 8 y 10	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	$\mu > 2x Pc$ ↑ sig respecto D0-D37 Seroconv. cerdos n° 11, 12 y 15	Idem D30 y D37	Idem D30 y D37		Grupos V-VII p < 0,0001
								Grupos VI-VII p = 0,0117	

$\mu$  Valor medio. **Pc**. Punto de corte. ↑ Incremento. **2x**, Doble. **Sig.** Significativo. **Seroconv.** Seroconversión



Tabla 54. B. ELISA-in. Resumen y comparación de la evolución de las IgG1 entre los grupos de estudio

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VI	Diferencias significativ.
<b>D0- D21</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D7 y D15</b> Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D7 y D15:</b> Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D0 y D21:</b> Sin diferencias sig. Sin seroconv.	↑sig respecto D0 Sin seroconv.	Sin seroconv. <b>D7:</b> Sin diferencias sig. <b>D15 y D21:</b> ↑sig respecto D0	Grupos II-VI p < 0,0001
<b>D30- D37</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	↑sig respecto D0-D15 Seroconv. todos los cerdos	<b>D30:</b> ↑sig respecto D0 <b>D37:</b> ↑sig respecto D0, D7, D21 y D30 Seroconv. cerdos n° 8 y 10	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	↑sig respecto D0 Seroconv. cerdos n° 11, 12 y 15 <b>D37:</b> μ > Pc	↑sig respecto D0 Seroconv. todos los cerdos	↑sig respecto D0-D21 Seroconv. todos los cerdos	Grupos III-VI p < 0,0001
<b>D3-D8 post-infección</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Idem D30 y D37	↑sig respecto D0-D37 Seroconv. cerdos n° 8 y 10 <b>D3:</b> μ > Pc <b>D8 y D13:</b> μ > 2x Pc	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	↑sig respecto D0-D37 Seroconv. cerdos n° 11, 12 y 15 <b>D3 y D13:</b> μ > 2x Pc <b>D8:</b> μ > Pc	<b>D3:</b> Idem D30 y D37 <b>D8 y D13:</b> ↑sig respecto D0-D21 Seroconv. todos los cerdos	Idem D30 y D37	Grupos VI-VII p < 0,0001

μ Valor medio. Pc. Punto de corte. ↑ Incremento. 2x, Doble. Sig. Significativo. Seroconv. Seroconversión

Tabla 55. A. **ELISA-sb**. Resumen y comparación de la evolución de las IgG2 entre los grupos de estudio

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grup IV	Grup V	Grupo VI	Grupo VI	Diferencias sig.
<b>D0- D21</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D7 y D15:</b> Sin diferencias sig. Sin seroconv. <b>D21:</b> ↑sig respecto D0 y D15 Seroconv. cerdos n° 2 y 3	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Grupos <b>II-III, V, VI</b> y <b>VI</b> p < 0,0001
<b>D30- D37</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>μ &gt; Pc</b> ↑sig respecto D0-D21 Seroconv. todos los cerdos	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>μ &gt; Pc</b> ↑sig respecto D0- D21 Seroconv. todos los cerdos	<b>μ &gt; Pc</b> ↑sig respecto D0-D21 Seroconv. todos los cerdos	Grupos <b>II- V</b> p = 0,00555 Grupos <b>III-VI</b> p = 0,0055
<b>D3-D8 post-infección</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	<b>D3:</b> Idem D30 y D37 <b>D8 y D13:</b> <b>μ &gt; 2x Pc</b> ↑sig respecto D0-D3 Seroconv. todos los cerdos	D3: Idem D37 <b>D8 y D13:</b> <b>μ &gt; Pc</b> ↑sig respecto D0-D3 Seroconv. cerdos n° 8 y 10	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Seroconv. cerdos n° 11, 12 y 15 <b>D3 y D13:</b> <b>μ &gt; Pc</b> ↑sig respecto D0 <b>D8: μ &gt; 2x Pc</b> ↑sig respecto D0-D37	<b>D3:</b> Idem D30 y D37 <b>D8 y D13:</b> <b>μ &gt; Pc</b> ↑sig respecto D0- D37 Seroconv. todos los cerdos	<b>D3 y D8:</b> Idem D30 y D37 <b>D13:</b> <b>μ &gt; Pc</b> ↑sig respecto D0-D21 Seroconv. cerdos n° 29 y 31	Grupos <b>III-VII</b> p = 0,0150 Grupo <b>V-VI</b> p = 0,0077 Grupo <b>V-VII</b> p = 0,0017

**μ** Valor medio. **Pc**. Punto de corte. **↑** Incremento. **2x**, Doble. **Sig.** Significativo. **Seroconv.** Seroconversión

Tabla 55. B. ELISA-in. Resumen y comparación de la evolución de las IgG2 entre los grupos de estudio

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grup IV	Grup V	Grupo VI	Grupo VI	Diferencias sig.
<b>D0- D21</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin seroconv. D7: Sin diferencias sig. D15 y D21: ↑sig respecto D0	Sin seroconv. D7: Sin diferencias sig. D15 y D21: ↑sig respecto D0 y D7	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	Sin seroconv. D7: Sin diferencias sig. D15 y D21: ↑sig respecto D0	Sin seroconv. D7: Sin diferencias sig. D15 y D21: ↑sig respecto D0	↑sig respecto D0 D15: Seroconv. cerdos n° 29 y 30 D30: $\mu > Pc$ Seroconv. cerdos n° 29 y 30	
<b>D30- D37</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	$\mu > Pc$ ↑sig respecto D0-D21 Seroconv. todos los cerdos	D30: $\mu > Pc$ ↑sig respecto D0 y D7 Seroconv. cerdo n° 7, 8 y 10 D37: Sin diferencias sig.	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	D30: Idem D21 D37: ↑sig respecto D0 Seroconv. cerdos n° 11, 12 y 15	D30: Idem D21 D37: $\mu > Pc$ ↑sig respecto D0 Seroconv. todos los cerdos	Sin seroconv. D30: ↑sig respecto D0 D37: Sin diferencias sig.	Grupos II- GIII, V, VI, VI p < 0,0001
<b>D3-D8 post-infección</b>	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	D3: Idem D30 y D37 D8 y D13: $\mu > 2x Pc$ ↑sig respecto D0-D30 Seroconv. todos los cerdos	D3: ↑sig respecto D0 D8 y D13: $\mu > Pc$ ↑sig respecto D0-D3 Seroconv. cerdo n° 8 y 10	Sin diferencias sig. Sin seroconv.	$\mu > Pc$ Seroconv. cerdos n° 11, 12 y 15 D3: ↑sig respecto D0 y D7 D8: ↑sig respecto D0- D37 D13: ↑sig respecto D0- D3	Seroconv. todos los cerdos D3: Idem D37 D8: $\mu > Pc$ ↑sig respecto D0-D37 D13: $\mu > 2x Pc$ ↑sig respecto D0-D8	D3: ↑sig respecto D0 Seroconv. cerdo n° 30 D8 y D13: $\mu > Pc$ ↑sig respecto D0 y D37 Seroconv. todos los cerdos	

$\mu$  Valor medio. **Pc**. Punto de corte. ↑ Incremento. **2x**, Doble. **Sig.** Significativo. **Seroconv.** Seroconversión

# Capítulo V: Respuesta de base celular frente a *Haemophilus parasuis*

## **1. Estudio de la evolución de las poblaciones leucocitarias en inmunizaciones e infecciones *in vivo*. Citometría de flujo.**

### 1.1 Establecimiento de regiones para el análisis de la población total

1.1.1. Infección con una DL de *H. parasuis*

1.1.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

1.1.3. Inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

1.1.4. Inmunización con una vacuna recombinante y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

1.1.5. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

1.1.6. Inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

1.1.7. Inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

### 1.2. Análisis de las distintas subpoblaciones celulares en R1.

1.2.1. Infección con una DL de *H. parasuis*

1.2.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

1.2.3. Inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

1.2.4. Inmunización con una vacuna recombinante y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

1.2.5. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

1.2.6. Inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

1.2.7. Inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

## **2. Respuesta *in vitro*. Pruebas de proliferación de leucocitos sanguíneos**

### 2.1. Optimización de la concentración de los inductores

2.1.1. Bacteria inactivada por calor

2.1.2. Sobrenadantes con proteínas de membrana externa enriquecidos en TbpB

2.1.3. Extractos eluidos de *E. coli* con la proteína recombinante PBAD-Thio-TbpB- V5-His

### 2.2. Proliferación de leucocitos de sangre periférica

## 1. Estudio de la evolución de las poblaciones leucocitarias en inmunizaciones e infecciones *in vivo*. Citometría de flujo

Este estudio se realizó con los leucocitos de sangre periférica procedentes de los grupos de cerdos descritos en el Capítulo 3.

### 1.1. Establecimiento de regiones para el análisis de la población total

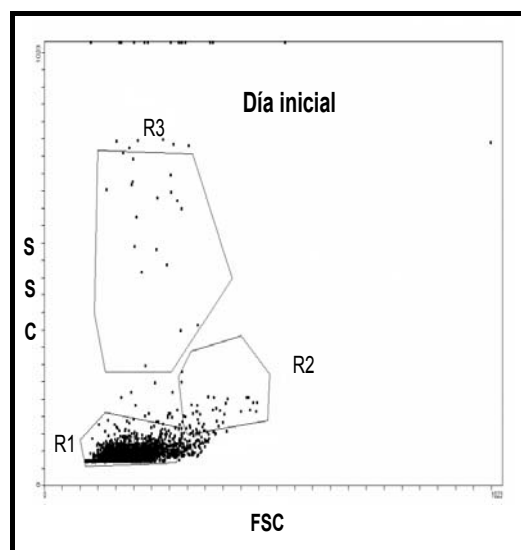
#### 1.1.1. Infección con DL de *H. parasuis* (grupo I)

Tanto en el inicio de la prueba (Figura 56 A) como en el momento del desafío (Figura 56 B.) las células se localizaron principalmente en la región R1, correspondiente a los linfocitos ( $CD3^+$ ,  $SWC3^-$ ). A los 6 días de la infección, (Figura 56 C) en el único cerdo superviviente se observó un importante aumento en los porcentajes de células localizadas en las regiones R2 y R3, constituidas por monocitos y granulocitos, respectivamente ( $CD3^-$ ,  $SWC3^+$ ); aunque la región con un mayor número de células continuó siendo la R1

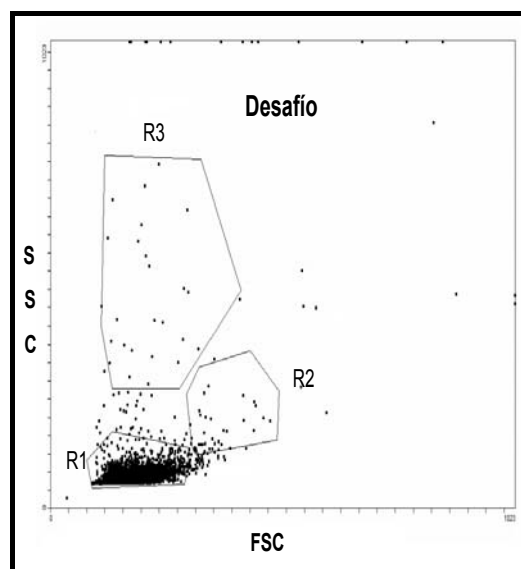
El ratio entre los marcadores  $SWC3$  y  $CD3$  no sufrió modificaciones reseñables en los días comprendidos entre el día 0 y el desafío, pero una vez tuvo lugar éste, sí se produjo un aumento importante (Tabla 56). El análisis estadístico puso de manifiesto que el incremento de la ratio observada a los 6 días después del desafío era estadísticamente significativo con respecto al día inicial y a los días 7, 21 y 37 ( $p < 0,0001$  en todos los casos).

Fig.56 A, B, y C. Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo I, obtenida por gradiente de densidad. **R1**, región 1; **R2**, región 2 y **R3**, región 6. **D.P.I**, días post-infección

A



B



C

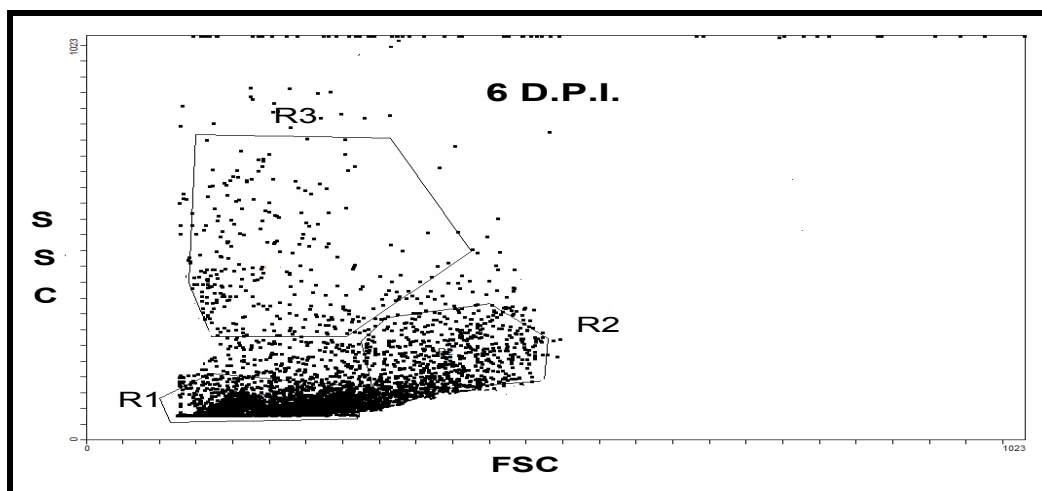


Tabla 56. Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo I, obtenida por gradiente de densidad. **SD**, desviación estándar; **D.P.I**, días post-infección

	SWC3		CD3		RATIO	
	MEDIA	SD	MEDIA	SD	MEDIA	SD
Día 0	18,50	5,68	59,83	3,72	0,31	0,09
Día 7	14,83	2,07	60,27	1,68	0,25	0,03
Día 21	15,43	3,37	60,52	2,03	0,25	0,05
Día 37	17,24	3,24	59,11	3,49	0,29	0,06
6 D.P.I.	45,08		36,26		1,24	

### 1.1.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una dosis DL de *H. parasuis* (grupo II)

Tal y como se observa en las Figuras 57 A y B tanto en el inicio de la prueba como en el momento del desafío, las células se localizaron principalmente en la región R1 (linfocitos). En los días que siguieron al desafío (Figuras 57 C y Figura 57 D), se observó un incremento del número de células pertenecientes a las regiones R2 (monocitos) y R3 (granulocitos), aunque la mayor cantidad de

leucocitos siguió encontrándose en la región R1.

El ratio entre SWC3 y CD3 descendió desde el día inicial hasta el momento del desafío, pero no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los días. Una vez tuvo lugar el desafío, a los 6 y 13 días del mismo, la ratio se incrementó de forma significativa con respecto a todos los días anteriores (Tabla 57). Los valores de “p” encontrados se recogen en la Tabla 58.

Fig 57.A, B, C y D. Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo II, obtenida por gradiente de densidad. **R1**, región 1; **R2**, región 2 y **R3**, región 3. **D.P.I.**, días post-infección

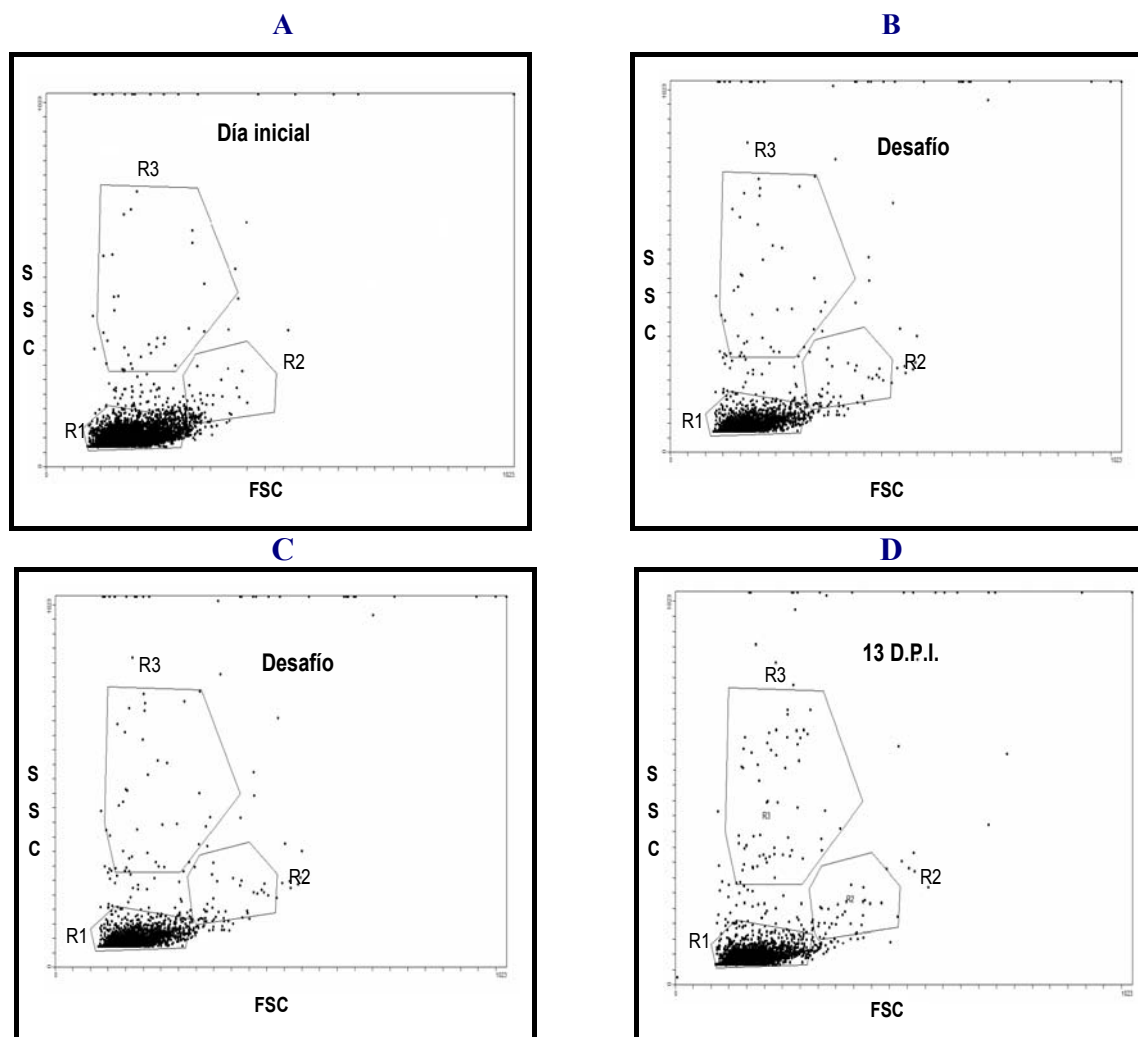


Tabla 57. Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo II obtenida por gradiente de densidad. **SD**, desviación estándar; **D.P.I.** días post-infección

	SWC3		CD3		RATIO	
	MEDIA	SD	MEDIA	SD	MEDIA	SD
Día 0	16,20	1,82	54,02	2,40	0,30	0,03
Día 7	14,58	2,83	55,69	3,45	0,27	0,05
Día 21	15,42	2,91	60,61	3,83	0,26	0,04
Día 37	14,72	2,12	60,10	4,09	0,24	0,04
6 D.P.I.	20,60	6,86	44,62	2,35	0,46	0,16
13 D.P.I.	17,56	4,72	41,64	2,48	0,42	0,10

Tabla 58 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar la ratio SWC3/CD3 en el grupo II. **D.P.I.** días post-infección

Valor de "p"		
	6 D.P.I.	13 D.P.I.
<b>Día 0</b>	0,0030	0,0259
<b>Día 7</b>	0,0003	0,0034
<b>Día 21</b>	0,0001	0,0021
<b>Día 37</b>	0,0001	0,0100

### 1.1.3. Inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo III)

El cerdo n° 7, en los días previos al desafío, apareció postrado con hipertermia, por lo que se excluyó del estudio para evitar que la presencia de alguna patología pudiera alterar los resultados. Dos de los cuatro animales murieron antes del día 6 post-infección. Las Figuras 58 A, B, C y D fueron tomadas a partir

de las muestras del cerdo n° 10 que sobrevivió al desafío. En los cuatro días valorados, la región con un mayor número de células fue la R1, pero después del desafío se observó un incremento de las células localizadas en la región R3, especialmente a los 6 días (Figura 58.C), y, en menor medida, a los 13 días (Figura 58.D).

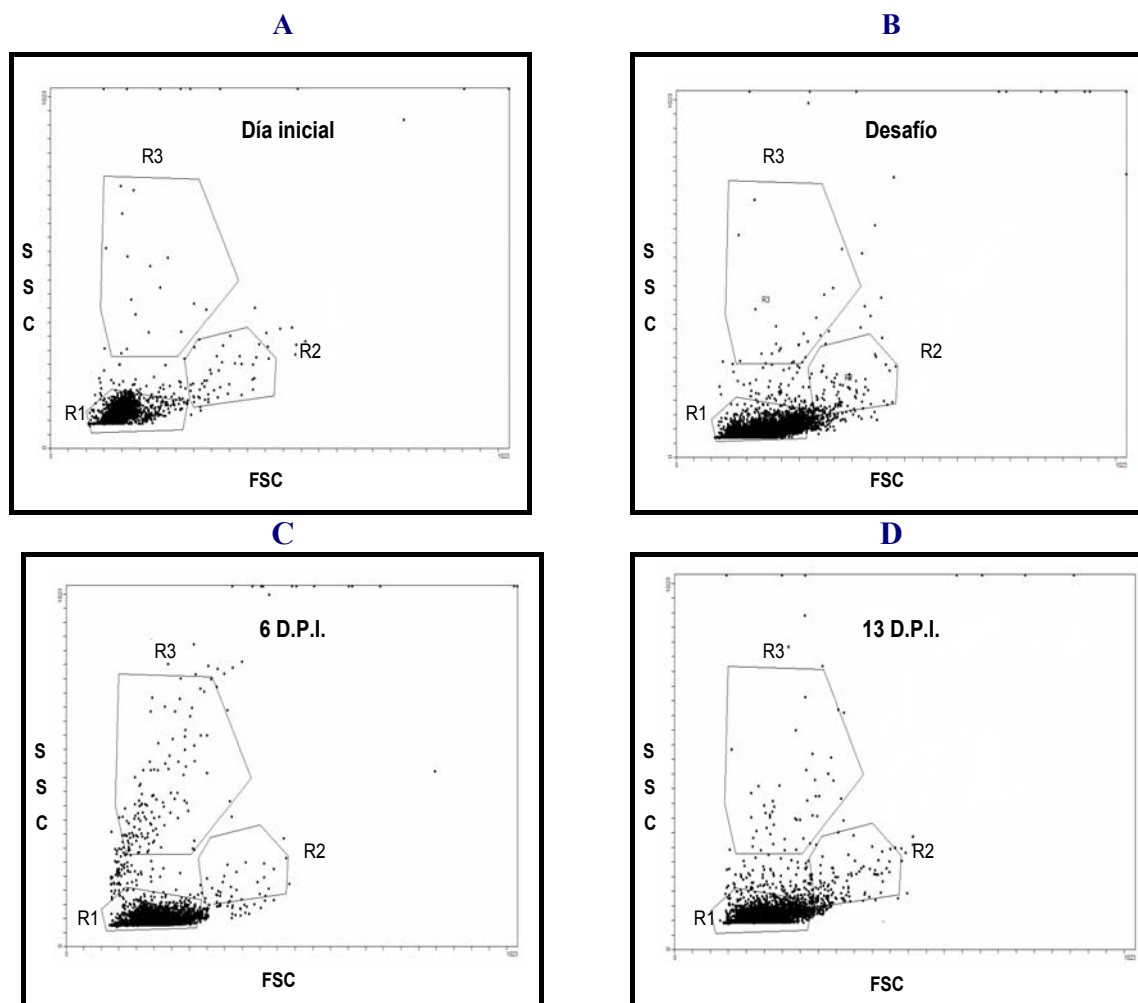
Cuando se analizó la ratio SWC3/ CD3, en los días anteriores a la infección no se encontraron diferencias significativas, aunque los valores fueron superiores en los días 21 y 37. Una vez tuvo lugar el desafío se produjo un incremento de la misma a los 6 días post-infección y se encontraron diferencias significativas con respecto al día inicial ( $p = 0,00209$ ) y a los días 7 ( $p = 0,0013$ ), 21 ( $p = 0,0249$ ) y 37 ( $p = 0,0065$ ). A los 13 días post-infección, la ratio descendió y ya no se observaron diferencias significativas con los días anteriores (Tabla 59).

Tabla 59. Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo III, obtenida por gradiente de densidad. **SD**, desviación estándar; **D.P.I.**, días post-infección

	SWC3		CD3		RATIO	
	MEDIA	SD	MEDIA	SD	MEDIA	SD
Día 0	11,69	3,66	59,84	1,99	0,20	0,06
Día 7	11,16	1,93	59,15	1,66	0,19	0,04
Día 21	15,21	3,64	58,35	1,11	0,26	0,06
Día 37	13,47	6,75	59,82	1,86	0,23	0,11
6 D.P.I.	23,75	11,10	55,53	2,01	0,42	0,18
13 D.P.I.	14,95	4,74	55,45	0,77	0,27	0,09



Figura 58 A, B, C, D. Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo III, obtenida por gradiente de densidad. **R1**, región 1; **R2**, región 2 y **R3**, región 3. **D.P.I.**, días post-infección



#### 1.1.4. Inmunización con un vacuna recombinante y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo IV)

Todos los animales murieron durante las 24 horas posteriores a la infección, por lo que sólo se pudo realizar el análisis de las poblaciones leucocitarias en los días anteriores a la misma. Como se observa en las Figuras 59. A y B, la mayoría de las células, tanto en el inicio del estudio como en el día del desafío, se localizaban principalmente en la región R1.

El número de células localizadas en la región R3 fue superior el día inicial con respecto al día del desafío, al contrario que ocurrió con la región R2.

La ratio SWC3/ CD3 descendió a los 21 días (Tabla 60) y aparecieron diferencias significativas con el día 0, aunque el valor de “p” era de 0,0454; por tanto, muy próximo al límite de significación.

Fig. 59. A, B. Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo IV, obtenida por gradiente de densidad. **R1**, región 1; **R2**, región 2 y **R3**, región 3

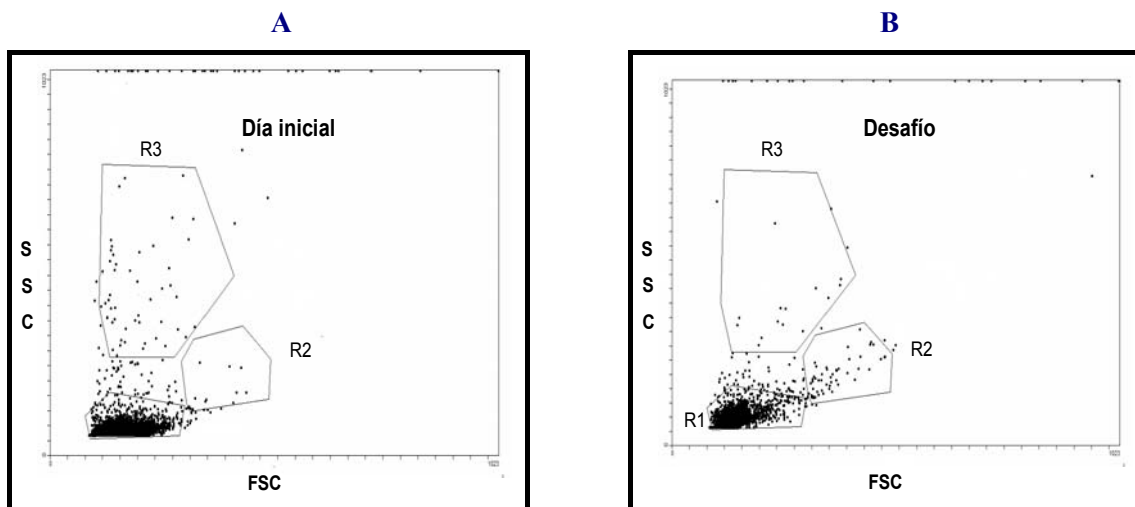


Tabla 60. Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo IV obtenida por gradiente de densidad. **SD**, desviación estándar; **D.P.I**, días post-infección

	SWC3		CD3		RATIO	
	MEDIA	SD	MEDIA	SD	MEDIA	SD
Día 0	16,81	3,38	57,62	4,16	0,30	0,08
Día 7	15,07	6,58	57,93	5,22	0,27	0,14
Día 21	10,66	3,22	56,80	5,23	0,19	0,07
Día 37	13,06	4,65	56,56	3,41	0,24	0,10

### 1.1.5. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo V)

Las Figuras 60. A, B, C y D se obtuvieron a partir de las muestras del cerdo nº 15, uno de los tres que sobrevivieron al desafío. Se observa cómo en las Figuras A y B, correspondientes al día inicial y al día del desafío, respectivamente, el mayor número de células se localizaba en la región R1. En los días 6 y 13 post-infección, la región con un mayor número de células siguió siendo

la R1, pero se observó un incremento del número de leucocitos en R2 y R3, especialmente en el día 13

La ratio entre SWC3 y CD3 no se modificó en los momentos anteriores al desafío, salvo en el día 21, en el que aumentó ligeramente. Aunque el verdadero incremento se produjo después de la infección, observándose diferencias significativas en relación con todos los días anteriores, incluido el del desafío (Tablas 61 y 62).

Fig. 60. A, B, C y D. Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo V, obtenida por gradiente de densidad. **R1**, región 1; **R2**, región 2 y **R3**, región 3. **D.P.I.**, días post-infección

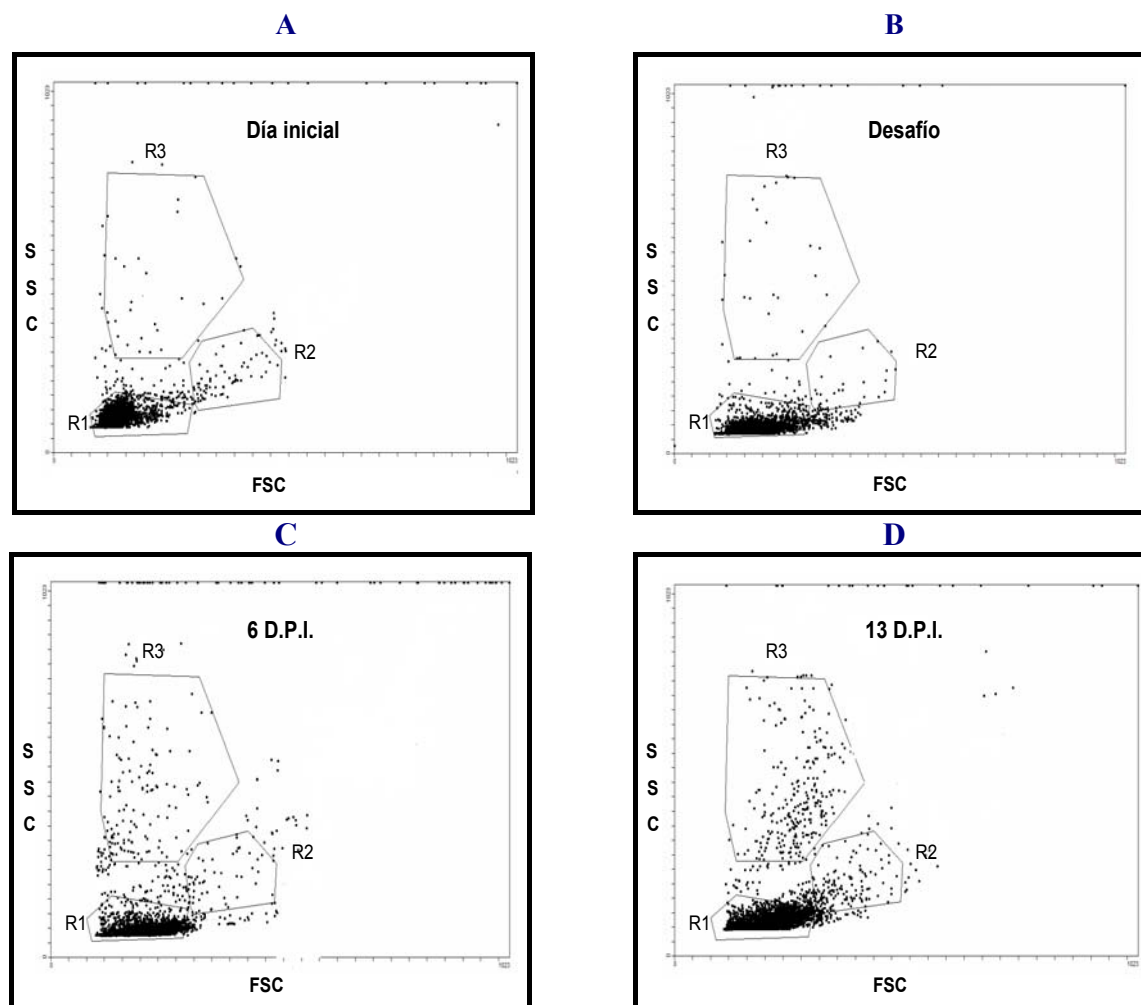


Tabla 61. Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo V, obtenida por gradiente de densidad. **SD**, desviación estándar; **D.P.I.** días post-infección

	SWC3		CD3		RATIO	
	MEDIA	SD	MEDIA	SD	MEDIA	SD
Día 0	12,80	5,05	56,74	3,96	0,22	0,08
Día 7	12,57	4,31	57,99	4,05	0,22	0,06
Día 21	15,08	3,33	57,29	3,92	0,26	0,05
Día 37	13,09	3,97	59,03	2,83	0,22	0,06
6 D.P.I.	24,54	0,97	50,28	4,72	0,49	0,04
13 D.P.I.	21,69	7,97	57,38	2,05	0,38	0,16

Tabla 62. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar la ratio SWC3/CD3 en el grupo V. **D.P.I.** días post-infección

Valor de "p"		
	6 D.P.I.	13 D.P.I.
<b>Día 0</b>	<0,0001	0,0076
<b>Día 7</b>	<0,0001	0,0057
<b>Día 21</b>	0,0003	0,0432
<b>Día 37</b>	<0,0001	0,0069

#### 1.1.6. Inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con DL de *H. parasuis* (grupo VI)

Tanto en el día inicial como en el del desafío, las células se localizaron principalmente en la región R1,

correspondiente a los linfocitos (Figuras 61 A y B). En los días 6 y 13 post-infección, aunque la región con un mayor número de células continuó siendo la R1, se observó un incremento en la cantidad de leucocitos pertenecientes a las regiones R2 y R3 (Figuras 61 C y D):

Por otro lado, durante los días anteriores al desafío no se observaron diferencias significativas en la ratio SWC3/ CD3, aunque los valores correspondientes a los días 7, 21 y 37 fueron inferiores a los del día inicial. Después del desafío, en los días 6 y 13, la ratio se incrementó de forma significativa con respecto a todos los días anteriores (Tabla 63). Los valores de "p" se recogen en la Tabla 64.

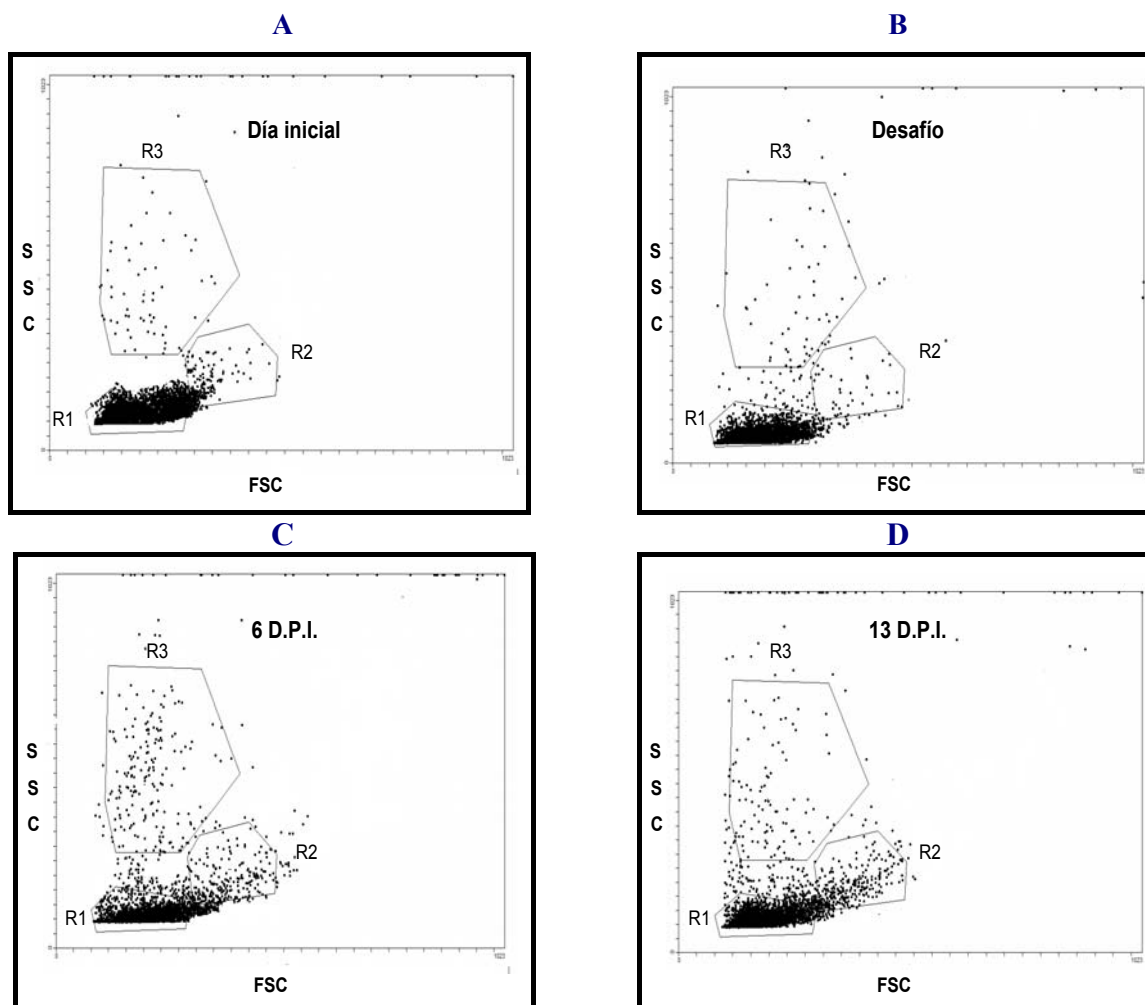
Tabla 63. Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo VI, obtenida por gradiente de densidad. **SD**, desviación estándar; **D.P.I.** Días post-infección

	SWC3		CD3		RATIO	
	MEDIA	SD	MEDIA	SD	MEDIA	SD
Día 0	8,07	2,79	47,55	5,74	0,18	0,08
Día 7	6,97	2,68	47,43	5,13	0,15	0,07
Día 21	6,87	2,54	46,85	3,62	0,15	0,06
Día 37	7,75	1,44	49,30	5,19	0,16	0,05
6 D.P.I.	14,33	2,37	40,12	0,59	0,36	0,05
13 D.P.I.	16,90	3,76	40,84	0,99	0,42	0,10

Tabla 64. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar la ratio SWC3/CD3 en el grupo VI. **D.P.I.** Días post-infección

Valor de "p"		
	6 D.P.I.	13 D.P.I.
<b>Día 0</b>	0,0077	0,0004
<b>Día 7</b>	0,0032	0,0001
<b>Día 21</b>	0,0023	<0,0001
<b>Día 37</b>	0,0043	0,0002

Fig. 61. A, B, C y D. Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo VI, obtenida por gradiente de densidad. **R1**, región 1; **R2**, región 2 y **R3**, región 3. **D.P.I.**, días post-infección



### 1.1.7. Inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo VII)

El día inicial y el del desafío, presentaron una distribución celular similar, con las células localizadas principalmente en la región R1 (linfocitos) y sólo un pequeño número se encontró en las regiones R2 y R3 (Figuras 62. A y B). A los 6 y a los 13 días post-infección, la región con un mayor número de leucocitos continuó siendo la R1, aunque se observó

un incremento de las células localizadas en las regiones R2 y R3 (figuras Figuras 62. C y D).

La ratio entre SWC3 y CD3 apenas sufrió modificaciones en los momentos anteriores al desafío; sin embargo, en los días 6 y 13 posteriores, se incrementó de forma significativa con respecto a todos los días anteriores (Tabla 65). Los valores de “p” se resumen en la Tabla 66.

Resultados

Figura. 62. A, B, C y D Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de la fracción de leucocitos del grupo VII, obtenida por gradiente de densidad. **R1**, región 1; **R2**, región 2 y **R3**, región 3. **D.P.I**, días post-infección

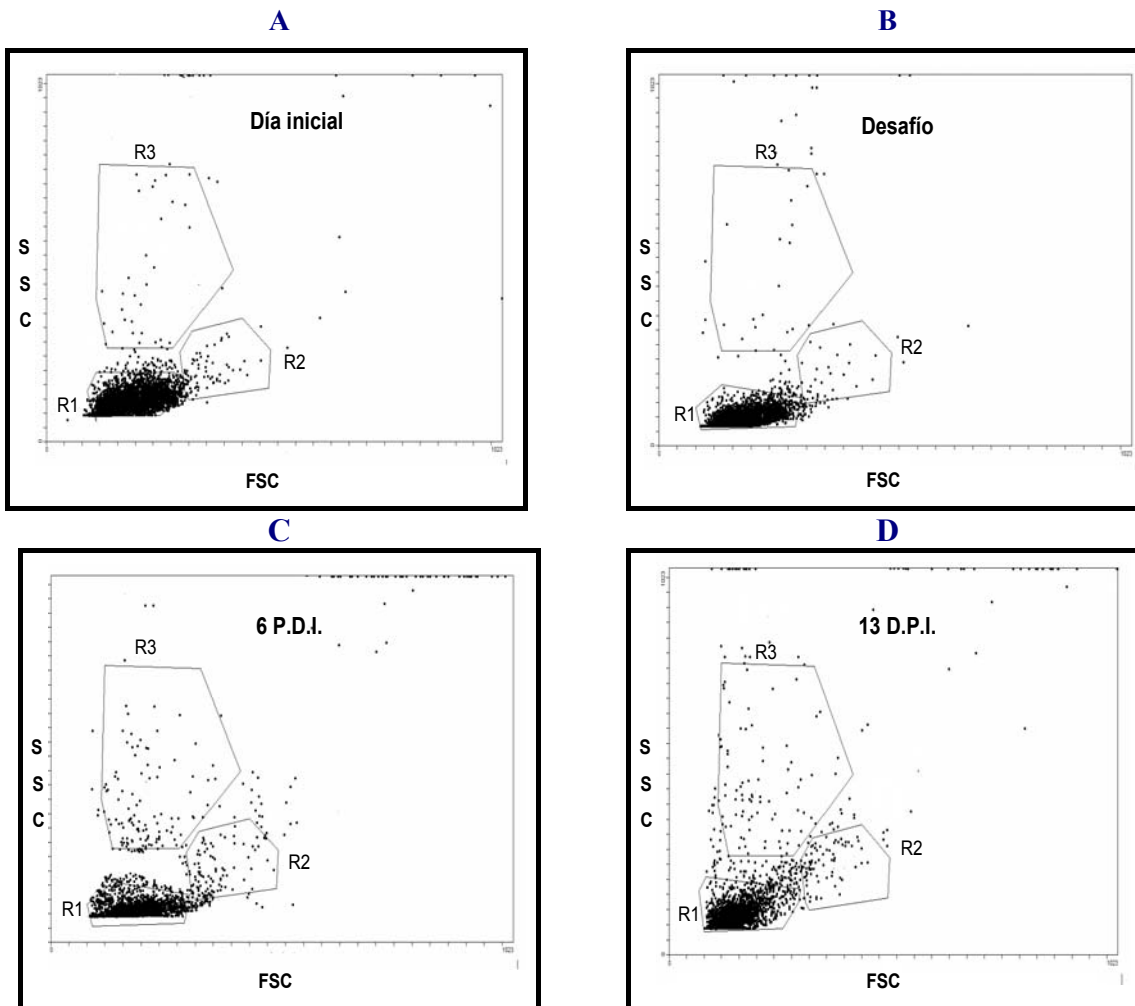


Tabla 65. Evolución de la ratio SWC3/ CD3 de la fracción de leucocitos del grupo VII obtenida por gradiente de densidad. **SD**, desviación estándar; **D.P.I**, días post-infección

	SWC3		CD3		RATIO	
	MEDIA	SD	MEDIA	SD	MEDIA	SD
Día 0	6,93	0,51	44,56	4,82	0,16	0,02
Día 7	6,73	0,64	44,86	5,90	0,15	0,03
Día 21	6,73	1,33	43,72	5,13	0,16	0,04
Día 37	7,48	1,98	43,51	9,85	0,18	0,07
6 D.P.I.	15,93	3,27	39,43	2,65	0,41	0,11
13D.P.I.	18,59	2,12	42,69	4,18	0,44	0,09

Tabla 66. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar la ratio SWC3/CD3 en el grupo VII. **D.P.I.**, días post-infección

Valor de "p"		
	6 D.P.I.	13 D.P.I.
<b>Día 0</b>	0,0002	<0,0001
<b>Día 7</b>	0,0001	<0,0001
<b>Día 21</b>	0,0003	<0,0001
<b>Día 37</b>	0,0008	0,0002

### 1.2. Análisis de las distintas subpoblaciones celulares en R1

El porcentaje de células en la región R1 que expresaron el marcador panleucocitario

CD45 (control positivo) se mantuvo constante durante todo el estudio, con valores comprendidos entre el 93 y el 97%. Lo mismo ocurrió con el antígeno SWC3 (control negativo) cuya expresión fue siempre inferior al 1%.

El análisis estadístico de los resultados reveló que los cambios en los porcentajes de expresión de los antígenos leucocitarios y sus ratios se produjeron casi exclusivamente en los días que siguieron al desafío, y prácticamente no se observaron en los días previos. En la Tabla 67 se recoge un resumen de estos resultados.

Tabla 67. Evolución de los marcadores leucocitarios y sus ratios, después de la infección con una DL de *H. parasuis*. **D0, D7, D21, D37**: días 0, 7, 21, 37. **D6 y D13**: días 6 y 13 post-infección

Grupos	CD3 <sup>+</sup>	αIgM <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /αIgM <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8α <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> / CD8α <sup>+</sup>
<b>Grupo I</b>	<b>D6</b> : ↓ sig respecto D0-D37	<b>D6</b> : ↑ sig respecto D0-D37	<b>D6</b> : ↓ sig respecto D0-D37	Sin diferencias	Sin diferencias	<b>D6</b> : ↓ sig respecto D37
<b>Grupo II</b>	<b>D6</b> ↓ sig respecto D7-D37 <b>D13</b> : ↓ sig respecto D21 y D37	<b>D6 y D13</b> : ↑ sig respecto D0-D37	<b>D6 y D13</b> : ↓ sig respecto D0-D37	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias
<b>Grupo III</b>	Sin diferencias	<b>D6</b> : ↑ sig respecto D7 y D37 <b>D13</b> : Sin diferencias	<b>D6</b> : ↓ sig respecto D7 y D37 <b>D13</b> : Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias
<b>Grupo V</b>	<b>D6 y D13</b> : ↓ sig respecto D0-D37	<b>D6 y D13</b> : ↑ sig respecto D0-D37	<b>D6 y D13</b> : ↓ sig respecto D0-D37	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias
<b>Grupo VI</b>	<b>D6</b> : ↓ sig respecto D0 <b>D13</b> : Sin diferencias	<b>D6</b> : ↑ sig respecto D0-D37 <b>D13</b> : ↑ sig respecto D37	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias
<b>Grupo VI</b>	Sin diferencias	<b>D6</b> : ↑ sig respecto D0 y D37 <b>D13</b> : Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias



CD4 <sup>+</sup> Y CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (DP)	DP/ CD4 <sup>+</sup>	DP/ CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Y CD8 $\beta$ <sup>+</sup> (LTc)	LTc/ CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup>	2 E3 <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup> / 2E3 <sup>+</sup>
Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias
Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	<b>D6</b> y <b>D13</b> : ↑ sig respecto D0- D37	<b>D6</b> : ↑ sig respecto D37 <b>D13</b> : Sin diferencias	Sin diferencias
Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias
Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias
Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	<b>D6</b> y <b>D13</b> : ↓ sig respecto D21
Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias

↓ descenso; ↑ aumento; **Sig.** Significativas **DP.** Linfocitos dobles positivos (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) **LTc** Linfocitos CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>CD8 $\beta$

## Resultados

A continuación se procede a la descripción más detallada de la respuesta de las subpoblaciones linfocitarias en cada grupo.

### 1.2.1. Infección con una DL de *H. parasuis* (grupo I)

En la Figura 118 del anexo 4 se representa la evolución de los porcentajes relativos de expresión correspondientes a los marcadores leucocitarios utilizados en este estudio, así como la de sus ratios.

Con respecto a los antígenos CD3,  $\alpha$ IgM y la ratio entre los mismos, se observó cómo en los días previos a la infección las medias del grupo eran muy similares y los cuatro cerdos presentaron valores muy próximos. Seis días después del desafío, en el único cerdo superviviente se indujo un aumento significativo en la expresión de  $\alpha$ IgM, junto con el descenso de la de CD3 y por tanto de la ratio CD3/ $\alpha$ IgM ( $p < 0,0001$ , en todos los casos) (Anexo 4, Figura 118. A, B, C).

Los porcentajes de expresión de los antígenos CD4, CD8 $\alpha$ , y la proporción de linfocitos dobles positivos (CD4<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>) y de linfocitos citotóxicos (CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD8 $\beta$ <sup>+</sup>) se mantuvieron sin diferencias significativas durante todo el estudio, aunque sus medias fueron descendiendo hasta el día del desafío. Después de éste, el porcentaje de CD8 $\alpha$  y de linfocitos dobles positivos aumentó, al contrario que la expresión de CD4 y de las dos isoformas del antígeno CD8 que disminuyeron. Por lo que se refiere a sus ratios, la ratio entre CD4 y CD8 $\alpha$ , descendió significativamente a los 6 días post-infección con respecto al día del desafío ( $p = 0,039$ ). Por su parte las ratios

correspondientes a los linfocitos dobles positivos mostraron un incremento tras la infección, al contrario que la ratio de los linfocitos citotóxicos, aunque en ningún caso se encontraron diferencias significativas (Anexo 4, Figura. 118. D-L)

Los porcentajes de expresión de los antígenos 2E3 y CD25 disminuyeron desde el inicio, aunque no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los días del estudio. Tampoco se observaron diferencias en la ratio CD25/ 2E3, con valores muy similares durante toda la prueba (Anexo 4, Figura 118. M, E. y F)

### 1.2.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo II)

En la figura 119 del anexo 4 se representa la evolución de los porcentajes relativos de expresión de los distintos marcadores leucocitarios analizados en este estudio, así como la de sus ratios.

Con respecto al marcador CD3, aunque aumentó tras la vacunación, especialmente en los días 21 y 37, sólo se encontraron diferencias significativas después del desafío. Así, a los 6 días se observó un descenso de su expresión respecto a los días 21 y 37 ( $p < 0,0001$  y  $p = 0,0005$ , respectivamente), que se mantuvo también a los 13 días ( $p = 0,0008$  y  $p = 0,0052$ , respectivamente). Todo lo contrario sucedió con el antígeno  $\alpha$ IgM, cuyos porcentajes de expresión aumentaron después del desafío, apareciendo diferencias significativas con los días 0, 7, 21, y 37 a los 6 ( $p = 0,0003$ ,  $p = 0,0002$ ,  $p < 0,0001$  y  $p <$

0,0001, respectivamente) y a los 13 días post-infección ( $p = 0,0043$ ,  $p = 0,0025$ ,  $p = 0,005$  y  $p = 0,0030$ , respectivamente). Los valores de la ratio entre CD3 y  $\alpha$ -IgM se mantuvieron sin modificaciones reseñables en los días anteriores al desafío, pero 6 días después de éste se produjo un descenso significativo respecto al día inicial ( $p = 0,0030$ ) y los días 7, 21 y 37 ( $p < 0,0001$  en todos los casos). Estas diferencias se mantuvieron a los 13 días post-infección ( $p = 0,0277$ ,  $p = 0,0009$ ,  $p < 0,0001$  y  $p = 0,0003$ , respectivamente) (Anexo 4, Figura 119, A, B, C)

No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los días del estudio respecto a los porcentajes de expresión de los antígenos CD8 $\alpha$  y CD4, de los linfocitos dobles positivos (CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>) y de los linfocitos citotóxicos, ni tampoco se hallaron en lo relativo a sus ratios. Todos los porcentajes medios disminuyeron después del desafío, pero las ratios se mantuvieron constantes. En el análisis individual para los cinco animales del grupo, únicamente señalar que el cerdo n° 1 presentó los valores de la ratio CD4/CD8 $\alpha$  más bajos y los porcentajes de linfocitos dobles positivos más elevados (Anexo 4, Figura. 119. D-L)

La media del porcentaje de expresión del antígeno 2E3 antes del desafío presentó su valor más elevado en el día 7 y el más bajo en el día 37, encontrándose diferencias significativas entre ambos ( $p = 0,0339$ ). A los 6 días post-infección el porcentaje medio se incrementó y de nuevo se hallaron diferencias significativas con el día 37 ( $p = 0,0310$ ), que desaparecieron a los 13 días post-infección. Lo mismo ocurrió con el antígeno CD25, cuya expresión también se incremento

significativamente el día 6 post-infección respecto a los días 0, 21 y 37 ( $p = 0,0207$ ,  $0,0407$  y  $= 0,0103$ , respectivamente); y este incremento se mantuvo a los 13 días post-infección ( $p = 0,0211$ ,  $0,0307$  y  $0,0074$ , respectivamente). Por el contrario, la ratio entre ambos marcadores, aunque aumentó después del desafío, especialmente en el cerdo n° 1, no presentó diferencias significativas durante todo el estudio (Anexo 4, Figura 119. M, E. y F)

### 1.2.3. Inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo III)

Sólo dos de los cerdos de este grupo (los cerdos n° 8 y 10) sobrevivieron a la infección. De nuevo se excluyó el cerdo n° 7 del estudio, por los motivos ya comentados. En la Figura 120 del Anexo 4 se representa la evolución de los antígenos leucocitarios y las ratios utilizados en este estudio.

Antes del desafío los porcentajes de los antígenos CD3,  $\alpha$ IgM y la ratio entre ambos se caracterizaron por presentar valores muy similares entre todos los cerdos del grupo, al igual que un valor medio muy próximo entre los distintos días comprendidos en este periodo del estudio. Pero a los 6 días post-infección se observó un aumento significativo del porcentaje de  $\alpha$ IgM respecto a los días 7 ( $p = 0,020$ ) y 37 ( $p = 0,0125$ ), y un descenso de la ratio ( $p = 0,0034$  y  $p = 0,0019$ , respectivamente). Estas diferencias desaparecieron a los 13 días, cuando los valores empezaron a normalizarse. En el caso de CD3 aunque su porcentaje fue inferior tras

el desafío, no difería significativamente del de los días previos (Anexo 4, Figura 120, A, B, C)

El análisis estadístico de los porcentajes de expresión de los antígenos CD4, CD8 $\alpha$ , así como de su ratio, puso de manifiesto la inexistencia de diferencias significativas entre los distintos días del estudio. En respuesta al desafío sólo se observó un ligero descenso de la expresión del antígeno CD4 a los 13 días. El porcentaje de linfocitos dobles positivos (CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>) se mantuvo sin modificaciones significativas, al igual que sus ratios; como tampoco se advirtieron cambios respecto a los linfocitos citóxicos o la ratio CD8 $\alpha$ CD8 $\beta$ /CD8 $\alpha$ . No obstante, el valor medio del porcentaje de linfocitos que expresaron las dos isoformas del antígeno CD8 $\alpha$  fue superior en los días previos al desafío, debido a que uno de los animales (nº 6) presentó valores muy elevados en ese período del estudio (Anexo 120, Figura. 3 D-L)

La expresión de los antígenos 2E3 y CD25, y la ratio entre ambos se mantuvieron sin diferencias significativas durante toda la prueba. En los días 0, 7 y 21, uno de los animales (el nº 9) que no sobrevivió a la infección presentó una expresión de CD25 claramente inferior a la del resto del grupo, pero que se normalizó en el momento del desafío (Anexo 4, Figura 120. M, E. y F)

#### 1.2.4. Inmunización con una vacuna recombinante y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo IV)

Todos los cerdos de este grupo murieron durante las 24 horas que siguieron a la infección, por lo que el estudio finalizó el día

del desafío (día 37), sin encontrarse diferencias significativas en la expresión de los marcadores leucocitarios. Los valores medios fueron muy similares durante toda la prueba, y tras la primera vacunación sólo se observó un ligero aumento de la ratio CD3/ $\alpha$ IgM y de los porcentajes de expresión de CD3, 2E3 y CD25, junto con una pequeña disminución del marcador  $\alpha$ IgM (Anexo 4, Figura 121 A-F)

#### 1.2.5. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo V)

En la figura 122 del Anexo 4 se representa la evolución de los marcadores leucocitarios y de sus ratios en los cinco cerdos del grupo durante todo el estudio. A partir del desafío, sólo se recogen las correspondientes a los tres animales que sobrevivieron a la infección.

Los porcentajes de expresión de los antígenos CD3,  $\alpha$ IgM y su ratio presentaron un valor medio similar entre los días previos a la infección. Seis días después, el porcentaje de CD3 disminuyó significativamente respecto al día de la inmunización ( $p = 0,0003$ ) y a los días 7, 21 y 37 ( $p < 0,0001$ ). De igual forma, también descendió la ratio CD3/ $\alpha$ IgM ( $p < 0,0001$ , con todos los días), mientras que aumentó el porcentaje de  $\alpha$ IgM ( $p < 0,0001$ , en todos los casos). A los 13 días los valores tendieron a restablecerse pero siguieron encontrándose diferencias significativas respecto a los días 0, 7, 21 y 37, tanto en la expresión de CD3 ( $p = 0,0249$ ,  $p = 0,0090$ ,  $p = 0,0024$  y  $37 p = 0,0030$ ), como en la de  $\alpha$ IgM ( $p = 0,0015$ ,  $p = 0,0002$ ,  $p = 0,0003$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente), o en la ratio entre ambos ( $p$

=0,0019,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente) (Anexo 4, Figura 122 A, B, C)

No se detectaron diferencias significativas en la expresión del antígeno CD8 $\alpha$  durante todo el estudio y tampoco en la de CD4. Sin embargo su ratio difirió significativamente ( $p = 0,0207$ ) entre los días 21 y 37, en los que se alcanzaron valores mínimos y máximos, respectivamente. No se observaron diferencias en la expresión de los linfocitos dobles positivos ni tampoco en los ratios CD4CD8 $\alpha$ /CD4 y CD4CD8 $\alpha$ /CD8 $\alpha$ ; aunque tras la infección se observó como el cerdo n° 11 presentaba valores claramente superiores a los otros dos cerdos del grupo. No se advirtieron diferencias significativas entre ninguno de los días con la ratio CD8 $\alpha$ CD8 $\beta$ /CD8 $\alpha$ , ni tampoco en el porcentaje de linfocitos T citotóxicos. No obstante, el porcentaje medio de esta subpoblación de linfocitos T fue superior antes de la infección, como consecuencia de que el cerdo n° 14 presentó una proporción elevada de estos linfocitos durante ese periodo del estudio (Anexo 4, Figura. 122. D-L)

Con respecto a los antígenos CD25 y 2E3, se observó como después del desafío la expresión del cerdo n° 12 era superior a la de los otros dos supervivientes; aunque no se apreciaron diferencias significativas entre ninguno de los días del estudio, al igual que tampoco se encontraron con la ratio CD25/2E3 (Anexo 4, Figura 122. M, E. y F)

#### 1.2.6. Inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo VI)

Los resultados referentes a la evolución de la expresión relativa de los marcadores leucocitarios y las ratios utilizados en este estudio se recogen en la figura 123 del Anexo 4.

Al igual que en otros grupos, la expresión de CD3,  $\alpha$ IgM y la ratio entre ambos marcadores se mantuvieron sin modificaciones reseñables en los días previos al desafío. A los 6 días post-infección se observó un descenso significativo del porcentaje de CD3 respecto al día inicial ( $p = 0,0183$ ) y un aumento del de  $\alpha$ IgM en relación con los días 0, 21 y 37 ( $p = 0,0040$ ,  $p = 0,0190$  y  $p = 0,0003$  respectivamente). En cambio los valores de la ratio en ese día no difirieron significativamente con los de los días previos. Una semana después, sólo persistieron las diferencias relativas a la expresión de  $\alpha$ IgM respecto al día 37 ( $p = 0,090$ ) (Anexo 123, Figura 6, A, B, C).

Los porcentajes de CD8 $\alpha$ , CD4 y de linfocitos dobles positivos se mantuvieron con valores similares durante todo el estudio y sólo se observó un ligero incremento de los mismos a los 13 días post-infección. La expresión de las dos isoformas del antígeno CD8 se caracterizó por presentar valores más elevados durante todo el estudio en el cerdo n° 31, así como por descender ligeramente a los 13 días post-infección, aunque en ningún momento se observasen diferencias significativas. Por su parte, las distintas ratios obtenidas entre estos marcadores apenas sufrieron modificaciones, manteniéndose con valores muy similares antes y después del desafío (Anexo 4, Figura. 6. D-L).

Con respecto a los antígenos CD25 y 2E3, no se obtuvieron diferencias significativas en

## Resultados

sus porcentajes de expresión y sus valores medios presentaron ligeras fluctuaciones durante todo el estudio. En cambio, cuando se calculó la ratio entre ambos se observó como la media descendía después del desafío, encontrándose diferencias significativas entre los días 6 y 13 post-infección respecto al día 21 ( $p = 0,0454$  y  $p = 0,0269$ , respectivamente) (Anexo 4, Figura 123. M, E. y F).

### 1.2.7. Inmunización con la bacteria comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo VII)

En la figura 124 del anexo 4 se representa la evolución de los marcadores leucocitarios y de sus ratios durante todo el estudio

La expresión del antígeno CD3 y el ratio CD3/ $\alpha$ IgM se caracterizaron por presentar valores muy similares durante todo el estudio y siempre más elevados en el cerdo n° 27. Por el contrario, el porcentaje relativo de  $\alpha$ IgM fue inferior en este animal y la media del grupo presentó valores superiores tras la infección, especialmente a los 6 días, que diferían significativamente de los del día inicial y los del desafío ( $p = 0,0122$  y  $p = 0,0218$ , respectivamente) (Anexo 4, Figura 7, A, B, C).

El análisis estadístico reveló la ausencia de diferencias significativas en los porcentajes de los antígenos CD4 y CD8 $\alpha$ , y en las proporciones de linfocitos dobles positivos y citotóxicos; pero mientras que la expresión

individual de ambos antígenos descendía a partir del día 21, la expresión conjunta (linfocitos dobles positivos) aumentaba. Los distintos ratios calculados para estas subpoblaciones de linfocitos (CD4/ CD8 $\alpha$ , CD4CD8 $\alpha$ /CD4, CD4CD8 $\alpha$ /CD8 $\alpha$  y CD8 $\alpha$  CD8 $\beta$ /CD8 $\alpha$ ) se mantuvieron con valores similares durante todo el estudio, sin que la vacunación o la infección los modificasen notablemente (Anexo 124, Figura. 7. D-L)

Los porcentajes de CD25, 2E3 y su ratio se caracterizaron por presentar fluctuaciones durante toda la prueba, sin encontrarse diferencias entre los distintos días. Para completar la descripción de estos tres parámetros, citar que tras la infección, en el cerdo n° 29 se observó un incremento importante de la expresión de CD25, 2E3 y la ratio entre ambos, alcanzándose los valores más elevados de todo el estudio (Anexo 4, Figura. 124. M, E y F).

### 1.3. Comparación de los diferentes grupos

El análisis estadístico comparativo excluyó a los grupos I y IV, debido a que todos los animales murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*, por lo que no se pudo disponer de los porcentajes y ratios de los días 6 y 13 post-infección. Los valores de “p”, en aquellos casos en los que se encontraron diferencias significativas se recogen en la tabla 68.

Tabla 68. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar los porcentajes relativos de expresión de marcadores leucocitarios y sus ratios en los diferentes grupos experimentales

Grupos	Valor de p
<b>CD3</b>	
Grupo II- Grupo III	p = 0,0001
Grupo II- Grupo V	p = 0,0173
Grupo II- Grupos VI y VII	p < 0,0001
Grupo III- Grupos VI y VII	p < 0,0001
Grupo V- Grupos VI y VII	p < 0,0001
<b>αIgM</b>	
Grupo II- Grupo III	p = 0,0012
Grupo II- Grupo V	p = 0,0400
Grupo II- Grupos VI y VII	p < 0,0001
Grupo III- Grupos VI y VII	p < 0,0001
Grupo V- Grupos VI y VII	p < 0,0001
<b>CD3/ αIgM</b>	
Grupo II- Grupos III, VI y VII	p < 0,0001
Grupo II- Grupo V	p = 0,0254
Grupo III- Grupo V	p = 0,0254
Grupo III- Grupos VI y VII	p < 0,0001
Grupo V- Grupos VI y VII	p < 0,0001
<b>CD8α</b>	
Grupo II- Grupo III	p = 0,0325
Grupo III- Grupo V	p = 0,0020
Grupo III- Grupo VII	p = 0,0042
<b>CD4</b>	
Grupo III- Grupo V	p = 0,0008
Grupo III- Grupo VI	p = 0,0316
Grupo III- Grupo VII	p = 0,0449
<b>CD4 CD8 α</b>	
Grupo II-Grupos III y VI	p < 0,0001
Grupo II-Grupo VII	p = 0,0048
Grupo III- Grupo V	p = 0,0015
Grupo III- Grupo VI	p = 0,0110
<b>CD4 CD8 α/ CD4</b>	
Grupo II-Grupo III	p = 0,0122
Grupo II-Grupo VI	p = 0,0008
Grupo II- Grupo VII	p = 0,0003
Grupo V- Grupo VII	p = 0,0364
<b>CD4 CD8 α/ CD8 α</b>	
Grupo II-Grupo VI	p = 0,0317
Grupo II- Grupo VII	p = 0,0017
<b>2E3</b>	
Grupo II-Grupo V	p = 0,0039
Grupo II-Grupo VI	p = 0,0069
Grupo III- Grupo VI	p = 0,0002
Grupo V- Grupo VI	p < 0,0001
Grupo V- Grupo VII	p = 0,0191
Grupo VI- Grupo VII	p = 0,0192
<b>CD25/ 2E3</b>	
Grupo II-Grupo VI	p < 0,0001
Grupo III- Grupo VI	p < 0,0001
Grupo V- Grupo VI	p < 0,0001
Grupo VI- Grupo VII	p < 0,0001

Por lo que se refiere a los porcentajes de expresión de los antígenos CD3,  $\alpha$ IgM, y su ratio, destacar la presencia de diferencias significativas entre los grupos de cerdos privados de calostro con respecto a los dos grupos de animales criados de forma natural. Éstos últimos presentaron durante todo el estudio porcentajes de CD3 más bajos y de  $\alpha$ IgM más elevados, y por tanto una ratio CD3/ $\alpha$ IgM menor.

Los porcentajes de CD8 $\alpha$  y CD4 resultaron similares en todos los grupos con la excepción del III, que presentó valores más bajos, especialmente después del día 21. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los distintos grupos cuando se comparó la ratio CD4/CD8 $\alpha$ . Tampoco se obtuvieron entre los porcentajes de linfocitos que expresaban las dos isoformas del antígeno CD8, ni en la ratio CD8 $\alpha$ CD8 $\beta$ /CD8 $\alpha$ , pero sí entre el porcentaje de linfocitos dobles positivos y sus correspondientes ratios.

El porcentaje de CD25 fue similar en todos los grupos, sin encontrarse diferencias significativas. En cambio, el porcentaje de 2E3 fue claramente inferior en el grupo VI durante todo el estudio y por tanto el ratio superior, apreciándose diferencias significativas con el resto grupos. Además, también se detectaron diferencias significativas entre el grupo V, con un porcentaje medio de 2E3 más elevado, y los grupos II y VII, con porcentajes más bajos.

## 2. Respuesta *in vitro*: Pruebas de proliferación de leucocitos sanguíneos

Las pruebas se realizaron con sangre procedente de cerdos SPF, que no habían estado en contacto con *H. parasuis*.

### 2.1. Optimización de la concentración de los inductores

#### 2.1.1. Bacteria inactivada por calor

En la Tabla 69 se recogen los promedios de proliferación estimados por el número de cuentas por minuto (c.p.m.), y las desviaciones estándar para cada una de las concentraciones bacterianas en estudio, así como el promedio y la desviación estándar en respuesta al medio de cultivo celular.

Con concentraciones bacterianas de  $1,87 \times 10^7$  y  $9,3 \times 10^6$  UFC/ ml se producía una proliferación adecuada con valores de c.p.m. superiores a los observados con otras concentraciones, por lo que la concentración óptima para las pruebas de proliferación se estableció como el valor medio de las dos concentraciones anteriores, es decir,  $1 \times 10^7$  UFC/ml. En todos los casos, la respuesta proliferativa proporcionó valores bajos de c.p.m. cuando se empleó el medio celular



Tabla 69. Promedio ( $\mu$ ) y desviación estándar (SD) de los valores de c.p.m. en respuesta a diferentes concentraciones de la cepa Nagasaki de *H. parasuis* inactivada con calor

	Cerdo 1		Cerdo 2		Cerdo 3		Cerdo 4	
UFC/ml	$\mu$	SD	$\mu$	SD	$\mu$	SD	$\mu$	SD
$6 \times 10^8$	749	22	313	133	201	100	480	117
$3 \times 10^8$	292	72	1361	316	356	126	658	142
$1,5, \times 10^8$	495	21	1639	421	357	3	882	225
$7,5, \times 10^7$	1019	215	2414	717	745	200	2981	804
$3,7, \times 10^7$	1147	248	2696	697	583	26	3106	495
$1,87, \times 10^7$	<b>2635</b>	500	<b>3008</b>	607	<b>1511</b>	588	<b>3797</b>	209
$9,3, \times 10^6$	<b>3553</b>	356	<b>3367</b>	1196	<b>1618</b>	276	<b>3982</b>	186
<b>Medio</b>	579	257	710	384	243	92	300	101

En color rojo se señalan los valores de c.p.m. más elevados para cada animal

### 2.1.2. Sobrenadantes con proteínas de membrana externa enriquecidos en TbpB.

Los resultados de la proliferación se resumen en la Tabla 70.

En los cuatro animales se observó una proliferación adecuada cuando se realizaba la inducción con concentraciones de los sobrenadantes de 4,8 y 2,4  $\mu\text{g/ml}$ .

Las concentraciones superiores producían una menor respuesta proliferativa, con valores de c.p.m. más bajos, y en algunos casos similares a los observados en respuesta al medio de cultivo celular, por lo que la concentración óptima se estableció como la media de las dos anteriores, es decir, 3,5  $\mu\text{g/ml}$ .

Tabla 70. Promedio ( $\mu$ ) y desviación estándar (SD) de los valores c.p.m. en respuesta a diferentes concentraciones de sobrenadantes con proteínas de membrana externa enriquecidos en TbpB, de la cepa Nagasaki de *H. parasuis*

	Cerdo 1		Cerdo 2		Cerdo 3		Cerdo 4	
( $\mu\text{g/ml}$ )	$\mu$	SD	$\mu$	SD	$\mu$	$\mu$	$\mu$	SD
<b>300</b>	198	40	76	64	337	100	267	85
<b>150</b>	181	65	171	74	485	123	433	102
<b>75</b>	113	21	548	32	753	210	558	103
<b>37,5</b>	373	127	238	76	568	96	704	127
<b>19</b>	338	36	553	124	707	152	685	91
<b>9,5</b>	462	110	506	162	621	129	685	17
<b>4,8</b>	<b>1004</b>	36	<b>714</b>	106	<b>903</b>	87	<b>1204</b>	140
<b>2,4</b>	<b>930</b>	42	<b>1109</b>	106	<b>972</b>	65	<b>725</b>	98
<b>Medio</b>	114	94	162	71	153	89	39	20

## Resultados

### 2.1.3. Extractos eluidos de *E. coli* con la proteína recombinante PBAD-Thio-TbpB-V5-His

En la Tabla 71 se resumen los resultados de las pruebas de proliferación con la proteína

recombinante. Las concentraciones del inductor de 3,5 y 2 µg/ml determinaban una proliferación adecuada, con valores de c.p.m. más elevados, por lo que la concentración óptima se estableció como el valor medio de las dos anteriores, es decir, 2,7 µg/ml.

Tabla 71. Promedio ( $\mu$ ) y desviación estándar (SD) de los valores c.p.m. en respuesta a diferentes concentraciones de extractos eluidos de *E.coli* con la proteína recombinante PBAD-Thio-TbpB-V5-His

	Cerdo 1		Cerdo 2	
(µg/ml)	$\mu$	SD	$\mu$	SD
210	248	71	567	126
105	215	109	566	142
52,5	324	120	512	150
26,2	491	6	305	139
13,1	454	326	938	67
6,5	850	336	1413	40
3,5	1415	36	1436	28
2	1134	374	3426	111
Medio celular	234	115	123	57

En color rojo se señalan los valores de c.p.m. más elevados para cada animal

### 2.2. Proliferación de leucocitos de sangre periférica

En la Tabla 72 se recogen los valores medios de c.p.m. en respuesta a la estimulación con la bacteria inactivada los sobrenadantes con OMP y la proteína recombinante PBAD-Thio-TbpB-V5- His.

Para normalizar los resultados, se calcularon los índices de proliferación y su valor medio (Figura 63).

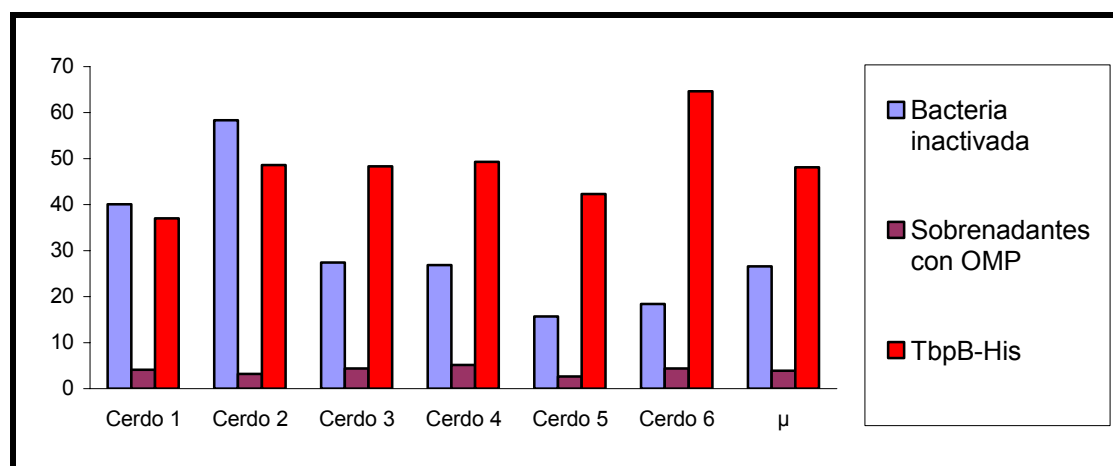
La proliferación leucocitaria, tanto expresada en base al número de c. p. m., como en base al índice de proliferación, fue superior para la bacteria inactivada y la proteína recombinante TbpB-His. No obstante, hay que explicar que en la muestra que contenía esta proteína, se observaron otras bandas proteicas que podrían corresponder a extractos de *E. coli* (la proteína se había expresado en esta bacteria), y que, por tanto, habrían podido influir en la inducción de la proliferación leucocitaria.

Tabla 72. Valores de c.p.m. en respuesta a la cepa Nagasaki de *H. parasuis* inactivada con calor, a los sobrenadantes de membrana externa con OMP y a la proteína recombinante PBAD-Thio-TbpB-V5-His (TbpB-His.)  $\mu$  Promedio. **SD**. Desviación estándar.

	ENSAYO 1		ENSAYO 2		ENSAYO 3	
	Bacteria inactivada	Medio de cultivo	OMP	Medio de cultivo	TbpB-His	Medio de cultivo
<b>Cerdo 1</b>	4411	110	566	138	3110	84
<b>Cerdo 2</b>	6008	103	474	149	4133	85
<b>Cerdo 3</b>	4111	150	671	153	2560	53
<b>Cerdo 4</b>	3007	112	688	134	2562	52
<b>Cerdo 5</b>	4971	317	433	162	2667	63
<b>Cerdo 6</b>	3336	181	578	131	4591	71
<b><math>\mu</math></b>	4307	162	568	145	3270	68
<b>SD</b>	1097	81	102	12	881	15

ENSAYO 1. Inductor: Bacteria inactivada. ENSAYO 2. Inductor: Sobrenadantes con OMP. ENSAYO 3. Inductor: TbpB-His.

Figura 63. Índices de proliferación en respuesta a la cepa Nagasaki de *H. parasuis* inactivada con calor, a los sobrenadantes con OMP, y a la proteína recombinante PBAD-Thio-TbpB-V5-His (TbpB-His.)  $\mu$  Promedio de los 6 cerdos



# Capítulo VI: Respuesta de fase aguda en infecciones de cerdos con *Haemophilus parasuis*

## 1. Cerdos privados de calostro

### 1.1 Infección con una DL de *H. parasuis*

#### 1.1.1. Pig MAP

#### 1.1.2. Haptoglobina

#### 1.1.3. CRP

#### 1.1.4. Apolipoproteína A-I

### 1.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

#### 1.2.1. Pig MAP

#### 1.2.2. Haptoglobina

#### 1.2.3. CRP

#### 1.2.4. Apolipoproteína A-I

### 1.3. Inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

#### 1.3.1. Pig MAP

#### 1.3.2. Haptoglobina

#### 1.3.3. CRP

#### 1.3.4. Apolipoproteína A-I

### 1.4. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

## 2. Cerdos criados de forma convencional

### 2.1 Inmunización con la bacterina comercial A y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

#### 2.1.1. Pig MAP

#### 2.1.2. Haptoglobina

#### 2.1.3. CRP

#### 2.1.4. Apolipoproteína A-I

### 2.2 Inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

#### 2.2.1. Pig MAP

#### 2.2.2. Haptoglobina

#### 2.2.3. CRP

#### 2.2.4. Apolipoproteína A-I

## 3. Comparación entre los cerdos del estudio

### 3.1. Pig Map

### 3.2. Haptoglobina

### 3.3. CRP

### 3.4 Apolipoproteína A-I

La respuesta de fase aguda se caracterizó con el estudio de las proteínas de fase aguda pig MAP, haptoglobina, proteína C reactiva (CRP) y apolipoproteína A-I. Para describir la evolución de las concentraciones de estas proteínas como respuesta a la infección por *H. parasuis* en los grupos de cerdos descritos en el Capítulo III, se han utilizado los valores medios de cada grupo; pero cuando se han observado diferencias importantes entre los animales de un mismo grupo, también se ha descrito de forma individual. Los cerdos inmunizados con la proteína recombinante murieron entre las 12 y 24 horas post-infección, por lo que no resultó posible estudiar la respuesta de fase aguda en estos animales.

## 1. Cerdos privados de calostro

### 1.1. Infección con una DL de *H. parasuis* (grupo I)

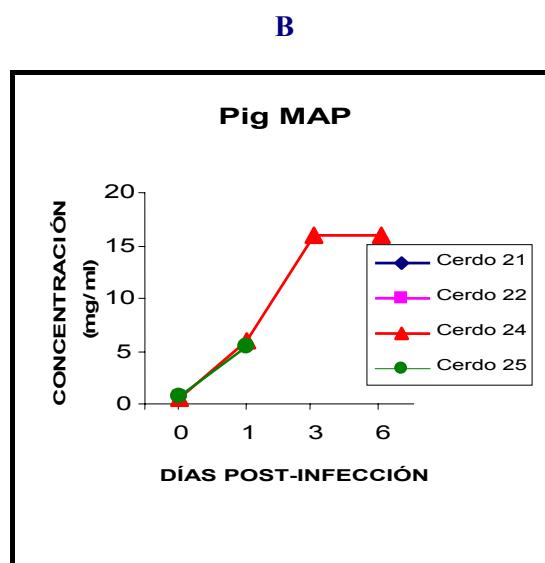
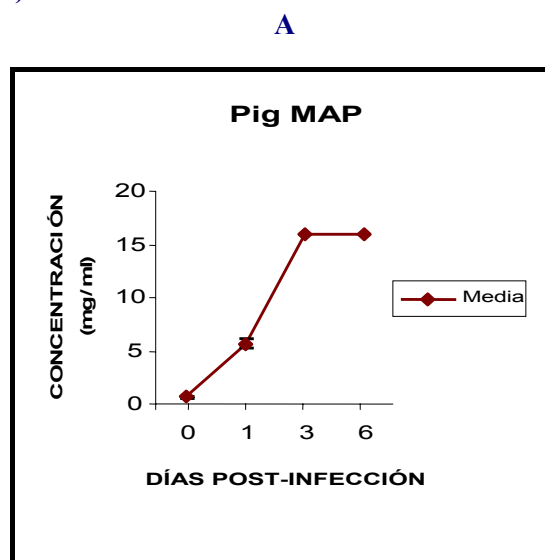
#### 1.1.1. Pig MAP

Al inicio de la prueba todos los animales presentaron una concentración similar de pig MAP, por lo que la desviación estándar resultó muy pequeña (Figura 64 A). La infección con una DL de la bacteria produjo un aumento destacado de la concentración de esta proteína y a las 24 horas la media de las concentraciones de los dos únicos cerdos supervivientes era 9 veces superior a la del día 0 (Figura 64 A). En ambos cerdos, el incremento observado fue similar.

El cerdo nº 25 murió a los dos días de la infección y el cerdo nº 24, a los seis días (Figura 64.B). Las concentraciones más elevadas de esta proteína se alcanzaron los días

3 y 6 después de la inoculación, con un valor de 16,04 mg/ml, por consiguiente, 25 veces superior al del día inicial (Fig. 64 A y B). El análisis estadístico de las concentraciones obtenidas reveló la existencia de elevaciones significativas cuando se comparaba el día inicial con los días 1, 3 y 6 posteriores a la infección ( $p < 0,0001$ ).

Figura 64. Evolución de los niveles de pig MAP después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo I. **A)** Media de los valores. **B)** Valores individuales



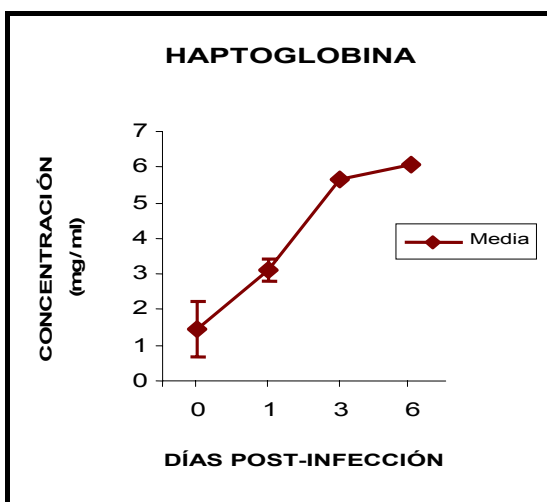
### 1.1.2. Haptoglobina

La concentración de esta proteína en el cerdo nº 25, que murió a las 48 horas, aumentó considerablemente el día posterior a la infección, casi seis veces, pasando de 0,56 mg/ml a 3,34 mg/ml. Por el contrario, en el cerdo nº 24, que sobrevivió durante 6 días, los niveles de la proteína sólo aumentaron ligeramente las primeras 24 horas (de 2,10 mg/ml a 2,90 mg/ml) y de forma más acusada a los 3 y a los 6 días, momento en el cual se alcanzó el valor máximo (Figura 65 A y B).

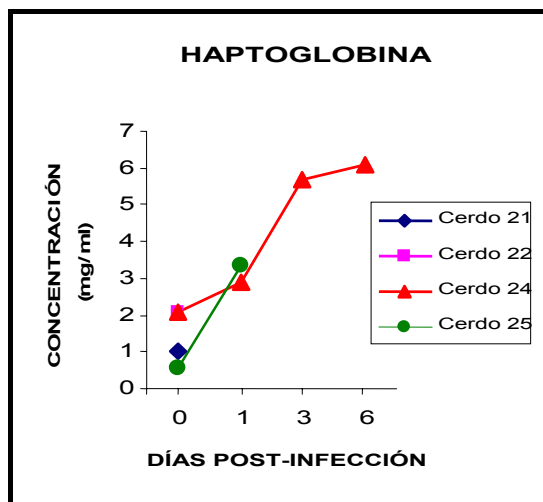
Cuando se analizó la concentración media del grupo se observó que en el día 1 se había incrementando su valor de forma significativa con respecto al día 0 ( $p = 0,026$ ), tendencia que continuó a los 3 ( $p = 0,0001$ ) y 6 días ( $p < 0,0001$ ), en los que se alcanzaron los valores máximos (Figura 65.A.).

Figura 65. Evolución de los niveles de haptoglobina después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo II. **A)** Media de los valores. **B)** Valores individuales

**A**



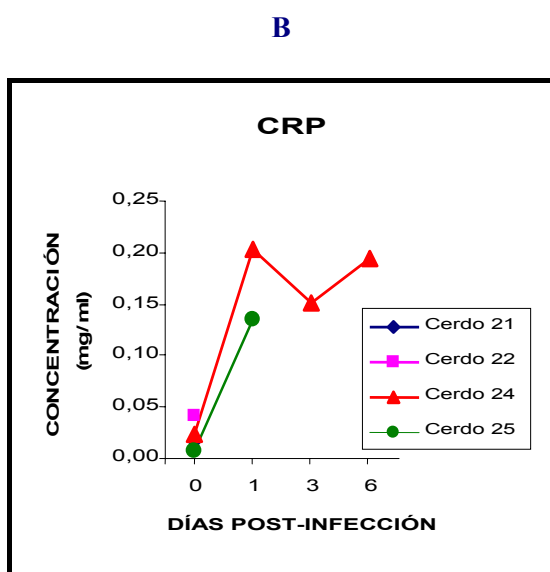
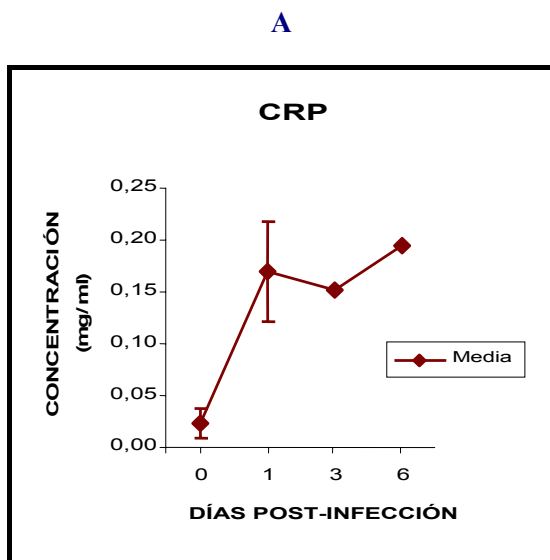
**B**



### 1.1.3. Proteína C-reactiva (CRP)

La concentración media de la CRP antes de la infección fue de 0,02 mg/ml. En las Figuras 66 A y B se observa cómo, transcurridas las primeras 24 horas, se produjo un incremento notable en los dos únicos cerdos que habían sobrevivido a la infección, más marcado en el caso del nº 24 que murió a los seis días, presentando una concentración sérica de CRP diecisiete veces superior a la inicial, mientras que en el cerdo nº 25 fue sólo diez veces más elevada. A los 3 días se produjo un descenso en la concentración con respecto al día 1, pero tres días después se volvió a incrementar (Figura 66.B.) Al igual que lo ocurrido con las otras proteínas, la concentración media se incrementó después del desafío (Figura 66 A) y se observaron diferencias significativas entre el día 0 y los días 1, 3 y 6 post-infección ( $p < 0,0001$  en todos los casos).

Figura 66. Evolución de los niveles de CRP después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo I. **A)** Media de los valores. **B)** Valores individuales



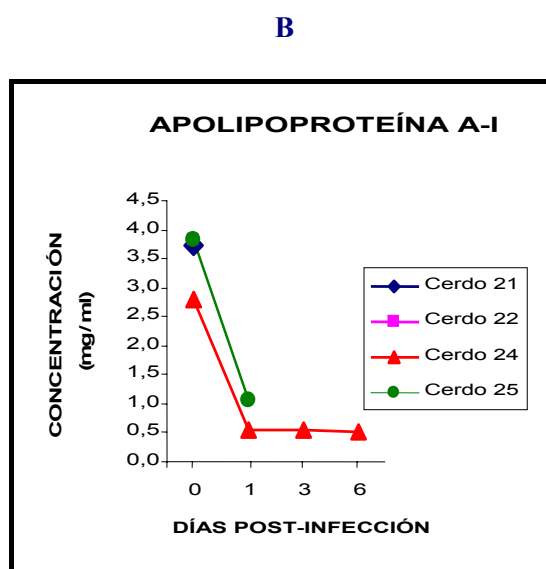
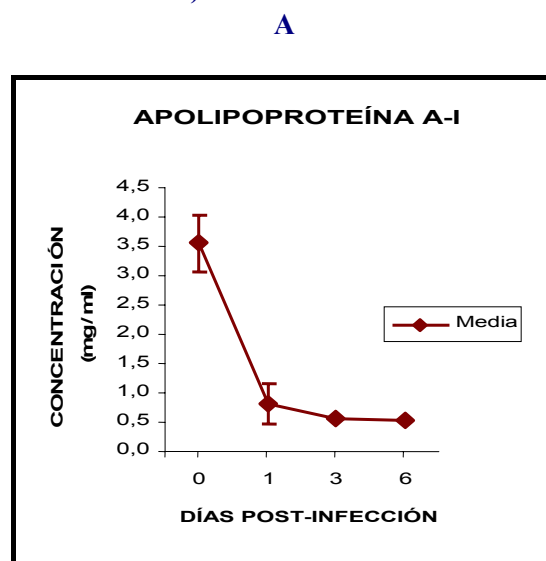
#### 1.1.4. Apolipoproteína A-I

Según lo esperado, puesto que se trata de una proteína de fase aguda negativa, la concentración de esta proteína descendió tras la infección. El día 1, los cerdos nº 24 y 25, que sobrevivieron al desafío, presentaron un descenso de 3,83 a 1,06 mg/ml y de 2,81 a 0,56 mg/ml, respectivamente. En los días 3 y 6, los niveles de esta proteína en el primero de estos

cerdos se mantuvieron sin experimentar apenas variación (Figura 67.B). La media del grupo descendió en las 24 horas posteriores al desafío y volvió a descender ligeramente en los días 3 y 6 (Figura 67.A).

El análisis estadístico de los datos puso de manifiesto que no había diferencias significativas entre las concentraciones de los tres días que siguieron al desafío, pero sí con respecto al día inicial ( $p < 0,0001$ , en los tres casos).

Figura 67. Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo I. **A)** Media de los valores. **B)** Valores individuales



## 1.2. Inmunización con una bacterina y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo II)

### 1.2.1. Pig MAP

El mayor incremento en la concentración de esta proteína se observó el día posterior a la infección con 2,89 mg/ml, aproximadamente el cuádruple de lo observado el día 0. A partir de ese momento, los niveles de esta proteína empezaron a disminuir, ligeramente el día 3, y de forma más acusada los días 6, 9 y 13 post-infección hasta alcanzar valores muy próximos a los iniciales (Figura 68 A). Es importante destacar que en el cerdo nº 5 la concentración de esta proteína se mantuvo constante durante toda la prueba, a diferencia de lo observado con los otros animales. En los cerdos nº 2, 3 y 4 se observó un incremento en los días 1 y 3 post-infección (menos acusado en el cerdo nº 4); mientras que en el cerdo nº 1 sólo se produjo un aumento en el día 1, pero con valores superiores a los observados en los otros cuatro cerdos del grupo (Figura 68.B).

El análisis estadístico de los resultados mostró diferencias significativas entre el día inicial y el día 1 ( $p < 0,0001$ ), y además entre el día 1 y los días 6, 9 y 13 ( $p = 0,0067$ ,  $p = 0,0024$  y  $p = 0,0026$ , respectivamente).

### 1.2.2. Haptoglobina

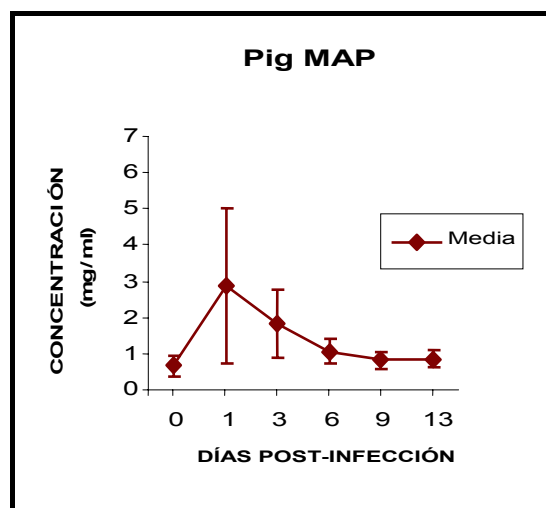
La concentración de la haptoglobina aumentó los días 1 y 3 post-infección, con un valor máximo durante el primer día, ocho veces superior al inicial. Ambos días presentaron diferencias significativas con el día de la primera inmunización ( $p = 0,0001$  y  $p = 0,0045$ , respectivamente). A partir del día 3,

los niveles comenzaron a disminuir, por lo que no se encontraron diferencias significativas entre la concentración de los días 6, 9 y 13 respecto al registro inicial, pero sí en relación con la del día 1 ( $p = 0,0025$ ,  $p = 0,0011$  y  $p = 0,009$ , respectivamente) (Figura 69.A).

La respuesta no fue la misma en los cinco animales: en el cerdo nº 5, a diferencia del resto, la concentración se mantuvo constante durante los 6 primeros días que siguieron a la infección, aumentando a partir de ese momento. En los otros cuatro animales, la concentración de la haptoglobina aumentó a las 24 horas de la infección, pero mientras que en el cerdo nº 4 se mantuvo constante hasta el final de la prueba, en los cerdos nº 1, 2, y 3 fue descendiendo ligeramente, de modo que el día 6 los valores eran similares a los del inicio. De nuevo, el incremento más acusado se observó en el cerdo nº 1 (Figura 69 B).

Figura 68. Evolución de los niveles de pig MAP después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo II. A) Media de los valores. B) Valores individuales.

A





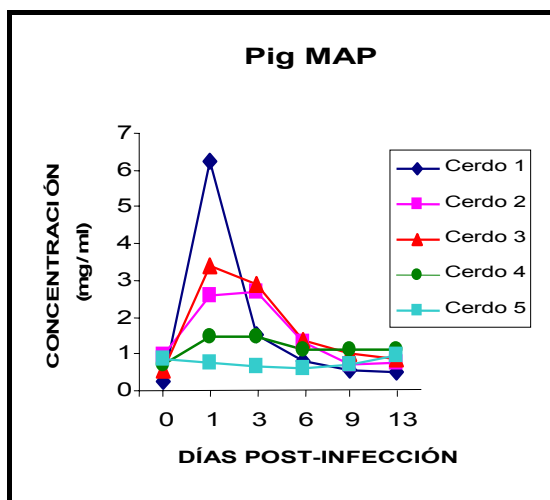
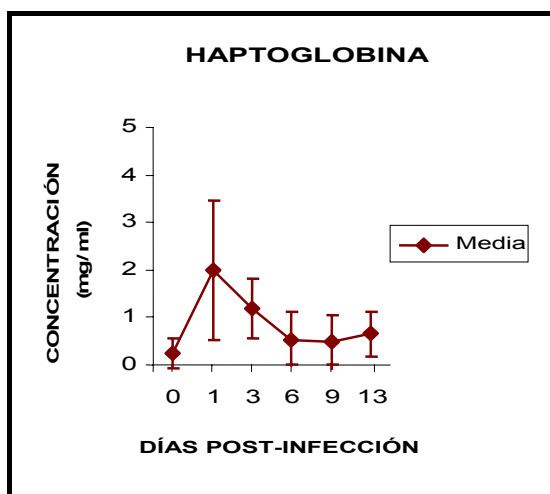
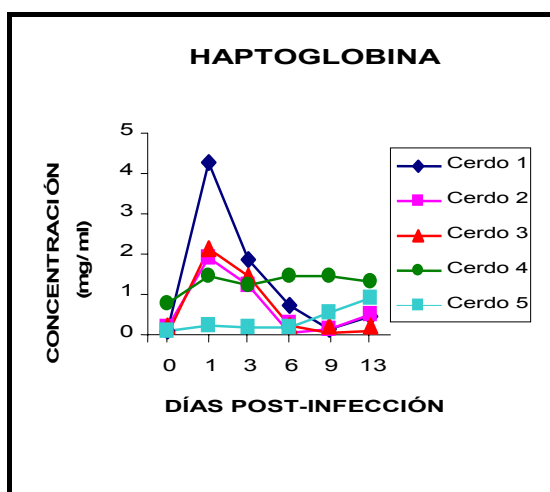


Figura 69. Evolución de los niveles de haptoglobina después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo II. A) Valores medios. B) Valores individuales

A



B



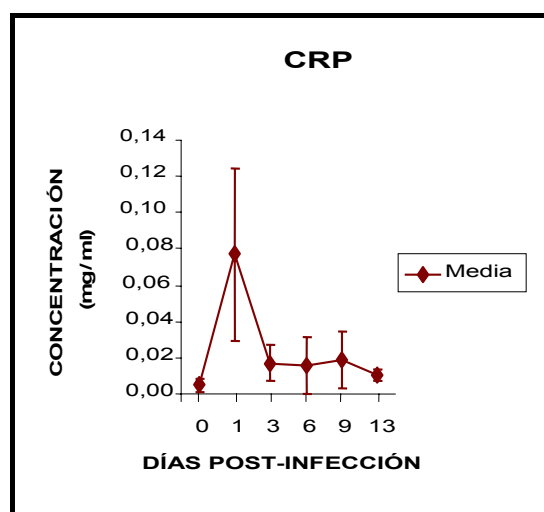
### 1.2.3. Proteína C- reactiva (CRP)

En las Figuras 70 A y B se puede observar cómo la concentración de CRP sólo aumentó el día posterior a la infección, especialmente en tres de los animales (cerdos n° 1, 2 y 3), mientras que en los otros dos apenas sufrió un ligero incremento (Figuras 70 A y B). En los días siguientes, los valores medios descendieron y se aproximaron a los del día inicial (Figura 70 A), con la excepción del cerdo n° 4, en el que la concentración también se volvió a incrementar durante los días 6 y 9 post-infección, con valores superiores a los del día 1 (Figura 70 B).

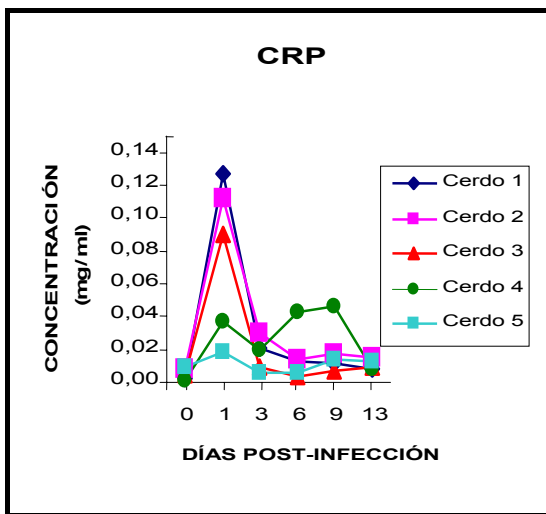
El análisis estadístico puso de manifiesto que el día 1 presentaba diferencias significativas con respecto al resto del estudio ( $p < 0,0001$ , en todos los casos).

Figura 70. Evolución de los niveles de CRP después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo II. A) Valores medios. B) Valores individuales

A



**B**



1.2.4. Apolipoproteína A-I

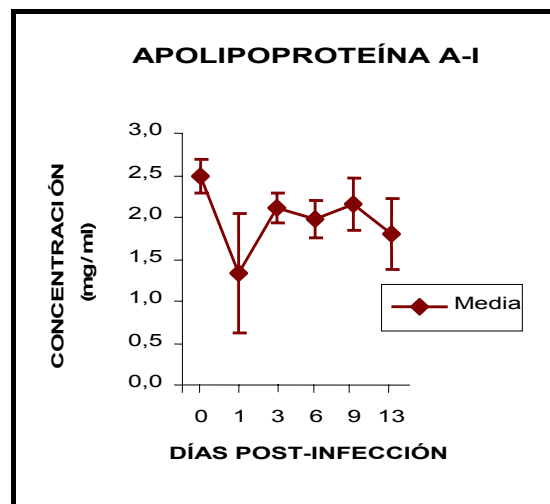
La concentración de esta proteína disminuyó ligeramente después de la infección, con la excepción del día 1 en el que el descenso fue más marcado, presentando una concentración de aproximadamente la mitad de la inicial. Al comparar ambos días, se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,0003$ ). Por otro lado, también se comprobó que los niveles de la proteína registrados el día 1 post-infección eran significativamente inferiores en comparación con los de los días 3, 6 y 9 ( $p = 0,0122$ ,  $p = 0,0375$  y  $p = 0,0074$ , respectivamente). Finalmente, en el día 13 los valores medios volvieron a descender y de nuevo aparecieron diferencias significativas entre este día y el inicial ( $p = 0,0244$ ) (Figura 71).

Cuando se analizó la respuesta para cada uno de los animales, en los cerdos nº 1, 2 y 3 se observó un descenso más notable en la concentración de apolipoproteína A- I a las 24 horas del desafío. A partir de ese momento y hasta el sacrificio de los animales, los valores

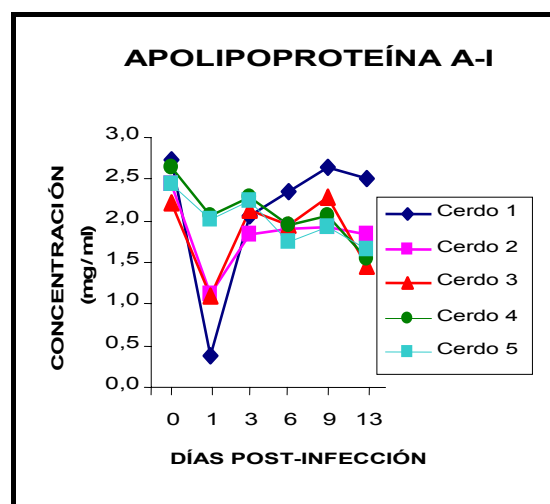
se incrementaron. En los cerdos nº 4 y 5 se observó una primera disminución de la concentración proteica a las 24 horas post-infección; a los 3 días, los valores se incrementaron, pero descendieron durante los días siguientes (Figura 71).

Figura 71. Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo II. A) Valores medios. B) Valores individuales

**A**



**B**



### 1.3. Inmunización con una vacuna con OMPs y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo III)

Para el estudio de la respuesta de fase aguda se excluyó del grupo al cerdo nº 7, que apareció postrado y con hipertemia en los días anteriores a la infección.

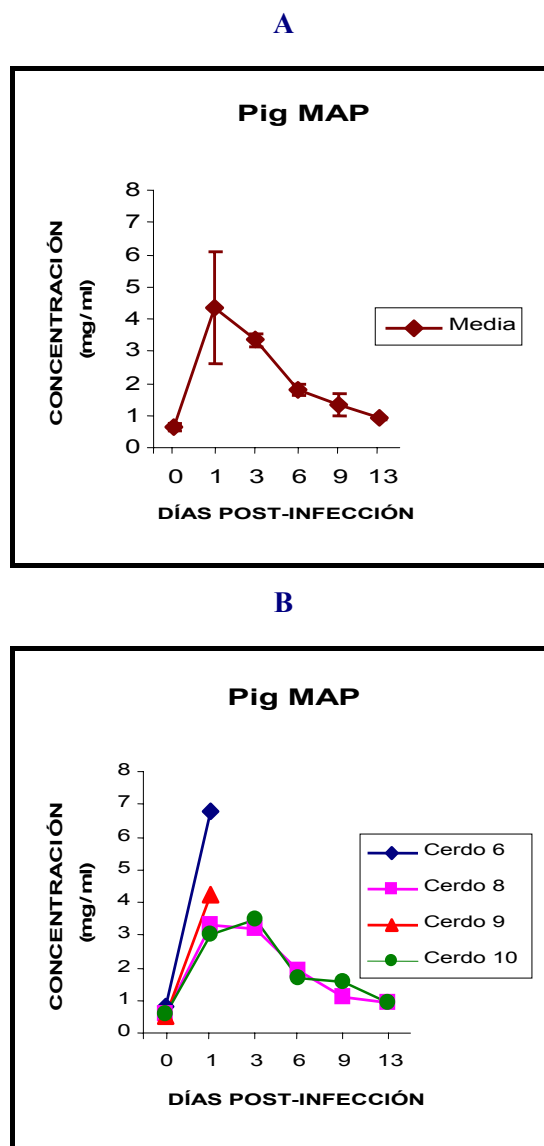
#### 1.3.1. Pig MAP

A las 24 horas de la infección, se observó un aumento de la concentración de la pig MAP (4,33 mg/ml), con valores aproximadamente 7 veces superiores a los iniciales. A partir de ese momento, fue disminuyendo progresivamente y en el día 13 la media del grupo resultó similar a la del día inicial (Figura 72. A). El análisis estadístico reveló la existencia de diferencias significativas entre el día del desafío y los días 1 y 3, que fueron los que presentaron las concentraciones más elevadas ( $p < 0,0001$  y  $p = 0,0034$ , respectivamente). Por otro lado, la concentración del día 1 presentó diferencias significativas con respecto a la de los días 6, 9 y 13 ( $p = 0,002$ ,  $p = 0,0024$  y  $p = 0,0006$ , respectivamente). Finalmente, también se encontraron entre el día 3 y los días 6, 9 y 13 ( $p = 0,0211$ ,  $p = 0,0102$  y  $p = 0,0136$ , respectivamente).

En la Figura 72 B. se puede observar cómo los cuatro animales experimentaron un incremento en la concentración a las 24 horas de la infección, más acusado en los cerdos nº 6 y 9 que murieron en las horas siguientes, por lo que a los 3 días de la infección sólo sobrevivieron dos animales, cuyas concentraciones de pig MAP apenas sufrieron modificaciones con respecto a las registradas a

las 24 horas. Sin embargo, a partir de ese momento fueron descendiendo, de forma que a los 13 días las concentraciones eran similares a las del inicio del estudio (Figura 72.B).

Figura 72. Evolución de los niveles de pig MAP después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo III. A) Valores medios. B) Valores individuales



#### 1.3.2. Haptoglobina

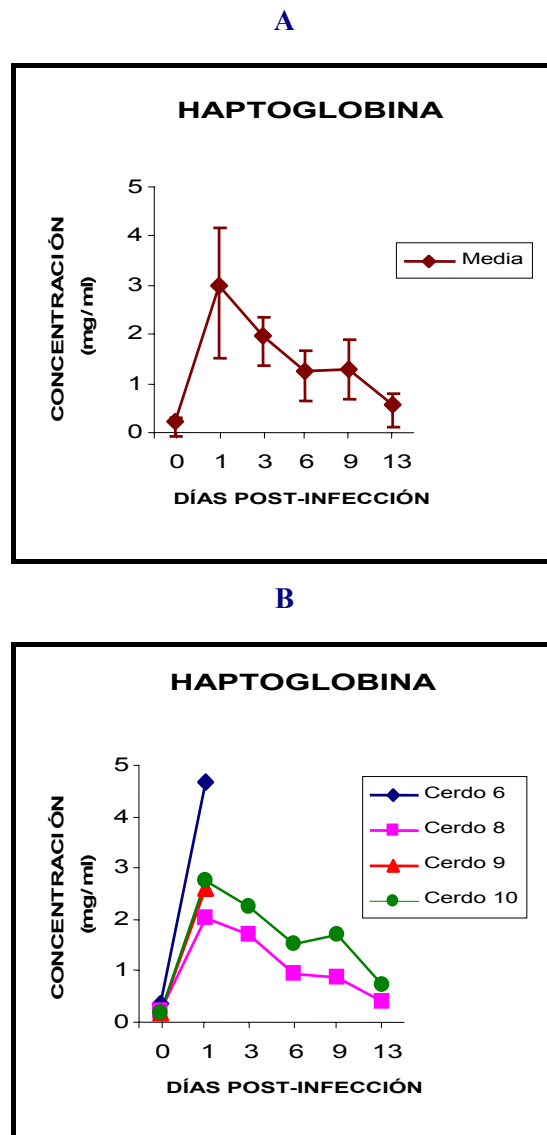
En las figuras 73 A y B se puede observar cómo la haptoglobina aumentaba

## Resultados

considerablemente después del desafío, con un valor máximo a las 24 horas, aproximadamente doce veces superior al del día de infección. Entre ambos días se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ). Estos valores se mantuvieron relativamente elevados hasta el día 9 post-infección, si bien fueron descendiendo progresivamente; mientras que en el día 3 los niveles eran 8 veces superiores a los iniciales, en los días 6 y 9 sólo se mantuvieron cinco veces por encima de los del día de la infección. En estos tres días se encontraron diferencias significativas con respecto al día inicial (con valores de  $p = 0,0022$  con el día 3,  $p = 0,0053$  con respecto al día 6 y  $p = 0,0043$  con respecto al día 9). Finalmente, en el día 13 los valores resultaron sólo el doble de los iniciales y no se hallaron diferencias significativas ( $p = 0,3764$ ). Sin embargo, sí se encontraron al comparar el día 13 con el día 1 ( $p = 0,0013$ ).

En la Figura 73.B, que muestra la evolución de los niveles de haptoglobina en los distintos animales, se observa cómo el valor máximo se alcanzó a las 24 horas post-infección en todos los cerdos, aunque el incremento resultó más acusado en los cerdos nº 6 y 9, que murieron en las horas siguientes. En el día 3 post-infección la concentración de los dos únicos cerdos supervivientes (cerdos nº 8 y 10) descendió con respecto al día 1 y siguió descendiendo tres días después. En el día 9 post-infección aumentó de forma temporal, puesto que descendió de nuevo el día 13, momento en el que se alcanzaron valores similares a los del día inicial.

Figura 73. Evolución de los niveles de haptoglobina después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo III. **A)** Media de valores. **B)** Valores individuales



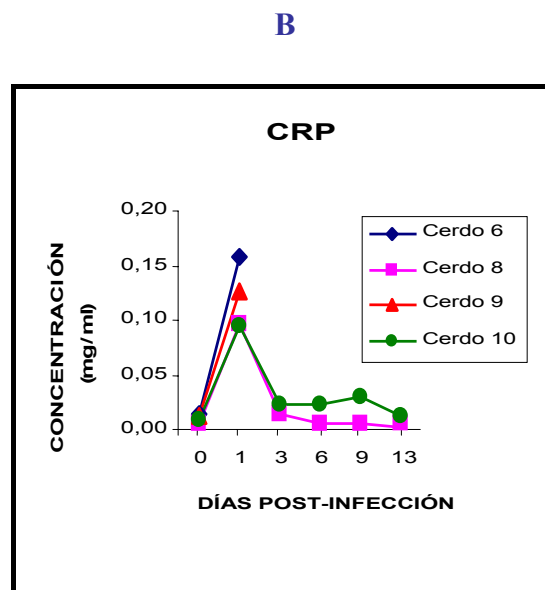
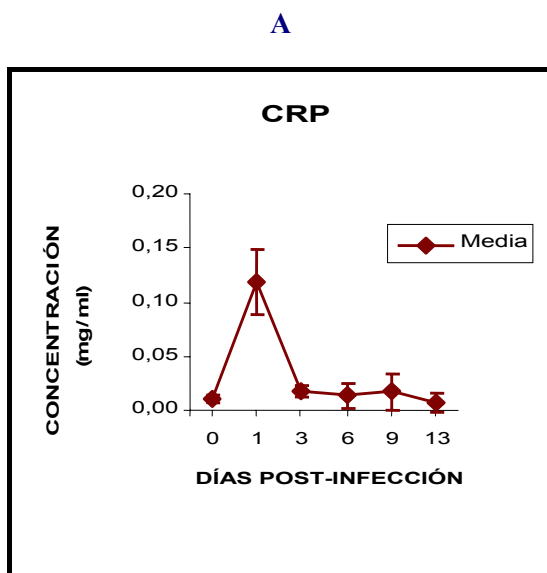
### 1.3.3. Proteína C-reactiva (CRP)

Los niveles de la CRP en sangre aumentaron con carácter inmediato y poco duradero, de tal forma que el día 1 la concentración fue doce veces superior a la del día de inicial, pero a partir de este momento descendió rápidamente, presentando valores similares a los del inicio (Figura 74.A). Cuando se realizó el análisis estadístico se

comprobó que la concentración de la proteína en el día de la infección sólo presentaba diferencias significativas con respecto al día 1 ( $p < 0,0001$ ), que también difirió de forma significativa en relación con los días 3, 6, 9 y 13 ( $p < 0,0001$ , en todos los casos).

Al igual que lo descrito con las proteínas anteriores, aunque su concentración aumentó en todos los animales a las 24 horas de la infección, este incremento fue más notable en los dos cerdos que murieron como consecuencia de ésta. A partir de ese momento, en los dos animales supervivientes se produjo un descenso hasta niveles similares a los del día inicial (Figura 74 B.).

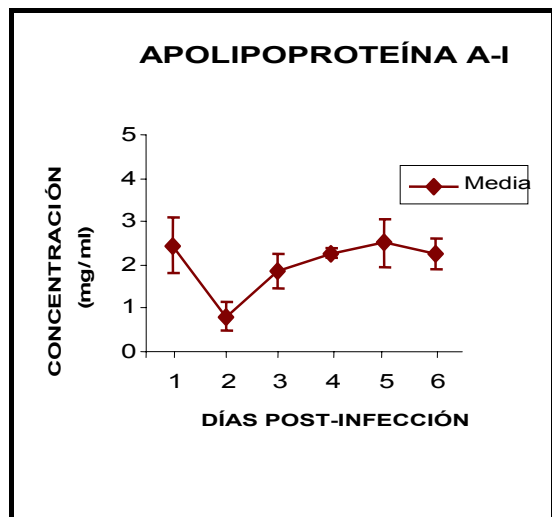
Figura 74. Evolución de los niveles de CRP después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo III. **A)** Media de valores. **B)** Valores individuales



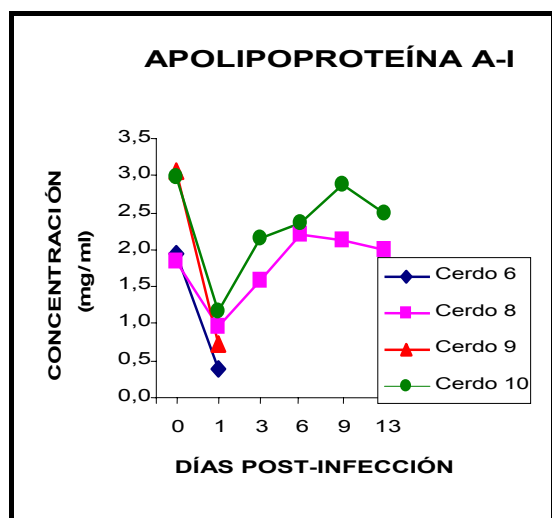
#### 1.3.4. Apolipoproteína A-I

La concentración de la apolipoproteína A-I disminuyó hasta casi tres veces durante el día 1, para recuperarse progresivamente a partir de ese momento y volver a descender ligeramente el día 13 (Figura 75.A.). El análisis estadístico puso de manifiesto que la concentración del día inicial resultaba significativamente más elevada que la del día 1 ( $p < 0,0001$ ). Además, el día 1 también presentó diferencias significativas con respecto a los días 3 ( $p = 0,0132$ ), 6 ( $p = 0,0001$ ), 9 ( $p = 0,0001$ ) y 13 ( $p = 0,0008$ ). Cuando se analizó la respuesta de cada animal se observó que en el momento del desafío, los cerdos nº 9 y 10 presentaron las concentraciones más elevadas, aunque los niveles de apolipoproteína A-I descendieron de forma notable en todos los cerdos a las 24 horas. A partir de ese momento, sólo sobrevivieron los cerdos nº 8 y 10 en los que la concentración fue aumentando progresivamente, para volver a descender a partir de los 6 días en el cerdo nº 8 y a los 13 días, en el cerdo nº 10 (Figura 75.B).

Figura 75. Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo III. **A)** Valores medios. **B)** Valores individuales



**B**



#### 1.4. Inmunización por exposición a una dosis subletal y posterior infección con DL de *H. parasuis* (Grupo V)

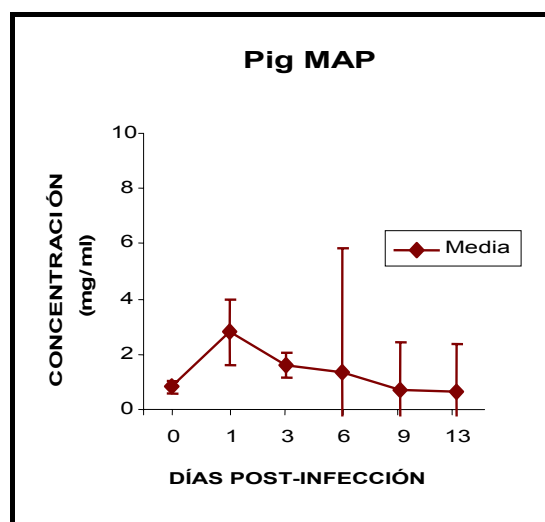
##### 1.4.1. Pig MAP

La concentración de la proteína antes de la infección fue similar en todos los animales (0,61 mg/ml). Estos valores aumentaron hasta cinco veces al día siguiente y de forma

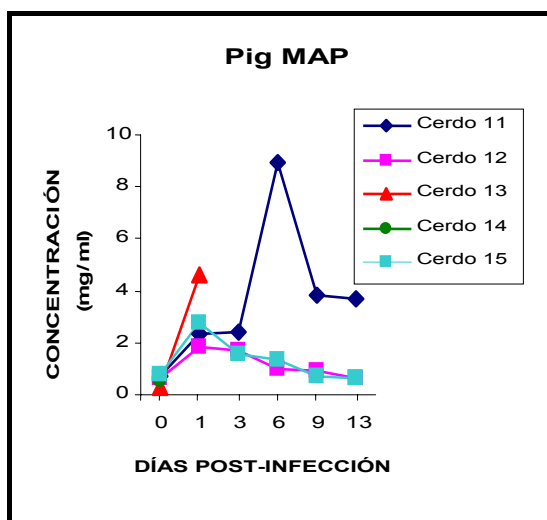
estadísticamente significativa ( $p = 0,026$ ). Dos días más tarde, la concentración disminuyó hasta valores aproximadamente tres veces superiores a los iniciales, sin observarse diferencias significativas entre este día y el día de la infección (Figura 76.A). A los seis días de ella, en dos de los tres cerdos supervivientes (cerdos nº 12 y 15) se encontraron concentraciones similares a las del día 3, mientras que en el cerdo restante (cerdo nº 11) se observó un incremento notable y aparecieron diferencias significativas con respecto al día de la infección ( $p = 0,0001$ ) y a los días 1 y 3 ( $p = 0,0256$  y  $p = 0,0019$ , respectivamente). La concentración de la proteína en este animal disminuyó considerablemente en los días 9 y 13 y no se observaron diferencias significativas entre estos dos días y los anteriores (Figura 76.A y B).

Figura 76. Evolución de los niveles de pig MAP después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo V. **A)** Media de valores. **B)** Valores individuales

**A**



B



Los cerdos n° 13 y 14 no sobrevivieron al desafío, por lo que en estos dos animales sólo se pudo disponer de las concentraciones de pig MAP correspondientes al día de infección. Pero, en el caso del n°14, también se dispuso de la correspondiente al día posterior a la infección. Se trató de una concentración más elevada que la observada en los otros tres cerdos que sobrevivieron hasta el final del estudio (Figura 76.B).

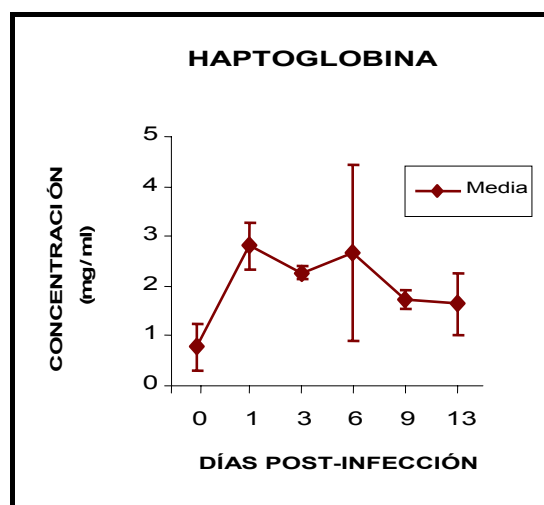
#### 1.4.2. Haptoglobina

En las figuras 77 A y B se muestra cómo la concentración de la haptoglobina se incrementó tras la infección, alcanzando en las 24 horas posteriores, valores máximos de 2,81 mg/ml, aproximadamente cuatro veces superiores a los iniciales. En los días siguientes, fue disminuyendo progresivamente, con la excepción de un animal, que en el día 6 presentó una concentración muy elevada, próxima a 5 mg/ml. El análisis estadístico puso de manifiesto que, a pesar de la gran variabilidad observada según los días y los animales, las únicas diferencias que se

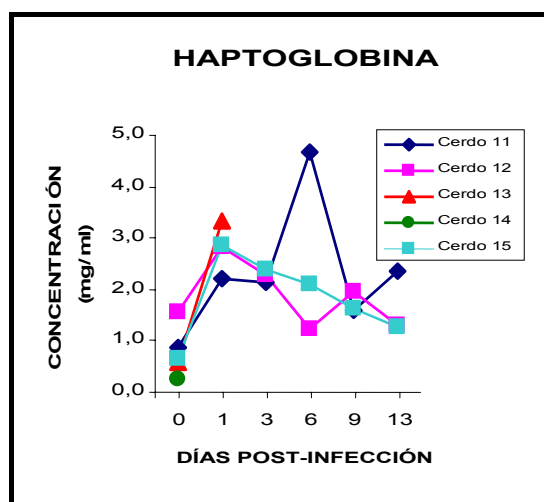
obtuvieron fueron entre el día 0 y los días 1, 3 y 6 ( $p = 0,0027$ ,  $p = 0,0284$  y  $p = 0,0185$ , respectivamente).

Figura 77. Evolución de los niveles de haptoglobina después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo V. A) Valores medios. B) Valores individuales

A



B



Cuando se analizaron los resultados de individualmente, se observó que los cerdos que sobrevivieron a la infección, presentaron un incremento de la concentración a las 24 horas. En el cerdo n° 15 los niveles de haptoglobina

## Resultados

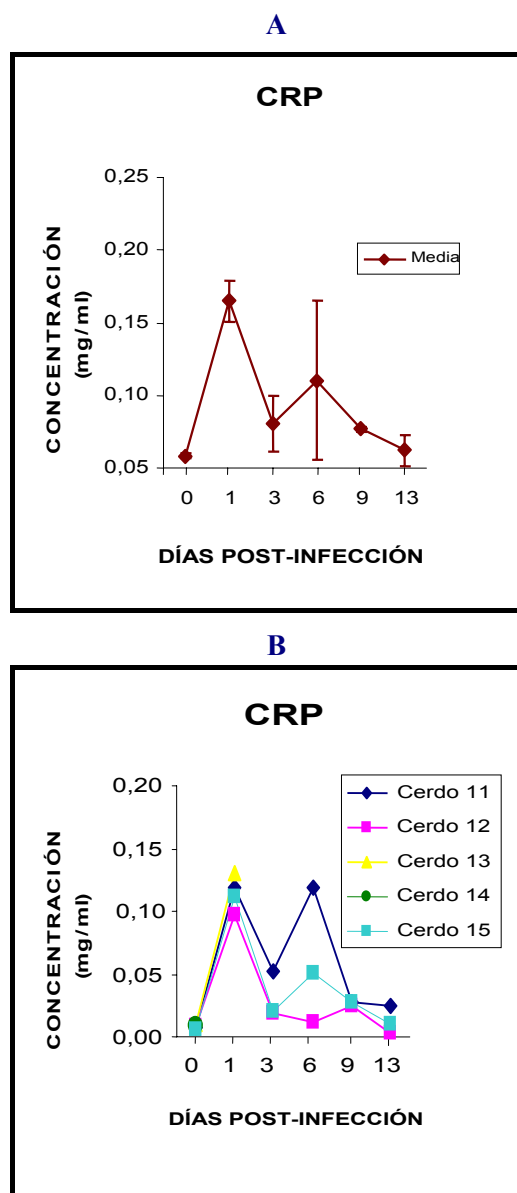
descendieron en los días siguientes, mientras que en los otros dos animales volvieron a incrementarse: en el cerdo nº 11 se produjo un aumento considerable a los 6 días post-infección y, aunque los valores descendieron rápidamente el día 9, cuatro días después volvieron a aumentar. En cambio en el cerdo nº 12, se incrementó a los 9 días aunque a los 13 días descendió. Del cerdo nº 14 sólo se dispuso del dato correspondiente al día de infección y del cerdo nº 13 sólo el del día 1, porque murió antes de los 3 días post-infección. El incremento de la concentración observado para este animal fue superior al del resto de del grupo (Figura 77.B).

### 1.4.3. Proteína C-reactiva (CRP)

Los niveles de la CRP en sangre alcanzaron su valor máximo el día posterior a la infección, al incrementarse hasta once veces respecto al momento de la inoculación: el incremento más notable se observó en el cerdo nº 14, que murió 24 horas después (Figuras 78. A y B). Dos días después disminuyeron estos valores pero se mantuvieron tres veces por encima de los iniciales. El día 6 post-infección, la media del grupo se incrementó hasta seis veces con respecto a la inicial, debido a que uno de los animales (cerdo nº 11) presentó una concentración muy elevada, superior a 0,1 mg/ml (Figura 78.B). Los niveles volvieron a reducirse el día 9 (la media de las concentraciones fue similar a la detectada a los 3 días post-infección), tónica que continuó el día 13 (Figuras 78. A y B). El análisis estadístico reveló la existencia de diferencias significativas entre el día de la infección y los días 1 y 6 ( $p < 0,0001$  y  $p = 0,0032$ ,

respectivamente). También se observaron entre el día 1 y todos los posteriores al mismo ( $p = 0,0001$ , en todos los casos), así como entre los días 6 y 13 ( $p = 0,0092$ ).

Figura 78. Evolución de los niveles de CRP después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo V. **A)** Media de los valores. **B)** Valores individuales

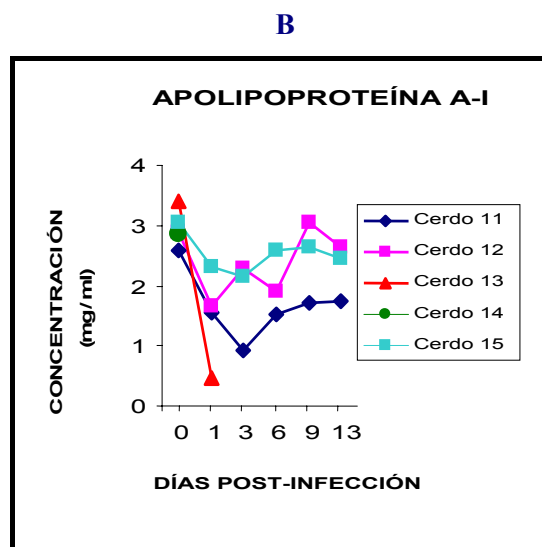
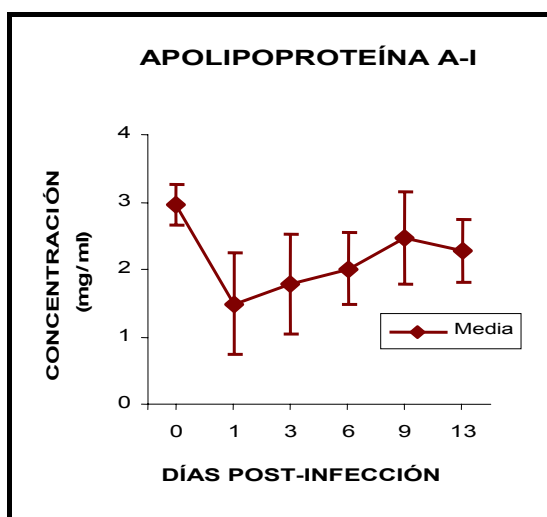




#### 1.4.4. Apolipoproteína A-I

Los niveles de esta proteína disminuyeron de forma significativa en los días 1, 3 y 6 post-infección ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0016$  y  $p = 0,0032$  respectivamente) (Figura 79 A.). Las concentraciones más bajas se observaron el día 1, en todos los cerdos (especialmente en el n° 13, que murió 24 horas después), menos en el cerdo n° 11 que presentó el valor mínimo a los 3 días (Figura 79 B.). Los niveles de esta proteína se recuperaron progresivamente durante los días 9 y 13, por lo que no se observaron diferencias significativas en relación con el día inicial, pero sí con el día 1 ( $p = 0,0091$  y  $p_s = 0,034$ , respectivamente) (Figura 79.A y B).

Figura 79. Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo V. **A)** Media de los valores. **B)** Valores individuales



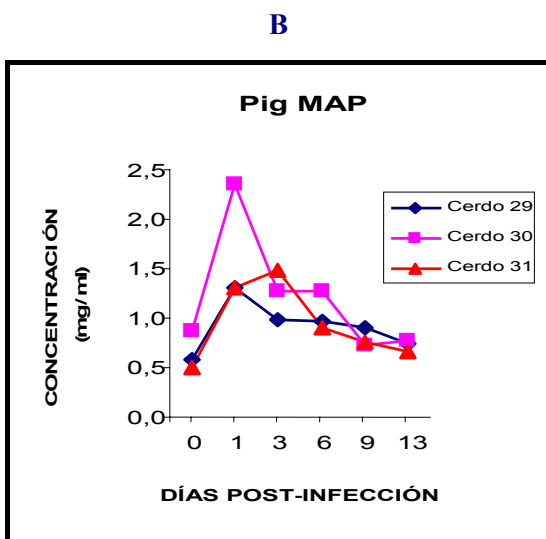
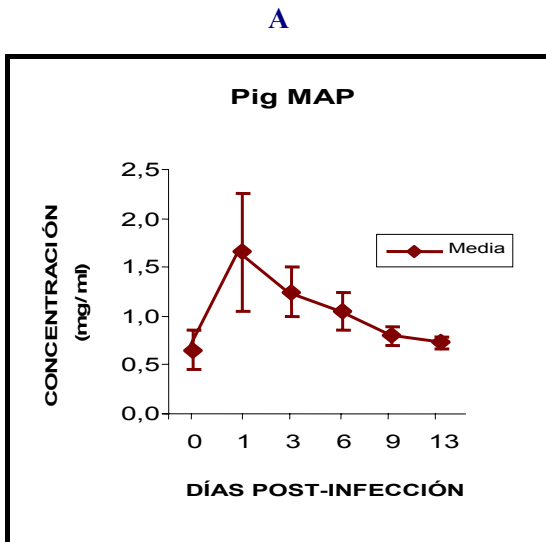
## 2. Cerdos criados de forma convencional

### 2.1. Inmunización con la bacteria comercial A y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo VI)

#### 2.1.1. Pig MAP

La media de las concentraciones de la pig MAP aumentó tras la infección, alcanzando un máximo a las 24 horas, aproximadamente dos veces y media superior al del inicio. El incremento más notable se produjo en el cerdo n° 30. A partir de ese día, fue disminuyendo progresivamente, con la excepción del cerdo n° 31, en el que volvió a aumentar a los 3 días y no empezó a descender hasta los 6 días. A los 13 días los valores obtenidos fueron similares a los del día inicial. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los días de estudio (Figura 80. A y B).

Figura 80. Evolución de los niveles de pig MAP después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VI. **A)** Media de los valores. **B)** Valores individuales

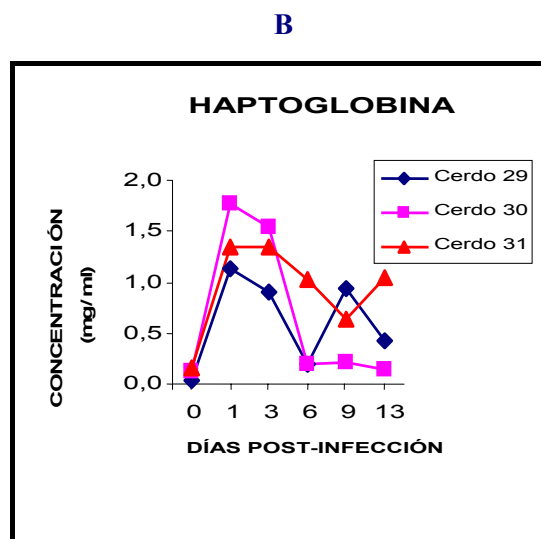
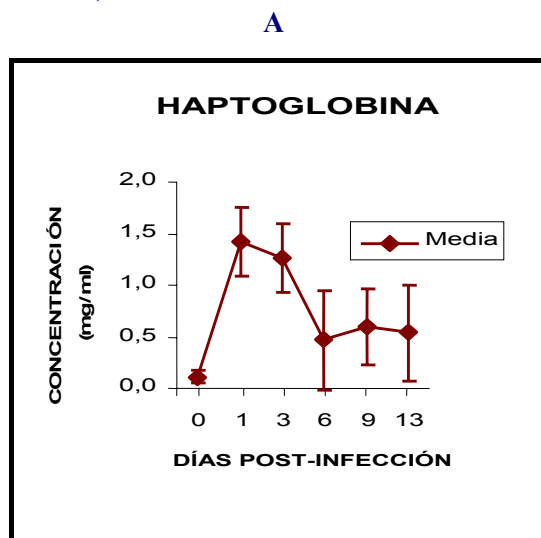


### 2.1.2. Haptoglobina

La concentración de haptoglobina aumentó después de la infección, de forma especialmente notable los días 1 y 3, con valores entre once y doce veces superiores al inicial. El mayor aumento se produjo en el cerco n° 30 (Figura 81.B). A partir de ese momento se observó un descenso de los niveles medios de esta proteína, con pequeñas fluctuaciones, pero manteniendo unos valores

que aproximadamente quintuplicaban las mediciones del día de la infección (Figura 81 A). No obstante, aunque los valores medios descendían después del día 3 post-infección, se volvieron a observar incrementos en la concentración de la proteína a los 9 y 13, días en los cerdos n° 29 y 31, respectivamente (Figura 81 B). El análisis estadístico únicamente reveló diferencias significativas entre los días 1 y 3 y el día de la infección ( $p = 0,0023$  y  $p = 0,0047$ , respectivamente).

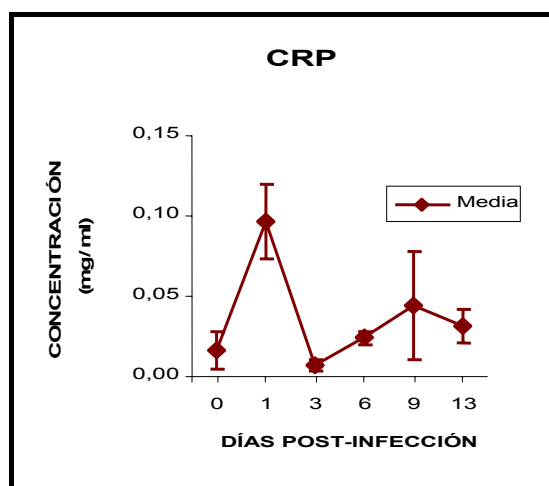
Figura 81. Evolución de los niveles de haptoglobina después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VI. **A)** Valores medios. **B)** Valores individuales



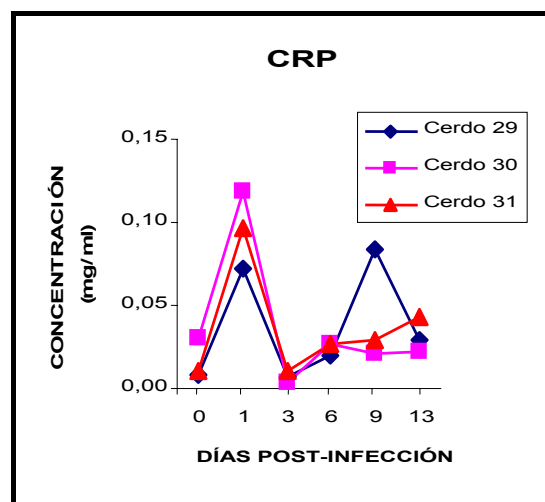
### 2.1.3 Proteína C- reactiva (CRP)

La CRP presentó un incremento importante pero poco duradero tras la infección, de tal forma que la concentración del día 0 sólo reveló diferencias significativas con la del día 1 ( $p < 0,0001$ ), que presentaba una concentración seis veces superior a la inicial. En los días restantes, las concentraciones descendieron hasta presentar valores similares a los del día inicial en los tres cerdos, para aumentar el día 6. En el día 9, aunque la media del grupo se incrementó con respecto al día 6, la respuesta no fue igual en los tres animales: mientras el cerdo nº 29 experimentó un aumento considerable en la concentración de CRP, en los cerdos nº 30 y 31 las concentraciones apenas presentaron modificaciones reseñables. Se encontraron diferencias significativas entre el día 1 y los días 3, 6, 9 y 13 ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0001$ ,  $p = 0,0047$  y  $p = 0,0005$ , respectivamente) (Figuras 82. A y B).

Figura 82. Evolución de los niveles de CRP después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VI. **A)** Media de los valores. **B)** Valores individuales



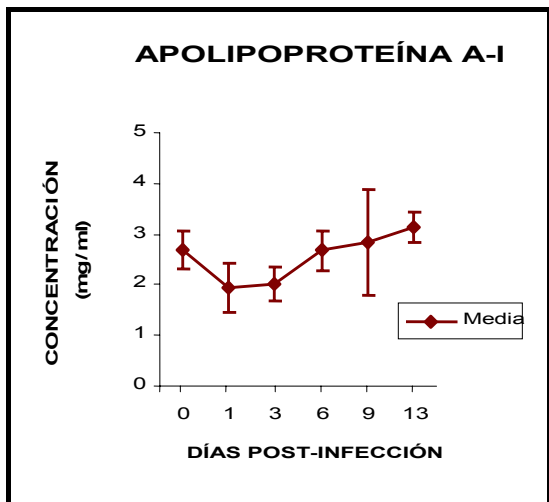
**B**



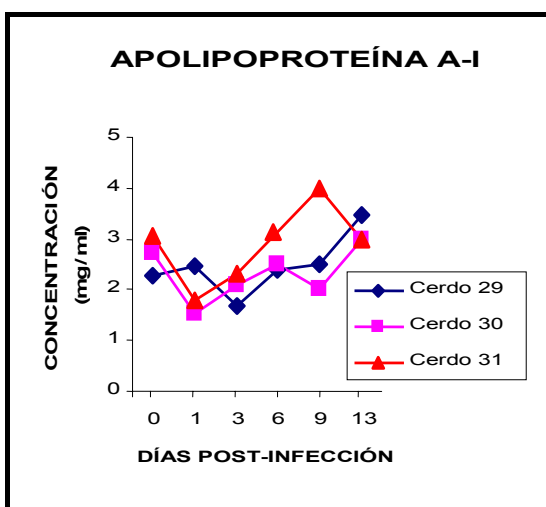
### 2.1.4. Apolipoproteína A-I

En las Figuras 83 A y B, se observa un ligero descenso de la concentración media de apolipoproteína A-I en sangre, en los días 1 y 3 post-infección. En los cerdos nº 30 y nº 31 este descenso se observó principalmente en el día 1, mientras que en el cerdo nº 29 no se empezó a producir hasta el día 3. Durante los días siguientes, la media de la concentración continuó en ascenso progresivo, con valores que llegaron a ser superiores a los iniciales en el día 13, aunque en el cerdo nº 30 se observó un descenso temporal a los 9 días después de la infección y en el cerdo nº 31, a los 13 días (Figura 83.B). El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los días 1 y 3, con respecto a los días 9 ( $p = 0,0224$  y  $p = 0,0399$ , respectivamente) y 13 ( $p = 0,0027$  y  $p = 0,0054$ , respectivamente).

Figura 83. Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VI. **A)** Media de los valores. **B)** Valores individuales **A**



**B**



## 2.2. Prueba de inmunización con la bacterina comercial B y posterior infección con una DL de *H. parasuis* (grupo VII)

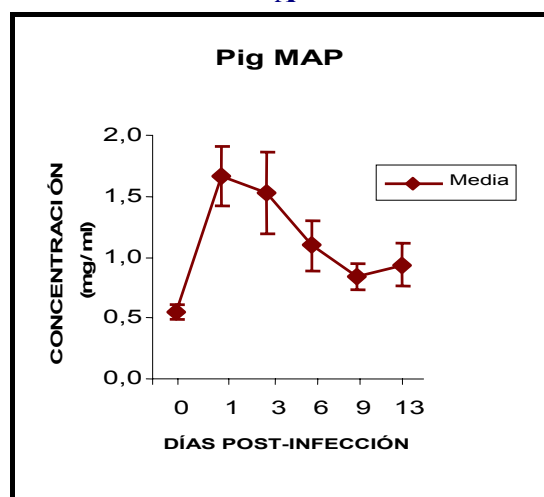
### 2.2.1. Pig MAP

En respuesta al desafío, la media de las concentraciones de pig MAP en sangre se triplicó a las 24 horas del mismo, antes de

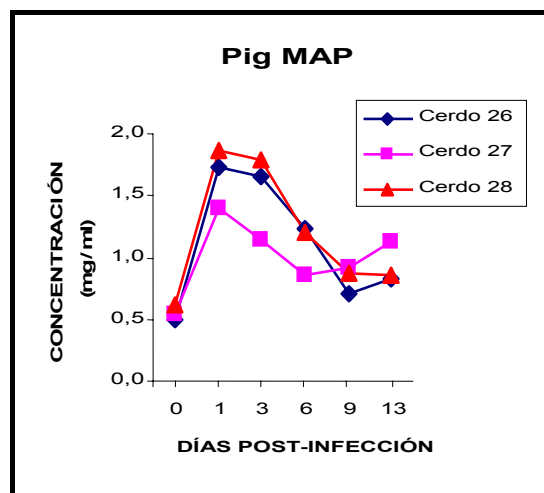
comenzar un descenso, que se prolongó hasta el día 9, para recuperarse el día 13, cuando casi se duplicó la medición del día inicial. El cerdo n° 27, a las 24 horas de la infección, presentó un incremento menor que el observado en los otros dos cerdos del grupo, aunque en el día 13 alcanzó valores más elevados que los otros dos animales. No se pudieron demostrar diferencias significativas entre ninguno de los días comparados (Figuras 84. A y B).

Figura 84. Evolución de los niveles de pig MAP después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VII. **A)** Valores medios. **B)** Valores individuales

**A**



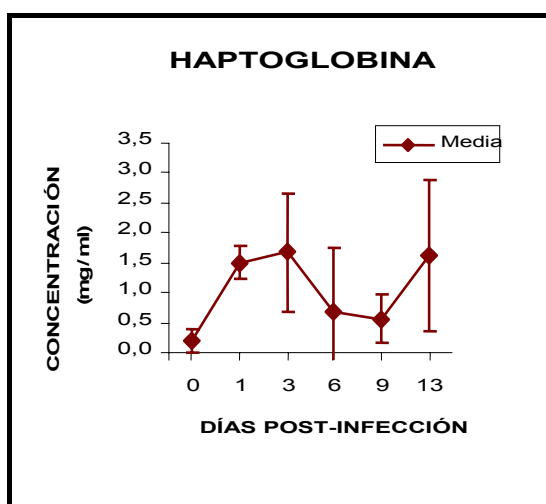
**B**



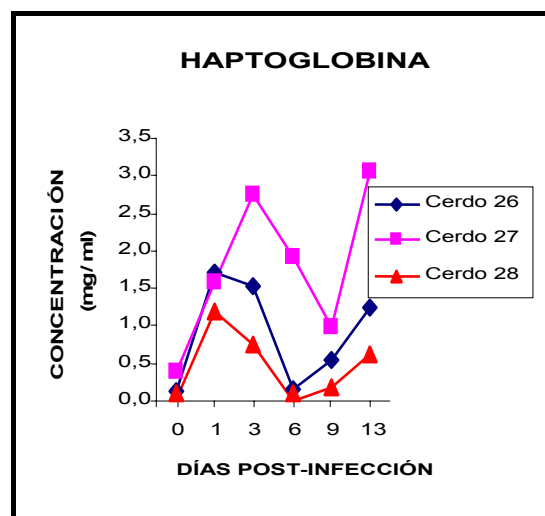
### 2.2.2. Haptoglobina

Las Figuras 85 A y B muestran cómo los niveles de haptoglobina se incrementaron durante los días 1 y 3 post-infección, hasta alcanzar valores nueve veces superiores a los iniciales. Durante los días 6 y 9, la media de las concentraciones disminuyó, pero el día 13 de nuevo remontó y obtuvo valores similares a los observados en los días 1 y 3. Este aumento se debió principalmente a que en uno de los animales (cerdo nº 27) se detectó una concentración de haptoglobina muy elevada en el día 13; además, en este animal, a diferencia de los otros dos cerdos, los valores del día 3 post-infección fueron superiores a los del día 1 (Figura 85 B). El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre el día inicial y los días 1, 3 y 13 ( $p = 0,0256$ ,  $p = 0,0021$  y  $p = 0,0032$ , respectivamente). También se encontraron entre el día 6 y los días 3 ( $p = 0,0256$ ) y 13 ( $p = 0,0365$ ).

Figura 85. Evolución de los niveles de haptoglobina después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VII **A)** Valores medios. **B)** Valores individuales



### B

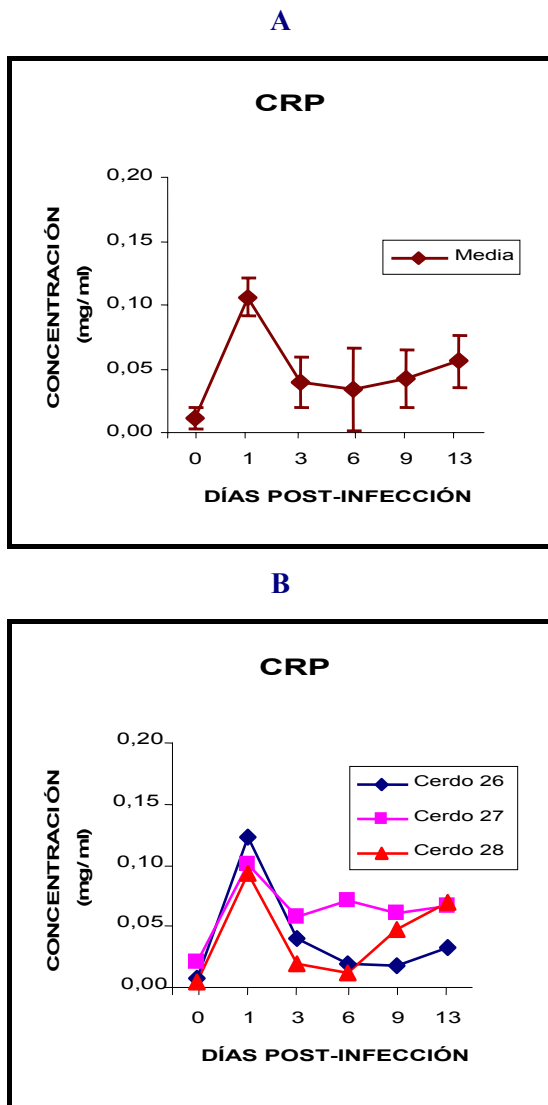


### 2.2.3. Proteína C-reactiva (CRP)

La respuesta de la CRP a la infección se puso de manifiesto al día siguiente al aumentar sus niveles en sangre hasta diez veces. A partir de este momento, se produjo un rápido descenso de su concentración de la misma, pero entre los días 3 y 13 los valores tendieron a recuperarse con niveles entre 3 y 5 veces superiores a los iniciales. En el cerdo nº 28, la concentración de CRP volvió a aumentar los días 9 y 13, y en el cerdo nº 26, el día 13 (Figura 86 A y B)

Se encontraron diferencias significativas el día 1 y los días 0, 3, 6, 9 y 13 ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0003$ ,  $p = 0,0001$ ,  $p = 0,0005$  y  $p = 0,0062$  respectivamente); y entre el día inicial y el día 13 ( $p = 0,0062$ ) (figuras 81 A y B).

Figura 86. Evolución de los niveles de CRP después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VII. **A)** Media de los valores. **B)** Valores individuales

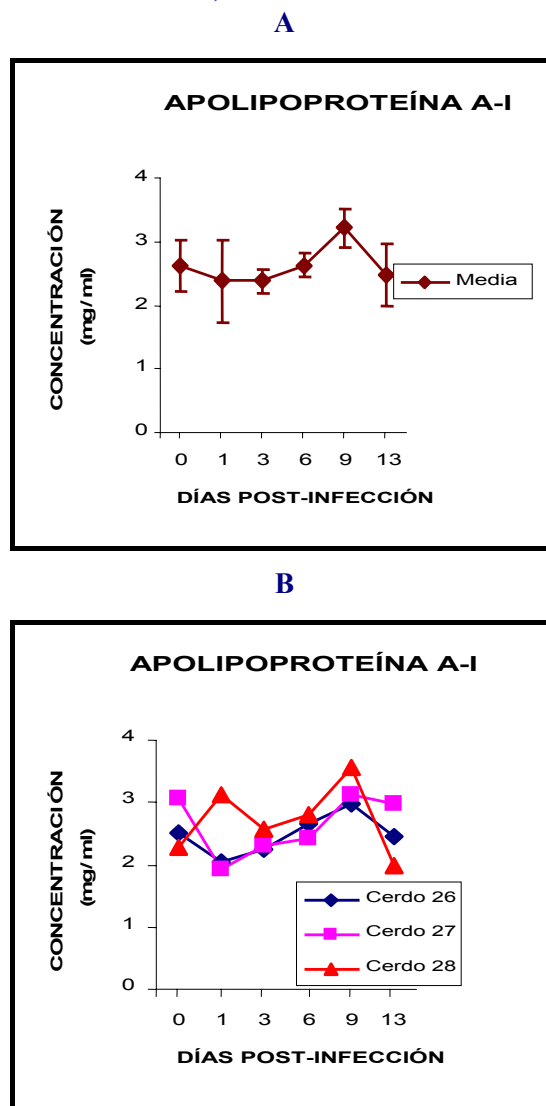


#### 2.2.4. Apolipoproteína A-I

En respuesta a la infección se produjeron escasas variaciones en la concentración de apolipoproteína, con un registro máximo a los 9 días. En los cerdos nº 26 y 27 se observó cómo la concentración de la proteína disminuía a las 24 horas post-infección, y en el nº 28 a los 3 días. En los días 6 y 9, las concentraciones de los tres animales aumentaron y en el día 13 descendieron (Figuras 87 A y.B). En cualquier

caso, el análisis estadístico reveló que no existían diferencias significativas entre ninguno de los días del estudio

Fig 87. Evolución de los niveles de apolipoproteína A-I después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Grupo VII. **A)** Valores medios. **B)** Valores individuales



### 3. Comparación entre los grupos del estudio.

En las tablas 73-76 se recoge un resumen comparativo de los resultados obtenidos en cada grupo.

Tabla 73 Resumen de la respuesta de la pig MAP en los distintos grupos del estudio.  $\mu$  Media de la concentración de Pig-MAP. **SD** Desviación estándar.  $\uparrow$  Incremento,  $\downarrow$  Descenso

	Día 0 (D0)	Día 1 (D1)	Día 3 (D3)	Día 6 (D6)	Día 9 (D9)	D13 (D13)
<b>G-I</b>	$\mu = 0,64$ SD = 0,11	$\mu = 9$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 25$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 25$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0		
<b>G-II</b>	$\mu = 0,66$ SD = 0,23	$\mu = 4$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0, D6, D9 y D13	$\mu = 3$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 1,6$ x D0 Sin diferencia significativas	$\mu = 1,2$ x D0 Sin diferencia significativas	Idem D9
<b>G-III</b>	$\mu = 0,62$ SD = 0,11	$\mu = 7$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0, D6, D9 y D13	$\mu = 5,4$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0, D6, D9 y D13	$\mu = 3$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 2$ x D0 Sin diferencia significativas	$\mu = 1,5$ x D0 Sin diferencia significativas
<b>GV</b>	$\mu = 0,61$ SD = 0,21	$\mu = 5$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 3$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 6$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0, D1 y D3	$\mu = 3$ x D0 Sin diferencia significativas	Idem D9
<b>GVI</b>	$\mu = 0,65$ SD = 0,20	$\mu = 2,5$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 2$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 1,6$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu =$ DO Sin diferencias significativas	Idem D9
<b>GVII</b>	$\mu = 0,55$ SD = 0,06	$\mu = 3$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 3$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 2$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 1,5$ x D0 Sin diferencias significativas	Idem D9

Tabla 74. Resumen de la respuesta de la haptoglobina en los distintos grupos del estudio.  $\mu$  Media de la concentración de haptoglobina. **SD** Desviación estándar.  $\uparrow$  Incremento,  $\downarrow$  Descenso.

	Día 0 (D0)	Día 1 (D1)	Día 3 (D3)	Día 6 (D6)	Día 9 (D9)	D13 (D13)
<b>G-I</b>	$\mu = 1,45$ SD = 0,77	$\mu = 2 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 4 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 4,2 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0		
<b>G-II</b>	$\mu = 0,24$ SD = 0,3	$\mu = 8 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0, D6, D9 y D13	$\mu = 5 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 2 \times D0$ Sin diferencias significativas	$\mu = 2 \times D0$ Sin diferencias significativas	$\mu = 3 \times D0$ Sin diferencias significativas
<b>G-III</b>	$\mu = 0,24$ SD = 0,08	$\mu = 12 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0 y D13	$\mu = 8 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 5 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 5,5 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 2,4 \times D0$ Sin diferencia significativas
<b>GV</b>	$\mu = 0,77$ SD = 0,48	$\mu = 3,6 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 3 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 3,4 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 2,2 \times D0$ Sin diferencia significativas	$\mu = 2 \times D0$ Sin diferencias significativas
<b>GV I</b>	$\mu = 0,11$ SD = 0,06	$\mu = 13 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 12 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 4,4 \times D0$ Sin diferencias significativas	$\mu = 5,6 \times D0$ Sin diferencias significativas	$\mu = 5 \times D0$ Sin diferencias significativas
<b>GVII</b>	$\mu = 0,18$ SD = 0,19	$\mu = 8 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 9 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0 y D6	$\mu = 4 \times D0$ Sin diferencias significativas	$\mu = 3 \times D0$ Sin diferencias significativas	$\mu = 9 \times D0$ $\uparrow$ significativo respecto D0 y D6



Tabla 75. Resumen de la respuesta de la CRP en los distintos grupos del estudio.  $\mu$  Media de la concentración de CRP. **SD** Desviación estándar.  $\uparrow$  Incremento,  $\downarrow$  Descenso.

	Día 0 (D0)	Día 1 (D1)	Día 3 (D3)	Día 6 (D6)	Día 9 (D9)	D13 (D13)
<b>G-I</b>	$\mu = 0,022$ SD = 0,01	$\mu = 7,4$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 6,6$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0	$\mu = 8,5$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0		
<b>G-II</b>	$\mu = 0,005$ SD = 0,003	$\mu = 15$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0, D3, D6, D9 y D13	$\mu = 3,3$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 3$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 3,7$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 2$ x D0 Sin diferencias significativas
<b>G-III</b>	$\mu = 0,010$ SD = 0,003	$\mu = 11,6$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0, D3, D6, D9 y D13	$\mu = 2$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 1,3$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 1,6$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = D0$
<b>GV</b>	$\mu = 0,008$ SD = 0,002	$\mu = 11$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0, D3, D6, D9 y D13	$\mu = 3,7$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 7,3$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0 y D13	$\mu = 3,3$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 1,5$ x D0 Sin diferencias significativas
<b>GVI</b>	$\mu = 0,016$ SD = 0,011	$\mu = 6$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0, D3, D6, D9 y D13	$\mu \downarrow D0$ Sin diferencias significativas	$\mu = 1,5$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 3$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 2$ x D0 Sin diferencias significativas
<b>GVII</b>	$\mu = 0,011$ SD = 0,008	$\mu = 9$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0, D3, D6, D9 y D13	$\mu = 3,4$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 3$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 4$ x D0 Sin diferencias significativas	$\mu = 5$ x D0 $\uparrow$ significativo respecto D0

Tabla 76. Resumen de la respuesta de la apolipoproteína A-I en los distintos grupos del estudio.  $\mu$  Media de la concentración de Apolipoproteína A-I. SD Desviación estándar.  $\uparrow$  Incremento,  $\downarrow$  Descenso.

	Día 0 (D0)	Día 1 (D1)	Día 3 (D3)	Día 6 (D6)	Día 9 (D9)	D13 (D13)
<b>G-I</b>	$\mu = 3,5$ SD = 0,5	$\mu = D0/4,3$ $\downarrow$ significativo respecto D0	$\mu = D0/6,3$ $\downarrow$ significativo respecto D0	$\mu = D0/7$ $\downarrow$ significativo respecto D0		
<b>G-II</b>	$\mu = 2,5$ SD = 0,2	$\mu = D0/2$ $\downarrow$ significativo respecto D0, D3, D6 y D9	$\mu = D0$	$\mu = D0/1,3$ Sin diferencias significativas	$\mu = D0$	$\mu = D0/1,4$ $\downarrow$ significativo respecto D0
<b>G-III</b>	$\mu = 2,4$ SD = 0,7	$\mu = D0/3$ $\downarrow$ significativo respecto D0, D3, D6, D9 y D13	$\mu = D0/1,3$ Sin diferencias significativas	$\mu = D0$	$\mu = D0$	$\mu = D0$
<b>GV</b>	$\mu = 3,0$ SD = 0,3	$\mu = D0/2$ $\downarrow$ significativo respecto D0, D9 y D13	$\mu = D0/1,7$ $\downarrow$ significativo respecto D0	$\mu = D0/1,4$ $\downarrow$ significativo respecto D0	$\mu = D0$	$\mu = D0$
<b>GV-I</b>	$\mu = 2,7$ SD = 0,4	$\mu = D0/1,4$ $\downarrow$ significativo respecto D9 y D13	$\mu = D0/1,3$ $\downarrow$ significativo respecto D9 y D13	$\mu = D0$	$\mu = D0$	$\mu = D0$
<b>GV-II</b>	$\mu = 2,6$ SD = 0,4	$\mu = D0$	$\mu = D0$	$\mu = D0$	$\mu = D0$	$\mu = D0$

El análisis estadístico de los resultados sólo permitió realizar comparaciones entre los grupos II, III, V, VI y VII, puesto que los animales del grupo I (infección sin inmunización previa) murieron antes del final del estudio, por lo que no se pudo disponer de las concentraciones de estas proteínas en los días 9 y 13. Los valores de p, en los casos en los que se encontraron diferencias significativas, se recogen en las tablas 29, 30, 31 y 32.

### 3.1. Pig MAP

No se obtuvieron diferencias significativas entre los tres grupos inmunizados con las bacterinas (grupos II, VI y VII). El grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs, sólo las presentó con los grupos II, VI, y VII. Finalmente, los resultados del grupo V difirieron de forma significativa de los de los grupos VI, VII (cerdos criados de forma natural) y II, constituido por cerdos privados de calostro inmunizados con una bacterina (Tabla 77).

Tabla 77 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar las concentraciones de la pig MAP en los diferentes grupos experimentales

Pig MAP		
Grupos		Valor de p
II	III	p = 0,0481
II	V	p = 0,0028
III	VI	p = 0,0079
III	VII	p = 0,0146
V	VI	p = 0,0004
V	VII	p = 0,0008

### 3.2. Haptoglobina

Al igual que en el caso de la Pig MAP, no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de animales inmunizados con bacterinas. El grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal, presentó en cambio diferencias con los grupos, II, III, VI y VII. El grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs, no reveló diferencias con el grupo VI, inmunizado con una de las bacterinas comerciales, pero sí con el resto de los grupos II, V y VII (Tabla 78).

Tabla 78 Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar las concentraciones de haptoglobina en los diferentes grupos experimentales

Haptoglobina		
Grupos		Valor de p
II	III	p = 0,0035
II	V	p < 0,0001
III	V	p = 0,0216
III	VII	p = 0,0377
V	VI	p < 0,0001
V	VII	p < 0,0001

### 3.3. Proteína C-reactiva (CRP)

No se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales criados de forma natural, pero el grupo inmunizado con la bacterina comercial B (grupo VII), las presentó con los grupos II y III (cerdos privados de calostro e inmunizados con una bacterina o una vacuna con OMPs, respectivamente). Por otro lado, el grupo V, inmunizado con una dosis subletal de la

bacteria, sólo reveló diferencias con el grupo II (Tabla 79).

Tabla 79. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar las concentraciones de CRP en los diferentes grupos experimentales

CRP		
Grupos		Valor de p
II	V	p = 0,0046
II	VII	p = 0,0004
III	VII	p = 0,0455

### 3.4. Apolipoproteína A-I

No se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de la apolipoproteína A-I entre los grupos de cerdos criados de forma natural, ni entre los de cerdos privados de calostro. Por el contrario, se produjeron al comparar los grupos de cerdos criados de forma natural con los privados de

calostro. Así las concentraciones de esta proteína en los grupos VI y VII, criados de forma natural, difirieron de forma significativa con los grupos II, III y V inmunizados con una bacterina, con una vacuna con OMPs y por exposición a una dosis subletal, respectivamente (Tabla 80)

Tabla 80. Diferencias estadísticamente significativas obtenidas al analizar las concentraciones de apolipoproteína A-I en los diferentes grupos experimentales

Apolipoproteína A-I		
Grupos		Valor de p
II	VI	p < 0,0001
II	VII	p < 0,0001
III	VI	p = 0,0003
III	VII	p = 0,0009
V	VI	p = 0,0085
V	VII	p = 0,0025

# Capítulo VII: Respuesta mediada por citocinas en infecciones de cerdos con *Haemophilus parasuis*

## 1. Pulmón

### 1.1 IL-1

1.1.1. Comparación entre grupos

1.1.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

### 1.2. IL-4

1.2.1. Comparación entre grupos

1.2.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

### 1.3. IL-6

1.3.1. Comparación entre grupos

1.3.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

### 1.4. IL-10

1.4.1. Comparación entre grupos

1.4.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

### 1.5. TNF- $\alpha$

1.5.1. Comparación entre grupos

1.5.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

### 1.6. IFN- $\gamma$

1.5.1. Comparación entre grupos

1.5.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

## 2. Bazo

### 2.1 IL-1

2.1.1. Comparación entre grupos

2.1.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

### 2.2. IL-4

2.2.1. Comparación entre grupos

2.2.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

### 2.3. IL-6

2.3.1. Comparación entre grupos

2.3.2. Comparación entre loscerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

### 2.4. IL-10

2.4.1. Comparación entre grupos

2.4.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

### 2.5. TNF- $\alpha$

2.5.1. Comparación entre grupos

2.5.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

### 2.6. IFN- $\gamma$

2.5.1. Comparación entre grupos

2.5.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

### **3. Ganglio**

#### 3.1 IL-1

3.1.1. Comparación entre grupos

3.1.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

#### 3.2. IL-4

3.2.1. Comparación entre grupos

3.2.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

#### 3.3. IL-6

3.3.1. Comparación entre grupos

3.3.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

#### 3.4. IL-10

3.4.1. Comparación entre grupos

3.4.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

#### 3.5. TNF- $\alpha$

3.5.1. Comparación entre grupos

3.5.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

#### 3.6. IFN- $\gamma$

1.5.1. Comparación entre grupos

1.5.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

### **4. Cerebro**

#### 4.1 IL-1

4.1.1. Comparación entre grupos

4.1.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

#### 4.2. IL-4

4.2.1. Comparación entre grupos

4.2.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

#### 4.3. IL-6

4.3.1. Comparación entre grupos

4.3.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

#### 4.4. IL-10

4.4.1. Comparación entre grupos

4.4.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

#### 4.5. TNF- $\alpha$

4.5.1. Comparación entre grupos

4.5.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

#### 4.6. IFN- $\gamma$

4.5.1. Comparación entre grupos

4.5.2. Comparación entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

Se estudio la expresión de citocinas en el pulmón, bazo, cerebro y ganglios adyacentes a la tráquea de los grupos de animales descritos en el capítulo III.

### 1. Pulmón

En las Tablas 81-87 se recogen los resultados de la cuantificación relativa de la expresión de las citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en el pulmón, y en la Tabla 109, al final de este apartado, un

resumen con el estudio comparativo realizado entre los cerdos que murieron como consecuencia de la infección, y los que sobrevivieron. En el grupo III, el cerdo n° 7 apareció postrado con hipertermia durante los días previos a la infección, por lo que para evitar que la presencia de alguna patología alterase la expresión de las citocinas en las muestras de este animal, se excluyó del estudio, tanto en este órgano como en los que serán tratados posteriormente

Tabla 81. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo I de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
21	0,640	0	0,252	0,407	0,407	0,331
22	0,426	0	5,893	0,483	0,352	0,335
24	0,353	0	0,012	0,240	0,125	0,026
25	0,442	0	0	0	0,389	0,679

Tabla 82 Resultados de la cuantificación relativa en el grupo II de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
1	0,343	4 $10^{-5}$	4 $10^{-5}$	0,430	0,751	0,182
2	1,734	0	0	0,602	0,485	0,407
3	0,689	0,065	0	0,361	0,252	0,876
4	0,627	0,016	0	0,099	1,059	0,502
5	0,667	2,26 $10^{-5}$	0,006	0,211	1,634	1,315

## Resultados

Tabla 83. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo III de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL1	IL4	IL6	IL10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
6	0,973	0	0,041	0,134	0,654	0,326
8	2,074	0,053	0,004	0,161	1,048	0,371
9	1,095	0	0,101	3,949	0,1751	0,294
10	0,473	0,004	2,074	0,387	0,214	0,459

Tabla 84. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo IV de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
16	0,211	0	0,159	0,202	0,002	0
17	0,091	0	$2,11 \cdot 10^{-6}$	0	0,235	0,279
18	0,002	0	$8,42 \cdot 10^{-5}$	0	0	0
19	0,987	0	0	0,478	0,091	0,102
20	0,146	0	0,033	0,350	0,928	0,015

Tabla 85. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo V de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
11	0,939	0,001	0,200	0	0,956	0,612
12	0,582	0,038	0,119	0,482	1,78	0,490
13	0,200	0	0,108	0,163	0	0
14	0,042	0	0,275	0	0,032	0,279
15	0,258	0,037	0,098	0,373	0,802	0,804



Tabla 86. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo VI de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
29	0,123	0,014	0	1,202	0,486	0,229
30	0,126	0,035	0,184	1,975	0,177	0,117
31	0,114	0,071	4,52 10 <sup>-07</sup>	1,108	0,224	0,294

Tabla 87. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo VII de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
26	1,174	0,010	0,142	0,168	0,680	0,549
27	0,155	0	0	0,120	0,327	0,169
28	0,160	0,016	0	0,163	0,359	0,301

## 1.1. IL-1

### 1.1.1. Comparación entre grupos

En el grupo I, los cuatro animales presentaron valores muy similares, aunque más elevados en los dos cerdos que murieron a las 24 horas post-infección (Tabla 81). En el grupo II, los cinco animales expresaron esta citocina en pulmón: el valor más bajo fue el correspondiente al cerdo n° 1, y el cerdo n° 2 exhibió el mayor registro (Tabla 82). En el grupo III, tres de los cuatro animales (los cerdos n° 6 y n° 9, que murieron tras la infección, y el cerdo n° 8, que sobrevivió) presentaron valores similares y más elevados que en el cerdo restante (Tabla 83). En el caso de los animales inmunizados con una vacuna recombinante, los resultados de la cuantificación fueron diversos: tres cerdos presentaron valores similares, mientras que los

dos restantes exhibieron una expresión muy variable (Tabla 84).

En el grupo V, el valor más bajo se observó en el animal que murió de forma inmediata, mientras que los más altos se encontraron en dos de los tres animales que sobrevivieron, los cerdos n° 11 y 12 (Tabla 85). Los resultados de la cuantificación fueron muy parecidos en todos los cerdos de los grupos VI y VII, menos en el n° 26, que presentó un valor superior (Tablas 86 y 87).

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos VI y VII. Pero sí entre el grupo VI y los grupos I ( $p = 0,0259$ ), II ( $p = 0,0377$ ) y III ( $p = 0,0259$ ).

Además también se obtuvieron entre el grupo III, que de forma general presentó los valores de expresión más altos, y los grupos I, IV y V ( $p = 0,0303$ ,  $p = 0,0331$  y  $p = 0,0331$ ,

## Resultados

respectivamente), así como entre los grupos I y IV ( $p = 0,0473$ ).

### 1.1.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *Haemophilus parasuis*.

No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

## 1.2. IL-4

### 1.2.1. Comparación entre grupos

En ninguno de los cerdos del grupo I se pudo detectar la expresión esta citocina en el pulmón (Tabla 81.). En lo referente al grupo II, observamos cómo el cerdo n° 2 no presentó una expresión detectable de la misma, que sí que se encontró en los cuatro animales restantes, con resultados superiores para los cerdos n° 3 y 4 (Tabla 82).

Los animales inmunizados con proteínas de membrana externa, que murieron tras infección, tampoco expresaron niveles detectables de esta citocina, al contrario que los dos cerdos supervivientes (n° 8 y n° 10) (Tabla 83). No se observó expresión de la IL-4, en ninguna de las muestras de pulmón procedentes de los animales inmunizados con una vacuna recombinante (Tabla 84).

En el grupo V, de nuevo se encontraron diferencias entre los cerdos que murieron y los que sobrevivieron a la infección: en los primeros no se pudo detectar la citocina pero sí en los segundos, con valores muy similares en los cerdos n° 12 y 15, superiores a los del cerdo

n° 11 (Tabla 85). Por lo que se refiere a los grupos VI y VII, inmunizados con bacterinas comerciales, se observó la expresión de esta citocina en todos los animales menos en el cerdo n° 27 (grupo VII). Además, en el caso del primer grupo los niveles de expresión fueron ligeramente más elevados (Tablas 86 y 87)

Se encontraron diferencias significativas entre los grupos I y IV con respecto a los grupos II ( $p = 0,0221$  y  $p = 0,0127$ ), VI ( $p = 0,0160$  y  $p = 0,0084$ ) y VII ( $p = 0,0255$  y  $p = 0,0395$ ).

### 1.2.2. Comparación entre los animales que sobrevivieron y los que murieron tras una infección con una DL de *H. parasuis*

Se observaron diferencias significativas entre ambos lotes ( $p = 0,0305$ ).

## 1.3. IL-6

### 1.3.1. Comparación entre grupos

En el grupo I, la expresión de esta citocina en pulmón varió según los animales. Así, mientras que en el cerdo n° 25 no se observó una expresión detectable, sí se encontró en los tres cerdos restantes con registros muy diferentes, inferiores en el cerdo que sobrevivió durante más tiempo a la infección (tabla 81). En el grupo II, no se encontraron niveles detectables de esta citocina, salvo en el cerdo n° 5 (Tabla 82). Por lo que se refiere al grupo III, los dos animales que murieron como consecuencia de la infección expresaron IL-6 en pulmón, mientras que sólo en uno de los cerdos que sobrevivió al

desafío se pudo detectar. Además, el resultado de la cuantificación en este último animal fue inferior (Tabla 83).

Sólo cuatro de los cinco animales inmunizados con la vacuna recombinante expresaron esta citocina, pero con niveles diferentes: los más elevados correspondieron al nº 16, por delante del nº 20, mientras que los menores aparecieron en los cerdos nº 17 y 18 (Tabla 84).

Todos los animales del grupo V expresaron la IL-6, con un valor máximo en el cerdo nº 14 que murió a las 24 horas post-infección, seguido por el nº 11 (Tabla 85). En el caso del grupo VI, se encontraron niveles detectables de esta citocina en dos de los tres animales, aunque con valores muy diferentes (Tabla 86). Por último, en el grupo VII, sólo se pudo detectar en uno de los animales (Tabla 87).

Únicamente se encontraron diferencias significativas entre el grupo V y los grupos II ( $p = 0,0159$ ) y III ( $p = 0,0187$ ).

### 1.3.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

Todos los cerdos que murieron como consecuencia de la infección (salvo un animal del grupo I y otro del grupo IV) expresaron IL-6 en el pulmón; en cambio, no se pudo detectar en muchos de los animales que sobrevivieron, por lo que se encontraron diferencias significativas entre ambos lotes ( $p = 0,0001$ ).

## 1.4. IL-10

### 1.4.1. Comparación entre grupos

En el grupo I, se observó la expresión de IL-10 en todos los animales excepto en el que murió a los 3 días (Tabla 81). Los cinco animales del grupo II expresaron esta citocina, con valores más bajos en el cerdo nº 5, mientras que los más elevados se encontraron en el nº 2 (Tabla 82). Con respecto al grupo III, se observó la expresión de IL-10 en todos los cerdos, pero fue muy superior en el cerdo nº 9, que murió a los tres días (Tabla 83). En el grupo inmunizado con una vacuna recombinante, sólo se comprobó la presencia de esta citocina en tres de los cinco animales (Tabla 84).

Con respecto al grupo V, no hubo expresión en el cerdo nº 14, que murió durante las 24 horas posteriores a la infección, ni tampoco en el cerdo nº 11, que sobrevivió. En cambio sí se observó en los otros tres animales, siendo mayor en los cerdos nº 12 y 15, que también sobrevivieron al desafío (Tabla 85). Los tres cerdos del grupo VI, inmunizados con la bacterina comercial A, presentaron valores que, de forma general, superaron a los observados en otros grupos (Tabla 86). Finalmente, en el grupo VII, de nuevo se observó la expresión en los tres cerdos que lo constituían, aunque con valores inferiores a los del grupo anterior (Tabla 87).

El análisis estadístico de los resultados puso de manifiesto que el grupo VI presentó diferencias significativas con los grupos I ( $p = 0,0259$ ), II ( $p = 0,0184$ ), IV ( $p = 0,0184$ ), V ( $p = 0,0179$ ) y VII ( $p = 0,0474$ ).

## Resultados

### 1.4.2. Comparación entre los animales que supervivieron y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

No se detectaron diferencias significativas entre ambos lotes.

## 1.5. TNF- $\alpha$

### 1.5.1. Comparación entre grupos

En el grupo I, se encontraron niveles detectables de esta citocina en todos los animales, aunque inferiores en el cerdo que sobrevivió a la infección durante más tiempo (Tabla 81). Los cinco animales inmunizados con la bacterina que contenía tres serotipos de *H. parasuis*, expresaron el TNF- $\alpha$ , con valores más bajos en el caso del cerdo nº 2 y especialmente en el nº 3 (Tabla 82). En el grupo III todos los animales presentaron niveles detectables de esta citocina, los más elevados se registraron en el cerdo nº 8 seguido por él nº 6 (Tabla 83). Los registros de los cinco animales inmunizados con una vacuna recombinante fueron muy diversos: no se encontró expresión en el cerdo nº 18, pero sí entre los cerdos restantes, con valores superiores en el nº 20 (Tabla 84).

En el grupo V, los cerdos que sobrevivieron a la infección expresaron esta citocina; sin embargo, no se pudo detectar en el nº 13, que murió a los tres días, pero sí en el caso del nº 15, que murió a las 24 horas, aunque con valores inferiores a los observados en los animales supervivientes (Tabla 85.). Tanto en el grupo VI como en el VII, se observó expresión en todos los animales (Tablas 86 y 87).

Sólo se encontraron diferencias significativas entre el grupo II, inmunizado con una bacterina, y el IV, inmunizado con una vacuna recombinante ( $p = 0,0364$ ).

### 1.5.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

El análisis estadístico puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los animales de ambos lotes ( $p = 0,0085$ ). De forma general, se observaron valores menos elevados en los cerdos que murieron tras la infección.

## 1.6. IFN- $\gamma$

### 1.6.1. Comparación entre grupos

Los cuatro animales del grupo I expresaron esta citocina, aunque con niveles inferiores en el cerdo nº 24 que, tras la infección, sobrevivió durante más tiempo (Tabla 81). En el grupo II, también se encontraron niveles detectables en todos los animales: el valor más bajo se observó en el cerdo nº 1 y los más elevados en los nº 3 y 5 (Tabla 82). Con respecto al grupo III, la expresión fue parecida en los cuatro cerdos que lo componían, aunque los que sobrevivieron a la infección presentaron valores ligeramente superiores (Tabla 83). Sólo en tres animales del grupo IV se pudo detectar esta citocina, y en uno de ellos el nivel de expresión fue notablemente inferior (Tabla 84).

En el grupo inmunizado con una dosis subletal no hubo expresión en el animal que murió a los tres días, a diferencia del resto. Los

resultados de la cuantificación fueron superiores en los tres cerdos que sobrevivieron a la infección (Tabla 85). Finalmente, todos los cerdos de los grupos VI y VII presentaron niveles detectables de esta citocina en pulmón (Tablas 86 y 87).

Solo se detectaron diferencias significativas entre el grupo IV, inmunizado con una vacuna recombinante, y los grupos I ( $p = 0,0487$ ), II ( $p = 0,0233$ ), III ( $p = 0,0238$ ) y VII ( $p = 0,0400$ ).

### 1.6.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

El análisis estadístico puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los animales de ambos lotes ( $p = 0,0161$ ). Salvo por alguna excepción, los valores resultaron menores en los cerdos que murieron.

## 2. Bazo

En las Tablas 88-94 se recogen los resultados de la cuantificación relativa de la expresión de las citocinas.

Tabla 88. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo I de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
21	2,723	0	0	0,092	0	0,456
22	0,344	0	0,037	0,194	0,089	0,319
24	0,220	0	0,042	0,139	0,354	0,105
25	0,367	0	0,773	0,197	0,470	2,395

Tabla 89. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo II de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
1	0,153	0,157	0,529	1,117	1,234	0,977
2	0,090	0,007	0	0,315	0,801	1,071
3	0,165	0,044	0	0,325	0,470	1,297
4	0,277	0,013	0	0,517	0,406	0,395
5	0,657	0,002	0,0582	0,299	0,564	1,052

## Resultados

Tabla 90. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo III de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo nº	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
6	1,151	0	0,225	0,251	0	0,120
8	0,379	0,066	0,050	0,559	0,315	0,341
9	1,107	0	0	0,457	1,419	0,270
10	0,339	0,008	0,084	0,302	0,300	0,193

Tabla 91. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo IV de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo nº	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
16	0,208	0	0	0,825	0	1,033
17	0,234	0	0	0,200	0	0,969
18	0,246	0	0,058	0,133	0	1,215
19	0,449	0	0,043	0,122	0	0,082
20	1,006	0	0,003	0,585	0	1,910

Tabla 92 Resultados de la cuantificación relativa en el grupo V de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo nº	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
11	0,817	0	0	0,116	0,563	0,309
12	0,525	0,047	0	0,396	0,230	0,715
13	0,638	0	0,0357	0,334	0,255	0,375
14	0,580	0	0	0,358	0,232	0,348
15	0,385	0	0	0,540	0,261	0,115

Tabla 93. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo VI de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
29	0,134	0,071	0,107	0,588	0,763	0,329
30	0,0186	0,051	0,051	0,222	0,944	0,147
31	0,0985	0,024	0,069	0,261	0,522	0,472

Tabla 94. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo VII de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
26	0,131	0,155	0,153	0,463	0,620	0,259
27	0,257	0,091	0,308	0,626	0,161	0,372
28	0,283	0	0,025	0,744	0,438	0,480

## 2.1. IL-1

### 2.1.1. Comparación entre grupos

Se observó la expresión de IL-1 en el bazo de todos los cerdos del grupo I. El valor más bajo se encontró en el animal que murió a los 6 días y el más elevado, en uno de los dos animales que fallecieron a las 24 horas (Tabla 88). En el grupo II, también se encontraron niveles detectables de IL-1 en sus cinco cerdos. Los valores más altos se observaron en el cerdo n° 5 y los más bajos, en el n° 2 (Tabla 89). Con respecto al grupo III, los niveles de expresión más elevados se encontraron en los dos cerdos que murieron tras la infección (Tabla 90). Todos los animales inmunizados con una vacuna recombinante presentaron una expresión similar de IL-1 salvo el cerdo n° 20, con un registro claramente superior (Tabla 91).

Todos los cerdos del grupo V, presentaron niveles detectables de esta citocina en el bazo. El valor más elevado se encontró en el cerdo n° 11, uno de los tres cerdos supervivientes; en cambio, la cuantificación en los otros dos animales supervivientes resultó menor, con registros incluso inferiores a los observados en los cerdos que murieron tras la infección (Tabla 92). En los dos grupos de cerdos convencionales se observó la expresión de la IL-1 en el bazo, aunque en el caso del grupo VI, los niveles fueron más bajos (Tablas 93 y 94).

El grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs presentó diferencias significativas con los tres grupos de cerdos inmunizados con bacterinas: el grupo II ( $p = 0,0331$ ), el VI ( $p =$

0,0479) y el VII ( $p = 0,0259$ ). De igual forma, el grupo V, inmunizado por exposición con una dosis subletal, también las reveló respecto a esos mismos grupos: II ( $p = 0,0473$ ), VI ( $p = 0,0377$ ) y VII ( $p = 0,0377$ ). Finalmente, también se encontraron entre el grupo VI y los grupos I ( $p = 0,0489$ ) y IV ( $p = 0,0377$ ).

### 2.1.2. Comparación entre los supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

En análisis estadístico puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre ambos lotes ( $p = 0,0175$ ).

## 2.2. IL-4

### 2.2.1. Comparación entre grupos

No se detectaron niveles cuantificables de la IL-4 en el bazo de ninguno de los animales del grupo I (Tabla 88). En cambio, sí se observaron en el grupo II, especialmente en el cerdo nº 1, con el registro más elevado (Tabla 89). En el grupo III, ninguno de los dos animales que murió como consecuencia de la infección expresó IL-4 en el bazo, a diferencia de los dos cerdos que sobrevivieron (Tabla 90).

Con respecto a los grupos IV y V, en el primero no se produjo expresión de IL-4 en ninguno de los animales, mientras que en el segundo sólo se detectó en el cerdo nº 12, uno de supervivientes de este lote (Tablas 91 y 92). La expresión de IL-4 en los cerdos criados de forma convencional se observó en todos los inmunizados con la bacterina comercial A, y sólo en dos de los inmunizados con la bacterina B (Tablas 93 y 94).

El grupo II presentó diferencias significativas con los grupos I ( $p = 0,0075$ ), IV ( $p = 0,0037$ ) y V ( $p = 0,0037$ ). Por su parte el grupo VI, inmunizado con la bacterina comercial A, dio origen a diferencias significativas con respecto a los grupos I, IV y V ( $p = 0,0160$ ;  $p = 0,0084$  y  $p = 0,0283$ , respectivamente). Se encontraron asimismo entre el grupo IV y el grupo VII ( $p = 0,0475$ ).

### 2.2.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una dosis letal de *H. parasuis*

El análisis estadístico reveló diferencias significativas ( $p = 0,0377$ ) entre ambos lotes. No se observaron niveles detectables de esta citocina en ninguno de los cerdos que murieron como consecuencia de la infección, mientras que sí se encontraron en los supervivientes, salvo en contadas excepciones.

## 2.3. IL-6

### 2.3.1. Comparación entre grupos

En el grupo I, todos los animales expresaron esta citocina excepto uno de los cerdos que murió durante las 24 horas siguientes a la infección. Además, el cerdo nº 25, que murió a los tres días, presentó valores muy superiores a los del resto del grupo (Tabla 88). Con respecto al grupo II, sólo se cuantificó la expresión en dos de los cerdos, pero con valores muy diferentes (Tabla 89). En el grupo III, el nivel de expresión más elevado se observó en el cerdo nº 6, que murió a las 24 horas de la infección. No se pudo detectar esta citocina en el cerdo nº 8, que murió a los tres



días, pero sí en los dos animales supervivientes (Tabla 90). Al igual que lo descrito con otros grupos, en el lote inmunizado con una vacuna recombinante, la IL6 se detectó únicamente en algunos cerdos, concretamente en tres de los cinco (Tabla 91).

En el grupo V, sólo se pudo cuantificar la expresión de esta citocina en el cerdo nº 13, que murió a los dos días de la infección (Tabla 92). Todos los cerdos criados de forma convencional, tanto del grupo VI, como del VII, presentaron una expresión detectable de IL-6, con valores más elevados en los cerdos nº 26 y 27 (Tablas 93 y 94).

Se encontraron diferencias significativas entre el grupo V y los grupos I ( $p = 0,0406$ ), III ( $p = 0,0406$ ), VI ( $p = 0,0131$ ) y VII ( $p = 0,0377$ ). Así como entre el grupo IV y los grupos III y VI ( $p = 0,0206$  y  $p = 0,0360$ ).

### 2.3.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

El análisis estadístico reveló la existencia de diferencias significativas entre ambos lotes ( $p = 0,0022$ ).

## 2.4. IL-10

### 2.4.1. Comparación entre grupos

Los cuatro animales del grupo I expresaron IL-10 en el bazo (Tabla 88), al igual que los cinco animales del grupo II, con registros superiores en los cerdos nº 1 y 4 (Tabla 89). Con respecto al grupo III, tanto en los animales que murieron como en los

supervivientes, se encontraron niveles detectables de IL-10, con unos resultados de la cuantificación muy similares en todos ellos (Tabla 90). Lo mismo se puede afirmar en caso del grupo V (Tabla 91).

En el grupo inmunizado con una vacuna recombinante, también se observó la expresión de la IL-10 en todos los animales, con valores más elevados en los cerdos nº 16 y 20 (Tabla 92). Finalmente en los dos grupos de cerdos de cría convencional, se pudo cuantificar la presencia de IL-10, con valores superiores en el caso del grupo VII (Tablas 93 y 94)

El grupo I presentó diferencias significativas con relación a los grupos II ( $p = 0,0242$ ), III ( $p = 0,0336$ ), V ( $p = 0,0406$ ) VI ( $p = 0,0259$ ) y VII ( $p = 0,0259$ ), como también fueron observadas entre los grupos V y VII ( $p = 0,0368$ ).

### 2.4.2. Comparación entre los animales que supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

Se encontraron diferencias significativas entre ambos lotes ( $p = 0,006$ ), con niveles de expresión generalmente superiores en los animales supervivientes.

## 2.5. TNF- $\alpha$

### 2.5.1. Comparación entre grupos

En el grupo I, la expresión de TNF- $\alpha$  se observó en los cerdos nº 24 y 25 que sobrevivieron hasta 3 y 6 días después de la infección, y en el cerdo nº 22, que murió durante las primeras 24 horas. El resultado de la

cuantificación fue inferior en este último (Tabla 88). En el grupo II, los cinco cerdos expresaron TNF- $\alpha$ , aunque con niveles superiores en los cerdos n° 1 y 2 (Tabla 89). Con respecto al grupo III, se observó la expresión de esta citocina en los dos cerdos supervivientes y en uno de que murieron tras la infección, que aportó el resultado de la cuantificación más elevado de todo el grupo (Tabla 90)

No pudo advertirse expresión en ninguno de los cerdos inmunizados con la vacuna recombinante, pero sí en los cerdos del grupo V inmunizados por exposición a una dosis subletal. En este último, todos los animales presentaron valores similares, salvo el cerdo n° 11, con una expresión claramente superior (Tablas 91 y 92). Tanto en el grupo VI como en el VII, todos los animales expresaron TNF- $\alpha$  en bazo, con valores más elevados en el grupo VI, especialmente en el cerdo n° 30 (Tablas 93 y 94).

Tras el análisis estadístico se comprobó que el grupo IV, inmunizado con una vacuna recombinante, presentaba diferencias significativas con respecto a los grupos I ( $p = 0,0380$ ), II ( $p = 0,0127$ ), III ( $p = 0,0380$ ), V ( $p = 0,0127$ ), VI ( $p = 0,0241$ ), y VII ( $p = 0,0241$ ). Además, también se encontraron diferencias entre el grupo I y los grupos II, VI y VII ( $p = 0,0431$ ,  $p = 0,0490$  y  $p = 0,0490$ , respectivamente); así como entre los grupos II y V ( $p = 0,0331$ ).

### 2.5.2. Comparación entre los animales que supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre ambos lotes ( $p = 0,0019$ ). En todos los supervivientes se observó la expresión del TNF- $\alpha$ ; sin embargo, algunos de los animales que murieron no revelaron niveles detectables de esta citocina.

## 2.6. IFN- $\gamma$

### 2.6.1. Comparación entre grupos

Los cuatro cerdos del grupo I expresaron IFN- $\gamma$  en el bazo. El valor más elevado correspondió al cerdo n° 25, que murió a los 3 días, mientras que el más bajo recayó en el cerdo n° 24, que murió a los 6 días (Tabla 88). En el grupo II, se observó la expresión de esta citocina en sus cinco cerdos, con niveles muy similares, salvo en el cerdo n° 4, que presentó un registro menor (Tabla 89). Los cuatro animales del grupo III también presentaron niveles cuantificables de IFN- $\gamma$  en bazo, con valores más elevados en los cerdos n° 8 y 9 (Tabla 90).

En el grupo IV, todos los animales presentaron una expresión similar de IFN- $\gamma$  salvo el cerdo n° 20, con un resultado de la cuantificación superior. Los niveles de expresión en este grupo fueron similares a los observados en el grupo II (Tabla 91). La expresión de IFN- $\gamma$  en el grupo inmunizado con una dosis subletal, puso de manifiesto valores similares en los cerdos n° 11, 13 y 14, pero fue claramente superior en el cerdo n° 12 e inferior en el n° 15 (Tabla 92). En el grupo VI, se observó la expresión de esta citocina en los tres animales, al igual que en el grupo VII (Tablas 93 y 94)

Se encontraron diferencias significativas entre el grupo II y los grupos I ( $p = 0,0482$ ), III ( $p = 0,0242$ ), V ( $p = 0,0472$ ), VI ( $p = 0,0368$ ) y VII ( $p = 0,0368$ ).

### 2.6.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

## 3. Ganglio linfático

En las Tablas 95-101 se recogen los resultados de la cuantificación relativa de la expresión de las citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en el ganglio.

Tabla 95. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo I de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
21	0,174	0	0,062	0,077	0	0,0301
22	1,060	0	0,023	0	0	0
24	0,179	0,0001	0,034	0,041	0,347	0,426
25	1,277	0	0	0	0	0

Tabla 96. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo II de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
1	0,175	0,027	0,050	0,459	0,638	2,998
2	0,0915	0,035	0,084	0,325	0,654	0,500
3	0,561	0,212	0,255	0,554	0,281	0,640
4	0,274	0,149	0,153	0,887	1,619	0,191
5	0,523	0,475	0,229	0,859	0,606	0,421

## Resultados

Tabla 97. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo III de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
6	1,579	0	0,093	0,384	0	0,274
8	0,338	0,063	0,081	0,895	0,563	1,169
9	1,390	0	0,288	0,420	0	0
10	0,103	0,235	0,092	0,444	1,172	1,422

Tabla 98. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo IV de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL1	IL4	IL6	IL10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
16	0,510	0	0	1,635	0	0
17	0,114	0	0	0,141	0	0,012
18	0,493	0	0	0,045	0	0
19	0,214	0	0,035	0,058	0	0,408
20	0,781	0	0	0	0	0

Tabla 99. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo V de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
11	0,117	0	0	0,237	0,277	0
12	0,435	0,321	0,123	0,152	0,663	0,104
13	0,248	0	0	0,283	0	0
14	0,190	0	0	0,641	0	0
15	0,202	0,125	$1,13 \cdot 10^{-7}$	0,285	0,428	$2,84 \cdot 10^{-7}$

Tabla 100. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo VI de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
29	0,152	0,115	0,058	0,135	0,618	0,553
30	0,124	0,018	0,073	0,288	0,261	0,408
31	0,209	0,006	0,058	0,222	0,843	0,139

Tabla 101. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo VII de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
26	0,182	0,195	0,081	0,838	0,122	0,715
27	0,156	0,028	0,115	0,548	0,692	0,276
28	0,651	0,139	0,223	0,140	0,614	0,879

### 3.1. IL-1

#### 3.1.1. Comparación entre grupos

Los cuatro cerdos del grupo I expresaron la IL-1 en el ganglio, aunque con valores claramente inferiores en el cerdo que sobrevivió durante más tiempo (Tabla 95). En el grupo II, también se observó su expresión en todos los animales. Los valores más elevados correspondieron a los cerdos n° 3 y 5 y los más bajos al n° 2 (Tabla 96). En el grupo III, tanto los animales que sobrevivieron como los que murieron tras la infección expresaron la IL-1, aunque con registros superiores en los últimos (Tabla 97). Se encontraron niveles de expresión detectables en los cinco cerdos inmunizados con la vacuna recombinante, con niveles superiores en los cerdos n° 16, 18 y 20 (Tabla 98).

En el grupo V, todos los cerdos expresaron la IL-1, con registros superiores en el caso del cerdo n° 13, mientras que los más bajos correspondieron al n° 11 (Tabla 99). Todos los cerdos de los grupos VI y VII expresaron esta citocina en el ganglio con resultados muy similares, salvo en el caso del cerdo n° 28, que presentó un valor claramente superior (Tablas 100 y 101).

No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos del estudio.

#### 3.1.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una dosis letal de *H. parasuis*

El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre ambos lotes ( $p = 0,0305$ ).

### 3.2. IL-4

#### 3.2.1. Comparación entre grupos

En el grupo I, sólo el cerdo que sobrevivió durante más tiempo expresó IL-4 en el ganglio (Tabla 95). Todos los animales del grupo II manifestaron niveles detectables de IL-4, aunque con valores superiores en los cerdos nº 3 y 4 y especialmente elevados en el cerdo nº 5 (Tabla 96).

No se pudo detectar esta citocina en los dos animales del grupo III que murieron tras la infección, aunque sí en los supervivientes, con una cuantificación superior en el cerdo nº 10 (Tabla 97). Ninguno de los animales inmunizados con la vacuna recombinante expresaron IL-4 en el ganglio (Tabla 98).

Respecto al grupo V, sólo se pudo cuantificar esta citocina en los cerdos nº 12 y 15, que sobrevivieron a la infección (Tabla 99); mientras que en los grupos de cerdos inmunizados con bacterinas comerciales, se detectó en todos los animales. Los valores más elevados se observaron en los cerdos nº 26 y 28 (grupo VII) y en el nº 29 (grupo VI) (Tablas 100 y 101).

Se encontraron diferencias significativas entre el grupo I y los grupos II ( $p = 0,0242$ ), VI ( $p = 0,0451$ ) y VII ( $p = 0,0451$ ) así como entre los grupos, II, VI y VII respecto al grupo IV ( $p = 0,0127$ ,  $p = 0,0241$  y  $p = 0,0241$ , respectivamente).

#### 3.2.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

Tras el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre ambos lotes ( $p = 0,006$ ). En los animales que murieron tras la infección sólo se observó la expresión de IL-4 en uno de los animales (el cerdo del grupo I que murió a los 6 días) mientras que fue cuantificada en todos los cerdos supervivientes, salvo en el cerdo nº 11 del grupo V.

### 3.3. IL-6

#### 3.3.1. Comparación entre grupos

En el grupo I, tanto los dos cerdos que murieron a las 24 horas post-infección, como el que lo hizo a los 6 días, expresaron IL-6 en el ganglio, lo que no sucedió en el cerdo nº 25, que murió a los 3 días (Tabla 95). Los cinco animales del grupo II revelaron niveles detectables de esta citocina, aunque fueron superiores en los cerdos nº 3, 4 y 5 (Tabla 96). En el grupo III, la expresión se registró de forma similar en los dos animales que sobrevivieron a la infección y en el que murió a las 24 horas, pero fue superior en el cerdo que murió a los dos días (Tabla 97).

En los grupos IV y V, sólo uno de sus componentes expresó esta citocina (cerdo nº 20 y cerdo nº 12, respectivamente) (Tablas 98 y 99), a diferencia de los grupos VI y VII, en los que todos los cerdos presentaron niveles cuantificables de la misma (Tablas 100 y 101).

Se encontraron diferencias significativas entre el grupo II y los grupos I ( $p = 0,0354$ ), IV ( $p = 0,0147$ ) y V ( $p = 0,0298$ ); entre los grupos III y VII con los grupos I ( $p = 0,0336$  y  $p = 0,0489$ , respectivamente) y IV ( $p = 0,0474$  y  $p = 0,0308$ , respectivamente) y entre los grupos VII y IV ( $p = 0,0368$ ).

### 3.3.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras una infección con una DL de *H. parasuis*

Tras el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre ambos lotes ( $p = 0,0001$ ).

## 3.4. IL-10

### 3.4.1. Comparación entre grupos

Sólo dos de los cuatro cerdos del grupo I expresaron la IL-10: uno que murió a las 24 horas post-infección y el otro que lo hizo a los 6 días (Tabla 95). Por su parte, en el grupo II se pudo cuantificar esta citocina en todos los animales, con registros mayores en los cerdos nº 4 y nº 5 (Tabla 96). En el grupo III, los dos animales que murieron como consecuencia de la infección, y el cerdo nº 10, que sobrevivió, mostraron una expresión similar de IL-10; que en cambio resultó superior en el nº 8, igualmente superviviente (Tabla 97).

La expresión de la IL-10 en los cinco cerdos inmunizados con la vacuna recombinante fue muy diversa: no se observó en el cerdo nº 20; los nº 17, 18 y 19 presentaron valores similares, y el nº 16 exhibió registros más elevados (Tabla 98).

En el grupo V, tanto los animales que murieron como los que sobrevivieron a la infección, expresaron IL-10. El valor más elevado se concentró en el cerdo nº 14, que murió a las 24 horas y el más bajo, en el nº 13 que sobrevivió. (Tabla 99). En el grupo VI, se encontró una expresión similar de esta citocina en sus tres integrantes. En cambio, en el grupo VII, dos de sus tres animales presentaron

valores claramente superiores, mientras que el restante se situó en niveles similares a los del grupo anterior (Tabla 100 y 101).

Se encontraron diferencias significativas entre el grupo II y los grupos I ( $p = 0,0242$ ), V ( $p = 0,0464$ ) y VI ( $p = 0,0377$ ). Además de entre el grupo I y los grupos III ( $p = 0,0336$ ), V ( $p = 0,0238$ ), VI ( $p = 0,0487$ ) y VII ( $p = 0,0477$ ).

### 3.4.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre ambos lotes ( $p = 0,0106$ )

## 3.5. TNF- $\alpha$

### 3.5.1. Comparación entre grupos

En el grupo I, el único animal que expresó el TNF- $\alpha$  fue el cerdo que murió a los 6 días (Tabla 95) y en el grupo III sólo se detectó en los cerdos que sobrevivieron a la infección (Tabla 97). En cambio, en el grupo II se observó la expresión de esta citocina en todos los cerdos, con un resultado más elevado para el cerdo nº 4 y más bajo en el nº 3 (Tabla 96). Ninguno de los cerdos del grupo IV (todos los animales murieron tras la infección) expresaron el TNF- $\alpha$  (tabla 98), ni tampoco los dos cerdos del grupo V, que murieron como consecuencia de la infección. Por el contrario, sí se pudo detectar en los tres cerdos del grupo V que sobrevivieron (Tabla 99) y en todos los animales de los grupos VI y VII. En estos últimos el valor más elevado recayó en el cerdo

## Resultados

n° 31 y los valores más bajos correspondieron a los cerdos n° 26 y 30 (Tablas 100 y 101)

Se encontraron diferencias significativas entre el grupo I y los grupos II ( $p = 0,0238$ ), VI ( $p = 0,0494$ ) y VII ( $p = 0,0494$ ). Igualmente entre el grupo IV, y los grupos II ( $p = 0,0127$ ), V ( $p = 0,0127$ ), VI ( $p = 0,0241$ ) y VII ( $p = 0,0241$ ).

### 3.5.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H.parasuis*

El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los animales de ambos lotes ( $p = 0,0001$ ). Todos los supervivientes, a diferencia de los que murieron, expresaron TNF- $\alpha$  en el ganglio.

## 3.6. IFN- $\gamma$

### 3.6.1. Comparación entre grupos

En el grupo I, sólo dos cerdos expresaron IFN- $\gamma$ : el n° 24 que sobrevivió durante los seis primeros días que siguieron a la infección, y, en menor cantidad, el n° 21 que murió a las 24 horas (Tabla 95). Por su parte, los cinco animales del grupo II, presentaron una expresión cuantificable de esta citocina. El valor más elevado se observó en el cerdo n° 1 y el más bajo, en el n° 4. (Tabla 96). En el grupo III, los cerdos n° 8 y 10, que superaron el desafío, expresaron niveles similares de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, sólo se pudo cuantificar en uno de los animales que murió, el n° 6, con un valor inferior al de los dos supervivientes anteriores (tabla 97).

Sólo en dos de los cinco animales inmunizados con la vacuna recombinante se puso de manifiesto la expresión de IFN- $\gamma$  (Tabla 98). En el grupo V, ninguno de los cerdos que murió después del desafío presentó una expresión cuantificable de esta citocina, ni tampoco el cerdo n° 11, superviviente. En cambio los cerdos n° 12 y 15, que también sobrevivieron, sí la expresaron, con un valor mayor para el primero (Tabla 99). El IFN- $\gamma$  pudo cuantificarse en todos los cerdos de los grupos VI y VII con valores inferior en los cerdos n° 31 y n° 27, respectivamente (Tabla 100 y 101).

Se encontraron diferencia significativas entre el grupo IV y los grupos II ( $p = 0,0425$ ), VI ( $p = 0,0447$ ) y VI ( $p = 0,0477$ ). Además estos tres últimos grupos, también diferían del grupo V ( $p = 0,0147$ ,  $p = 0,0308$  y  $p = 0,0308$ , respectivamente). Por último, también se detectaron entre los grupos I y II ( $p = 0,0325$ ).

### 3.6.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras una infección con una DL de *H. parasuis*

Tras análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre ambos lotes ( $p = 0,0015$ ). Sólo cuatro de los animales que no superaron la infección presentaron una expresión cuantificable de IFN- $\gamma$  en ganglio, mientras que todos los cerdos supervivientes, con la excepción del cerdo n° 11 (grupo V), sí la expresaron.



#### 4. Cerebro

En las tablas 102-108 se recogen los resultados de la cuantificación relativa de la expresión de las citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en el cerebro.

Tabla 102. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo I de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
21	0,0227	0	0	0	0	0
22	0,0237	0	0,019	0,184	0	0,063
24	0,0345	0	0,026	0,045	0,340	0,040
25	0,0453	0	0,017	0	0	0

Tabla 103. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo II de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
1	0,070	0	0	$1,66 \cdot 10^{-6}$	0	0
2	0,0478	0	0	$3,71 \cdot 10^{-5}$	0	0
3	0,017	0	0	0,051	0,047	0
4	0	0	$3,20 \cdot 10^{-5}$	0,001	0	0
5	0,0230	0	$2,30 \cdot 10^{-5}$	0,242	0	0

Tabla 104. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo III de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
6	0,074	0	0,014	0,186	0	0,162
8	0,010	0	0,002	0,133	0,024	0,098
9	0,348	0	0,372	0,149	0	0,625
10	0,009	0	0	0,121	0,173	0,162

## Resultados

Tabla 105. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo IV de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL1	IL4	IL6	IL10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
16	0,066	0	0	0	0	0
17	0,083	0	0.0012	0,0001	0	0
18	0,158	0	$7,72 \cdot 10^{-06}$	0,004	0	0
19	0,303	0	0,503	0,562	0	0,560
20	0,058	0	0,0005	0,423	0	0

Tabla 106. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo V de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
11	0,176	0	0,081	0,053	0,650	0,165
12	0,039	0	0	0,273	0,085	0,027
13	0,031	0	0	0,014	0	0
14	0,018	0	0	0	0	0
15	0,038	0	0	0,016	0,892	0,081

Tabla 107. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo VI de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL1	IL4	IL6	IL10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
29	0,0152	0,003	0,021	0,193	0,253	0,029
30	0,0150	0	0	0,037	0,462	0,024
31	0,0399	0	0,003	0,021	0,064	0,024

Tabla 108. Resultados de la cuantificación relativa en el grupo VII de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , expresadas como su valor  $R_0$  normalizado con el valor  $R_0$  de un gen conservado (ciclofilina)

Cerdo n°	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
26	0,022	0	0	0,310	0,135	0,027
27	0,024	0,005	0,155	0,344	0,143	0,070
28	0,024	0	0,08	0,114	0,042	0,040

## 4.1. IL-1

### 4.1.1. Comparación entre grupos

Los cuatro cerdos del grupo I expresaron esta citocina en cerebro, con valores mayores en los cerdos nº 24 y 25, que sobrevivieron durante más tiempo después la infección (Tabla 102). En el grupo II, no se pudo cuantificar la IL-1 en el cerdo nº 4 pero sí en los animales restantes, con un valor más elevado en el nº 1 (Tabla 103). Todos los animales del grupo III, tanto los que sobrevivieron como los que murieron como consecuencia de la infección, expresaron esta citocina, aunque con valores mayores en estos los últimos, especialmente en el cerdo nº 6 (Tabla 104). En el grupo IV, se observó la expresión en sus cinco cerdos y los niveles más elevados correspondieron a los cerdos nº 18 y 19 (Tabla 105).

Tanto los cerdos que murieron como los que superaron la infección del grupo V, expresaron la IL-1. El valor más elevado correspondió al cerdo nº 11. Los cuatro cerdos restantes presentaron resultados de la cuantificación similares, ligeramente inferiores en el nº 14 (Tabla 106). En los grupos VI y VII, todos los animales expresaron la IL-1 en cerebro. En el grupo VI, los cerdos nº 29 y 30 mantuvieron valores similares, e inferiores al del nº 31 (Tabla 107). En el grupo VII, los tres animales manifestaron valores muy próximos (Tabla 108).

Se encontraron diferencias significativas entre el grupo IV y los grupos I ( $p = 0,0242$ ), II ( $p = 0,0331$ ), V ( $p = 0,0464$ ), VI ( $p = 0,0377$ ) y VII ( $p = 0,0377$ ).

### 4.1.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre ambos lotes ( $p = 0,0175$ ), con valores medios de expresión más elevados en los que no superaron la infección.

## 4.2. IL-4

### 4.2.1. Comparación entre grupos

Sólo se pudo detectar la expresión de esta citocina en dos cerdos, el cerdo nº 29 del grupo VI, y el nº 27 del grupo VII. Por ello, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Tablas 102-108).

### 4.2.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una dosis letal de *H. parasuis*

No se encontraron diferencias significativas al comparar la expresión de la IL-4 entre ambos lotes

## 4.3. IL-6

### 4.3.1. Comparación entre grupos

En el grupo I, tanto los cerdos que murieron durante las primeras 24 horas posteriores a la infección, como el que murió a los 6 días expresaron la IL-6 en el cerebro; en cambio, no se detectó en el cerdo nº 25, que murió a los tres días (Tabla 102). En los cerdos nº 4 y nº 5 del grupo II se pudo cuantificar la expresión de esta citocina, con valores inferiores a los del grupo anterior (Tabla 103).

En el grupo III, los dos animales que murieron como consecuencia de la infección, así como el cerdo nº 8 que sobrevivió, expresaron la IL-6, con un valor inferior en este último (Tabla 104).

En el grupo IV, la expresión resultó muy diversa en sus cuatro integrantes: en el cerdo nº 16 no se pudo cuantificar, al contrario que en el resto, aunque los cerdos nº 18 y 20 presentaron valores inferiores (Tabla 105). En el grupo V, sólo se pudo cuantificar esta citocina (tabla 106) en el cerdo nº 11. Finalmente, se detectó en 4 de los 6 animales que constituían los grupos VI y VI, (Tablas 107 y 108).

No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos del estudio.

### 4.3.2. Comparación entre los animales que supervivieron y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

Tras el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre ambos lotes.

## 4.4. IL-10

### 4.4.1. Comparación entre grupos

Sólo se observaron niveles detectables de esta citocina en dos de los cerdos del grupo I, el nº 22 y el nº 24, con un valor inferior en este último (Tabla 102). Todos los animales del grupo II expresaron IL-10 en el cerebro. Los valores más elevados se alcanzaron en el cerdo nº 3 y especialmente en el nº 5 (Tabla 103). En el grupo III, los cuatro animales presentaron

una expresión similar de IL-10 (Tabla 104). En cambio en el grupo IV, su cuantificación mostró variaciones entre los cinco animales: el nº 16 no la expresó, y los niveles de los cerdos nº 19 y nº 20 resultaron más altos en comparación con los de los cerdos nº 17 y nº 18 (Tabla 105).

Los tres animales del grupo V que sobrevivieron a la infección con una dosis letal, junto con el que murió a los dos días expresaron IL-10 en este órgano (Tabla 106). Todos los componentes de los grupos VI y VII mostraron una expresión cuantificable de esta citocina, con valores superiores en los cerdos nº 29 y nº 28, respectivamente (Tablas 107 y 108).

No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos del estudio.

### 4.4.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras una infección con una dosis letal de *H. parasuis*

El análisis estadístico reveló que no había diferencias significativas en la expresión de esta citocina entre ambos lotes.

## 4.5. TNF- $\alpha$

### 4.5.1. Comparación entre grupos

En los grupos I y II sólo se apreciaron niveles cuantificables de esta citocina en uno de sus componentes, el cerdo nº 24, que sobrevivió durante más tiempo a la infección, en el caso del primer grupo, y el cerdo nº 3 en el caso del segundo. (Tabla 102 y 103). Entre

los animales inmunizados con OMPs, la expresión del TNF- $\alpha$  se cuantificó sólo en los dos animales que sobrevivieron a la infección (Tabla 104). Ninguno de los animales del grupo IV presentó niveles cuantificables de esta citocina (Tabla 105). En el grupo V, sólo se observó la expresión del TNF- $\alpha$  en los cerdos que sobrevivieron a la infección. Los resultados fueron menores en el cerdo n° 12 (Tabla 106). Todos los cerdos criados de forma convencional, inmunizados con bacterinas comerciales, expresaron esta citocina. El valor menor correspondió a los cerdos n° 28 y 31 (grupos VII y VI, respectivamente); y el más elevado a los cerdos n° 29 y 30 (grupo VI) (Tablas 107 y 108).

Tanto el grupo VI como el grupo VII presentaron diferencias significativas con respecto a los grupos II ( $p = 0,0308$  y  $p = 0,0492$ , respectivamente) y el grupo IV ( $p = 0,0241$  y  $p = 0,0300$ , respectivamente).

#### 4.5.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una DL de *H. parasuis*

El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre ambos grupos ( $p = 0,0106$ ). Con la excepción del grupo II, se observaron niveles cuantificables de esta citocina en cerebro, de todos los animales supervivientes, mientras que en los que murieron como consecuencia del desafío sólo se pudo detectar en el cerdo n° 23 (grupo I).

### 4.6. IFN- $\gamma$

#### 4.6.1. Comparación entre grupos

Sólo dos de los cerdos del grupo I presentaron una expresión cuantificable de esta citocina en el cerebro: el n° 22 que murió durante las primeras 24 horas, y el cerdo n° 24, que murió a los 6 días (Tabla 102). Por el contrario, ninguno de los animales del grupo II la expresaron (Tabla 103). En el grupo III, los cuatro cerdos pusieron de manifiesto el IFN- $\gamma$ , con un valor máximo en el cerdo n° 6, que murió como consecuencia de la infección (Tabla 104). Sin embargo, en el grupo IV sólo se pudo medir esta citocina en uno de sus componentes, el cerdo n° 19, que presentó valor similar al del cerdo n° 6 (Tabla 105). La expresión de IFN- $\gamma$  en el grupo V se pudo cuantificar exclusivamente en los tres cerdos que sobrevivieron a la infección, con un valor más elevado en el n° 11 (Tabla 106). Los seis cerdos criados de forma convencional, inmunizados con bacterinas comerciales expresaron esta citocina. Su medición resultó mayor en los animales n° 27 y 28 (grupo VII) (Tablas 107 y 108).

Se anotaron diferencias significativas entre los grupos I y III ( $p = 0,0329$ ). Además, el grupo III también las presentó con el II ( $p = 0,0171$ ) y con el IV ( $p = 0,0482$ ). Por último se observaron entre los grupos VI y VII con respecto al grupo II ( $p = 0,0241$  en ambos casos).

#### 4.6.2. Comparación entre los animales supervivientes y los que murieron tras la infección con una dosis letal de *H. parasuis*

No se observaron diferencias significativas con respecto a la expresión del IFN- $\gamma$  en cerebro de ambos grupos. Tanto en uno como en otro se encontraron cerdos que no expresaron esta citocina.

Tabla 109. Resultados del análisis comparativo de la expresión de citocinas entre los cerdos supervivientes y los que murieron tras la infección.  $\mu$ - Media, **SD** Desviación estándar.

	IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
<b>Pulmón</b>	Supervivientes $\mu=0,63$ SD = 0,6 No supervivientes $\mu = 0,43$ SD = 0,4 <b>Sin diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu=0,022$ SD = 0,02 No supervivientes $\mu = 0$ SD = 0 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,05$ SD = 0,07 No supervivientes $\mu = 0,52$ SD = 1,6 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,49$ SD = 0,5 No supervivientes $\mu = 0,50$ SD = 1 <b>Sin diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,70$ SD = 0,5 No supervivientes $\mu = 0,28$ SD = 0,3 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,47$ SD = 0,3 No supervivientes $\mu = 0,20$ SD = 0,2 <b>Diferencias significativas</b>
<b>Bazo</b>	Supervivientes $\mu=0,29$ SD = 0,2 No supervivientes $\mu = 0,71$ SD = 0,7 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu=0,05$ SD = 0,05 No supervivientes $\mu = 0$ SD = 0 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,08$ SD = 0,1 No supervivientes $\mu = 0,1$ SD = 0,2 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,46$ SD = 0,2 No supervivientes $\mu = 0,25$ SD = 0,2 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,54$ SD = 0,3 No supervivientes $\mu = 0,21$ SD = 0,4 <b>Diferencias significativa</b>	Supervivientes $\mu = 0,53$ SD = 0,4 No supervivientes $\mu = 0,74$ SD = 0,7 <b>Sin diferencias significativas</b>
<b>Ganglio</b>	Supervivientes $\mu=0,27$ SD = 0,2 No supervivientes $\mu = 0,63$ SD = 0,5 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu=0,13$ SD = 0,1 No supervivientes $\mu = 0$ SD = 0 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,1$ SD = 0,7 No supervivientes $\mu = 0,04$ SD = 0,1 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,45$ SD = 0,3 No supervivientes $\mu = 0,3$ SD = 0,4 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,6$ SD = 0,4 No supervivientes $\mu = 0,03$ SD = 0,1 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,6$ SD = 0,7 No supervivientes $\mu = 0,09$ SD = 0,2 <b>Diferencias significativas</b>
<b>Cerebro</b>	Supervivientes $\mu=0,04$ SD = 0,04 No supervivientes $\mu = 0,1$ SD = 0,1 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0$ SD = 0 No supervivientes $\mu = 0$ SD = 0 <b>Sin diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,02$ SD = 0,04 No supervivientes $\mu = 0,07$ SD = 0,2 <b>Sin diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,12$ SD = 0,12 No supervivientes $\mu = 0,13$ SD = 0,2 <b>Sin diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,19$ SD = 0,26 No supervivientes $\mu = 0,03$ SD = 0,1 <b>Diferencias significativas</b>	Supervivientes $\mu = 0,04$ SD = 0,05 No supervivientes $\mu = 0,1$ SD = 0,2 <b>Sin diferencias significativas</b>



# ÍNDICES



## ESTUDIOS DE INMUNIDAD EN CERDOS FRENTE A *Haemophilus parasuis*

### 1. Infección experimental con *H. parasuis*: Modelos animales

#### 1.1. Ratones

En 1977 Siodrov y cols., descartaron el ratón como modelo experimental para la enfermedad de Glässer, al considerar que este animal no resultaba susceptible a *H. parasuis*. Cuatro años más tarde, Morozumi y cols., llegaron a la misma conclusión después de inocular ratones intraperitonealmente con el serotipo 1 (cepa nº 4 de referencia). La inoculación con concentraciones elevadas ( $2 \times 10^9$  UFC), originó la presencia de sintomatología durante las primeras 6 horas (incluso 24 horas), provocando la muerte de algunos animales, a partir de los que se pudo recuperar el microorganismo; en cambio, con concentraciones bacterianas más bajas, la presencia de síntomas era irregular, sólo se observaba en algunos animales, pero ni había mortalidad ni se pudo aislar la bacteria. El hecho de que no se observasen lesiones características de la enfermedad después de la inoculación de *H. parasuis*, unido a la baja tasa de recuperación bacteriana, llevó a estos autores a desechar al ratón como un modelo experimental apropiado.

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran las conclusiones recogidas por los autores citados antes, aunque en nuestro caso se utilizó la cepa de referencia Nagasaki, del serotipo 5. Solamente después de inocular una dosis de  $2 \times 10^9$  UFC/ml, vía intraperitoneal, se

produjo la muerte de todos los animales en las primeras 8 horas posteriores a la infección, aislándose la bacteria de hisopos de la cavidad abdominal que presentaba una intensa congestión. La muerte de los ratones y su cuadro sobreagudo, podría relacionarse con el LOS de *H. parasuis* tal y como ha sido descrito previamente por otros autores, tanto en el cerdo (Amano y cols., 1997) como en el ratón (Tadjadine y cols., 2004) quienes señalaron una alteración en la coagulación de la sangre y un fallo multisistémico a las pocas horas de la infección. En el resto de animales, inoculados con dosis más bajas, no se observó ni sintomatología ni mortalidad y no se pudo aislar la bacteria cuando, después de seis días, se sacrificaron, resultado que coincide con lo descrito por Tadjadine y cols., (2004) que tampoco consiguieron recuperar el microorganismo a partir de muestras del bazo, hígado, pulmón y corazón en el momento del sacrificio, a los 7 días de la infección.

La inoculación por vía intranasal sólo provocó una breve sintomatología inespecífica durante las primeras 24 horas en los ratones que recibieron la dosis más alta, y en ningún caso se pudo aislar la bacteria cuando se sacrificaron a los seis días.

La colonización y supervivencia bacterianas después de la inoculación intranasal con  $2 \times 10^9$  UFC, se caracterizó por la presencia de la bacteria en el pulmón y en el bazo a partir de las 4 y 8 horas post-infección, respectivamente, aunque siempre en menor cantidad en este último órgano. El número de bacterias fue disminuyendo con el tiempo, hasta ser eliminadas completamente de ambos órganos a las 24 horas. Esto también concuerda con el estudio de Tadjadine y cols. (2004), que

puso de manifiesto que la bacteriemia después de una inoculación intraperitoneal iba disminuyendo progresivamente.

Nuestros resultados sugieren que aunque *H. parasuis* puede diseminarse desde la cavidad nasal no es capaz de colonizar ninguno de los sistemas orgánicos del animal y producir la enfermedad consiguiente, siendo eliminado por el sistema de vigilancia inmune, seguramente debido a la incapacidad de esta bacteria para utilizar receptores celulares murinos, así como a la imposibilidad de abastecerse de elementos esenciales para su crecimiento y multiplicación. A este respecto, la ausencia en *H. parasuis* de receptores para la transferrina murina, podría explicar, al menos en parte, la especificidad por el cerdo, su hospedador natural (del Rio y cols., 2004).

## 1.2. Cobayas

El primer estudio en el que se utilizaron estos animales fue realizado en 1977 por Siodrov y cols., quienes determinaron que la infección con *H. parasuis* tanto por vía intraperitoneal, como nasal o subcutánea originaba una enfermedad septicémica, con serositis y meningoencefalitis. En 1982, Morozumi y cols. observaron bacteriemia en cobayas durante las 6 primeras horas que siguieron a la inoculación intraperitoneal del serotipo 1, con un cuadro clínico relacionado directamente con el número de bacterias infectantes. Estos autores consideraron que el cobaya representaba un modelo adecuado de la enfermedad de Glässer, puesto que la inoculación de *H. parasuis* desencadenaba serositis y meningitis (lesiones características de esta enfermedad) y además la bacteria se

recuperaba de los animales afectados. A diferencia de Siodrov y cols., determinaron que no era patogénica por la vía intranasal, pero sí por otras vías, especialmente la intrapulmonar, intramuscular e intramucosa (mucosa oral). Rapp Gabrielson y cols. (1992) emplearon las cepas de referencia de los siete primeros serotipos, entre ellas, la Nagasaki del serotipo 5 (empleada en nuestra investigación), que cuando se inoculaba a dosis elevadas ( $2 \times 10^9$  UFC) por vía intraperitoneal originaba septicemia y la muerte sobraguda del animal, recuperándose después de localizaciones sistémicas; mientras que por vía intratraqueal originaba bronconeumonía purulenta, con muerte de los animales en 24 horas y aislamiento tanto de muestras pulmonares como de otros órganos (nivel sistémico). Con concentraciones menores, apenas se encontraron hallazgos clínicos y lesiones reseñables, salvo una bacteriemia temporal.

En nuestro estudio la inoculación de los cobayas tanto por vía intranasal, como por las vías intraperitoneal o torácica resultó inocua para todos los animales, incluso con dosis de  $10^{10}$  y  $10^9$  UFC; además, no se observó mortalidad en ningún cobaya ni se pudo aislar la bacteria después del sacrificio. Tampoco se encontraron lesiones reseñables, salvo una ligera congestión en el mesenterio de algunos animales, que pudo ser debida al efecto del eutanásico. En el caso de las vías intraperitoneal e intratorácica se observó una leve sintomatología inespecífica, que fue remitiendo con el tiempo, de forma más lenta en los animales inoculados con la dosis más alta ( $10^{10}$  UFC).

Las diferencias encontradas entre las distintas investigaciones pueden ser debidas a

varias causas. Así Rapp-Gabrielson y cols. (1992) apuntaron que las diferencias entre sus resultados y los obtenidos por Morozumi y cols. (1982) pudieron ser consecuencia de la metodología empleada en la preparación de las suspensiones para el desafío y su estandarización, ya que para el recuento bacteriano utilizaron medios de cultivo diferentes: ágar a partir de caldo con extracto de levadura para el primer supuesto, ágar PPLO con NAD en el estudio de Rapp-Gabrielson y cols. (1992) y ágar chocolate suplementado con Polyvitex en nuestro caso. Por otro lado, Rapp-Gabrielson y cols. (1992) habían realizado varios pases en cobayas con la cepa de Nagasaki para aumentar su virulencia antes de proceder a la infección, observando un aumento en el desarrollo capsular. Además, en algunos de los cobayas utilizados por estos autores se detectó una moderada cantidad de *Bordetella bronchiseptica*, una bacteria que aumenta la capacidad de colonización de *H. parasuis* en el tracto respiratorio superior del cerdo (Brockmeier, 2004), de tal forma que cuando las dos bacterias están presentes el número de cerdos con neumonía es superior, por lo que podría haber ocurrido algo similar en el caso del cobaya. Otras explicaciones son difíciles de encontrar, toda vez que la cepa utilizada del serotipo 5 (Nagasaki) fue proporcionada por Kielstein con el resto de la colección, y en el resto de ensayos realizados, incluyendo las inoculaciones en el cerdo (con una dosis similar a la de los cobayas), se comportó con la virulencia esperada.

### 1.3. Cerdos privados de calostro

La reproducción de la enfermedad sistémica tras la inoculación de *H. parasuis* en cerdos convencionales presenta dificultades derivadas de la existencia de inmunidad activa, como consecuencia de la colonización previa por esta bacteria, o bien pasiva, por la presencia de anticuerpos maternos en el calostro de reproductoras infectadas o simplemente colonizadas por el agente (Oliveira y cols., 2003; Blanco y cols., 2004); como quiera que sea, un hecho muy común debido a que estos microorganismos se describen en la mayoría de las explotaciones porcinas (Segalés, 1996; Solano-Aguilar y cols., 1999) y además colonizan precozmente la mucosa nasal (Rodríguez Ferri y cols., 2000).

En la práctica resulta difícil encontrar explotaciones libres de *Haemophilus parasuis* por la razón aludida de la colonización precoz de la mucosa nasal, fundamentalmente a partir de la madre infectada. Por ello, los intentos para reproducir la enfermedad son muy difíciles cuando se utilizan cerdos convencionales, pues los anticuerpos naturales y los formados frente al estímulo de los colonizadores nasales, desvirtúan el resultado. Se ha conseguido reproducir la enfermedad en cerdos SPF (Rosendal y cols., 1985; Nielsen, 1993; Amano y cols., 1996-1997) y también en cerdos obtenidos por cesárea y privados de calostro (CDCD), evitando en un caso y otro la transmisión del agente por contacto con la madre, así como la presencia de anticuerpos maternos (Vahle y cols., 1995-1997; Rapp-Gabrielson y cols., 1997)

Actualmente Oliveira y cols. (2003) y Blanco y cols. (2004), han propuesto como

alternativa los cerdos obtenidos por parto natural y privados de calostro, que presentaban el mismo estatus inmunitario que los cerdos CDCD respecto a *H. parasuis*, pero con la ventaja de evitar la necesidad de la cesárea, y por tanto las complicaciones derivadas de la misma, en relación con el desarrollo posterior de los animales. Ambos autores demostraron que la inoculación de una suspensión bacteriana con una cepa de campo del serotipo 5 reproducía la enfermedad, con lesiones características como poliserositis, meningitis y artritis (las más comunes) junto con la recuperación de la bacteria a partir de los animales afectados.

Con los resultados de este estudio se confirman los obtenidos por los dos autores anteriores, puesto que igual que ellos hemos

conseguido reproducir la enfermedad después de la inoculación intratraqueal de una suspensión de la cepa Nagasaki, del serotipo 5. Este modelo experimental también nos permitió analizar la evolución de las lesiones y los aislamientos microbiológicos (Tabla 26). Además pudimos comprobar que dependiendo del estatus inmunitario, el desarrollo de la enfermedad era diferente, con casos sobreagudos y agudos en los animales que no habían sido inmunizados o en los que la inmunización no resultó eficaz; mientras que los cerdos que habían desarrollado una protección adecuada tras una inmunización previa, sobrevivieron a la infección sin observarse lesiones reseñables ni aislamientos de *H. parasuis* en la necropsia (Tabla 26).

## 2. Estrategias de inmunización frente a una infección con *H. parasuis*

Se admite que la protección frente a *H. parasuis* viene determinada por la existencia de inmunidad humoral (Segalés, 1996). En la actualidad, se observa la tendencia de mantener las poblaciones porcinas aisladas, circunstancia que reduce los contactos con el patógeno y por ello la inducción de inmunidad específica (Segalés, 1996; Rodríguez Ferri, y cols., 2000).

Otro factor a tener en cuenta a la hora de conferir una protección adecuada es la gran diversidad serológica que se ha encontrado al tipificar esta bacteria, así como los diferentes grados de virulencia e inmunogenicidad que presenta (Kielstein y cols., 1991; Miniats y cols., 1991; Nielsen, 1993; Segalés, 1996).

La estrategia de inmunización más utilizada es el empleo de bacterinas con cepas inactivadas (Smart y Miniats, 1989; Miniats y cols., 1991; Rapp-Gabrielson y cols., 1997; Solano-Aguilar, 1999; Takahashi y cols., 2001; Back y Riising, 2002), pero se han propuesto otras medidas alternativas como la colonización precoz por exposición a una dosis subletal, tanto de las madres como de los lechones (Oliveira y cols., 2001), o el empleo de vacunas recombinantes o formuladas con proteínas extracelulares presentes en todos los serotipos y que por su situación, son más accesibles al sistema inmune (del Río, 2004; McVicker y cols., 2006). La eficacia de estos tipos de vacunas ya ha sido probada en otras bacterias de la familia *Pasteurellaceae*, como en *A. pleuropneumoniae* (Van Overbeke, 2000; Goethe y cols., 2001)

### 2.1. Bacterinas

En la actualidad, las bacterinas constituyen el único tipo de vacuna que se ha diseñado de forma comercial o experimental, con objeto de conferir protección frente a *H. parasuis*, comprobándose que habitualmente inducen una protección adecuada frente a desafíos homólogos (Smart y Miniats, 1989; Miniats y cols., 1991; Rapp Gabrielson, y cols., 1997; Takahaschi, y cols., 2001; Oliveira, y cols., 2003); pero en cambio la protección heteróloga resulta parcial sino nula (Miniats y cols., 1991; Rapp-Gabrielson, y cols., 1997). Por lo que a la hora de formular un producto eficaz, la selección de las cepas basada en el conocimiento previo de las que circulan en la región o en la explotación resulta decisiva.

De acuerdo con estos precedentes, en este estudio seleccionamos los serotipos 2, 4 y 5 para el desarrollo de una bacterina experimental, basándonos para ello en el conocimiento de su prevalencia principal en España (Rubies y cols., 1999). Se determinó incluir en la vacuna los tres serotipos, al igual que realizaron previamente Takahaschi y cols. (2001) con los serotipos 2 y 5, puesto que estos autores demostraron que mientras una vacuna formulada con ambos era capaz de proteger frente a un desafío experimental tanto con el serotipo 2 como con el 5, las vacunas formuladas con uno de ellos no protegían frente a un desafío heterólogo.

Dentro del serotipo, a la hora de seleccionar una cepa particular adecuada de cada uno se tuvieron en cuenta datos de interés industrial y otros, como el comportamiento y los resultados de las pruebas de crecimiento (Rodríguez Ferri y cols., 2000). Las cepas

seleccionadas fueron la 19 M-2, la 13 PC 1 y la 11261, de los serotipos 2, 4 y 5 respectivamente (aislamientos clínicos realizados en nuestro laboratorio), puesto que en la fase logarítmica de su crecimiento alcanzaron DO muy elevadas; además de que su entrada en esta fase se produjo de forma más rápida que en las otras cepas comparadas (Figuras 8-13).

Otro de los aspectos importantes a la hora de preparar una bacterina eficaz está representado por la elección de un agente inactivante adecuado, no sólo desde el punto de vista de la seguridad de la vacuna, sino también en términos del efecto degradante sobre los antígenos, y su eficacia basada en la concentración y tiempo necesarios para que proporcionar una inactivación completa. Por esta razón, además del formol, que es el agente inactivante empleado rutinariamente en las bacterinas con *H. parasuis* (Smart y Miniats, 1989; Miniats y cols., 1991; Rapp-Gabrielson y cols., 1997, Solano-Aguilar y cols., 1999; Takahashi y cols., 2001; Back y Riising, 2002), también se estudió la acción del thimerosal, un compuesto organomercuriado, que según la “Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos” (EMA, 1997), resulta muy eficaz a concentraciones bajas al no reaccionar con el antígeno. Los resultados obtenidos en nuestro estudio corroboran la idoneidad del thimerosal como inactivante, puesto que mientras que con el formol la inactivación completa se conseguía a partir de una concentración del 0,2% con tiempos entre 5 y 7 horas, el thimerosal proporcionaba el mismo efecto a partir de una concentración casi diez veces menor, con tan sólo 2-3 horas de tratamiento (Tablas 23 y 24).

Por otro lado, tras analizar el efecto degradante sobre las proteínas del sedimento bacteriano reconocidas por los anticuerpos del suero de un animal convaleciente y por un suero policlonal frente a la proteína TbpB, los resultados demostraban que el perfil proteico obtenido no se veía alterado para el tratamiento con thimerosal, mientras que con el formol no se podían observar todas bandas proteicas, que además aparecían muy difuminadas (Figura 15). Estos mismos resultados han sido también observados por nuestro grupo de investigación durante la elaboración de una bacterina con *A. pleuropneumoniae* (datos sin publicar).

El adyuvante de elección fue el Montanide IMS 2215 N VG, que ya había sido utilizado en nuestro laboratorio en la elaboración de otro tipo de bacterinas, con buenos resultados de protección frente al desafío (datos sin publicar). Constituye un producto comercial de nueva generación, basado en la asociación de nanopartículas con un inmunoestimulante soluble, para el que se proponen diversos modos de actuación, incluyendo la atracción de células inmunocompetentes o la estimulación de la captura del antígeno por las células presentadoras (Aucouturier y cols., 2000).

## 2.2. Vacunas formuladas con OMPs

Algunos autores han observado cómo la inoculación con una suspensión de la bacteria viva induce la producción de anticuerpos contra antígenos comunes (Nielsen, 1993; Milward, 1997), generándose una protección heteróloga adecuada, lo que ha llevado a pensar que los antígenos que se expresan durante la infección serían buenos candidatos

para desarrollar una vacuna eficaz. Uno de los factores determinantes para la expresión de las proteínas bacterianas durante la infección, es la ausencia de hierro en el hospedador (Goethe y cols., 1991). En estudios realizados con *A. pleuropneumoniae* en el cerdo, se ha descrito la inmunogenicidad de algunas lipoproteínas de la membrana externa como la proteína *tbpB*, cuya expresión aumenta en condiciones restrictivas de hierro (Gerlach y cols., 1992; Rossi-Campos y cols., 1992; Burka y cols., 1995). Goethe y cols. (1991) determinaron que la inmunización con una combinación de estas lipoproteínas extraídas *in vitro* en condiciones restrictivas de hierro inducía una buena protección frente a *A. pleuropneumoniae*.

Basándonos en los resultados obtenidos por del Río (2004), que demostraron que en *H. parasuis* la expresión de las proteínas que intervienen en la captación del hierro unido a la transferrina también se encuentran reguladas positivamente por la concentración disponible de este oligoelemento, decidimos desarrollar una vacuna a partir de las proteínas de la membrana externa de esta bacteria cultivada en condiciones restrictivas de hierro, con un protocolo similar al descrito por Goethe y cols (2001). Dicha técnica resulta sencilla en su ejecución y evita procesos costosos de purificación. Solamente es necesario cultivar las bacterias en condiciones restrictivas de hierro, para simular lo que ocurriría en una infección *in vivo* y finalmente elegir una concentración adecuada de un detergente, el deoxicolato sódico, que permita la extracción de la totalidad de proteínas de la membrana externa sin alterar su estabilidad. En nuestro estudio se demuestra la reproducibilidad de este método de extracción aplicado a *H.*

*parasuis*, al observarse que con una concentración de detergente, del 0,075% la solubilización de las proteínas es total y no se altera la estructura de la membrana, puesto que no se liberaban proteínas constitutivas, como la *TbpA* (Figuras 16-18).

Otra de las ventajas de los sobrenadantes proteicos reside en su estabilidad tras someterlos a procesos para aumentar la concentración final como la precipitación con el ácido tricloroacético o la ultrafiltración (observándose en ambos casos un aumento del grosor de la banda correspondiente a la proteína *TbpB*) y a procesos relacionados con la seguridad biológica de la vacuna, como la filtración o la inactivación con thimerosal (Figuras 19-21) Al igual que en el caso de la bacterina, se empleó Montanide IMS 2215 N VG como adyuvante.

### 2.3. Vacunas recombinantes

Como se ha señalado antes, las proteínas de unión a la transferrina *TbpB* y *TbpA* podrían ser dos candidatas vacunales ideales, debido a su localización extracelular (sólo en algunas regiones en el caso de la *tbpA*), a su importancia en la supervivencia y propagación de la enfermedad y a su composición aminoacídica, con regiones conservadas intra e inter-específicamente (del Río, 2004). En otras bacterias de la familia *Pasteurellaceae* se ha demostrado su inmunogenicidad y se han diseñado proteínas recombinantes después de llevar a cabo procesos de clonación en *E. coli*, con el fin de obtener una importante concentración final de estos antígenos. En el caso de *A. pleuropneumoniae*, se comprobó que una vacuna recombinante elaborada con la

TbpB completa proporcionaba una buena protección frente al desafío reduciendo la mortalidad y las lesiones pulmonares (Rossi-Campos y cols., 1992).

En estudios llevados a cabo previamente por nuestro grupo de investigación, se ha demostrado la dificultad de clonar la totalidad del gen *tbpB* de *H. parasuis* en *E. coli*, puesto que la proteína resultante forma cuerpos de inclusión y no resulta posible su solubilización con detergentes suaves sin que sufra desnaturalización. La predicción de la estructura secundaria de la TbpB ha permitido determinar que el extremo amino terminal se encuentra expuesto al medio extracelular, lo que unido a su inmunodominancia, igual que sucede en el caso de *Neisseria meningitidis* (Rokbi y cols., 1997), le convierten en un candidato vacunal idóneo. En estas condiciones, tomando como base el extremo amino-terminal se obtuvo una proteína recombinante de 27,3 kDa en *E. coli* (del Río, 2004). La ultrafiltración de los extractos eluidos que contenían la proteína permitió el aumento de la concentración proteica, lo que redujo el número de procesos de expresión y purificación necesarios para disponer de una cantidad apropiada de proteína, sin que por ello se viera comprometida su estabilidad, como tampoco se vio afectada por la incorporación de thimerosal (Figura 22).

El adyuvante empleado fue el mismo que para los otros dos preparados vacunales, Montanide IMS 2215 N VG. Este tipo de adyuvante ha sido descrito con éxito en asociación con una toxina recombinante de *Pasteurella multocida* (Aucouturier y cols., 2000).

#### 2.4. Inmunización por exposición previa al agente

La exposición al agente causal ha sido propuesta como una medida de prevención y control en varias enfermedades, en particular en las que el contacto precoz con los animales genera un tipo de respuesta que protege de ataques posteriores mucho más virulentos y con consecuencias desastrosas. Por ejemplo, en el caso de *Streptococcus suis*, la colonización de la cavidad nasal con cepas de esta bacteria reduce la mortalidad y los gastos derivados del tratamiento en los lechones (Oliveira y cols., 2001); además, en un estudio con *A. pleuropneumoniae* se observó que la inoculación de la bacteria viva en el tracto respiratorio inducía la producción de antígenos comunes entre los distintos serotipos, originando reactividad cruzada (Milward, 1997), al tiempo que se expresaban proteínas y otros factores de virulencia de gran importancia para el desarrollo de una respuesta inmune adecuada. En el caso de *H. parasuis*, se ha observado que la exposición nasal a un aerosol que incorpora bacterias vivas proporciona protección heteróloga (Nielsen, 1993), por lo que se propuso la colonización nasal con cepas sistémicas de la bacteria como medida de protección frente a procesos patológicos, ya que los aislamientos sistémicos son muy homogéneos entre sí y favorecen las reacciones cruzadas (Oliveira, y cols., 2001).

En nuestro estudio analizamos la inmunización inducida tras la inoculación intratraqueal de una dosis subletal de la bacteria mediante punción entre dos anillos. Las ventajas de este método consisten en su sencillez, puesto que no se requieren prácticas de manejo complicadas ni anestesia previa; su



rapidez, puesto que el inóculo se administra mediante un único pinchazo en la tráquea, y exactitud, puesto que permite la administración de una cantidad y concentración concreta del inóculo directamente en el aparato respiratorio del cerdo. Tras la inoculación, se comprobó

que no provocaba ninguna alteración tisular o de la respiración, lo que unido a la rapidez de la actuación lo convertía en un protocolo de inmunización adecuado, ya que el estrés provocado en los cerdos se reducía al máximo.

### **3. Inmunización e infección con *H. parasuis*: patogenia, cuadro clínico, estudio anatomo-patológico, y hallazgos microbiológicos**

La patogenia de la infección por *H. parasuis* no se comprende suficientemente, habiéndose descrito hasta cuatro formas clínicas. Vahle y cols. (1997) observaron que la bacteria producía una alteración en la mucosa del aparato respiratorio, desde donde se difundía a los vasos sanguíneos al cabo de 12 y 36 horas, distribuyéndose desde allí a los distintos órganos, en los que asociaba con la presencia de infiltrados inflamatorios (Kwonil y cols., 2004).

La forma septicémica es la que presenta el cuadro más agudo. En ella, los animales manifiestan postración, disnea y cianosis en las primeras 24 horas, así como una alteración del sistema de la coagulación en respuesta a la endotoxina bacteriana, lo que determina la aparición de congestión, edema y microtrombos de fibrina en distintos órganos. La enfermedad de Glässer es otra de las formas observadas, también de carácter agudo, caracterizada por una inflamación fibrinosa de las serosas, que en ocasiones se acompaña de poliartritis y meningitis. Otras formas clínicas son la forma respiratoria, con bronconeumonía de tipo catarral o fibrinohemorrágica, y la forma muscular, descrita en cerdos SPF, cuya cabeza aparece hinchada y cianótica, con presencia de un exudado inflamatorio muscular (cit. por Segalés, 1996).

En este estudio hemos observado que después de inocular la cepa Nagasaki por vía intratraqueal en cerdos privados de calostro, sin inmunización previa, se producía una

septicemia aguda o sobreaguda, que provocaba la muerte de todos los animales con un cuadro similar al descrito por Amano y cols (1997) (Tabla 26). La inmunización con una bacterina evitaba el desarrollo de la enfermedad al no observarse cuadros clínicos ni lesiones relevantes en el desafío, mientras que otras estrategias de inmunización, como la vacunación con la proteína recombinante TbpB-His, no pudieron cambiar la patogenia (con cuadros semejantes al de los animales no inmunizados) en ningún animal (Tabla 26):

Hecha la primera salvedad (infección de controles no inmunizados, con DL de *H. parasuis* serotipo 5, y desafío en animales inmunizados por medio de bacterinas y vacunas recombinantes) los resultados encontrados en el resto de grupos de cerdos privados de calostro después del desafío (animales inoculados con dosis subletal, o inmunizados con vacuna con OMPs) no fueron homogéneos (Tabla 26): En relación con esto, pueden considerarse algunas razones que podrían justificar los hechos, al menos en parte, como la posible influencia de factores derivados de la condición individual o de la propia técnica de inmunización e infección. En este sentido, en los animales inoculados con OMPs pudo influir su estado de salud, puesto que en uno de los cerdos se observó hipertermia y postración en los días previos a la infección. En el caso de los animales inoculados con la dosis subletal no pueden descartarse los efectos derivados del tratamiento con antibióticos y analgésicos que fueron administrados al grupo tras la aparición de sintomatología compatible con la infección por *H. parasuis* en algunos cerdos, y que pudieron haber contribuido a la eliminación del

agente antes de que se desarrollara una respuesta inmune adecuada.

Cuando se utilizaron cerdos convencionales inmunizados con bacterinas comerciales tampoco se observó un proceso patológico característico de una infección por *H. parasuis*, no obstante, a diferencia de lo ocurrido con los cerdos privados de calostro, desconocemos si estos animales presentaban algún tipo de inmunidad previa frente a *H. parasuis* (se criaron en contacto con sus madres, y como ya hemos citado este microorganismo puede transmitirse por contacto colonizando la mucosa nasal muy precozmente), por lo que no podemos asegurar que la protección frente al desarrollo de la enfermedad fuera conferida exclusivamente por las bacterinas (Tabla 26).

Respecto de la evolución del proceso se observaron diferencias entre los animales que murieron como consecuencia de la infección, pues aunque todos presentaron lesiones compatibles con un proceso septicémico, el cuadro clínico y lesional fue diferente en función de la evolución previsible. Así, sólo en los casos más agudos correspondientes a los animales que murieron durante las primeras 24 horas de los grupos no inmunizados o inmunizados con una vacuna recombinante, junto con los cerdos que murieron entre los 2 y 3 días de los grupos III y V, inmunizados por exposición a una dosis subletal y por medio de una vacuna con OMPs respectivamente, se encontró una depleción del tejido linfoide perioarteriolar en el bazo. Por otro lado, con el transcurso del tiempo se observó un aumento de la gravedad de la poliserositis (durante las primeras horas que siguieron a la infección sólo se observaban unos hilillos de fibrina, que

luego fueron reorganizándose a modo de membranas especialmente en el animal que murió a los 6 días) (Figura 23, Anexo 4) y también se puso de manifiesto la aparición de procesos degenerativos de los túbulos renales y de áreas de consolidación con neumonía exudativa, a diferencia de lo observado en las primeras 24 horas que siguieron a la infección, con lesiones de tipo vascular predominantemente. La presencia de lesiones articulares y nerviosas fueron menos frecuentes, y sólo se observaron en algunos animales, independientemente de la evolución de la enfermedad o del tipo de inmunización recibida.

Por el contrario, en los animales supervivientes no se observó ninguna lesión que se pudiera asociar directamente con la infección por *H. parasuis*, salvo en el grupo V, que había sido inmunizado por exposición a una dosis subletal, en el que los cerdos presentaron linfadenitis purulenta de los ganglios de la cabeza y de la tráquea, lo que podría estar relacionado con la inoculación de la bacteria en esa zona. Además, en uno de estos animales se observó meningitis purulenta que, como hemos visto, es uno de los procesos patológicos en los que se encuentra implicada esta bacteria

Los aislamientos microbianos encontrados después de una infección experimental con *H. parasuis* tanto en cerdos SPF (Miniats y cols., 1991) como en los privados de calostro (Blanco y cols., 2004) se caracterizaron por la obtención de un número abundante de colonias a partir de más de una localización orgánica (cerebro, cavidades torácica y abdominal, articulaciones y meninges). Sin embargo, en las infecciones

llevadas a cabo en animales que habían sido criados en forma convencional, frecuentemente se aislaron a partir de una localización única, con una menor concentración bacteriana (Blanco, y cols., 2004). Los cerdos vacunados previamente con bacterinas no ofrecieron resultados positivos en los aislamientos o estos fueron muy escasos (Miniats y cols., 1991 y Oliveira y cols., 2003).

En este estudio, en ninguno de los cerdos que sobrevivieron a la infección se pudo aislar la bacteria en el momento del sacrificio. Por el contrario, en todos los cerdos que murieron, independiente de si habían sido o no inmunizados previamente y del tipo de inmunización recibida, se confirmó la presencia de la bacteria en varios órganos. El número de aislamientos y su concentración bacteriana fue disminuyendo con el tiempo, de forma que a los 6 días se localizaron principalmente en las serosas, a pesar de que también se observaran lesiones en otros órganos. Estos hallazgos podrían asociarse a la acción del sistema inmune del cerdo, que determinaría la eliminación de la bacteria, o a una mayor supervivencia bacteriana en esas localizaciones, así se ha comprobado que la capacidad de crecimiento de *H. parasuis* está influida directamente por la cantidad de NAD y ésta varía en función de los órganos y tejidos (O' Reilly y cols, 2003).

Las lesiones observadas en estos animales y la distribución de los aislamientos de *H. parasuis* ayudan a interpretar la patogenia de la enfermedad. Así, podríamos predecir que como respuesta a la infección se produciría una alteración vascular con el aumento del calibre de los vasos, del flujo sanguíneo y de la permeabilidad para favorecer la llegada de

células inflamatorias a la zona de la infección, lo que explicaría la congestión y el edema que observamos en los distintos órganos. Se activaría el sistema de la coagulación y la liberación de fibrina para inmovilizar a la bacteria, lo que daría lugar a los finos hilillos que con el tiempo se reorganizan en membranas o bien forman microtrombos. La depleción del tejido linfoide y los corpúsculos esplénicos en el bazo serían indicativos de la leucopenia citada por Amano y cols. (1997), como consecuencia del shock endotóxico de los cerdos.

En la disnea observada tras la infección en todos los animales intervendrían las lesiones encontradas en pulmón, que fueron de tipo vascular en los cerdos que murieron durante las primeras horas, aunque con el paso del tiempo evolucionaron a una neumonía exudativa, con mayor cantidad de fibrina y células inflamatorias. La presencia de la bacteria en sangre, que se observó en los animales que murieron a las 24 horas, agravaría sin duda el curso de la enfermedad, facilitando una mayor adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio, cuyo resultado sería la coagulación intravascular diseminada, que explicaría las hemorragias y otras alteraciones sanguíneas observadas en estos animales, así como el fallo multiorgánico que condujo a su muerte. Debido a la similitud de estas lesiones con las descritas previamente por Amano y cols. (1997) se podría considerar que en la enfermedad y muerte del animal podría intervenir la endotoxina bacteriana, al ser una posible causa del shock endotóxico, en el que la sobreestimulación de la respuesta inmune contribuiría a la muerte de los animales.

#### 4. Respuesta humoral

Existen numerosas estructuras antigénicas en una bacteria frente a las que se induce la síntesis de anticuerpos, pero sólo las proteínas pueden provocar una respuesta inmune adaptativa. Otras estructuras, como los polisacáridos capsulares o la endotoxina determinan una respuesta de tipo timo independiente, sin memoria inmunológica. Los factores que influyen en la inmunogenicidad de una proteína son numerosos, como sus características moleculares (resultan mejor las proteínas complejas, particuladas y de un peso molecular grande), su dosis (es necesario elegir una dosis intermedia que no induzca tolerancia por exceso o por defecto), y la vía de administración (mejor las vías subcutánea e intramuscular) (Janeway y cols., 2000).

En este trabajo se recoge la evolución de los niveles de inmunoglobulinas séricas frente a antígenos de naturaleza proteica (sobrenadantes con OMP) y frente a los que constituyen la célula bacteriana completa, durante la inmunización y la posterior infección con una DL de la cepa Nagasaki, de *H. parasuis*. De esta forma, se consiguió caracterizar la cinética de la respuesta humoral y los tipos de inmunoglobulinas implicados. Este estudio, apoyado con los resultados del apartado anterior, facilitarán un mejor conocimiento del papel de los anticuerpos en la protección frente a la enfermedad, así como de la inmunogenicidad de los determinantes antigénicos que constituyen la bacteria.

Para realizar este estudio determinamos hacer una distinción entre los cerdos privados de calostro y los cerdos de cría convencional. Los primeros no habían estado en contacto con

*H. parasuis*, y por tanto, no podrían haber desarrollado inmunidad protectora; mientras que en el caso de los cerdos convencionales, desconocemos si habrían tenido oportunidad natural de exponerse al agente. Empezaremos discutiendo la respuesta de las inmunoglobulinas frente a las inmunizaciones, y una vez establecida, nos centraremos en la respuesta a la infección con una DL de *H. parasuis*.

##### 4.1. Cerdos privados de calostro

La respuesta de las inmunoglobulinas séricas frente a los antígenos de *H. parasuis* en estos cerdos, puso de manifiesto la existencia de diferencias importantes entre los animales que sobrevivieron y los que murieron después del desafío.

En los dos grupos en los que la mortalidad tras la infección con una DL fue del 100% (cerdos no inmunizados e inmunizados con una vacuna recombinante), no se observó seroconversión en ninguno de los cerdos; algo que era de esperar, en el caso del grupo que no había recibido inmunización. Una posible explicación a lo ocurrido con la proteína recombinante, sería el hecho de que sólo dos de los 11 anticuerpos monoclonales generados frente a esta proteína, reconocieron a la nativa (del Río, 2004). La ausencia de anticuerpos en estos cerdos después del desafío es comprensible debido al escaso tiempo transcurrido entre la infección y su muerte.

Continuando con el análisis de la respuesta humoral en los cerdos privados de calostro, se comprobó que la inmunización con una bacteria formulada con cepas de campo

de los serotipos 2, 4 y 5, inducía la producción de anticuerpos; estos reconocieron los antígenos de la cepa de referencia Nagasaki, del serotipo 5. Por tanto, se podría hablar de inmunidad cruzada entre esta cepa y las contenidas en la vacuna. Aunque los epitopos que inducen inmunidad en *H. parasuis* no están definidos, parecen ser específicos de serovar (Segalés, 1996), por lo que lo lógico sería pensar que existen epitopos comunes con la cepa del mismo serotipo empleada en la bacterina. Pero tampoco podríamos descartar las cepas de campo de los serotipos 2 y 4, puesto que ya se ha descrito que presentan reacciones cruzadas con respecto a la de Nagasaki (Rapp Gabrielson y cols., 1997; Takahashi y cols., 2001)

Las características cinéticas de la respuesta humoral, observadas con este protocolo de inmunización (bacterina con cepas de serotipos 2, 4 y 5), evidenciaron que era capaz de estimular el sistema inmune tanto frente a las OMPs como frente a los antígenos de la célula bacteriana completa. Así, después de la primera vacunación, se puso de manifiesto una respuesta primaria, con un incremento significativo inicial de las IgM, seguido por un aumento de las IgG (tanto las IgGt como los subisotipos IgG1, e IgG2); mientras que la revacunación indujo una respuesta secundaria, con un aumento temporal de las IgM, similar al de la primera inmunización, y una respuesta de las IgG más rápida y de mayor concentración, con la seroconversión de todos los animales (Figuras 27-31) (Tabla 31). Estos resultados concuerdan con otras investigaciones realizadas con bacterinas, como la de Miniats y cols. (1991) o la de Takahashi y cols. (2000), que también

observaron una respuesta mediada por anticuerpos frente a *H. parasuis*, principalmente después de la revacunación.

En el caso de la vacuna con OMPs, aunque la respuesta primaria fue similar a la descrita para la bacterina, sólo en los cerdos que sobrevivirían a la infección se puso de manifiesto la existencia de una respuesta secundaria adecuada, al ser los únicos animales seropositivos para las IgG (IgGt, IgG1 e IgG2) después de la revacunación (Figuras 32-36) (Tabla 36).

La presencia de anticuerpos en respuesta a la exposición a una dosis subletal se detectó una vez aparecieron los primeros síntomas clínicos, que pusieron de manifiesto el inicio de la respuesta innata frente a la infección (fiebre e inflamación). La cinética observada fue similar a la descrita en los otros dos grupos durante la respuesta primaria. A partir de los 21 días, los tres cerdos que sobrevivieron a la infección fueron seropositivos para las IgM y desde los 30 días, también para las IgG; lo que concuerda con lo descrito por Nielsen (1993) (Figuras 41 y 42) En cambio, en los cerdos de este grupo que después morirían como consecuencia de la infección, sólo se observó seroconversión con ambas inmunoglobulinas frente a los antígenos de la célula bacteriana inactivada, pero no frente a las OMPs (Figuras 41 y 42) (Tabla 41): Esto podría indicar que la inmunización de estos animales había resultado menos eficaz. Circunstancia que se pudo corroborar por medio del análisis de los subisotipos IgG1 e IgG2, puesto que ninguno de estos cerdos, a diferencia de los que sobrevivieron, resultó seropositivo (Figuras 42 y 44) (Tabla 41)

Por otro lado, en los animales supervivientes de estos dos últimos grupos a los que nos acabamos de referir (inmunización con una vacuna con OMPs y por exposición a una dosis subletal), pudimos determinar que las inmunizaciones inducían una respuesta frente a las OMPs, mediada principalmente por el subisotipo IgG1; y por los subisotipos IgG1 e IgG2, frente a la célula bacteriana completa (Figuras 34, 35, 42 y 44) (Tablas 36 y 41). Estos resultados podrían explicarse, si consideramos que otros autores han descrito que la respuesta frente a antígenos proteicos está mediada principalmente por las IgG1 (Meulebroek y Zeijlemaker, 1996; Janeway y cols., 2000).

La respuesta al desafío, tanto en los animales vacunados con una bacterina, como en los cerdos que sobrevivieron de los grupos inmunizados con una vacuna de OMPs y por exposición a una dosis subletal, se caracterizó por un incremento notable de las IgM y las IgGt. Ambas inmunoglobulinas presentaron los valores más elevados de todo el estudio, especialmente en el caso de las IgGt, a partir de los 8 días post-infección (Tablas 31, 36 y 41) (Figuras 27, 28, 32, 33, 41 y 42). En este incremento de la intensidad de la respuesta humoral, no podemos descartar la intervención de factores como la dosis antigénica, que pudo ser superior si consideramos que la bacteria podría haberse multiplicado en la tráquea, como habían indicado previamente Vahle y cols. (1997); o el hecho de que la inoculación de una bacteria viva, induce una respuesta inflamatoria más intensa y, por tanto, una mayor estimulación de las células que intervienen en la respuesta adaptativa. Hecha esta salvedad, este aumento de los niveles de

IgGt también sería característico de una respuesta secundaria o terciaria, y el incremento de las IgM, a su vez podría estar relacionado con la expresión de nuevos antígenos durante la infección, frente a los que el sistema inmune respondería por primera vez. Así, en cultivos *in vitro*, bajo unas condiciones que simulan lo que ocurriría en el hospedador, se ha demostrado la inducción de la expresión de antígenos bacterianos relacionados con procesos metabólicos (Melnikow y cols., 2005). Además, en el caso del grupo inmunizado con la bacterina, para la realización del desafío se empleó la misma cepa que la utilizada para tapizar los ELISA (cepa Nagasaki), por lo que podría darse el caso, de que esta cepa dispusiese de epítomos antigénicos diferentes a los de las cepas presentes en esta vacuna y por tanto, frente a los que se desarrollaría una respuesta primaria, mediada por las IgM.

Continuando con el estudio de la respuesta humoral tras la infección con una DL, observamos cómo la inducción de las IgGt resultó similar frente a ambos antígenos (OMP y bacteria inactivada) (Tablas 31, 36 y 41) (Figuras 28, 33, 42). En cambio, la respuesta de las IgM fue superior frente a las OMP, especialmente en los animales inmunizados por exposición a una dosis subletal y con la vacuna de sobrenadantes proteicos, en los que se alcanzaron DO superiores al doble del punto de corte (Tablas 31, 36 y 41) (Figuras 27, 32, 41). Estos resultados contribuirían a reforzar las hipótesis de otros autores sobre la gran inmunogenicidad de estas proteínas (Miniats y cols., 1991; Gerlach y cols., 1993; Goethe, y cols., 2001). En el grupo expuesto a una dosis subletal, los

niveles de las IgM siguieron aumentando progresivamente en los días post-infección, alcanzando un máximo a los 13 días (Tabla 41) (Figura 41), lo que podría asociarse al hecho de que en este grupo la respuesta inmune parecía seguir activa en el momento del sacrificio, ya que sus ganglios aparecieron tumefactos y reactivos, e incluso algún animal presentó un proceso inflamatorio a nivel del sistema nervioso.

La respuesta de los subisotipos IgG1 e IgG2 frente al desafío presentó una cinética similar a la descrita para las IgGt, alcanzándose valores en los días 8 y 13 post-infección, significativamente superiores a los de los días previos (Tablas 31, 36 y 41) (Figuras 29, 30, 34, 35, 43 y 44). La única excepción se observó con los cerdos inmunizados con una bacterina, en cuya respuesta frente a la bacteria inactivada intervinieron sólo las IgG2 (aunque frente a las OMPs sí participaron los dos subisotipos) (Tabla 31) (Figuras 29 y 30). Una posible explicación de estas diferencias sería el hecho de que las IgG1 se han relacionado con antígenos de naturaleza proteica, como las OMPs y las IgG2 con polisacáridos (Meulebroek y Zeijlemaker, 1996; Janeway y cols., 2000).

Si comparamos la respuesta al desafío entre los subisotipos de IgG, encontramos diferencias que podrían asociarse al tipo de inmunización recibida. Así, en el grupo vacunado con la bacteria inactivada, el subisotipo predominante tras la infección con una DL fueron las IgG2, cuya respuesta se observó tanto frente a las OMPs, como frente a la célula completa, (como hemos explicado previamente) (Tabla 31) (Figura 30). En cambio, en el caso de los cerdos inmunizados

con la vacuna de sobrenadantes proteicos o por exposición a una dosis subletal, la respuesta al desafío se caracterizó porque las IgG1 alcanzaron niveles más elevados y su respuesta se instauró de forma más rápida; puesto que desde los tres días post-infección, la DO superó al doble del punto de corte (Tablas 36 y 41) (Figuras 34 y 43). Si consideramos por un lado, que las IgG1 se inducirían principalmente frente a antígenos proteicos y las IgG2 frente a antígenos polisacáridicos, y por otro lado, que la vacuna de sobrenadantes está formulada con proteínas, y la bacterina, con células bacterianas completas (proteínas y además otras estructuras como polisacáridos); sería factible pensar que la inmunización con la primera vacuna contribuiría a que en la respuesta secundaria, inducida con el desafío, predominasen las IgG1, mientras que la bacterina estimularía también la de las IgG2. En el caso de la inmunización por exposición a una dosis subletal, la predominancia de las IgG1 podría correlacionarse con el hecho de que se inoculó la bacteria viva, que para su adaptación en el hospedador, podría haber expresado una serie de factores de virulencia, formados en gran parte por proteínas, tal y como se ha comprobado en estudios *in vitro* (Melnikow y cols., 2005).

No se encontraron diferencias significativas entre los índices de avidéz y afinidad de los días anteriores y posteriores a la infección, pero a partir de los 8 días post-infección, se observó un incremento de estos índices frente a la bacteria inactivada (Figuras 31, 36 y 45). Sin embargo, esto no ocurría con las OMPs, lo que podría relacionarse con el hecho de que se trata de unas proteínas, cuya



expresión, en algunos casos, está condicionada por factores relacionados con la supervivencia bacteriana dentro del hospedador, como por ejemplo, la cantidad de hierro disponible (Goethe y cols., 2001 y Melnikow y cols., 2005). De esta forma, sería factible que se hubiesen expresado en mayor cantidad o por primera vez después del desafío, y por tanto la avidéz no habría aumentado, al no haberse producido una inmunización previa frente a estos antígenos.

#### 4.2. Cerdos convencionales

La vacuna comercial A estaba formulada con la cepa 4800, perteneciente al serotipo 5 y su utilización indujo una respuesta de IgM y de IgG frente a los antígenos de la cepa Nagasaki. Por lo que se puede considerar la existencia de inmunidad cruzada entre ambas, lo que coincide con la hipótesis señalada por Segalés (1996), que afirma que los epitopos inmunógenos podrían ser específicos del serotipo. En cambio, la vacuna B contenía cepas de los serotipos 1 y 6, de las que de antemano, desconocemos si presentan o no inmunidad cruzada con la cepa de Nagasaki, al no existir bibliografía sobre el particular o al menos no haber sido descrito hasta la fecha.

El hecho de que ambas vacunas estuviesen formuladas con la célula bacteriana completa (bacterinas), pudo influir en la respuesta observada después de la primera vacunación, puesto que principalmente se observó un incremento de las IgM en el ELISA con la bacteria inactivada, y en menor medida, frente a los sobrenadantes con OMP (Tablas 46 y 51) (Figuras 46 y 51). Por otro lado, también podría haber influido la existencia de memoria

inmunológica previa frente a estas proteínas, ya que en algunos animales, especialmente en los que recibieron la bacterina B, sí se observó, una respuesta de las IgGt frente a las OMPs (Tablas 46 y 51) (Figuras 47 y 52), siendo ésta la inmunoglobulina mayoritaria en las respuestas de memoria. Esta última hipótesis adquiere importancia, si consideramos que se trata de proteínas muy conservadas dentro de la familia *Pasteurellaceae* (del Río, 2004), y que además, desconocemos si estos cerdos habían estado en contacto con el agente durante el periodo de tiempo que permanecieron con sus madres.

La revacunación implicó un incremento en los niveles de IgM, similar al de la primera vacunación y siguió sin observarse respuesta frente a las OMPs en los cerdos inmunizados con la bacterina B (Tablas 46 y 51) (Figuras 46 y 51). Sin embargo, los cambios más importantes en los dos grupos de animales se observaron para las IgGt, tanto frente a los antígenos de la célula bacteriana completa como frente a las OMPs, encontrándose seroconversión en todos los cerdos y una concentración media superior al punto de corte (Tablas 46 y 51) (Figuras 47 y 52). Estos resultados, al igual que los descritos previamente en los cerdos privados de calostro, indicarían que tras la revacunación, se estaría induciendo una respuesta secundaria adecuada.

La cinética de la respuesta de los subisotipos IgG1 e IgG2 resultó similar a la de las IgGt, como era de esperar (Tablas 46 y 51) (Figuras 48, 49, 53 y 54). No obstante, en el caso del grupo inmunizado con la bacterina B, la respuesta de las IgG2 frente a la célula completa se inició de forma más temprana y los niveles, aunque seguían siendo superiores a

los del día inicial, fueron descendiendo progresivamente después de la revacunación.

La infección con una DL determinó un incremento de la concentración de IgM e IgG en los dos grupos de cerdos criados con sus madres (Tablas 46 y 51) (Figuras 46, 47, 51 y 52). Esto podría relacionarse con las mismas causas a las que nos referimos para los cerdos privados de calostro (dosis antigénica, mayor inducción de la respuesta al ser una bacteria viva, etc...). De nuevo, se podría considerar la existencia de memoria inmunológica, puesto que la respuesta más importante correspondió a las IgGt, especialmente a partir de los 8 días, con concentraciones máximas de estas inmunoglobulinas significativamente superiores a las de los días previos.

En lo referente a la respuesta de los subisotipos IgG1 e IgG2 frente a la infección, se observó la ausencia de cambios importantes en sus concentraciones, que presentaron valores similares a los registrados en los días que siguieron a la revacunación (Tablas 46 y 51) (Figuras 48, 49, 53 y 54). La única excepción se observó con las IgG2 frente a la bacteria inactivada, puesto que sí se incrementaron después del desafío, alcanzando niveles significativamente superiores a los de los días previos. Por tanto, se podría considerar que en estos dos grupos de animales, inmunizados con bacterinas, la respuesta más notable después el desafío correspondería al subisotipo IgG2; algo que ya se había observado y discutido en el grupo II de cerdos privados de calostro, también inmunizado con este tipo de vacunas.

Los índices de avidéz y afinidad no presentaron diferencias significativas durante

todo el estudio. En el caso del grupo inmunizado con la bacterina A, se observó como su valor se fue incrementando progresivamente, aunque descendió al final del ensayo (13 días post-infección); por lo que no es posible afirmar con rotundidad, que se haya producido un aumento avidéz y afinidad después de la infección (Figuras 50 y 55).

### 4.3. Comparación entre grupos

#### 4.3.1. IgM

La respuesta de IgM frente a las OMPs en el grupo inmunizado con una dosis subletal fue significativamente diferente a la de los otros grupos de cerdos privados de calostro: comenzó más tarde, resultó más duradera e, incluso después del desafío, la DO fue más elevada que en el resto de los grupos. En estos resultados pudo haber influido el hecho de que se utilizara un inóculo vivo para la inmunización, que pudo multiplicarse, como ya ha sido demostrado por Vahle y cols. (1997), dando lugar a una estimulación constante y más fuerte del sistema inmune, que podría explicar la mayor intensidad y duración de la respuesta en estos animales. En el caso de los cerdos criados de forma convencional, ambos grupos presentaron DO más elevadas que el resto en el día inicial, especialmente el grupo inmunizado con la bacterina comercial A. Por otro lado, mientras que en este último grupo se observó seroconversión durante varios días antes del desafío, en el otro (bacterina B) la respuesta de esta inmunoglobulina se indujo prácticamente después de la infección (Tabla 52 A)

Al igual que para las OMPs, el grupo inmunizado por exposición a una dosis subletal presentó una respuesta de IgM frente a la célula completa más duradera. Sin embargo, después de la infección no se observaron diferencias con los otros grupos. De esta forma, las únicas diferencias significativas se encontraron entre los grupos inmunizados con una bacterina y con una vacuna comercial B, puesto que el primero, ya desde el inicio, presentó DO más elevadas, lo que se acentuó todavía más después del desafío (Tabla 52 B).

#### 4.3.2. IgGt

Por lo que se refiere a la respuesta frente a las OMPs, sólo en los grupos inmunizados mediante una bacterina de elaboración propia y la vacuna comercial B, se detectó la presencia de esta inmunoglobulina antes de la revacunación; siendo los lotes en los que se presentó una DO media más elevada antes del desafío, lo que podría explicar las diferencias significativas que presentaban con el resto de los grupos. Estos resultados indicarían que ambas bacterinas son buenas inductoras de una respuesta humoral mediada por las IgG, aunque en el caso del segundo grupo, al tratarse de cerdos convencionales, no podemos descartar que influya la posible existencia de una memoria inmunológica previa, derivada de haberse criado en contacto con las madres. Además, en las diferencias referidas al lote que se inmunizó por medio de la vacuna formulada con OMPs, también pudo influir el hecho de que en este grupo no hubiera seroconversión en todos los animales antes del desafío (sólo en los supervivientes), y que en respuesta a éste,

se presentasen DO más elevadas, que en el resto de los grupos del estudio (Tabla 53 A).

En cuanto a la respuesta de las IgGt frente a los antígenos de la célula bacteriana completa, nuevamente observamos que la inmunización con una vacuna formulada con OMPs no determinaba seroconversión en todos los animales. Además, la DO alcanzada por este grupo después del desafío era superior cuando se comparaba con el resto; salvo con el grupo inmunizado con la bacterina comercial B. Estas evidencias son de gran importancia para comprender por qué los grupos anteriores no presentaban diferencias significativas entre sí, pero sí con el resto de lotes que componían este estudio (Tabla 53 B).

Si analizamos los resultados para las IgGt en su conjunto, podemos deducir que las diferentes estrategias de inmunización empleadas en este trabajo, inducen seroconversión en todos los cerdos, salvo en el caso de la vacuna formulada con OMPs. En respuesta a este tipo de inmunización, sólo los cerdos que posteriormente sobrevivieron al desafío fueron seropositivos. En estos cerdos se observó una buena respuesta tras el desafío, con un incremento notable de la DO, incluso superior al observado en otros grupos. Esto llevaría a pensar que las OMPs contenidas en la vacuna, son capaces de inducir una adecuada inmunidad que asegure que en futuros contactos con la bacteria y sus antígenos, la respuesta humoral sea más notable y se instaure de forma más rápida, con las IgG como inmunoglobulinas predominantes. No podemos descartar que se hubiese producido algún tipo de interferencia en el proceso de inmunización de los animales que murieron

tras la infección, que no permitiera que en ellos la inmunidad se desarrollara correctamente.

#### 4.3.3. IgG1

Al igual que para las IgGt, se observó seroconversión con IgG1 en todos los grupos, generalmente después de la revacunación y hasta el final del estudio; con la excepción del grupo inmunizado con la bacterina comercial B, que no presentó un nuevo incremento de la DO en los días 8 y 13 post-infección, con respecto a los días anteriores. Esto podría determinar las diferencias significativas encontradas entre este grupo y el resto (Tabla 54)

Por otro lado, hay que destacar también, que el grupo II, inmunizado con una bacterina de elaboración propia, ya desde el comienzo presentó valores superiores, y además, al igual que lo descrito para las IgGt, se observó seroconversión antes de la revacunación, lo que explicaría las diferencias encontradas entre este grupo y el resto. Estas divergencias resultaron especialmente evidentes cuando se comparó con los grupos inmunizados con una vacuna de sobrenadantes proteicos y por exposición a una dosis subletal, en los que sólo se observó seroconversión en algunos animales (los que sobrevivieron a la infección). Una vez tuvo lugar el desafío, las DO más altas correspondieron a los cerdos inmunizados con la vacuna de sobrenadantes proteicos, lo que podría ser otro factor que justificase sus diferencias con el grupo inmunizado con la bacterina de elaboración propia (Tabla 54 A).

La respuesta de IgG1 frente a la célula bacteriana completa, presenta similitud con la

observada frente a las OMPs: se observa seroconversión después de la revacunación en todos los grupos, salvo en los inmunizados con una vacuna con OMPs y por exposición a una dosis subletal, en los que este fenómeno sólo se producía en los cerdos supervivientes. De nuevo, fueron estos cerdos, los que después del desafío presentaron incrementos más notables de la DO, especialmente con respecto al grupo inmunizado con la bacterina A, que presentó DO significativamente más bajas durante todo el estudio (Tabla 54 B).

Si analizamos estos resultados en conjunto, podemos determinar que sólo las inmunizaciones con bacterinas logran seroconversión para las IgG1 en el 100% de los animales. Sin embargo, en respuesta al desafío, estos cerdos presentaron una respuesta de IgG1 menos notable que la observada en los animales inmunizados por medio de una vacuna con OMPs o mediante exposición a una dosis subletal. Estas evidencias indicarían que como consecuencia de estas dos inmunizaciones, en los futuros contactos con el antígeno, se habría inducido el desarrollo de una buena respuesta secundaria, mediada por las IgG1. El hecho de que este fenómeno sólo se observase en algunos animales, concretamente en los cerdos que sobrevivieron a la infección, nos lleva a pensar en la posible existencia de interferencias durante los procesos de inmunización, que impedirían el desarrollo de respuesta completa.

#### 4.3.4. IgG2

Respecto de las IgG2, sólo los animales inmunizados con bacterinas seroconvirtieron antes del desafío, lo que podría ser la clave

para entender por qué presentaron diferencias significativas con los otros dos grupos. De nuevo, en el caso del grupo II, inmunizado con una bacterina de elaboración propia, la respuesta se empezó a observar antes que en el resto, pero además, también presentó DO más elevadas que los dos grupos inmunizados con bacterinas comerciales (Tabla 35)

Por otro lado, el incremento que se observó en el grupo inmunizado con una dosis subletal, resultó superior al observado en el grupo de la vacuna con OMPs, lo que podría estar relacionado con el hecho de que esta vacuna estuviera formulada con proteínas que, como hemos explicado previamente, inducen una respuesta principalmente mediada por IgG1 en detrimento de IgG2 (Tabla 35)

Con respecto a las células bacterianas completas, la respuesta se mantuvo similar en todos los animales, no obstante la inducción de este subisotipo se produjo de forma más temprana, cuando los cerdos se inmunizaron con la bacterina de elaboración propia. Además, tras el desafío, el incremento y las DO alcanzadas por este grupo fueron superiores, lo que podría ser la clave para comprender las diferencias significativas que presentaba con el resto. Todos estos datos indicarían que esta bacterina inducía una respuesta de IgG2 más notable, en lo que quizás podría influir la naturaleza de los antígenos de la vacuna, como hemos comentado con anterioridad (Tabla 35).

#### 4.3.5. Índice de avidéz y afinidad de la IgGt

El valor medio de la avidéz de las IgGt frente a las OMPs a largo de todo el estudio,

fue superior para los grupos inmunizados con la bacterina de elaboración propia (grupo II) y con la vacuna comercial A (grupo VI); especialmente en el primer caso, en el que se registraron los valores más elevados, incluso desde el comienzo del experimento. Por lo que estas diferencias podrían entenderse más allá e independientemente de los procesos de inmunización o infección. En el caso del grupo inmunizado con la vacuna comercial A, la avidéz más alta se observó después del desafío, pero incluso antes del mismo, ya se habían registrado valores superiores a los de los grupos inmunizados con la vacuna con OMPs, o con el producto comercial B.

Si se comparan los resultados de avidéz de las IgGt que reconocían los antígenos de la célula bacteriana completa (ELISA-in), se observa cómo los índices correspondientes a los animales de cría convencional fueron superiores a los de los cerdos criados sin calostro, e incluso más elevados que los establecidos frente a las OMPs. Esto puede deberse a que la avidéz para unirse a antígenos multivalentes, como los que se encuentran en la bacteria completa (cápsula, flagelos...), es superior con respecto a las proteínas (Janeway y cols., 2000). Así mismo, el hecho de que los valores más elevados se encontrasen, ya desde el inicio del estudio, en los dos grupos de cerdos criados de forma convencional, podría relacionarse con la posibilidad que estos animales hubiesen podido inmunizarse previamente por contacto con sus madres. Por tanto, la respuesta observada, correspondería a una respuesta de memoria, que llevaría asociada un incremento de la afinidad y avidéz de las IgGt.

En la mayoría de los estudios consultados se ha relacionado directamente la presencia de anticuerpos y la condición de protección frente a la enfermedad (Nielsen y cols., 1975; Rapp-Gabrielson, 1994; Nielsen, 1993; Solano-Aguilar, y cols., 1999; Blanco y cols., 2004), e incluso se ha sostenido que aunque los anticuerpos no impiden la colonización bacteriana sí dificultan su diseminación (Solano-Aguilar y cols., 1999). Se han utilizado antígenos como el LPS y las OMPs (frente a los que se ha demostrado la presencia de anticuerpos tras la infección) para generar anticuerpos monoclonales en ratón, comprobándose que reducen la invasión de la bacteria y favorecen su eliminación. Además en el caso del primeros, también son capaces de neutralizar el LPS, evitando la endotoxemia (Tadjine y cols., 2004). En este trabajo no se ha estudiado el mecanismo de acción de los

anticuerpos detectados; no obstante, sobre la base de los resultados a los que nos acabamos de referir, se podría afirmar que también hemos encontrado una cierta relación entre la inmunidad humoral mediada por anticuerpos y la protección frente a la enfermedad. Así, hemos observado que en los grupos con una mortalidad tras el desafío del 100%, no se producía seroconversión en ninguno de los animales, ni frente a las OMP ni frente a los antígenos de la bacteria completa. Además, cuando comparamos la respuesta en los cerdos que, dentro de un mismo grupo, murieron o sobrevivieron tras la infección, observamos que los primeros no seroconvirtieron ni para las IgG1 ni para las IgG2 y sólo en algunos casos para las IgGt; mientras que todos los que sobrevivieron fueron seropositivos y además presentaron un importante aumento de la DO tras el desafío.

## 5. Respuesta celular

Existe escasa información acerca de la interacción de las células del sistema inmune y *H. parasuis*. En algunos estudios, como el de Amano y cols (1997) se determinó que los procesos septicémicos ocasionados por este agente llevaban asociada una leucopenia entre las 24 y 40 horas. Müller y cols (2003), por su parte, describieron que en algunos animales se producía la reducción del porcentaje de linfocitos que expresaban el receptor CD25 (para la IL-2) y de la actividad fagocítica de los monocitos, mientras que la de los neutrófilos se mantenía en niveles muy variables.

Considerando estos antecedentes, nos ha parecido de interés plantear el estudio de la evolución de los porcentajes relativos de expresión de marcadores leucocitarios representativos dentro del sistema inmune porcino, tanto durante los diferentes protocolos de inmunización utilizados, como después de la infección con una DL de la bacteria (desafío). Solamente en el caso del grupo inmunizado con una vacuna recombinante, en el que todos los animales murieron durante las primeras 24 horas que siguieron a la infección, no se pudo llevar a cabo el estudio completo, por razones obvias.

### 5.1 Cambios observados en las poblaciones celulares periféricas en el curso de la inmunización y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

Los análisis relativos a las características de tamaño y complejidad de los leucocitos mostraron cómo después de la infección con una DL, tenía lugar un aumento del número de

células localizadas en las regiones R2 y R3, correspondientes a granulocitos y monocitos, respectivamente (Figuras 56-62). Estos cambios eran independientes del tipo de inmunización recibida, ya que se observaron en todos los grupos de animales, inmunizados o no, lo que haría pensar en su relación con una respuesta inespecífica, que como es sabido, implica la llegada de células inflamatorias al foco de infección, primero neutrófilos y luego monocitos. Estas células producen citocinas inflamatorias y quimiocinas, con la consiguiente atracción de nuevas oleadas de células fagocíticas (Roitt y cols., 1989; Janeway y cols., 2000).

Cómo estas células se caracterizan por presentar el antígeno SWC3, analizamos su porcentaje relativo de expresión en los leucocitos de la sangre periférica y confirmamos un incremento en todos los grupos tras el desafío, lo que también ocurrió con la ratio entre los porcentajes de expresión de SWC3 y CD3 (linfocitos T) (Tablas 56- 65). El aumento más notable se produjo a los 6 días post-infección en el animal que no había recibido inmunización previa. Este cerdo presentó una importante respuesta inflamatoria, tal y como se confirmó mediante el cuadro clínico y lesional, y en la que, por tanto, jugarían un papel importante los monocitos y granulocitos.

### 5.2. Evolución de los linfocitos en el curso de la inmunización y posterior infección con una DL de *H. parasuis*

Desde el comienzo del estudio hasta el momento del desafío, no se observaron cambios significativos en ninguno de los

grupos en respuesta a las inmunizaciones (Tabla 67). Appleyard y cols. (2002) habían descrito resultados similares después de inmunizar frente a *A. pleuropneumoniae* con una bacterina o con la exposición a una dosis subletal de la bacteria.

Una vez tuvo lugar la infección con la DL, las diferencias más importantes, en todos los grupos, se encontraron en la relación entre los antígenos CD3 y  $\alpha$ IgM, característicos de los linfocitos T y B, respectivamente, así como en sus porcentajes de expresión relativos. La ratio CD3/  $\alpha$ IgM descendió tras el desafío en todos los animales, pero sólo lo hizo de forma significativa en los grupos de cerdos privados de calostro (grupos I, II, III y V). Este descenso fue debido al aumento del porcentaje de  $\alpha$ IgM y a la disminución de la expresión de CD3. Así, el porcentaje de  $\alpha$ IgM se incrementó significativamente a los 6 días en todos los grupos, pero sólo en los grupos inmunizados con una bacterina y por exposición a una dosis subletal, estas diferencias persistieron al cabo de 13 días. La expresión del antígeno CD3 también se modificó después de la infección (especialmente en el único cerdo superviviente del grupo I), pero no de forma tan marcada como el antígeno  $\alpha$ IgM, ya que sólo se observó un descenso significativo en el grupo expuesto a una dosis subletal, y en los lotes vacunados con la bacterina de elaboración propia y la bacterina comercial A (Tabla 67) (Fig 1-7, Anexo IV).

Los cambios más notables hallados en este estudio, con respecto a los porcentajes relativos de estas dos subpoblaciones linfocitarias, a las que nos acabamos de referir, correspondieron al cerdo del grupo I (sin inmunización), que presentaba un proceso

septicémico agudo en el momento en el que se realizó el muestreo (Tabla 67) (Figuras 1-7, Anexo IV). Estos resultados coinciden con lo observado durante las septicemias provocadas por patógenos humanos, como *Neisseria* spp o *Haemophilus influenzae* (Holub y cols., 2003); en las que también se han descrito un aumento del número de linfocitos B, relacionado con la transición de la respuesta inmune innata a la adaptativa, y una disminución transitoria de los linfocitos T. Esta se asoció a la liberación de determinados mediadores, durante la fase aguda de la infección, que en nuestro caso, fue especialmente acusada para este cerdo del grupo I.

Por otro lado, durante todo el estudio, los porcentajes de expresión relativos de  $\alpha$ IgM en los cerdos de cría convencional fueron significativamente superiores a los de los cerdos privados de calostro, al contrario que los porcentajes de CD3 y el ratio CD3/ $\alpha$ IgM (Tabla 68) (Figuras 1-7, Anexo 4). Esto podría relacionarse con la infección por PRRS que presentaron estos cerdos, al haberse confirmado que este virus provoca una activación policlonal de los linfocitos B (Lamontagne, L., 2001). También se encontraron diferencias significativas entre los grupos de cerdos privados de calostro: los grupos II y V, inmunizados con una bacterina y por exposición a una dosis subletal, respectivamente, difirieron respecto al grupo inmunizado con una vacuna formulada con OMPs (Tabla 68). En estas diferencias pudo influir el hecho de que en este último grupo, el efecto de la infección sobre los LT y LB no fuese tan marcado y, a diferencia de los grupos II y V, a los 13 días post-infección, tanto la



ratio como los dos marcadores habían recuperado sus valores normales.

Al igual que lo descrito previamente por Kijhler y cols., (1997) en infecciones con *P. multocida* y por Faldyna y cols., (2005) con *A. pleuropneumoniae*, en ninguno de los grupos de nuestro estudio se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos que expresaban los antígenos CD4<sup>+</sup> y CD8α<sup>+</sup> y que, por tanto, también expresaban el marcador CD3<sup>+</sup>. (Tabla 67) (Figuras 1-7, Anexo IV). Tampoco se encontraron diferencias en el porcentaje de linfocitos doble positivos (CD4<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup>), ni en el de linfocitos citotóxicos (CD8α<sup>+</sup>CD8β<sup>+</sup>), o en el de los linfocitos con un fenotipo CD8α<sup>+</sup>CD8β<sup>-</sup> (Tabla 67) (Figuras 1-7, Anexo IV), entre los que se incluyen los linfocitos γδ, las células NK, y los linfocitos dobles positivos. Con respecto a las ratios, Appleyard y cols. (2002) han asociado el aumento de la relación CD4/CD8, con la protección frente a una infección por *A. pleuropneumoniae*. En nuestro caso, este valor sólo descendió de forma significativa en el animal del grupo I que murió a los 6 días, sin observarse diferencias significativas en el resto de los grupos inmunizados, en los que todos o una parte de los animales sobrevivieron a la infección. No pudimos calcular esta ratio en los cerdos que murieron antes de los 6 días, especialmente en el grupo inmunizado con una vacuna recombinante, en el que todos los animales murieron a las 24 horas, por lo que no fue posible averiguar si en ellos también habría disminuido la ratio, y de esa forma, saber si hubiera existido relación entre este descenso y la protección frente a la enfermedad.

Cuando comparamos los grupos inmunizados, no encontramos diferencias en la

ratio CD4/CD8, ni tampoco en el porcentaje de linfocitos CD8α<sup>+</sup>CD8β<sup>+</sup>, o en la ratio CD8α<sup>+</sup>CD8β<sup>+</sup>/CD8α<sup>+</sup>, pero sí en los porcentajes de expresión de los antígenos CD4, CD8α, y en la proporción y ratios obtenidas a partir de los linfocitos dobles positivos (Tabla 68). Generalmente, estas diferencias se observaron desde el comienzo del estudio hasta su final; lo que unido al hecho de que no se encontrasen cambios significativos en ninguno de estos grupos, como consecuencia de la infección o la inmunización, nos llevaría a pensar que la causa de estas desigualdades estaría más relacionada con diferencias individuales entre los animales, que con una respuesta frente a *H. parasuis* o alguno de sus antígenos.

Tampoco se observó el efecto de la inmunización y de la infección en la activación de los linfocitos en sangre, puesto que ni el porcentaje de expresión del marcador CD25, característico de linfocitos T activados (entre otras células), ni el del marcador 2E3, que se expresa en linfocitos T vírgenes, presentaron diferencias significativas durante todo el estudio (Tabla 67) (Figuras 1-7, Anexo IV). La excepción fue el grupo inmunizado con una bacterina, en el que la expresión de ambos antígenos aumentó después del desafío. Sin embargo, la ratio entre ambos no experimentó cambios significativos, por lo que no podríamos afirmar que el desafío ejerciese un efecto estimulador sobre una de estas dos subpoblaciones de LT, en detrimento de la otra.

Cuando comparamos la expresión de estos marcadores y la ratio CD25/2E3 entre los grupos inmunizados, al igual que con los antígenos CD4 y CD8, observamos que los porcentajes de expresión relativos y la ratio

diferían en algunos grupos, pero también desde el inicio del estudio, por lo que tampoco podríamos relacionar estas diferencias exclusivamente con los procesos de inmunización e infección (Tabla 68).

El hecho de que apenas se encontraran diferencias en las subpoblaciones leucocitarias en la sangre periférica, se puede explicar si consideramos que sólo el 2% de los linfocitos T se encuentra en sangre; además, los procesos de presentación antigénica no se realizan en el compartimiento vascular y la multiplicación bacteriana también tiene lugar en otros órganos (Diez, 2006). Por lo que sería necesario estudiar las subpoblaciones linfocitarias en los órganos linfoides y órganos diana para la bacteria (Diez, 2006). En infecciones experimentales por *A. pleuropneumoniae* (Faldyna y cols., 2005) o *P. multocida*, (Kijhler y cols., 1997), aunque no se encontraron diferencias significativas en la evolución de las subpoblaciones linfocitarias en sangre, sí se obtuvieron en el pulmón y ganglios linfáticos regionales, gracias a lo que se pudo determinar las subpoblaciones que respondían a la infección y las diferencias dependientes del estado de inmunización. Las infecciones por *H. parasuis* no resultan tan localizadas como las producidas por estas bacterias y normalmente se distribuyen por todo el organismo, dando lugar a un proceso septicémico, como observamos en este estudio; por lo que la elección de un sólo órgano diana y los ganglios o el tejido linfoide próximo, sería insuficiente para valorar la evolución de estas subpoblaciones. Con estos precedentes, sería conveniente llevar a cabo nuevos estudios *in vivo* (infecciones experimentales) para valorar

esta respuesta en diversos órganos (bazo, pulmón, MALT...).

### 5.3. Proliferación de leucocitos de sangre periférica en respuesta a *H. parasuis* y sus antígenos

Los ensayos de proliferación celular se llevaron a cabo a partir de sangre completa con el fin de no eliminar moléculas como citocinas, proteínas, hormonas, etc., que podrían influir en la actividad celular. En todos los cerdos se observó que las preparaciones con *H. parasuis* inactivado por calor inducían proliferación leucocitaria de nivel superior a la observada con las OMPs (Figura 63). Una posible explicación de estos resultados residiría en el hecho de que entre los antígenos que componen la bacteria se encuentra el lipoligoosacárido, un antígeno timo-independiente que determinaría una activación policlonal de las células B, sin necesidad de colaboración por parte de células T activadas. Esto explicaría lo ocurrido en nuestro caso, al tratarse de sangre procedente de cerdos SPF, y que por tanto, suponemos que no mantuvieron un contacto previo con el antígeno.

La respuesta proliferativa que se indujo con la preparación que contenía la proteína recombinante TbpB-His, presentó valores similares a los observados con la bacteria inactivada (Figura 63), pero en esta preparación (tal y como puso de manifiesto su análisis por SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie) aparecían otras bandas proteicas (del Río, 2004), que también habrían podido intervenir en la respuesta proliferativa.

## 6. Respuesta de fase aguda

La respuesta de fase aguda implica una serie de procesos metabólicos, endocrinos y fisiológicos, entre los que se incluyen los cambios en los niveles plasmáticos de determinadas proteínas. Estas proteínas se han utilizado en numerosos estudios para monitorizar la inflamación y la respuesta de fase aguda (Hulten y cols., 2003), dado que sus concentraciones se modifican rápidamente, en una magnitud y duración comparables a lo observado en los modelos bioquímicos de inflamación inducida (González-Ramón, 1997). Además, la duración e intensidad de estos cambios coincide con las características y manifestación de los síntomas clínicos (Hulten y cols., 2000).

En el cerdo, entre las proteínas plasmáticas que experimentan una inducción durante la respuesta de fase aguda se incluyen la haptoglobina (HPT), la proteína C-reactiva (CRP) y la pig MAP. Recientemente, se ha descrito una proteína de fase aguda negativa, la apolipoproteína A-I, cuya concentración disminuye en infecciones experimentales y en inflamaciones inducidas (Carpintero y cols., 2005).

En este estudio hemos evaluado la respuesta de fase aguda mediada por estas cuatro proteínas en cerdos privados de calostro y cerdos criados de forma convencional, después de la infección con una DL de *H. parasuis*. Además hemos valorado y comparado la influencia que ejercería una inmunización previa, sobre el desarrollo de la misma. No pudo estudiarse la respuesta de fase aguda en el grupo inmunizado con una vacuna recombinante, puesto que todos los animales

murieron a las 24 horas, por tanto antes de que se realizara la primera medición. La única evidencia de la que pudimos disponer, para comprobar que esta respuesta se estaría iniciando, fue la hipertermia observada a las 12 horas en los cinco cerdos de este grupo (Anexo II).

### 6.1. Caracterización de la respuesta de fase aguda

Tomamos los cerdos privados de calostro que no habían sido inmunizados, como referencia para estudiar la respuesta de fase aguda frente a la infección con *H. parasuis*, y una vez establecimos sus características, se valoró el efecto de las inmunizaciones sobre su desarrollo e intensidad. Finalmente se realizó un estudio comparativo entre los distintos tipos de inmunización.

En estos animales, sin inmunización previa, se produjo un proceso septicémico que evolucionó de forma sobreaguda, por lo que sólo pudieron anotarse los cambios en las proteínas de los cerdos que sobrevivieron durante 2 y 6 días, respectivamente. El que murió a los 3 días presentó variaciones importantes de todas las proteínas a las 24 horas, especialmente de la CRP y la pig MAP (Figuras 64-66).

Mención especial merece el animal que sobrevivió 6 días, pues proporcionó información mucho más abundante. Este animal presentó variaciones significativas en los niveles de las cuatro proteínas comparadas, desde el día 1 hasta el día de su fallecimiento, que se pudieron relacionar con los distintos momentos de su evolución clínica y

anatomopatológica (Figuras 64-67). De hecho, la respuesta de estas cuatro proteínas progresó de forma paralela a la propia enfermedad, algo que ya había sido observado por otros autores con bacterias próximas, como el *A. pleuropneumoniae* (Hulten C., 2000 y 2003). La CRP y la apolipoproteína A-I respondieron de forma más rápida, puesto que desde las primeras 24 horas, se observaron los cambios más importantes en sus concentraciones con respecto al día del desafío. Mientras la pig MAP y la HPT ofrecieron una respuesta más lenta, y aunque en el primer día ya se encontrasen incrementos significativos en sus niveles plasmáticos, la respuesta no alcanzó su intensidad máxima hasta el tercero. Tanto en el cerdo como en otras especies, se considera que la CRP es una proteína de fase aguda de tipo I, o de primera línea, inducida por la IL-1 y la IL-6, con una respuesta que se caracteriza por un inmediato incremento, seguido de una rápida normalización de su concentración (Baumann and Gauldie, 1994; Ramadori and Christ, 1999). Mientras que la HPT y la pig MAP se consideran proteínas de tipo II, estimuladas por la IL-6, y con una respuesta que se inicia de forma más tardía, pero es más duradera (Ramadori and Christ, 1999; Gonzalez-Ramón y cols., 2000). Heegaard y cols. (1998), en el caso de la CRP y Hulten y cols. (2000-2003), en el de la HPT, habían descrito resultados similares a los nuestros en infecciones experimentales con *A. pleuropneumoniae*. Los primeros autores observaron que la respuesta de la CRP era más rápida que la de la pig MAP, y los segundos que la respuesta de la HPT se producía más retardada que la de otras proteínas, pues hasta el 4º día post-infección su concentración no alcanzaba el valor máximo. En un estudio reciente, Sorensen y cols (2006)

observaron una cinética similar a la nuestra para estas cuatro proteínas, en infecciones experimentales con *S. suis*, y clasificaron la Apolipoproteína A-I y la CRP como “respondedoras tempranas” (*early responders*), y la Pig MAP y la HPT, como “respondedoras prolongadas” (*protracted responders*).

Por otro lado, los incrementos relativos de las proteínas de fase aguda positivas que encontramos en este animal que sobrevivió 6 días, fueron similares a los observados en un proceso inflamatorio inducido mediante la inoculación de trementina (20 -30 veces para la pig-MAP, 4-10 veces para la HPT y 8-12 veces para la CRP) (González-Ramón, 1997), lo que podría indicar que la variación de estas proteínas se encuentra asociada con la respuesta inflamatoria consecuente a la infección.

La inmunización de cerdos privados de calostro con una bacterina de elaboración propia redujo la duración de la respuesta de fase aguda frente a la infección con *H. parasuis*, puesto que la variación más importante en la concentración de las cuatro proteínas se encontró a las 24 horas y a partir de ese momento, sus niveles tendieron a recuperarse (Figuras 68-71). Así, en este grupo de animales, volvimos a observar la coincidencia entre la presentación de esta respuesta y la de los síntomas clínicos, puesto que ambos se pusieron de manifiesto casi exclusivamente durante las primeras 24 horas que siguieron a la infección.

Al igual que en el aspecto de la duración, la intensidad de la respuesta en los cerdos inmunizados con una bacterina también disminuyó: la media de las concentraciones de

las proteínas de fase aguda positivas (pig-MAP, haptoglobina, y CRP), después de la infección, fue siempre superior en el cerdo no inmunizado, mientras que la media de Apolipoproteína A-I (fase aguda negativa) resultó menor. Puesto que la gravedad y extensión de las lesiones también fueron menores en este grupo de animales (sólo se encontraron pequeños focos de neumonía exudativa), de nuevo podemos destacar la existencia de una cierta relación entre la evolución de la enfermedad y la de este tipo de respuestas.

Estas evidencias se corroboran con los resultados obtenidos en los cerdos inmunizados con una vacuna formulada con OMPs, y en los criados de forma convencional inmunizados con bacterinas comerciales (Figuras 72-75). En los primeros, además se apreciaron diferencias dentro del mismo grupo, puesto que la vacuna con OMPs sólo fue eficaz protegiendo frente al desarrollo de la enfermedad, a 2 de los 5 animales del grupo. Así, los tres cerdos que murieron como consecuencia de la infección, además de presentar similitudes en el cuadro clínico y lesional con los cerdos no inmunizados (como fue explicado en apartados anteriores), también las mostraron con respecto a los niveles plasmáticos de las proteínas de fase aguda, registrados a las 24 horas post-infección (sólo se pudo disponer de sus concentraciones en ese momento del estudio, debido a la muerte de los animales antes de que se realizará la siguiente medición). En cambio, los supervivientes, sin apenas lesiones reseñables, presentaron una respuesta de fase aguda similar a la de los cerdos privados de calostro e inmunizados con la bacterina de elaboración propia, por tanto de menor duración e intensidad. Pero además, también

coincidieron en la presentación de una respuesta para la CRP menos duradera que la correspondiente a la de HPT, al ser esta última, la única proteína que continuó presentando a los 9 días, diferencias significativas con el día del desafío.

Por lo que se refiere a los cerdos convencionales, sin lesiones características de la infección por *H. parasuis*, sólo se observaron variaciones significativas para la HPT y la CRP, y de nuevo la duración de la respuesta fue mayor en el caso de la primera, hasta 3 días después de la infección (Figuras 80-87). En los días 9 y 13, en algunos animales se observó un nuevo incremento en la concentración de CRP y también de Pig MAP, lo que podría ser consecuencia de la infección por PRRS diagnosticada en estos animales, o bien a razón del estrés ocasionado por las sangrías. En los dos grupos, se encontró un animal con niveles basales de HPT muy bajos, lo que supuso un incremento relativo muy elevado, superior al de los cerdos no inmunizados (con valores basales más elevados); sin embargo, las concentraciones de esta proteína registradas en estos cerdos durante todo el estudio, fueron claramente inferiores con respecto al animal que no había recibido inmunización, y similares a las del grupo de cerdos privados de calostro que también había recibido una bacterina (no comercial)

No obstante, debe reconocerse que las variaciones dentro de un mismo grupo de animales, con un cuadro clínico similar, se han observado en la mayoría de los estudios de respuesta de fase aguda. La explicación a estas diferencias se encuentra en el hecho de que se trata de un mecanismo de defensa inespecífico,

que no sólo depende del efecto de la infección, sino también de otras causas externas, como el posible estrés al que estén sometidos los animales o su estado sanitario previo (González-Ramón, 1997; Petersen y cols., 2002).

Continuando con este estudio, la existencia de una relación entre la intensidad de la respuesta de fase aguda y la gravedad del cuadro clínico se volvió a poner de manifiesto en el grupo inmunizado con una dosis subletal. Así, dos de los cinco de animales de este lote murieron presentando un proceso septicémico similar al de los cerdos sin inmunización previa, y en uno de ellos pudo medirse la respuesta a las 24 horas, que presentó cambios relativos con respecto al día del desafío, claramente superiores a los encontrados en los cerdos supervivientes (Figuras 76-79). Aunque en estos cerdos, las variaciones más acusadas se observaron a las 24 horas, y a partir de ese momento los niveles tendieron a recuperarse, la duración de la respuesta de fase aguda que presentaron fue difícil de interpretar, puesto que un animal, el cerdo nº 11, a los 6 días, presentó una elevación de los niveles de Pig MAP, CRP y HPT, incluso superior a la observada a las 24 horas (Figuras 76-79). Esta segunda respuesta podría asociarse con el descenso de peso observado en este cerdo, así como con la meningitis purulenta diagnosticada en la necropsia.

## 6.2. Comparación entre grupos

Cuando se comparó la respuesta de fase aguda entre los diferentes grupos del estudio, no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las proteínas entre los dos

lotes de cerdos de cría convencional e inmunizados con bacterinas comerciales. Tampoco se habían observado diferencias en su cuadro clínico y lesional que, como hemos visto, está relacionado con esta respuesta. Estos resultados podrían indicar que las dos bacterinas comerciales determinaron una misma protección frente al desarrollo de la enfermedad, o bien que ésta podría estar relacionada con el estado inmunitario previo de estos animales, dado que se criaron con sus madres y pudieron inmunizarse frente a *H. parasuis* por contacto.

La respuesta de pig MAP no ofreció diferencias significativas entre los tres grupos inmunizados con bacterinas (grupos II, VI y VII), pero sí con respecto al lote que recibió la vacuna formulada con OMPs y al grupo que fue expuesto a una dosis subletal. Ambos presentaron incrementos relativos superiores de esta proteína después de la infección, así como una mayor concentración a lo largo de toda la prueba (Tablas 73 y 77).

En el caso de la HPT, el grupo V presentó, desde el inicio del estudio, una concentración significativamente más elevada que la del resto de los lotes y por consiguiente, un incremento relativo menor. Una posible explicación, sería el hecho de que la inmunización que había recibido este grupo, exposición a una dosis subletal de la bacteria viva, indujo una respuesta de esta proteína, con niveles que permanecieron elevados hasta el día del desafío (datos sin publicar). También se encontraron diferencias entre el grupo inmunizado con una vacuna de OMPs y los cerdos que recibieron la bacteria de elaboración propia y el producto comercial A. Estas divergencias pudieron derivarse de la

duración de la respuesta, inferior en los dos últimos grupos (Tablas 74 y 78)

Con respecto a la CRP, destacar cómo los grupos inmunizados por exposición a una dosis subletal y mediante la bacterina comercial B, presentaron nuevos incrementos de la concentración de esta proteína a los 6 y 13 días, que podrían explicar las diferencias significativas encontradas con respecto al grupo inmunizado con una bacterina de elaboración propia, en el que la respuesta se

indujo exclusivamente durante las primeras 24 horas (Tablas 75 y 79)

Finalmente, la respuesta mediada por la apolipoproteína A-I frente a la infección con una DL de *H. parasuis*, se presentó exclusivamente en los lotes de cerdos privados de calostro, a diferencia de los cerdos convencionales, que no mostraron cambios significativos de la concentración plasmática de esta proteína en ningún momento del estudio (Tablas 76 y 80).

## 7. Respuesta mediada por citocinas

En la actualidad, se desconoce en gran medida la respuesta mediada por citocinas después de la infección con *H. parasuis* y sólo se ha descrito brevemente en algunas publicaciones como la de Mueller y cols. (2003).

Si analizamos los trabajos de investigación sobre la producción de citocinas en respuesta a infecciones experimentales con otras bacterias próximas, como por ejemplo *A. pleuropneumoniae* (Fossum, y cols., 1998; Huang y cols., 1999; Balaji y cols., 2002), encontramos que la detección de estos mediadores se ha llevado a cabo, tanto a partir de células sanguíneas como de muestras de órganos y tejidos. El hecho de que los resultados obtenidos en los diferentes estudios no coincidan, ha sido explicado por sus autores, sobre la base de que la expresión de las citocinas está condicionada por numerosos factores, como la sensibilidad de la técnica empleada para su cuantificación, el tiempo que transcurre desde la infección o la existencia de diferencias interindividuales, entre otros.

La ventaja de estudiar las citocinas en sangre periférica reside principalmente en que permite valorar la expresión de estos mediadores a distintos tiempos en un mismo animal, evitando la variabilidad inherente a las diferencias interindividuales, en función de la edad, la raza, el sexo (de Groot y cols., 2005) y el estado de salud (Fossum, 1998). Como desventaja destacaremos que la sangre periférica sólo contiene un pequeño porcentaje de linfocitos y que además, el procesamiento del antígeno y la replicación del patógeno suelen producirse también en otros órganos.

Por lo que la expresión de citocinas en sangre periférica no tiene que coincidir necesariamente con la de los órganos linfáticos o diana (Müller y cols., 2003; Díez, 2006).

Teniendo en cuenta que *H. parasuis* es capaz de distribuirse por todo el organismo originando una enfermedad sistémica, para el estudio de la respuesta mediada por citocinas seleccionamos el pulmón (la bacteria se inoculó por la vía intratraqueal), los ganglios cercanos a la tráquea (por su proximidad a la zona de inoculación), el bazo (por ser el lugar en el se procesan los antígenos que llegan vía sistémica) y el cerebro (al tratarse de una bacteria que puede invadir el sistema nervioso). Para interpretar los resultados y comparar los distintos grupos, tuvimos en consideración las diferencias interindividuales, ya citadas, y el hecho de que la expresión de citocinas parece asociarse principalmente a las zonas de la lesión, como se ha demostrado en infecciones por *A. pleuropneumoniae* (Baarsh y cols., 1995; Huang y cols., 1999). Por esta razón, la elección de las muestras suele corresponderse con el área intermedia entre la zona lesionada y la sana (Baarsh y cols., 1995). En nuestro caso, encontramos muchas dificultades debido a que en ocasiones las lesiones se encontraban muy difuminadas, cuando no pasaban completamente desapercibidas (en el estudio macroscópico) o bien, simplemente, no existían. Tales dificultades fueron todavía mayores en el caso del pulmón, puesto que en ocasiones observamos procesos neumónicos asociados a otras causas, y además las lesiones eran diferentes en función del lóbulo, por lo que se decidió tomar exclusivamente las muestras de los lóbulos apicales.



Junto con la comparación de los distintos grupos de animales, procedimos a relacionar la expresión de citocinas entre los cerdos que murieron y los que sobrevivieron a la infección, para valorar el papel de estos mediadores en el desarrollo de la enfermedad. En todos los casos, obtuvimos diferencias interindividuales muy importantes, con una desviación estándar para cada grupo, generalmente igual o superior a la media, lo que concuerda con lo descrito por otros autores (Huang y cols., 1999; Müller y cols., 2003)

### 7.1. Pulmón

En todos los cerdos se encontraron niveles detectables de IL-1 $\alpha$  sin obtenerse diferencias entre los que murieron y los que sobrevivieron a la infección (Tablas 81-87), lo que pudo ser debido a que en la mayoría de los animales (incluso en los que sobrevivieron) se observaron lesiones pulmonares. Es un hecho reconocido que únicamente en el órgano sano, los niveles de expresión de esta citocina son prácticamente indetectables (Baarsch y cols., 1995). Además, la lesión más común en los cerdos que sobrevivieron fue una neumonía exudativa, con infiltrados de células inflamatorias, que se han descrito como las principales productoras de este mediador, durante la inflamación en el pulmón (Thacker, 2006).

Entre los cerdos privados de calostro, los valores más altos se encontraron en el grupo inmunizado con la vacuna formulada con OMPs, significativamente superiores con respecto al resto de los grupos, menos el inmunizado con una bacterina de elaboración propia (Tablas 81-87). La causa de la mayor

expresión de IL-1 $\alpha$  en este grupo no está del todo clara, puesto que las lesiones inflamatorias encontradas (especialmente en los cerdos que murieron) no presentaban muchas diferencias con las observadas en los otros grupos; además tampoco conocíamos los valores previos a la infección, que quizá ya serían más elevados en ese momento, como consecuencia de posibles diferencias interindividuales o bien por la existencia de algún otro proceso patológico, ya que uno de los cerdos de este grupo presentó fiebre e inflamación en los días previos al desafío.

Los cerdos convencionales, portadores de lesiones neumónicas por PRRS, presentaron una expresión de esta citocina más baja (Tablas 81-87). Se ha observado que los niveles de IL-1 suelen coincidir con los periodos de viremia, y que la estimulación con LPS bacteriano, entre los 5 y 14 días después de una infección por PRRS, aumentaba la expresión de esta citocina (Van Gucht y cols., 2004). Pero ninguna de estas dos premisas se produjeron en nuestro caso, ya que se habían detectado anticuerpos frente al virus, al menos un mes antes del desafío con la bacteria. Por otro lado, en inflamaciones pulmonares crónicas (cómo la provocada por este agente), la expresión de esta citocina tiende a regularse y disminuir con el tiempo (Thacker, 2006).

Al igual que sucede con la IL-1, la expresión de la IL-10 se ha localizado en las células inflamatorias, en las que ejerce una función reguladora, pero no en los pulmones sanos (Cho y cols., 2005). Esto sería la clave para entender por qué tampoco encontramos diferencias entre los cerdos que sobrevivieron y murieron después de la infección. Debemos destacar que esta citocina presentó valores

claramente superiores en el grupo inmunizado con una bacterina comercial A (Tablas 81-87), lo que pudo ser consecuencia del aumento de su expresión, que se ha descrito asociada al PRRS (Díez, 2006).

Si se encontraron diferencias con respecto a la IL-6, cuya expresión resultó significativamente superior en los cerdos que murieron tras el desafío, con un cuadro agudo o sobreagudo. De esta forma, podría tratarse de un marcador adecuado de la respuesta de fase aguda en este órgano, como ya se había observado previamente para infecciones con *A. pleuropneumoniae* (Fossum, 1998). Además, esta citocina interviene en la síntesis de proteínas de fase aguda que, como ya se ha descrito, experimentaron cambios más destacados en los animales que murieron tras la infección. No obstante, los resultados de la cuantificación fueron muy diversos dentro de los mismos grupos (Tablas 81-87) y cuando se compararon, sólo se hallaron diferencias significativas entre el grupo inmunizado por una dosis subletal (que fue el único en el que se detectó esta citocina en todos los cerdos) y los grupos inmunizados con una bacterina y una vacuna formulada con OMPs, especialmente con el primero, puesto que sólo se encontró expresión en dos de sus cinco animales.

Lo contrario a lo descrito para la IL-6, ocurrió con la expresión de la IL-4, el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$ , especialmente en el caso de la primera citocina, puesto que sólo los animales supervivientes ofrecieron una expresión detectable, e incluso en los grupos inmunizados con una vacuna de OMPs o por exposición a una dosis subletal, la expresión se cuantificó únicamente en los cerdos que sobrevivieron al desafío (Tablas 81-87). La IL-

4 está implicada en una respuesta de tipo Th2, que tiene como resultado la estimulación y diferenciación de células B y por tanto, la producción de anticuerpos (Roitt y cols., 1989, Janeway y cols., 2000). Esto coincide con los resultados obtenidos en el apartado de inmunidad humoral, en el que comprobamos que los cerdos supervivientes, a diferencia de los que murieron tras la infección, produjeron anticuerpos frente a la bacteria y sus antígenos.

Por lo que se refiere al TNF- $\alpha$ , mientras que prácticamente se expresó en todos los supervivientes, sólo se pudo detectar en algunos de los animales que fallecieron (Tablas 81-87). Las diferencias más destacables se observaron entre el grupo inmunizado con una bacterina (donde se recogieron los valores más altos) y el que se vacunó con la proteína recombinante. Estos resultados son difíciles de interpretar, puesto que se trata de una de las citocinas implicadas en el inicio y desarrollo de la respuesta inflamatoria del pulmón (Thacker, 2006); no obstante, son mayoría los autores que han concluido, en infecciones experimentales por *Salmonella* spp y especialmente con *A. pleuropneumoniae*, que el TNF- $\alpha$ , no intervendría en las etapas tempranas de la respuesta inflamatoria (Barsch y cols., 1995; Fossum y cols., 1998; Barsch y cols., 2000; Johansson y cols., 2001; Balaji y cols., 2002); mientras que si que se han descrito incrementos de esta citocina a los 4 días post-infección (Huang y cols., 1999).

Una situación similar se observó con el IFN- $\gamma$ , cuya expresión en los cerdos que murieron presentaba niveles muy bajos, o no era detectable (Tablas 81-87). Además los cerdos que recibieron la vacuna recombinante, presentaron diferencias significativas con

respecto a los inmunizados con la bacterina de elaboración propia, el producto comercial B o la vacuna con OMPs. El IFN- $\gamma$  ejerce un efecto modulador sobre la respuesta innata y además interviene en la respuesta adaptativa, estimulando la presentación del antígeno y la respuesta de tipo Th1 (Roitt y cols., 1989; Janeway y cols., 2000). Según los resultados de la inmunidad humoral y de la expresión de la IL-4, parece existir una importante respuesta de tipo Th2, por lo que estas diferencias en la producción de IFN- $\gamma$  podrían estar relacionadas con los efectos biológicos de esta citocina durante la respuesta innata, que intervendrían en la resolución de la infección en los animales supervivientes mediante mecanismos inespecíficos, como la fagocitosis. Por otro lado, se ha comprobado que esta citocina también intervendría en la respuesta humoral mediante la estimulación de la producción de determinados isotipos de inmunoglobulinas (citado por Reddy y cols., 2000)

## 7.2. Bazo

El bazo es el órgano donde se procesan los antígenos que llegan vía sanguínea.

Por lo que se refiere a la IL-1 $\alpha$ , la expresión generalmente fue superior en los animales que murieron (que fueron los únicos en los que se encontraron lesiones en el bazo). Los valores más bajos correspondieron a los grupos inmunizados con bacterinas, especialmente el grupo que se vacunó con el producto comercial A, que presentó diferencias significativas con todos los lotes en los que murieron animales (Tablas 88-94). La presencia de abundantes depósitos de fibrina en este órgano, una sustancia quimiotáctica para

las células fagocíticas, junto con la intensa congestión observada, podrían favorecer la llegada de estas células a la zona, con la consiguiente liberación de esta citocina proinflamatoria.

Todo lo contrario ocurrió con la IL-4, la IL-10 y el TNF- $\alpha$  (Tablas 88-94). De nuevo, al igual que lo observado en el caso del pulmón, en ninguno de los cerdos que murieron como consecuencia del desafío se encontraron niveles detectables de IL-4 y, salvo en dos excepciones, sí que se detectaron en los cerdos supervivientes. Estas diferencias fueron significativas entre los grupos inmunizados con una bacterina y el producto comercial A con respecto al grupo no inmunizado y los lotes inmunizados por exposición a una dosis subletal y mediante una vacuna recombinante. Como mencionamos en el apartado anterior, se trata de una citocina implicada en la respuesta adaptativa de tipo Th2, relacionada con la producción de anticuerpos.

Las diferencias observadas con la IL-10, que al igual que la anterior citocina se expresó principalmente en los cerdos supervivientes, unido al hecho de que el grupo no inmunizado presentara diferencias significativas con el resto de los grupos, excepto con el lote que recibió una vacuna recombinante (siendo ambos grupos los únicos en los que todos los animales murieron sin que se pudiesen detectar anticuerpos), nos lleva a pensar que esta citocina también ejercería su función reguladora hacia una respuesta de tipo Th2 (impide una respuesta de tipo Th1, mediante la acción inhibitoria que ejerce sobre los macrófagos). Los resultados del TNF- $\alpha$  fueron similares a los de la IL-10, y tanto el grupo no inmunizado, como el que se vacunó con la

proteína recombinante, presentaron diferencias significativas con los grupos inmunizados con bacterinas, pero además, en el caso de la bacterina de elaboración propia, también se observaron diferencias con el lote que se inmunizó por exposición a una dosis subletal (en el que sólo hubo expresión en los supervivientes). El TNF- $\alpha$ , además de su participación en la inflamación, posee otros efectos biológicos relacionados con el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, como la inducción de la expresión del MHC, la estimulación de la presentación de antígenos y la activación de los linfocitos T y B (Roitt y cols., 1989; Janeway y cols., 2000). Por lo que podríamos pensar, que la expresión de TNF- $\alpha$  en los cerdos supervivientes habría contribuido al desarrollo de la respuesta adaptativa en el bazo. No obstante, no podemos descartar que la menor expresión de estas citocinas en los cerdos que murieron, pudiera estar relacionada con la depleción de los folículos linfoides esplénicos, descrita en estos animales.

Respecto de la IL-6, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que no se podía emplear esta citocina como un marcador adecuado de un proceso agudo en el bazo, puesto que a pesar de que se encontrasen diferencias significativas entre los animales que murieron y los supervivientes, los cerdos presentaron valores muy diversos. Además tanto en el lote de animales que murieron como consecuencia de la infección, como en el de los supervivientes, se encontraron cerdos que no expresaron esta citocina en niveles detectables, junto con otros cerdos que, sin explicación aparente, presentaron valores muy altos (Tablas 88-94). Este comportamiento podría relacionarse con el hecho de que en el bazo no

se encontrasen lesiones inflamatorias tan claras como las evidenciadas en el pulmón. Por otro lado, Lee y cols., (2004) determinaron que la producción de IL-6 en células esplénicas, estimuladas con LPS, empezaba a decrecer de forma muy temprana, a partir de las 24 horas. El hecho de que esta respuesta sea tan corta, podría haber dificultado la detección de citocinas en nuestro estudio, puesto que muchos animales murieron o fueron sacrificados, a partir de las 24 horas de la infección.

La producción del IFN- $\gamma$  no presentó diferencias entre los animales que murieron y los supervivientes, y se detectó en todos los cerdos de este estudio (Tablas 88-94), lo que coincide con lo observado en estudios *in vitro*, en los que la estimulación de células esplénicas con LPS inducía una notable expresión de esta citocina (Choi y cols., 2002). Los valores más altos se encontraron en el grupo vacunado con una bacterina, y en el inmunizado con una proteína recombinante, que presentaron un porcentaje de mortalidad tras la infección del 0 y 100% respectivamente. Por tanto, no se puede establecer una relación clara entre la expresión de esta citocina en el bazo y el desarrollo de una respuesta inmune que proteja frente a la enfermedad. Por otro lado, se trata de una citocina que induce una respuesta de tipo Th1, que, aunque no podemos descartarla, puesto que en determinadas ocasiones se ha visto que *H. parasuis* es capaz de invadir las del endotelio vascular del cerebro (Vanier y cols., 2006), los resultados de la respuesta humoral y los obtenidos con otras citocinas (IL-4 e IL-10) abogan por una respuesta de tipo Th2.

### 7.3. Ganglios

La expresión de IL-1 $\alpha$  se observó en todos los animales y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos del estudio (Tablas 95-101). Estos resultados están en línea con los obtenidos por Reddy y cols (2000), que demostraron que la estimulación de los ganglios linfáticos con LPS determinaba un importante incremento de la expresión de esta citocina. No obstante, si se obtuvieron diferencias cuando se compararon los cerdos supervivientes con los que murieron. La media y la desviación estándar fueron superiores en estos últimos, lo que podría estar relacionado con el hecho de que fueron los únicos que presentaron un proceso inflamatorio agudo, si exceptuamos dos de los tres cerdos supervivientes del grupo inmunizado con una dosis subletal, que también presentaron linfadenitis.

La expresión del resto de las citocinas analizadas en este estudio resultó significativamente inferior en los cerdos que murieron como consecuencia de la infección (Tablas 95-101). Una vez más, la detección de IL-4 se realizó exclusivamente en los cerdos que sobrevivieron a la infección que, como hemos dicho, desarrollaron una respuesta mediada por anticuerpos, y las diferencias más importantes volvieron a encontrarse entre los grupos I y IV (no inmunizados e inmunizados con una vacuna recombinante) con respecto a los lotes vacunados con bacterinas. Los resultados concernientes a la IL-6, con una expresión superior en los supervivientes (especialmente en el caso de los grupos inmunizados con bacterinas, con respecto al que recibió la vacuna recombinante), presentaron cierta controversia, al tratarse de

una citocina pro-inflamatoria, proceso que se observó, casi exclusivamente, en los cerdos que fallecieron. No obstante, en estudios *in vitro* se puso de manifiesto que su expresión, tras la inoculación de ganglios linfáticos con LPS, resultaba inferior a la observada para la IL-1 (Reddy y cols., 2000). Por otro lado, la IL-6 también interviene en el desarrollo de la respuesta adaptativa, de forma que las células presentadoras de antígeno la liberan para inducir una respuesta de tipo Th2, con la producción de anticuerpos, tal y como fue observado en los animales supervivientes después de la infección.

En el caso del TNF- $\alpha$  se vuelve a plantear el mismo problema que para la IL-6, al tratarse también de una citocina inflamatoria, y haberse demostrado su inducción en estudios *in vitro* con LPS (Reddy cols., 2000). No obstante, Reddy, y cols. (2000), observaron que se producía de forma más retardada que la IL-1, y sólo a partir de las 24 horas de la inducción se observa un máximo en su expresión. Esto último podría contribuir a explicar su ausencia en los cerdos que fallecieron, puesto que prácticamente en todos, la muerte se produjo antes de las 24 horas post-infección. Además, también observaron, que la estimulación con proteínas de ganglios linfáticos, procedentes de cerdos previamente inmunizados frente a las mismas, y productores de anticuerpos, inducía una notable expresión de TNF- $\alpha$ , por lo que lo consideraron un mediador crucial en la inmunidad humoral. Por otro lado, tampoco se ha descrito la expresión de esta citocina en otros tejidos linfoides como las Placas de Peyer, después de incubarlas durante 2 o 3 horas con *Salmonella enterica* (Hyland y cols., 2006).

La predominancia observada en los cerdos supervivientes respecto a la expresión de IFN- $\gamma$ , especialmente en los grupos inmunizados con bacterinas en comparación con los lotes no inmunizados o vacunados con la proteína recombinante, tendría una explicación similar a la recogida para el TNF- $\alpha$ , ya que al igual que éste, también se indujo con valores máximos, a partir de las 24 horas de la estimulación *in vitro* con LPS (Reddy y cols., 2000). No obstante la presencia de ambas citocinas en los cerdos supervivientes, podría estar implicada en el desarrollo de la respuesta adaptativa descrita en estos animales, como ya se ha citado en el bazo. Por otro lado, se ha observado que el IFN- $\gamma$  regularía la secreción del isotipo IgG2 durante el desarrollo de la respuesta humoral (citado por Reddy y cols., 2000).

Respecto a la IL-10, se vuelve a poner de manifiesto su posible contribución al desarrollo de la respuesta Th2, a la que ya nos referimos en el bazo, puesto que, su expresión fue superior en los supervivientes, y los dos grupos que no desarrollaron anticuerpos presentaron unos resultados en la cuantificación similares.

### 7.5. Cerebro

En el caso del cerebro, en estudios realizados en humanos se ha comprobado que las citocinas son producidas por las células que lo componen y por los macrófagos que lo infiltran, pero también presenta receptores, que pueden reaccionar con las citocinas que acceden mediante la vía sanguínea (Sternberg, 1997).

Sólo uno de los cerdos que sobrevivió al desafío presentó meningitis purulenta. Respecto de los cerdos que murieron después de la infección, en algunos casos se observó congestión en el encéfalo y, en una proporción mucho menor, gliosis, satelitismo y meningitis. En cambio, en otros cerdos no se encontraron lesiones ni tampoco se pudo aislar la bacteria del encéfalo por lo que, a diferencia de otros órganos, resulta difícil relacionar la expresión de citocinas en el cerebro con el cuadro lesional y con el tipo de respuesta que observamos entre los distintos grupos de animales. Por otro lado, en estudios realizados en humanos, se ha demostrado que la estimulación *in vitro* con LPS de las células de las meninges, induce una mayor producción de quimiocinas en detrimento de citocinas inflamatorias (Christodoulides y cols., 2002). Todas estas evidencias podrían influir en la disparidad de los resultados obtenidos, así como en el hecho de que la expresión de algunas citocinas no presentara diferencias entre los grupos del estudio, ni tampoco entre los animales que murieron y los que sobrevivieron.

Por lo que se refiere a la IL-1 $\alpha$ , la media y la desviación estándar de su cuantificación resultaron superiores en los animales que murieron después de la infección, especialmente en los que habían sido previamente inmunizados por medio de vacunas recombinantes o formuladas con OMPs (Tablas 101-108). Tanto en el conjunto de los supervivientes, como en los que fallecieron tras la infección, la expresión de esta citocina fue superior en los cerdos que presentaron un proceso meningítico, lo que estaría en concordancia con lo descrito en el

caso de otras meningitis bacterianas humanas (Christodoulides y cols., 2002), en las que se ha asociado su expresión con las células de la microglia activadas (Meme y cols., 2006).

La expresión de IL-4 sólo presentó niveles cuantificables en dos cerdos (Tablas 101-108), por lo que no se observaron diferencias significativas entre los supervivientes y los que murieron, ni tampoco entre los distintos grupos. No hemos encontrado información bibliográfica sobre su detección en el cerebro porcino, pero sí en el humano, en el que se han identificado receptores para esta citocina pero no su expresión (Sternberg, 1997), lo que podría ser una posible causa de su ausencia en los cerdos que empleamos en nuestra investigación.

La expresión de IL-6 y de IL-10 no presentaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos del estudio y tampoco se encontraron entre los animales que sobrevivieron y los que murieron, como consecuencia de la infección. Mientras que la IL-6 se ha detectado tras la inducción de las meningitis con *Neisseria meningitidis* (Christodoulides y cols., 2002), la expresión de la IL-10, resulta muy baja o poco significativa. Basándonos en los tres cerdos que presentaron las lesiones más acusadas (meningitis purulenta, gliosis y satelitismo) podemos observar que los tres expresaron IL-6, mientras que la expresión de IL-10 o no se observó, o resultó claramente inferior (Tablas 101-108).

La respuesta de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en el cerebro se caracterizaron porque en los grupos

inmunizados con una bacterina de elaboración propia y con una vacuna recombinante, no se observó la expresión de ninguna de estas dos citocinas (Tablas 101-108); a pesar de que la mortalidad observada en los mismos fuese del 0 y el 100% respectivamente, y se encontrasen claras diferencias en la evolución de la enfermedad. Se trata de dos citocinas que se han asociado a procesos como la desmielinización, la degeneración neuronal o la inflamación (en el caso del cerebro humano), por lo que parece lógico que no se expresen en el cerebro de los cerdos inmunizados con una bacterina, en los que no se encontraron lesiones; sin embargo, resulta contradictorio que en ocasiones tampoco las detectásemos en cerdos que presentaron meningitis o congestión encefálica, mientras que sí que se expresaron en animales como los criados de forma natural, en los que tampoco se observaron lesiones. Una posible explicación puede encontrarse en los datos obtenidos a partir de estudios realizados en humanos, que han puesto de manifiesto que la expresión de citocinas en el cerebro sigue muchos patrones y respuestas diferentes, al estar regulada por varios estímulos (antigénicos, proinflamatorios y neuropéptidos); y además los efectos biológicos de las citocinas en este órgano son muy diversos, incluso contrarios, así el TNF- $\alpha$  puede inducir tanto la apoptosis como la supervivencia neuronal (Meme y cols., 2006), de lo que se deduce, que no se puede asociar la expresión de una citocina con una única función.

# CONCLUSIONES



- 1.** En las condiciones de este trabajo ni el ratón ni el cobayo resultan modelos experimentales apropiados para el estudio de la infección producida por *H. parasuis* en el cerdo.
- 2.** En la elaboración de preparados vacunales frente a *H. parasuis* el tratamiento con una concentración de deoxicolato sódico del 0,075%, en condiciones restrictivas de hierro, determina la liberación de la TbpB, respetando la integridad de la membrana externa. La inactivación con thimerosal resulta eficaz, al no degradar los principales antígenos de esta bacteria.
- 3.** La infección experimental de cerdos privados de calostro con una dosis  $5 \times 10^9$  UFC de la cepa Nagasaki de *H. parasuis* por vía intratraqueal desencadena un proceso septicémico agudo, con un mortalidad del 100% en un plazo no superior a 6 días. La concentración de la bacteria en los distintos órganos disminuye con el transcurso del tiempo. Su distribución, inicialmente sistémica, evoluciona hacia la localización casi exclusiva en las serosas porcinas, a partir de las 24-48 horas.
- 4.** En las condiciones del experimento, sólo se consigue protección total mediante la inmunización previa con una bacterina formulada con cepas de los serotipos 2, 4 y 5 de *H. parasuis*. Los preparados con proteínas de la membrana externa y la exposición a una dosis subletal solamente indujeron una protección parcial, mientras que la inmunización con la proteína de fusión TbpB-His no indujo ningún tipo de protección.
- 5.** La respuesta humoral frente a *H. parasuis* resulta fundamental en la protección. En los cerdos que sobrevivieron al desafío se observó sistemáticamente seroconversión tanto de IgM como de IgG. Contrariamente, los cerdos que murieron carecían de niveles significativos de anticuerpos. En la mayoría de los casos se observó un predominio de las IgG1 frente a los antígenos proteicos y de las IgG2 frente a la bacteria completa.
- 6.** La infección experimental con *H. parasuis* determina un aumento de las poblaciones de monocitos y granulocitos en sangre periférica. En lo referente a la respuesta de linfocitos sanguíneos, no se observan cambios importantes en los porcentajes relativos de las subpoblaciones de linfocitos T, ni se afecta su activación; aunque sí se produce un incremento de la expresión relativa del antígeno  $\alpha$ IgM de los linfocitos B, lo que podría relacionarse con el inicio de una respuesta adaptativa, entre otras opciones.

**7.** La infección con una dosis letal de *H. parasuis* determina cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de las proteínas de la fase aguda pig-MAP, haptoglobina, CRP y apolipoproteína A-I, cuya intensidad y duración, además de relacionarse directamente con la gravedad del cuadro clínico y lesional, se reducen cuando los cerdos han sido inmunizados previamente con bacterinas.

**8.** La respuesta celular a la infección con una dosis letal de *H. parasuis*, en diversos órganos de los animales supervivientes, se caracteriza por una mayor expresión de las citocinas IL-4, IL-6 e IL-10, que se relacionan con una respuesta de base humoral; junto con otros mediadores como el TNF- $\alpha$  o el IFN- $\gamma$ , que podrían favorecer el desarrollo de una

respuesta adaptativa. Por el contrario, en los animales que murieron como consecuencia de la infección generalmente se observa una mayor expresión de citocinas proinflamatorias, como la IL-1 $\alpha$ , que podrían relacionarse con la mayor gravedad del proceso inflamatorio observado en estos últimos.

**9.** Tanto las células completas de *H. parasuis* inactivadas por el calor como los extractos eluidos con la proteína de fusión pBAD-Thio-TbpB-V5-His producen una proliferación leucocitaria superior a la inducida exclusivamente por los sobrenadantes con proteínas de la membrana externa.



# BIBLIOGRAFÍA

1. **Acouturier, J., V. Ganne, and A. Laval.** 2000. Adjuvants designed for swine vaccines. 16<sup>th</sup> I.P.V.S. Congress, Melbourne, Australia, p. 180.
2. **Amano, H., M. Shibata, N. Kajio, and T. Morozumi.** 1994. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4, and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. *J. Vet. Med. Sci.* **56**: 639-644.
3. **Amano, H., M. Shibata M, N. Kajio and T. Morozumi.** 1996. Pathogenicity of *Haemophilus parasuis* serovars 4 and 5 in contact-exposed pigs. *J. Vet. Med. Sci.* **58**: 559-561.
4. **Amano, H., M. Shibata, K. Takahashi, and Y. Sasaki.** 1997. Effects on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of *Haemophilus parasuis* infection. *J. Vet. Med. Sci.* **59**: 451-455.
5. **Appleyard, G. D., B. A. Mallard, B. W. Kennedy and B. N. Wilkie.** 1992. Antibody avidity in swine lymphocyte antigen-defined miniature pigs. *Can. J. Vet. Res.* **56**:303-307.
6. **Appleyard, G., B. N. Wilkie, B. W. Kennedy, and B. A. Mallard.** 1992. Antibody avidity in Yorkshire pigs and high and low immune response groups. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **31**: 229-240.
7. **Appleyard, G. D., S. E. Furesz, and B. N. Wilkie.** 2002. Blood lymphocyte subset in pigs vaccinated and challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **86**: 221-228.
8. **Baarsch, M. J., R. W. Scamurra, K. Burger, D. L. Foss, S. K. Maheswaran and M. P. Murtaugh.** 1995. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**: 3587-3594.
- 9 **Baarsch, M. J., D. L. Foss, and M. P. Murtaugh.** 2000. Pathophysiologic correlates of acute porcine pleuropneumoniae. *Am. J. Vet. Res.* **61**:684-690.
10. **Bailey, M. and K. Haverson.** The postnatal development of the mucosal immune system and mucosal tolerance in domestic animals. *Vet. Res.* **37**: 443-453.
11. **Bak, H. and H. J. Riising.** 2002. Protection of vaccinated pig against experimental infection with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*. *Vet. Record*, **151**: 502-505
12. **Baker, E. N. and P. F. Lindley.** 1992. New perspectives on the structure and function of transferrins. *J. Inorg. Biochem.* **47**: 147-160.
13. **Bakos, K., A. Nilsson, and E. Thal.** 2003. Untersuchungen über *Haemophilus suis*. *Nord.Vet. Med.* **4**: 241-255.
14. **Balaji, R., K. J. Wright, J. L. Turner, C. M. Hill, S. S. Dritz and B. Fenwick.** 2002. Circulating cortisol tumor necrosis factor - $\alpha$  interleukin-1 $\beta$ , and interferon- $\gamma$  in pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Anim. Sci.* **80**: 202-207.
15. **Barigazzi, G. F., Valenza, and E. Bollo.** 1994. Anatomohistopathological features related to *Haemophilus parasuis* infection in pigs. *Proc. Int. Pig. Vet. Soc.* **12**: 235.

16. **Basta, S., S. M. Knoetig, M. Spagnuolo-Weaver, G. Allan, and K. C. McCullough.** 1999. Modulation of monocytic cell activity and virus susceptibility during differentiation into macrophages. *J. Immunol.* **162**: 3961–3969.
17. **Baumann H. and J. Gauldie.**1994. The acute phase response. *Immunol. Today.* **15**: 74–80.
18. **Belanger, M., C. Begin, and M. Jackes.** 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* **63**: 656-662.
19. **Bigas, A., M. A. Garrido, I. Badiola, J. Barbe, and M. Llagostera.** 2006. Non-viability of *Haemophilus parasuis* fur-defective mutants. *Vet. Microbiol.* **118**: 107-116.
20. **Birberstein, E. L. and D. C. White.** 1969. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *J. Med. Microbiol.* **2**: 75-78.
21. **Blackall, P. J. and Pahoff J. L.** 1995. Characterization of porcine haemophili isolated from Australian pigs between 1988 and 1992. *Aust. Vet. J.* **72**:1, 18-21.
22. **Blackall, P. J., D. J. Trott, V. Rapp-Gabrielson, and D. J. Hampson.**1997. Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. *Vet. Microbiol.* **56**: 125-134.
23. **Blanco, I., L. Galina-Pantoja, S. Oliveira, C. Pijoan, C. Sánchez, and A. Canals.** 2004. Comparison between *Haemophilus parasuis* infection in colostrums-deprived and sow-reared piglets. *Vet. Microbiol.* **103**:21-27.
24. **Boulton, I. C., A. R. Gorringe, N. Allison, A. Robinson, B. Gorinsky, C. L. Joannou, and R. W. Evans.** 1998. Transferrin-binding protein B isolated from *Neisseria meningitidis* discriminates between apo and diferric human transferrin. *Biochem. J.* **334 (Pt 1)**: 269-273.
25. **Brockmeier, S. L.** 2004. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. *Vet. Microbiol.* **99**: 75-78.
26. **Bullido, R.** 1996. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a antígenos de membrana de leucocitos porcinos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
27. **Calsamiglia, M.C., C. Pijoan, G. Solano, and V. Rapp-Gabrielson.** 1999. Development of an oligonucleotide specific capture plate hybridization assay for detection of *Haemophilus parasuis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **11**:140-145.
28. **Carbonetti, N., V. Simnad, C. Elkins, and P. F. Sparling.** 1990. Construction of isogenic gonococci with variable porin structure: effects on susceptibility to human serum and antibiotics. *Mol. Microbiol.* **4**: 1009-1018.

29. **Carpintero, R., M. Piñeiro, M. Andrés, M. Iturralde, M. A. Alava, P. H. M. Heegard, J. L. Jobert, F. Madec, and F. Lampreave.** 2005. The concentration of apolipoprotein A-I decreases during experimentally induced acute processes in pigs. *Infect. Immun.* **73**: 3184-3187.
30. **Chamorro, S., C. Revilla, B. Álvarez, L. López-Fuerte, A. Ezquerro, and J. Domínguez.** 2000. Phenotypic characterization of monocyte subpopulations in the pig. *Immunobiology.* **202**: 82-93.
31. **Charland, N., C. G. D'Silva, R. A. Dumont, and D. F. Niven.** 1995. Contact-dependent acquisition of transferrin-bound iron by two strains of *Haemophilus parasuis*. *Can. J. Microbiol.* **41**: 70-74.
32. **Chen, C. Y., S. A. Berish, S. A. Morse, and T. A. Mietzner.** 1993. The ferric iron-binding protein of pathogenic *Neisseria spp* functions as a periplasmic transport protein in iron acquisition from human transferrin. *Mol. Microbiol.* **10**: 311-318.
33. **Cho, W-S., K. Jung, J. Kim, Y. Ha, and C. Chae.** 2005. Expression of mRNA encoding interleukin (IL)-10, (IL)-12p35 and IL-12p40 in lungs from pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Research. Commun.* **29**:111-122
34. **Choi I-S., E. W. Collison, S. K. Maheswaran, and H. S. Yoo.** 2002. Evaluation of cytokine gene expression in porcine spleen cells, and alveolar macrophages by competitive RT-PCR. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* **34**: 119-126
35. **Christodoulides, M., B. L. Makepeace, K. A. Partridge, D. Kaur, M. I. Fowler, R. O. Weller, and J. E. Heckerls.** 2002. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human meningeal cells induces the secretion of a distinct group of chemotactic, proinflammatory, and growth-factor cytokines. *Infect. Immun.* **70**: 4035-4044.
36. **Clark, R. A., K. G. Leidal, D. W. Pearson, and W. M. Nauseef.** 1987. NADPH oxidase of human neutrophils. Subcellular localization and characterization of an arachidonate-activatable superoxide-generating system. *J. Biol. Chem.* **262**: 4065-4064. 23.
37. **Collins, H. L.** 2003. The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunol. Letter.* **85**: 193-195.
38. **Cornelissen, C. N. and P. F. Sparling.** 1994. Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* **14**: 843-850.
39. **Cornelissen, C. N., J. E. Anderson, and P. F. Sparling.** 1997. Characterization of the diversity and the transferrin-binding domain of gonococcal transferrin-binding protein 2. *Infect. Immun.* **65**: 822-888.
40. **Davis, W. C., F. A. Zuckermann, M. J. Hamilton, J. I. Rodríguez Barbosa, A. Saalmüller, R. M. Binns, and S. T. Licence.** 1998. Analysis of monoclonal antibodies that recognize  $\lambda\gamma$  T/null cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **60**:305-316.

41. De Groot, J., L. Kruijt, J. W. Scholten, W. J. A. Boersma, W. G. Buist, B. Engel, and C. G. van Reenen. 2005. Age, gender and litter-related variation in T-lymphocyte cytokine production in young pigs *Immunology* **115**: 495-505.
42. De la Fuente, A. J., A. W. Tucker, J. Navas, M. Blanco, S. J. Morris, and C. B. Gutiérrez Martín. 2007. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. *Vet. Microbiol.* **120**:184-191.
43. De la Puente Redondo, V. A. 2001. Los receptores de la transferrina en patógenos porcinos de la familia *Pasteurellaceae*. Distribución y aplicaciones diagnósticas. Tesis doctoral. Universidad de León.
44. De la Puente Redondo, V. A., N. García Blanco, C. Gutiérrez Martín, J. Navas Méndez, and E. F. Rodríguez Ferri. 2003. Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene. *Vet. Microbiol.* **92**:253-262.
45. Del Río González, M. L., J. Navas Méndez, C. Gutiérrez Martín, and E. F. Rodríguez Ferri. 2002. Transporte de hierro en *Haemophilus parasuis*. Genes *exbBD-tbp* y su interés en la virulencia. Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, León, p. 223.
46. Del Río González, M., J. Navas Méndez, C. Gutiérrez Martín, E. F. Rodríguez Ferri. 2002. Transporte de hierro en *Haemophilus parasuis*. Clonaje y secuenciación de la región *TonB-exbBD-tbpA* en el serotipo 2. Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, León, p. 223.
47. Del Río, M. L., C. B. Gutiérrez, and E. F. Rodríguez Ferri. 2003. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 880-882.
48. Del Río González, M. L. 2004. Sistemas de captación de hierro en *Haemophilus parasuis*. Tesis doctoral. Universidad de León.
49. Del Río M. L., C. B. Gutiérrez Martín, J. Navas, B. Gutiérrez-Muñiz, J. I. Rodríguez-Barbosa, and E. F. Rodríguez-Ferri. 2005. *aroA* gene PCR-RFLP diversity patterns in *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus* species. *Res. Vet. Sci.* **80**:55-61.
50. Del Río, M. L. Navas-Méndez., Gutiérrez C. B. Rodríguez-Barbosa J. I., and E. F. Rodríguez Ferri. 2005. Identification and characterization of the TonB region and its role in transferri-mediated iron acquisition in *Haemophilus parasuis*. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* **45**(1):75-86.
51. Del Río, M. L., J. Navas J, A. J. Martín, C. B. Gutiérrez, J. I. Rodríguez-Barbosa, and E. F. Rodríguez Ferri. 2006. Molecular characterization of *Haemophilus parasuis* ferric hydroxamate uptake (*flu*) genes and constitutive expresión of the FhuA receptor. *Vet. Res.* **37**:49-59.
52. Del Río, M. L., C. B. Martín, J. Navas, B. Gutierrez-Muñiz, J. I. Rodríguez-Barbosa and E. F. Rodríguez Ferri. 2006. *aro A* gene PCR-RFLP diversity patterns in *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus* species. *Res. Vet. Sci.* **80**:55-61.



- 53. Dewhirst, F. E., B. J. Paster, I. Olsen, and G. J. Fraser.** 1992. Phylogeny of 54 representative strains of species in the family *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* **183**:1983-1989.
- 54. Díaz Luque, I.** 2006. Caracterización de la respuesta inmune de lechones durante la infección y tras la vacunación contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- 55. Doree, S. M. and M. H. Mulks.** 2001. Identification of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* consensus promoter structure. *J. Bacteriol.* **183**:1983-1989.
- 56. Duvigneau, J. C., R. T. Hartl, S. Groiss, and M. Gemeiner.** 2005. Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines. *J. Immunol. Methods.* **306**:16-27.
- 57. Evans, R. W. and J.S. Oakhill.** 2002. Transferrin-mediated iron acquisition by pathogenic *Neisseria*. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 705-707.
- 58. Faldyna, M., K. Nechvatalova, J. Sinkora, P. Knotigova, L. Levaa, J. Krejci, and M. Toman.** 2005. Experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in piglets with different types and levels of specific protection: Immunophenotypic analysis of lymphocyte subsets in the circulation and respiratory mucosal lymphoid tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **107**: 143-152.
- 59. Faraldo-Gomez, J. D., and M. S. Sanson.** 2003. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**: 105-116.
- 60. Farrant, J. L., A. Sansone, J. R. Canvin, M. J. Pallen, P. R. Langford, T. S. Wallis, G. Dougas, and J. S. Kroll.** 1997. Bacterial copper- and zinc-cofactored superoxide dismutase contributes to the pathogenesis of system salmonellosis. *Mol. Microbiol.* **25**: 785-796.
- 61. Fossum, C.** 1998. Cytokines as markers for infection and their effect on growth performance and well-being in the pig. *Domestic. Anim. Endocrinol.* **15**:439-444.
- 62. Fossum, C., E. Wattrang, L. Fuxler, K. T. Jensen, and P. Wallgren.** 1998. Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) as markers for acute bacterial infection in swine- a possible role for serum interleukin-6. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **64**: 161-172.
- 63. Furesz, S. E., B.A. Mallard, J. T. Bossé, S. Rosendal, B. N. Wilkie, and J. I. McInnes.** 1997. Antibody and cell-mediated immune response of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected and bacterin-vaccinated pigs. *Infect. Immun.* **65**:2, 358-365.
- 64. Gerlach, G. F., C. Anderson, A. A. Potter, S. Klashinsky, and P. J. Willson.** 1992. Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **60**:892-898.

65. Gerlach, G.F., S. Klashinsky, C. Anderson, A. A. Potter, and P. J. Willson. 1992. Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in two different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Infect. Immun.* **60**: 3253-3261.
66. Goethe, R., O. Flores González, T. Linder, and G. F. Gerlach. 2001. A novel strategy for protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccines: detergent extraction of cultures induced by iron restriction. *Vaccine.* **19**:966-75.
67. Gómez del Moral, M. 1998. Interacciones del virus de la peste porcina africana con el sistema inmune porcino. Implicaciones en la patogenia del cuadro agudo de la enfermedad. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
68. González, G. C., R. H. Yu, P.R. Rosteck, Jr., and A. B. Schryvers. 1995. Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptors genes. *Microbiology.* **141**(Pt 10):2405-2416.
69. González, S., C. Mendoza, J. M. Sánchez-Vizcaino, and F. Alonso. 1990. Inhibitory effect of African swine fever virus on lectin-dependent swine lymphocyte proliferation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **26**:71-80.
70. González-Ramón, N. 1997. Pig-MAP, una nueva proteína plasmática mayoritaria durante la fase aguda: estudio bioquímico y fisiopatológico en el cerdo. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
71. González-Ramón, M. N., K. Hoebe, M. A. Álava, L. van Leengoed, M. Piñeiro, S. Carmona, M. Iturralde, F. Lampreave, and A. Piñeiro. 2000. Pig MAP/ITIH4 and haptoglobin are interleukin-6-dependent acute-phase plasma proteins, in porcine primary cultured hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **267**:1878-1885.
72. Gray-Owen, S. D., S. Loosmore, and A. B. Schryvers. 1995. Identification and characterization of genes encoding the human transferrin-binding proteins from *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **63**: 1201-1210.
73. Hasset, D. J. and M. S. Cohen. 1989. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *FASEB J.* **3**: 2574-2578.
74. Harley, C. B. and R. P. Reynolds. 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic. Acids. Res.* **15**: 2343-2361.
75. Heegaard, P. M., J. Klausen, J. P. Nielsen, N. González-Ramón, M. Piñeiro, F. Lampreave, and M. A. Álava. 1998. The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **119**:365-373.
76. Hoeffling, D. C. 1991. The various forms of *Haemophilus parasuis*. *Swine Health Prod.* **2**:1.
77. Holub, M., Z. Kluckova, M. Helel, J. Prihodov, R. Rokyta, and O. Beran. 2003. Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**: 202-211.

- 78. Horejsi, V. and I. Hilgert.** 1983. Nitrocellulose membrane as an antigen or antibody carrier for screening hybridoma cultures. *J. Immunol. Methods* **62**: 325-329.
- 79. Huang, H., A. A. Potter, M. Campos, F. A. Leighton, P. J. Wilson, D. M. Haines, and W. D. G. Yates.** 1999. Pathogenesis of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Vet. Res.* **63**: 69-78.
- 80. Hulten, C., B. Ek, and P. Wallgren.** 2000. Serum haptoglobin concentration following antibody treatment in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 16<sup>th</sup> I.P.V.S. Congress. Melbourne, Australia. p. 469.
- 81. Hulten, C., E. Johansson, C. Fossum, and P. Wallgren.** 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.
- 82. Hyland, K. A., D. R. Brown, and M. P. Murtaugh.** 2006. *Salmonella enterica* serovar cholerasuis infections of the porcine jejunal Peyer's patch rapidly induces IL-1 $\beta$  and IL-8 expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **109**:1-11.
- 83. Janeway, C., P. Travers, M. Walport, and J. D. Capra.** 2000. *Inmunobiología* El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Masson. Barcelona.
- 84. Jin, H., R. Zhou, M. Kang, R. Luo, X. Cai, and H. Ken.** 2006. Biofilm formation by field isolates and reference strains of *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.* **118**: 117-123.
- 85. Johansson, E., C. Fossum, L. Fuxler, and P. Wallgren.** 2001. Effects of an experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* on the interferon- $\alpha$  and interleukin-6 producing capacity of porcine peripheral blood mononuclear cells stimulated with bacteria, virus or plasmid DNA. *Vet. Microbiol.* **79**, 171-182.
- 86. Johansson, E., K. Domeika, M. Berg, G. V. Alm, and C. Fossum.** 2003. Characterisation of porcine monocyte-derived dendritic cells according to their cytokine profile. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **91**:183-197.
- 87. Jung, K., Y. Ha, S. H. Kim, and C. Chae.** 2004. Development of a polymerase chain reaction and comparison with In situ Hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in formalin-fixed, paraffin embedded tissues. *J. Vet. Sci.* **66**:841-845.
- 88. Kielstein, P., H. Rosner, and W. Muller.** 1991. Typing of heat-stable soluble *Haemophilus parasuis* antigen by means of argagel precipitation and the dot-blot procedure. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* **38**:315-320.
- 89. Kielstein, P and V. J. Rapp-Gabrielson.** 1992. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* based on immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 862-865.

- 90. Kijhler, H., B. Lemser, G. Miller, and A. Saalmüller.** 1997. Early changes in the phenotypic composition of lymphocytes in the bronchoalveolar lavage of pigs after aerogenic immunization with *Pasteurella multocida* aerosols. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **58**: 277-286.
- 91. Kilian, M.** 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.* **93**: 9-62.
- 92. Kirkham, P. A., H. Takamatsu, H. Yang, and R. M. E. Parkhouse.** 1996. Porcine CD3: its characterization, expression and involvement in activation of porcine T-lymphocytes. *Immunology* **87**: 616-623.
- 93. Lamontagne, L., C. Page, R. Laroche, D. Longtin, and R. Magar.** 2001. Polyclonal activation of B cells occurs in lymphoid organs from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-infected pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **82**: 165-181.
- 94. Lampreave, F., N. González-Ramón, S. Martínez-Ayensa, M. A. Hernández, H. K. Lorenzo, A. García-Gil, and A. García Piñeiro.** 1994. Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis* **15**: 672-76.
- 95. Langford, P. R., B. M. Loynds, and J. S. Kroll.** 1992. Copper-zinc superoxide dismutase in *Haemophilus* species. *J. Gen. Microbiol.* **130** (Pt 3): 517-522.
- 96. Lecce, J. G., W. H. Justice, and G. A. Elliot.** 1960. Significance of husbandry, pleuropneumoniae-like organism, and *Haemophilus influenzae suis* in the pathogenesis of porcine polyserositis with arthritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **137**:345-347.
- 97. Lee D. Y., Y. W. Choo, S. G. Kang, N. R. Shin, I. S. Choi, S. J. Shin, and H. S. Yoo.** 2004. Quantitative analysis of interleukin-6 expression in porcine spleen cells and alveolar macrophages using real-time PCR. *Vet. Res. Commun.* **28**: 503-513.
- 98. Legrain, M., V. Manzarin, S. W. Irwin, B. Bouchon, M. J. Quentin-Millet, E. Jacobs, and A. B. Schryvers.** 1993. Cloning and characterization of *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferrin binding proteins Tbp1 and Tbp2. *Gene.* **130**: 73-80.
- 99. Licence, S. T. and R. M. Binns.** 1995. Major long-term changes in  $\gamma/\delta$  T-cell receptor-positive and CD2. T-cell subsets after neonatal thymectomy in the pig: a longitudinal study lasting nearly 2 years. *Immunology* **85**: 276-284.
- 100. Licence, S. T., W. C. Davis, M. M. Carr, and R. M. Binns.** 1995. The behaviour of monoclonal antibodies in the first international CD workshop reacting with  $\gamma\delta$ /null T lymphocytes in the blood of SLAb/b line pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **47**: 253-71.
- 101. Liebler-Tenorio, E. M. and R. Pabst.** 2006. MALT structure and function in farm animals. *Vet. Res.* **37**:257-280.
- 102. Liechtensteiger, C.A. and E. R. Vimr.** 1997. Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. *FEMS. Microbiol. Letters* **152**: 269-274.

- 103. Liechtensteiger, C.A. and E. R. Vimr.** 2003. Purification and renaturation of membrane neuraminidase from *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.* **93**:79-87.
- 104. Lillie, B., J. D. Hammermueller, J. I. McInnes, M. Jacques, and M. A. Hayes.** 2006. Porcine mannan-binding lectin A binds to *Actinobacillus suis* and *Haemophilus parasuis*. *Dev. Comp. Immunol.* **30**:954-965.
- 105. Lin C. B.** 2003. Identification and differentiation of *Haemophilus parasuis* ser-typeable strains using a species specific PCR and the digestion of PCR products with Hind III endonuclease. *American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting*, pp. 229-301.
- 106. Loosmore, S. M., Y. P. Yang, D. C. Coleman, J. M. Shortreed, D. M. England, R. E. Harkness, P. S. C. Chong, and M. H. Klein.** 1996. Cloning and expression of the *Haemophilus influenzae* transferring receptor genes. *Mol. Microbiol.* **19**:575-586.
- 107. Lunney, J. K and M. D. Pescovitz.** 1987. Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **17**:135-144.
- 108. Mancini G., A. O. Carbonara, and J. F. Heremans.** 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**: 235-254.
- 109. McCord, J. M. and I. Fridovich.** 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocrupein). *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.
- 110. McVicker J. K., L. B. Tabatai, and M. van Schilfaarde.** 2004. *Haemophilus parasuis* novel proteins hopes for vaccine. *Proceedings of Swine Disease Conference for Swine Practitioners*, pp. 57-67.
- 111. McVicker J. K. and L. B. Tabatai.** 2006. Isolation and characterization on the P5 adhesin protein of *Haemophilus parasuis* serotype 5. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **36**:363-374.
- 112. Melnikow E., S. Dorman, C. Sargent C, M. Duszenko, G. Evans, N. Gunkel, P.M. Selzer, and H.J Ulrich.** 2005. Microarray analysis of *Haemophilus parasuis* gene expression under *in vitro* growth conditions mimicking the *in vivo* environment. *Vet. Microbiol.* **110**:255-63.
- 113. Mème W., C. F. Calvo, N. Froger, P. Ezan, E. Amigou, A. Koulakoff, and C. Giaume.** 2006. Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes potentiation by  $\beta$ -amyloid. *FASEB J.* **20**: 494-496.
- 114. Meulebroek A. J. and W. P. Zeijlemaker.** 1996. Human IgG subclasses: useful diagnostic markers for immunocompetence. Sanquin Formerly CLB [www.sanquin.nl](http://www.sanquin.nl).
- 115. Mietzner, T.A. and S.A. Morse.** 1994. The role of iron-binding protein in the survival of pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Nutr.* **14**: 471-493.
- 116. Milward, F.** 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines. *Veterinary Vaccinology* **46**:456-457.

117. **Miniats, O.P., N. L. Smart, and S. Rosendal.** 1991. Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs. *Can. J. Vet. Res.* **51**: 37-41.
118. **Moller, K., L. V. Andersen, G. Christensen, and M. Kilian.** 1993. Optimalization of the detection of NAD dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. *Vet. Microbiol.* **36**: 261-271.
119. **Morello, J. A. and M. Bohnhoff.** 1989. Serovars and serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* from disseminated and uncomplicated infections. *J. Infect. Dis.* **160**: 1012-1017.
120. **Morozumi, T., T. Hiramune, and K. Kobayashi.** 1981. Glässer's disease in piglets produced by intraperitoneal inoculation with *Haemophilus parasuis*. *Natl. Inst. Anim Health Q* (Tokyo) **21**: 121-128.
121. **Morozumi, T., T. Hiramune, and K. Kobayashi.** 1982. Experimental infections of mice and guinea pigs with *Haemophilus parasuis*. *Natl. Inst. Anim Health Q.* (Tokyo) **22**: 23-31.
122. **Morozumi, T and Nicolet, J.** 1986. Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for a serological classification. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 1022-1025.
123. **Morozumi, T. and J. Nicolet.** 1986. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 138-142.
124. **Morton, D. J. and P. Williams.** 1989. Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins. *FEMS. Microbiol. Letters* **53**: 123-127.
125. **Muller, G., H. Kohler, R. Diller. A. Rassbach, A. Berndt, and D. Schimel.** 2003. Influences of naturally occurring and experimentally induced porcine pneumonia on blood parameters. *Res. Vet. Sci.* **74**: 23-30.
126. **Munch, S., S. Grund, and M. Kruger.** 1992. Fimbriae and membranes on *Haemophilus parasuis*. *Zentralbl. Veterinarmed. B* **39**:59-64.
127. **Myers, M. J., D. E. Farrell, T. G. Snider 3rd, L. O. Post.** 2004. Inflammatory cytokines, pleuropneumonia infection and the effect of dexamethasone. *Pathobiology* **71**:35-42.
128. **Neil, D. H., K. A. McKay, C. L'Ecuyer, and A. H. Corner.** 1969. Glässer's disease of swine produced by the intratracheal inoculation of *Haemophilus suis*. 1969. *Can J. Comp. Med.* **33**: 187- 193.
129. **Nicolet, J., P. H. Paroz, and M. Krawinkler** 1980. Polyacrylamide gel electrophoresis of whole-cell proteins of porcine strains of *Haemophilus parasuis*. *Int. J. Syst. Bact.*, **30**: 69-76.
130. **Nielsen, R. and V. Danileson.** 1975. An outbreak of Glässer disease. Studies on etiology, serology and the effect of vaccination. *Nord. Vet. Med.* **27**:20-25.
131. **Nielsen, R.** 1993. Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes. *Acta. Vet. Scand.* **32**: 193-198.

- 132. Nowalk, A. J., S. B. Teneza, and T. A. Mietzner.** 1994. Coordination of iron by the ferric iron-binding protein of pathogenic *Neisseria* is homologous to the transferrin. *Biochemistry* **33**: 12769-12775.
- 133. O'Reilly, T. and D. F. Niven.** 2003. Levels of nicotinamide adenine dinucleotide extracellular body fluids of pigs may be growth-limiting for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*. *Can. J. Vet. Res.* **67**: 229-231.
- 134. Ogikubo, Y., M. Norimatsu, A. Kojima, Y. Sasaki, and Y. Tamura.** 1999. Biological activities of lipopolysaccharides extracted from porcine vaccine strains. *J. Vet. Med. Sci.* **61**: 1265-1269.
- 135. Oliveira, S., L. Galina, and C. Pijoan.** 2001. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* **13**: 495-501.
- 136. Oliveira, S., L. Batista, M. Torremorell, and C. Pijoan.** 2001. Experimental colonization of piglets and gilts with systemic strains of *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis* to prevent disease. *Can J. Vet. Res.* **3**:161-167.
- 137. Oliveira, S., P. J. Blackall, and C. Pijoan.** 2003. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use a serotyping and genotyping. *Am. J. Vet. Res.* **64**: 435-442.
- 138. Oliveira, S., L. Galina, I. Blanco, A. Canals, and C. Pijoan.** 2003. Naturally-farrowed, artificially-reared pigs as an alternative model for experimental infection by *Haemophilus parasuis*. *Can J. Vet. Res.* **67**: 146-150.
- 139. Oliveira, S. and C. Pijoan.** 2004. Computer-based analysis of *Haemophilus parasuis* protein fingerprints. *Can J. Vet. Res.* **68**: 71-5.
- 140. Oliveira, S. and C. Pijoan.** 2004. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Vet. Microbiol.* **99**: 1-12.
- 141. Olvera, A., M. Calsamiglia, and V. Aragon.** 2006. Genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* field strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3984-3992.
- 142. Olvera van der Stoep, A.** 2006. Application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of *Haemophilus parasuis*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- 143. Paumusch, M.S., A. M. Bennaars, S. Harsch, and M. P. Murtaugh.** 1998. Inducible nitric oxide synthase expression in porcine immune cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **61**: 279-289.
- 144. Peirson, S. N., N. J. N. Butler, and R. G. Foster.** 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic. Acids. Res.* **31**. e73.
- 145. Pescovitz, M. D., A. G. Sakopoulos, J. A. Gaddy, R. J. Husmann, and F. A. Zuckermann.** 1994. Porcine peripherical blood CD4/CD8 dual expressing T-cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**: 53-62

- 146. Peterson, A., T. Prinz, A. Umar, B. J. van der, and J. Tommassen.** 1998. Molecular characterization of LbpB, the second lactoferrin binding protein of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **27**: 599-610.
- 147. Petersen, H. H., A. J. Ersboll, C. S. Jensen, and J. P. Nielsen.** 2002. Serum-haptoglobin concentration in Danish slaughter pigs of different health status. *Prev. Vet. Med.* **54**:325-335.
- 148. Piñeiro, M.** 1999. Estudio bioquímico de la ITIH4 humana, una proteína plasmática de fase aguda. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- 149. Pyle, S. W. and W. B. Schill.** 1985. Rapid serological analysis of bacterial lipopolysaccharides by electrotransfer to nitrocellulose. *J. Immunol. Methods* **85**: 371-382.
- 150. Provenzano, D. and K.E. Klose.** 2000. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance. Virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**:10220-10224.
- 151. Raffie, M. and P.J. Blackall.** 2000. Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.* **78**: 172-174.
- 152. Raffie, M., M. Bara, C. P. Shephens, and P. J. Blackall.** 2000. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.* **78**: 846-849.
- 153. Ramadori G. and B. Christ.** 1999. Cytokines and the hepatic acute phase response. *Semin. Liver. Dis.* **19**: 141-155.
- 154. Ramakers, C., J. M. Ruijter, R. H. Deprez, and A.F. Moorman.** 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Letters* **339**: 62-66
- 155. Rapp-Gabrielson, V. J., D. A. Gabrielson, and J. Musser.** 1992. Phenotypic and genotypic diversity of *Haemophilus parasuis*. *Proc. Int. Pig Vet. Soc. Congr.* **12**: 334.
- 156. Rapp-Gabrielson, V. J., D. A. Gabrielson, and G. J. Schramber,** 1992. Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs. *Am. J. Vet. Res.* **54**:997-1004.
- 157. Rapp-Gabrielson, V. J., G. J. Kokur, S. K. Muir, and J. T. Clark.** 1994. *Haemophilus parasuis* immunogenicity and cross protection between serovars. *Proc 25<sup>th</sup>. Ann Meeting. AASP.* 26-28.
- 158. Rapp- Gabrielson, V.J., G.J. Kocur, T. Clarck, and S.K- Muir..** 1995. Virulence of different serovars of *Haemophilus parasuis* for cesarean-derived, colostrum-deprived pigs. New York Plenum Press, p. 204.
- 159. Rapp-Gabrielson, V., G. J. Kocur, J. T. Claark, and K. M. Stephen.** 1997. *Haemophilus parasuis*: immunity in swine after vaccination. *Vet. Med.* **92**:83-90
- 160. Rapp- Gabrielson, V. J.** 1999. *Haemophilus parasuis. Disease of Swine.* 8<sup>th</sup> edition. In Straw B. S. et al, Blackwell Science, Iowa State University, Ames, Iowa.



- 161. Reddy, N. R., P. Borgs, and B. N. Wilkie.** 2000. Cytokine mRNA expression in leukocytes of efferent lymph from stimulated lymph node in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **74**:31-46.
- 162. Retzer, M. D., R. Yu, Y. Zhang, G.C. González, and A. B. Schryvers.** 1998. Discrimination between apo and iron-loaded forms of transferrin by transferrin binding protein B and its N-terminal subfragment. *Microb. Pathog.* **25**: 175-180
- 163. Revilla, C., M. P. Rodríguez-Carreño, B. Álvarez, S. Chamorro, L. M. Alonso, A. Ezquerro, F. Alonso, and J. Domínguez.** 2004. 2E3, a new marker that selectively identifies porcine CD4<sup>+</sup> naive T cells. *Dev. Comp. Immunol.* **28**:239-250.
- 164. Rodríguez Ferri, E. F., C. B. Gutiérrez Martín, V. de la Puente, N. García Blanco, J. Navas, M. C. Paniagua, M. L. del Río, J. L. Monter, and N. García de la Fuente.** 2000. Meningitis bacterianas en el cerdo. *Porci.* **59**: 43-60.
- 165. Roitt, I. M. J. Brostoff, and D. K. Male.** 1989. *Immunology.* Gower Medical. London.
- 166. Rokbi, B., V. Mazarin, G. Maitre-Wilmotte, and M. J. Quentin-Millet.** 1993. Identification of two major families of transferrin receptors among *Neisseria meningitidis* strains based on antigenic and genomic features. *FEMS Microbiol. Letters.* **110**: 51-57.
- 167. Rokbi, B., M. Mignon, G. Maitre-Wilmotte, L. Lissolo, B. Danve. D. A. Caugant, and M. J. Quentin-Millet.** 1997. Evaluation of recombinant transferrin-binding protein B variants from *Neisseria meningitidis* for their ability to induce cross-reactive and bactericidal antibodies against a genetically diverse collection of serogroup B strains. *Infect. Immun.* **65**:55-63.
- 168. Rosendal, S., D. A. Boyd, and K. A. Gilbride.** 1985. Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria. *Can. J. Comp. Med.* **49**:68-74.
- 169. Rosner, H.P., P. Kielstein, W. Muller, and B. Rohrmann.** 1991. Relationship between serotype, virulence, and SDS-PAGE protein patterns of *Haemophilus parasuis*. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **98**: 327-330.
- 170. Rossi-Campos, A., C. Anderson, G. F. Gerlach, S. Klashinsky, A. A. Potter, and P. J. Wilson.** 1992. Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine* **10**: 512-518.
- 171. Rubies, X., P. Kielstein, L. Costa, P. Riera, C. Artigas, and E. España.** 1999. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. *Vet. Microbiol.* **66**: 245-248.
- 172. Ruiz, A., S. Oliveira, M. Torremorell, and C. Pijoan.** 2001. Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1757-1762.

173. Rutz, J. M., J. Liu, J.A. Lyons, J. Goranson, S. K. Armstrong, M. A. McInstosh, J. B. Feix, and P. E. Klebba. 1992. Formation of a gated channel by ligand-specific transport protein in the bacterial outer membrane. *Science* **258**:471-475.
174. Saalmüller, A., W. Hirt, and M. J. Redehasse. 1989. Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ porcine T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **19**: 2011-2015.
175. Salmon, H., I. Jonson, S. Germana, G. W. Haller, D. H. Sachs, and C. Leguern. 2000. Dendritic cells enriched from swine thymus co-express CD1, CD2 and major histocompatibility complex class II and actively stimulate alloreactive T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* **52**:164-172.
176. Sánchez, C., N. Doménech, J. Vázquez, F. Alonso, A. Ezquerra, and J. Domínguez. 1999. The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. *J. Immunol.* **162**: 5230-5237.
177. Schimmel, D., P. Kielstein, and R. Hass. 1985. Serological typing of *Haemophilus parasuis*. *Arch. Exp. Veterinariamed.* **39**: 944-947.
178. Segalés, J. 1996. Enfermedad de Glässer: conceptos generales de la infección por *Haemophilus parasuis*. *Med. Vet.* **13**: 595-605.
179. Segalés, J., M. Domingo, G.I. Solano, and C. Pijoan. 1997. Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embeded tissues of an experimentally infected swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* **9**: 237-243.
180. Segalés, J., M. Domingo, M. Balasch, G. I. Solano, and C. Pijoan. 1998. Ultrastructural study of porcine alveolar macrophages infected *in vitro* with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus, with and without *Haemophilus parasuis*. *J. Comp. Pathol.* **118**: 231-243.
181. Segalés, J., F. Alonso, C. Rossell, J. Pastor, F. Chianini, E. Campos, L. López-Fuertes, J. Quintana, G. Rodríguez-Arrijoja, M. Calsamiglia, J. Pujols, J. Domínguez, and M. Domingo. 2001. Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **81**:37-44.
182. Segalés, J., C. Piñeiro, F. Lampreave, M. Nofafrias, E. Mateu, M. Calsamiglia, M. Andrés, J. Morales, M. Piñeiro, and M. Domingo. 2004. Haptoglobin and pig-major acute protein are increased in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Res.* **35**: 275-282.
183. Sidodrov, M.A., D.I. Skorodumov, and Y. K. Gumbatov. 1977. Patogennost vobzudytelya gemofileznogo poliserozita svinej. *Trud. Vsesoyuz. Inst. Exp. Vet.* **45**: 50-54.
184. Smart, N. L., O. P. Miniats, and J. I. MacInnes. 1988. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. *Can. J. Vet. Res.* **52**: 319-324.
185. Smart, N. L. and O. P. Miniats. 1989. Preliminary assessment of a *Haemophilus parasuis* bacterin for use in specific pathogen free swine. *Can. J. Vet. Res.* **53**: 390-93.

- 186. Solano, G. I., J. Segalés, J. E. Collins, T. W. Molitor, and C. Pijoan.** 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.* **55**:247-257.
- 187. Solano Aguilar, G.I., C. Pijoan, V. Rapp-Gabrielson, J. Collins, L. F. Carvalho, and N. Winkelman.** 1999. Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis*. *Am. J. Vet. Res.* **60**:1, 81-7.
- 188. Sorensen, N. S., C. Tegtmeier, L.O. Andresen, M. Piñeiro, M. J. M. Toussaint, F. M. Campbell, F. Lampreave, and P.M. H. Heegard.** 2006. The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **113**: 157-168.
- 189. Sternberg E. M.** 1997. Perspectives series cytokines and the brain neural-immune interactions in health and disease. *J. Clin. Invest.* **100**: 2641-2647.
- 190. Stoebner, J.A., and S. M. Payne.** 1988. Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **56**: 2891-2985.
- 191. Stumpe, S., R. Schmid, D.L. Stephens, G. Georgiou, and E.P. Bakker.** 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.
- 192. Summerfield, A. and K. C. McCullough.** 1997. Phenotype and adhesion molecule expression of porcine bone marrow myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* **62**:176-185.
- 193. Summerfield, A., K. Haverson, E. Thacker, and K.C. McCullough.** 2001. Differentiation of porcine myeloid bone marrow haematopoietic cell populations. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **80**: 121-129.
- 194. Summerfield, A., L. Guzilack-Piriou, A. Schaub, C. P. Carrasco, V. Tache, B. Charley, and K. McCullough.** 2003. Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells. *Immunology* **110**:440-449.
- 195. Tabatabai, L. B., J. K. Mcvicker, M. K. Zimmerli, E. S. Zehr, and M. van Schilfgaarde.** 2006. Identification and properties of *Haemophilus parasuis* adhesion proteins [abstract]. Stupka Memorial Symposium **15**, p. 14.
- 196. Tadjine, M., K. R. Mittal, S. Bourdon and M. Gottschalk.** 2004. Production and characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis* and study of their protective role in mice. *Microbiology.* **150**:3935-3945.
- 197. Takahaschi, K., Nagai, S., Yagihashi, T., Idehata, T., Nakano, Y., Senna, K., T. Maruyama, and J. Murofushi.** 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.
- 198. Thaker, E. L.** 2006. Lung inflammatory responses. *Vet. Res.* **37**: 469-486.
- 199. Thanassi, D. G., L.W. Cheng, and H. Nikaido.** 1997. Active efflux bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 2512-2518.

- 200. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.** 1997. Committee for veterinary medicinal products, thiomersal and timerfonate. Summary report. *www.emea.eu.int*.
- 201. Vahle, J. L., J. S. Haynes, and J. J. Andrews.** 1995. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriological, and morphologic findings. *J. Vet. Diagn. Invest* 7: 476-480.
- 202. Vahle, J. L., J.S. Haynes, and J.J. Andrews.** 1997. Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrum deprived swine (CDCD). *Can. J. Vet. Res.* 61: 200-206.
- 203. Van Gucht, S., G. Labarque, and K. van Reeth.** 2004. The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102: 165-178.
- 204. Van Overbeke, I., K. Chiers, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 2000. Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing APX toxins and transferring binding proteins. 16<sup>th</sup> I.P.V.S. Congress. Melbourne, Australia, p. 473.
- 205. Vanier G., A. Szczotka, P. Friedl, S. Lacouture, M. Jacques, and M. Gottschalk.** 2006. *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells. *Microbiology* 152 (Pt1):135-142.
- 206. Vonder Haar, R.A., M. Legrain, H.V. Kolbe, and E. Jacobs.** 1994. Characterization of a highly structured domain in Tbp2 from *Neisseria meningitidis* involved in binding to human transferrin. *J. Bacteriol.* 176: 6207-6213.
- 207. Williams, P. and E. Griffiths.** 1992. Bacterial transferrin receptors: structure, function and contribution to virulence. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 181: 301-322.
- 208. Wooldrige, K. G. and P. H. Williams.** 1993. Iron uptake mechanism of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 325-348.
- 209. Yang, H. and M. E. Parkhouse.** 1996. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 89: 76-83.
- 210. Zehr, E. S. and L. B. Tabatai.** 2003. Identification of iron-regulated proteins of *Haemophilus parasuis* by comparative 2-D electrophoresis western blotting and MALDI-TOF. American Society for Microbiology Meeting, abstract #Z-024.
- 211. Zimmerli, M. K. and L. B. Tabatai.** 2006. Identification and characterization of *Haemophilus parasuis* p2 and p5 adhesin proteins. *Protein Society Symposium*, paper N° 134-588.
- 212. Zucker, B., Kruger, M., Rehak, E. and F. Horsch.** 1994. The lipopolysaccharide structure of *Haemophilus parasuis* strains in SDS-PAGE. *Berl. Munch Tierzl. Wochenschr.* 107: 78-81.

- 213. Zuckermann, F. and R, Husmann.**1996. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double positive T cells. *Immunology* **87**: 500-512.
- 214. Zuckermann, F. A., M.D. Pescovitz, B. Aasted, J. Dominguez, I. Trebichavsky, B. Novikov, I. Valpotic, J. Nielsen, S. Arn, D. H. Sachs, J. K. Lunney, P. Boyd, J. Walker, R. Lee, W. C. Davis, J. I. Rodríguez-Barbosa, and A. Saalmüller.** 1998. Report on the analyses of mAb reactive with porcine CD8 for the second international swine CD workshop. *Vet. Immunol Immunopathol.* **60**: 291-303.

**ANEXOS**

## ANEXO N° I: Registro de las temperaturas corporales durante las pruebas de inmunización y posterior infección

Tabla 110. Registro de las temperaturas corporales en el grupo infectado con una DL (grupo I). **D**, desafío, **12H**, 12 horas post-infección

Días de muestreo															
Cerdo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
21	39,1	39,0	39,2	39,0	39,0	39,2	39,1	39,1	39,1	38,8	39,2	39,0	39,0	39,2	39,2
22	39,0	39,1	39,1	39,1	39,1	39,0	39,1	38,9	39,0	39,1	39,3	39,3	39,1	39,0	39,0
24	39,4	39,1	39,0	39,3	39,1	39,0	39,0	38,8	39,3	39,3	38,7	38,8	39,3	39,0	39,0
25	39,2	39,0	39,0	39,1	39,2	39,0	39,1	39,0	39,1	38,7	39,0	38,8	38,7	38,5	39,1
Cerdo	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
21	38,7	39,3	39,2	39,2	38,8	39,0	39,0	39,1	39,1	39,0	39,2	38,5	39,0	39,2	39,1
22	39,0	38,7	39,0	39,0	39,2	38,8	39,0	39,0	38,8	39,1	39,0	38,9	39,1	39,0	39,0
24	38,5	39,1	39,1	39,1	39,0	39,2	38,7	39,0	38,9	39,3	39,0	39,2	39,3	38,9	39,3
25	39,1	38,7	39,1	38,7	39,1	38,8	39,0	39,1	38,7	39,0	38,6	39,0	39,1	39,1	39,0
Cerdo	30	31	32	33	34	35	36	<b>D</b>	<b>12H</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
21	39,1	38,7	39,1	38,9	39,0	39,1	39,2	39,1	<b>41</b>	⊕					
22	38,9	39,0	39,0	38,7	39,1	39,3	39,1	39,2	<b>41,3</b>	⊕					
24	38,9	39,1	38,7	38,9	39,0	39,0	39,0	39,1	<b>40,7</b>	<b>40,8</b>	⊕				
25	39,2	39,1	39,0	39,2	39,1	39,0	39,1	39	<b>40,9</b>	<b>41,1</b>	<b>40,1</b>				⊕

Tabla 111. Registro de las temperaturas corporales en el grupo inmunizado con una bacterina e infectado con una DL (grupo II). **D**, desafío, **12H**, 12 horas post-infección

Días de muestreo															
Cerdo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	39,0	39,1	39,3	39,0	39,2	38,7	38,8	39,0	39,1	38,7	39,3	39,4	39,0	39,1	39,3
2	38,6	39,2	38,8	38,8	39,3	38,9	39,0	39,0	38,9	38,7	38,6	39,0	39,0	39,1	39,2
3	39,0	39,2	39,3	38,9	39,0	39,0	39,3	39,2	38,9	38,9	38,7	39,3	39,1	39,1	39,0
4	39,1	39,3	38,7	39,2	39,2	38,7	39,3	39,1	38,6	38,9	38,5	39,0	39,1	39,3	39,1
5	38,7	38,5	38,6	38,8	39,0	38,6	39,0	39,1	38,8	38,8	38,6	39,0	39,1	39,1	39,0
Cerdo	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	39,3	39,2	39,0	39,1	39,1	39,0	38,8	39,2	39,0	39,3	38,6	39,0	39,2	39,4	39,1
2	39,1	39,0	38,6	39,2	39,1	38,5	39,2	39,2	39,3	39,3	39,3	39,1	39,3	38,6	39,2
3	38,3	38,5	39,0	39,1	39,3	39,1	39,0	39,0	39,3	39,1	38,8	39,2	39,1	39,1	39,1
4	38,3	38,5	39,0	39,1	39,3	39,1	39,0	38,7	39,1	39,2	39,3	39,0	39,1	39,0	39,0
5	38,3	38,5	39,0	39,1	39,3	39,1	39,0	38,9	38,7	39,0	38,9	39,3	38,7	39,0	39,0
Cerdo	30	31	32	33	34	35	36	<b>D</b>	<b>12H</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
1	38,3	38,5	39,0	39,1	39,3	39,1	39,0	39,2	<b>40</b>	39,1	39,5	38,9	38,9	38,7	38,7
2	38,6	39,3	39,1	39,2	39,0	39,2	39,1	39,2	<b>40</b>	39,1	39,6	39,1	39,3	39,3	38,9
3	39,3	39,1	39,1	39,3	39,3	39,2	38,9	39,3	<b>39,8</b>	39,4	39,5	39,1	39,3	39,3	39,2
4	39,1	39,1	39,1	38,9	39,1	39,3	38,7	39,3	<b>40,2</b>	39,5	39,7	38,9	38,6	38,6	38,8
5	39,0	38,8	38,8	39,0	39,0	39,0	39,0	39,0	<b>39,9</b>	39,2	39,4	39,3	39,0	39,1	39,2
Cerdo	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
1	38,9	39,2	39,2	39,3	39,3	39,1	39,1	39,1	⊕						
2	39,3	39,2	39,0	39,1	39,1	39,0	38,8	39,2	⊕						
3	39,1	39,2	39,3	39,0	39,1	39,0	39,0	38,9	⊕						
4	38,7	39,0	38,9	39,3	38,7	39,0	39,0	39,0	⊕						
5	38,3	38,5	39,0	39,3	39,1	38,6	38,9	39,0	⊕						

Tabla 112. Registro de las temperaturas corporales en el grupo inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL (grupo III). **D**, desafío, **12H**, 12 horas post-infección

Días de muestreo															
Cerdo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
6	39,0	39,1	38,8	39,0	39,1	38,6	39,1	38,9	39,1	38,9	39,0	39,0	38,6	39,1	39,3
7	39,3	39,1	39,2	38,8	39,1	39,1	39,2	39,0	38,6	38,7	39,1	39,3	39,0	39,1	39,2
8	39,5	39,1	39,3	39,1	39,3	38,5	39,2	39,0	39,0	39,0	39,1	39,2	39,3	39,1	39,0
9	39,2	39,3	38,7	39,2	39,0	39,1	39,2	39,0	39,0	38,9	39,1	39,0	38,9	38,8	39,2
10	39,3	38,5	38,6	39,1	39,0	38,6	38,9	39,1	39,1	38,8	38,6	39,3	39,0	39,0	39,0
Cerdo	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
6	39,2	39,2	39,1	38,3	38,5	39,0	39,0	39,2	39,3	39,1	39,1	39,0	39,2	39,4	39,1
7	39,1	39,0	39,2	39,2	39,0	39,2	38,9	39,1	39,1	39,1	39,3	38,6	39,3	39,3	39,2
8	39,3	38,5	39,3	39,1	38,9	39,1	38,9	39,2	39,0	39,1	38,8	39,2	39,1	39,1	39,1
9	38,9	38,5	38,9	39,0	39,3	39,1	38,7	39,2	39,1	39,2	38,9	39,0	39,1	39,0	38,5
10	38,3	38,5	39,0	39,1	39,0	39,0	39,0	38,3	38,5	39,1	38,8	39,3	38,7	39,0	39,1
Cerdo	30	31	32	33	34	35	36	<b>D</b>	<b>12H</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
6	38,3	38,5	39,0	39,1	39,3	39,1	39,0	39,0	<b>41,5</b>	⊕					
7	38,3	38,5	39,3	39,1	39,2	38,9	<b>39,6</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	⊕					
8	39,2	39,0	38,9	39,0	39,1	38,9	38,9	39,1	<b>40</b>	39,1	38,7	39,0	39,1	39,3	39,1
9	39,2	39,3	39,0	39,1	39,1	38,7	38,9	39,2	<b>39,9</b>	41,2	⊕				
10	39,1	39,1	38,8	39,0	39,0	39,0	39,0	39,0	<b>39,8</b>	39,0	39,3	39,0	39,1	39,2	39,1
Cerdo	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
8	38,9	39,2	39,2	39,3	39,3	39,1	39,1	39,1	⊕						
10	39,3	39,2	39,0	39,1	39,1	39,0	38,8	39,2	⊕						

Tabla 113. Registro de las temperaturas corporales en el grupo inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL (grupo IV). **D**, desafío, **12H**, 12 horas post-infección

Días de muestreo															
Cerdo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
16	39,1	39,2	39,1	38,9	39,1	39,1	39,0	38,7	39,1	39,1	39,0	39,3	39,1	38,5	39,1
17	39,4	39,1	39,2	39,0	39,0	39,0	39,0	38,8	39,3	39,2	39,1	39,0	39,1	39,3	39,3
18	39,2	38,9	39,0	39,0	39,2	39,2	38,8	39,0	39,1	39,0	39,1	39,2	39,2	39,0	39,2
19	39,0	38,9	39,0	39,1	38,9	39,1	39,1	39,0	39,0	39,0	38,9	38,9	39,3	39,0	39,0
20	39,2	39,0	39,0	39,3	39,0	39,0	39,2	38,5	39,9	39,3	39,0	39,0	38,7	39,1	39,1
Cerdo	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
16	39,0	39,0	39,2	38,7	39,3	39,0	39,2	39,0	39,1	39,1	39,0	39,2	39,0	39,0	39,1
17	39,1	38,5	39,1	38,9	39,1	39,1	39,3	39,3	39,0	39,1	39,1	39,2	39,3	39,2	39,0
18	39,3	39,0	39,0	39,0	39,0	39,0	39,1	39,2	39,2	39,2	39,0	39,1	38,7	39,1	39,3
19	39,2	39,3	39,1	39,1	39,3	39,1	39,1	39,0	39,0	39,2	39,1	39,1	39,0	39,0	39,0
20	39,1	38,7	39,3	39,0	39,1	39,2	39,2	39,1	39,1	39,3	39,0	39,1	38,5	39,1	39,0
Cerdo	30	31	32	33	34	35	36	<b>D</b>	<b>12H</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
16	39,0	38,9	39,0	38,7	39,0	39,0	39,2	39,0	<b>41,3</b>	⊕					
17	38,6	39,1	39,1	38,9	39,3	39,1	39,1	38,6	<b>40,2</b>	⊕					
18	38,7	38,9	39,2	39,0	39,1	39,2	39,2	38,7	<b>41,0</b>	⊕					
19	38,9	39,1	39,0	39,1	39,1	39,1	39,0	38,9	<b>39,9</b>	⊕					
20	39,0	39,0	39,0	39,0	39,0	39,1	39,1	39,0	<b>41,2</b>	⊕					



Tabla 114. Registro de las temperaturas corporales en el grupo inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL (grupo V). **D**, desafío, **12H**, 12 horas post-infección

Días de muestreo															
Cerdo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
11	39,1	39,2	39,1	38,9	39,1	39,1	39,0	38,7	<b>39,8</b>	39,1	39,0	39,3	39,1	38,5	39,1
12	39,4	39,1	39,2	39,0	39,0	39,0	39,0	38,8	<b>40,5</b>	<b>39,5</b>	39,1	38,7	39,2	39,1	39,1
13	39,2	38,9	39,0	39,0	39,2	39,2	38,8	39,1	<b>39,8</b>	<b>39,7</b>	39,1	39,2	39,2	39,0	39,2
14	39,0	38,9	39,0	39,1	38,9	39,1	39,1	39,0	<b>39,9</b>	39,0	38,9	38,9	39,3	39,0	39,0
15	39,2	39,0	39,0	39,3	39,0	39,0	39,2	38,5	<b>39,9</b>	39,3	39,0	39,0	38,7	39,1	39,1
Cerdo	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
11	39,0	39,0	39,2	38,7	39,3	39,0	39,2	39,0	39,1	39,1	39,0	39,2	39,0	39,0	39,1
12	39,3	39,1	38,7	38,2	39,1	39,1	39,3	39,3	39,0	39,1	39,1	39,2	39,3	39,2	39,0
13	39,3	39,0	39,0	39,0	39,0	39,0	39,1	39,2	39,2	39,2	39,0	39,1	38,7	39,1	39,3
14	39,2	39,3	39,1	39,1	39,3	39,1	39,1	39,0	39,0	39,2	39,1	39,1	39,0	39,0	39,0
15	39,1	38,7	39,3	39,0	39,1	39,2	39,2	39,1	39,1	39,3	39,0	39,1	38,5	39,1	39,0
Cerdo	30	31	32	33	34	35	36	<b>D</b>	<b>12H</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
11	39,0	38,9	39,0	38,7	39,0	39,0	39,0	39,1	<b>40,5</b>	<b>39,6</b>	39,4	39,3	39,2	38,9	39,0
12	38,6	39,1	39,1	38,9	39,3	39,1	39,1	39,1	<b>40,0</b>	38,7	38,7	39,0	38,7	39,1	39,3
13	38,7	38,9	39,2	39,0	39,1	39,2	39,0	39,1	<b>40,5</b>	<b>41,7</b>	†				
14	38,9	39,1	39,0	39,1	39,1	39,1	39,1	39,3	<b>41,2</b>	†					
15	39,0	39,0	39,0	39,0	39,0	39,1	39,0	39,1	<b>39,9</b>	38,9	38,9	38,9	39,1	38,7	38,9
Cerdo	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
11	39,3	39,0	39,0	39,2	39,3	39,0	39,2	38,6	39,3	†					
13	39,2	39,0	39,0	39,3	39,1	39,0	39,0	38,7	39,2	†					
15	39,1	39,0	38,5	38,7	39,1	39,1	39,0	38,9	39,1	†					

Tabla 115. Registro de las temperaturas corporales en el grupo inmunizado con la bacteria comercial A y posteriormente infectado con una DL (grupo VI). **D**, desafío, **12H**, 12 horas post-infección

Días de muestreo															
Cerdo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
29	39,1	39,0	39,2	39,0	39,0	39,2	39,1	38,7	39,0	38,8	38,7	38,7	39,1	39,0	39,2
30	39,0	39,0	39,2	38,7	39,3	39,0	39,3	39,0	39,2	39,3	38,9	39,1	38,9	39,0	38,8
31	39,1	38,5	39,1	38,9	39,1	39,1	39,0	38,6	39,0	39,1	39,1	39,1	39,0	39,1	39,1
Cerdo	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
29	39,0	38,9	39,0	39,1	38,9	39,1	39,1	38,9	38,5	39,0	39,1	39,3	39,1	39,0	39,1
30	39,2	39,0	39,0	39,3	39,0	39,0	39,2	38,8	38,6	39,0	39,1	39,1	39,0	39,0	39,0
31	39,0	39,0	38,9	38,9	39,3	39,0	39,0	39,0	39,1	39,1	39,1	39,0	38,8	39,0	39,0
Cerdo	30	31	32	33	34	35	36	<b>D</b>	<b>12H</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
11	39,0	39,0	39,0	39,1	39,2	39,1	39,2	39,1	<b>39,6</b>	39,2	39,2	39,0	39,0	39,0	38,9
12	39,0	39,0	39,0	39,1	39,2	39,1	39,2	39,1	<b>39,6</b>	39,1	39,3	39,1	39,1	39,1	39,0
13	39,0	39,0	39,0	39,1	39,2	39,1	39,2	39,0	<b>39,5</b>	38,6	39,0	39,3	39,1	39,3	39,0
Cerdo	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
11	39,2	39,3	39,1	39,1	39,3	39,1	39,1	39,0	†						
13	39,1	38,7	39,3	39,0	39,1	39,2	39,2	39,1	†						
15	39,0	39,0	39,3	39,0	39,0	39,1	39,1	39,0	†						

Tabla 116. Registro de las temperaturas corporales en el grupo inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una DL (grupo VII). **D**, desafío, **12H**, 12 horas post-infección

Días de muestreo															
Cerdo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
26	39,1	39,1	39,3	39,2	39,3	38,9	39,2	39,0	39,1	39,0	39,1	39,3	38,9	39,1	39,1
27	39,0	39,0	39,1	39,2	39,3	38,9	39,2	39,1	39,1	39,0	39,0	39,3	38,9	39,1	39,0
28	39,3	39,1	39,1	39,0	39,1	39,1	39,3	39,0	39,1	38,5	39,9	39,0	39,3	38,7	39,0
Cerdo	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
26	39,2	38,6	39,2	39,2	39,0	39,2	38,5	39,0	39,0	39,2	39,2	39,2	39,0	39,2	39,3
27	39,0	38,7	38,9	39,3	39,0	39,2	38,5	39,1	39,1	39,0	38,9	39,1	39,1	39,0	39,3
28	39,0	38,9	39,0	38,7	38,6	39,0	39,1	38,7	39,3	39,0	39,0	39,0	39,3	38,9	39,0
Cerdo	30	31	32	33	34	35	36	<b>D</b>	<b>12H</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
26	39,3	39,1	39,1	38,9	39,0	39,1	39,2	39,1	<b>39,6</b>	39,1	39,0	39,0	39,1	39,0	39,1
27	39,1	38,7	39,1	39,1	39,2	39,1	39,1	39,0	<b>39,5</b>	39,2	38,9	39,1	39,1	39,0	39,1
28	39,1	38,7	39,1	38,7	39,0	39,2	39,3	39,1	<b>39,7</b>	39,3	38,9	39,1	39,1	39,1	39,0
Cerdo	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
	38,5	39,0	39,2	39,0	39,1	39,0	39,2	38,6	⊕						
	39,0	39,0	38,7	39,4	39,1	39,0	39,1	39,0	⊕						
28	39,0	39,0	38,5	38,7	39,1	39,1	39,2	38,6	⊕						

El símbolo ⊕ indica la muerte o el sacrificio del animal.

Los días en rojo representan los días que siguieron a la infección.

**ANEXO N° II: Imágenes del estudio anatomopatológico**

Figura 88. Grupo I. Cavity abdominal. Peritonitis fibrinosa. Evolución cronológica de la lesión. A). Animal muerto a las 24h. Presencia de hilillos de fibrina (▶) depositados sobre las vísceras abdominales con gran cantidad de líquido turbio en la cavidad (no aparece en la imagen); B). Animal muerto a las 48h Se observa una reducción del líquido en la cavidad y cómo la fibrina empieza a organizarse formando láminas (▶) que se sitúan entre las vísceras; C) Animal muerto a los 6 días. Desaparece el líquido en las cavidades y aparece una gran cantidad de fibrina que se deposita en capas y forma adherencias entre las vísceras

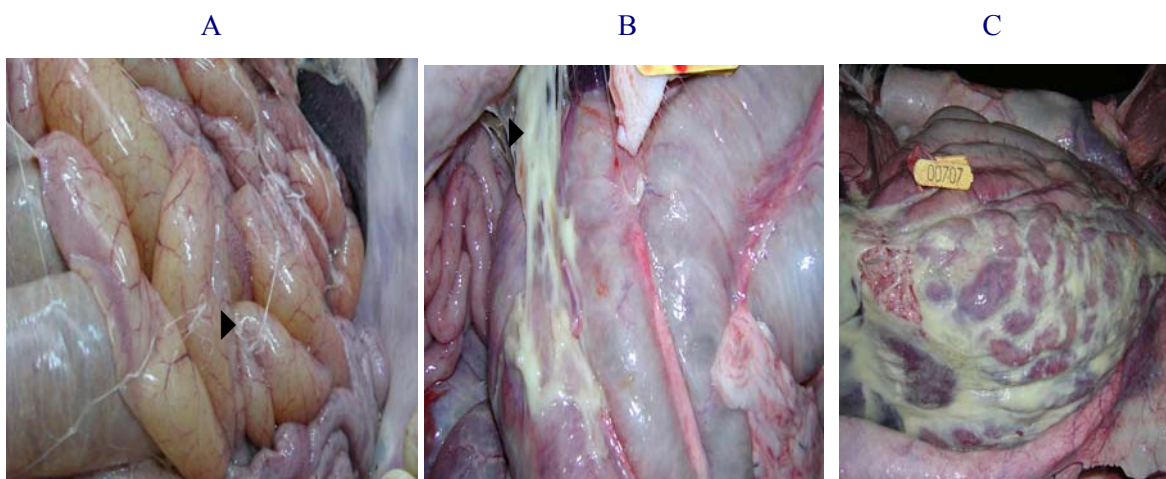


Figura 89. Grupo I. Congestión visceral generalizada



Figura 90. Grupo I. Hígado. Presencia de microtrombos de fibrina (▶) en vasos del espacio porta H-E. 50x

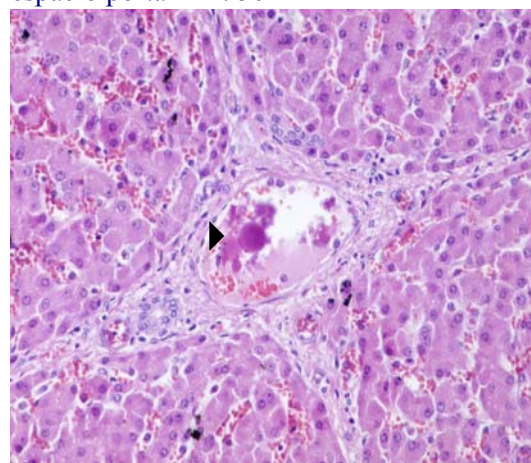


Figura 91. Grupo I. Bazo. Depleción linfocitaria grave de la pulpa blanca, con presencia de restos celulares, fibrina y glóbulos rojos. H-E. 50x

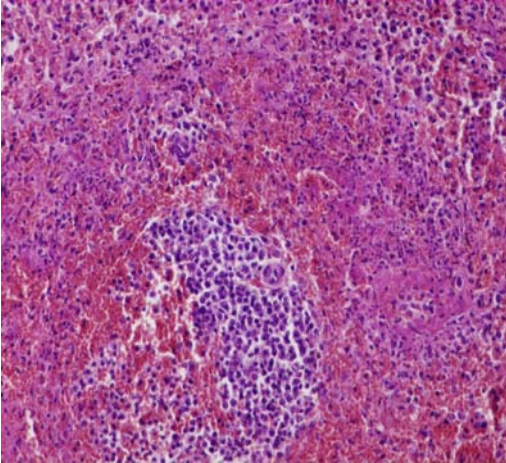


Figura 92. Grupo I. Ganglio linfático mesentérico. Linfadenitis aguda caracterizada por hiperemia (▶) de pequeños vasos. También se observa trombosis vascular (★). H-E.10x

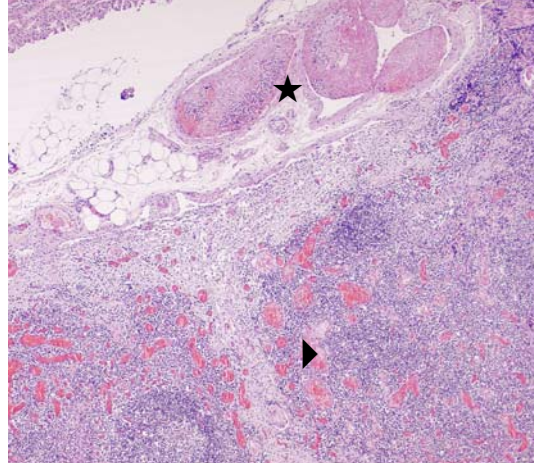


Figura 93 Grupo I. Pulmón. Neumonía de tipo exudativo. Evolución cronológica de la lesión. A) Animal muerto a las 24 horas. En el parénquima pulmonar se observan alteraciones vasculares caracterizadas por hemorragias, congestión y edema alveolar; B) Animal muerto a las 48 horas. Se continúa observando congestión vascular y edema alveolar con llegada a las luces alveolares de polimorfonucleares neutrófilos; C) Animal muerto a los 6 días. El contenido de las luces alveolares es reemplazado por un exudado inflamatorio constituido predominantemente por neutrófilos y macrófagos, que se entremezclan con restos celulares. H-E.10x

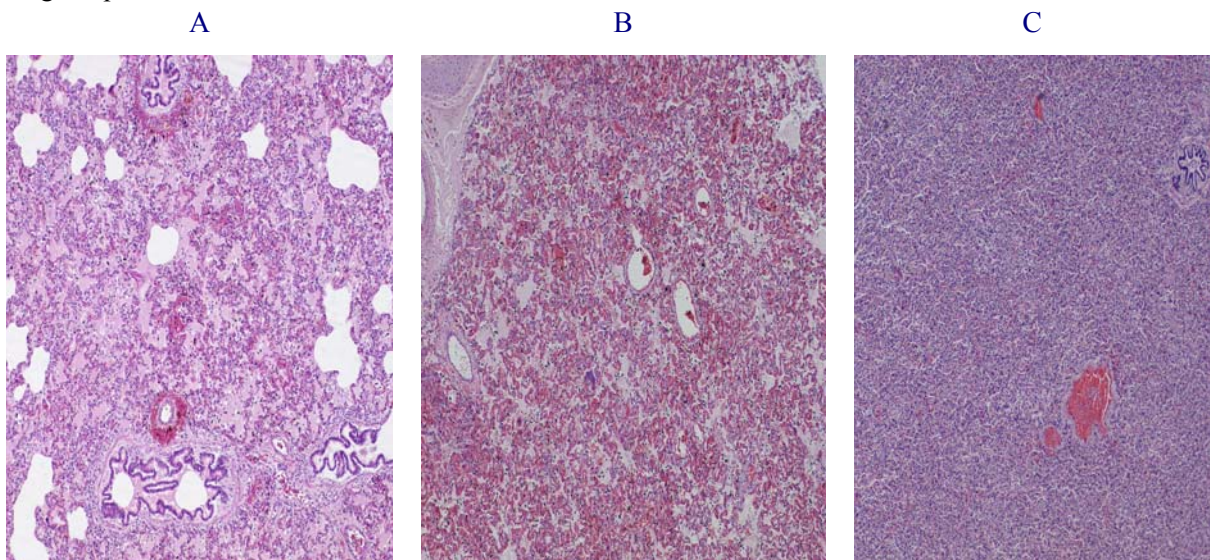


Figura 94. Grupo II. Pulmón. Estructura normal del parénquima pulmonar caracterizada por la presencia de septos alveolares finos que delimitan las luces, en las que sólo ocasionalmente se identifica alguna célula descamada. H-E. 50X

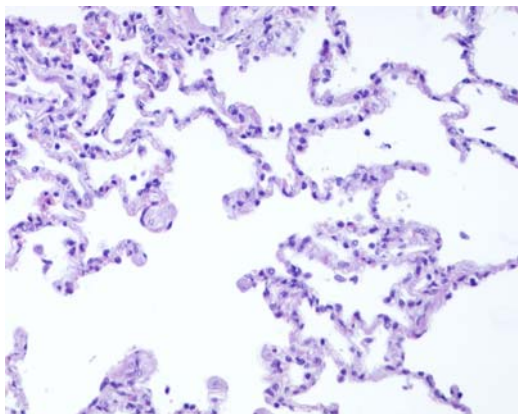


Figura 95. Grupo II. Bazo. Pulpa blanca constituida por tejido linfoide (★) dispuesto en torno a la arteria central (▶). H-E. 50X

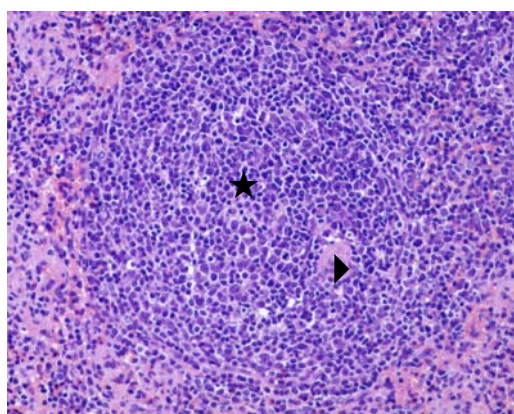


Figura 96. Grupo II. Ganglio linfático mesentérico. Estructura normal, en la que se identifican nódulos linfáticos (NL) y tejido linfoide difuso (TLD) correspondiente a la zona cortical, así como cordones y senos medulares que conforman la zona medular (★) del ganglio. H-E. 10X

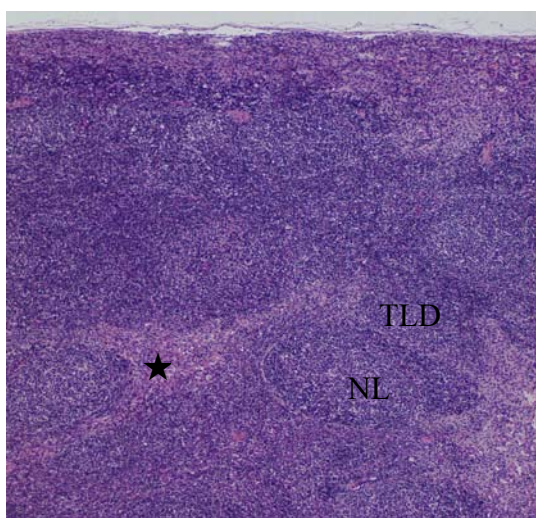


Figura 97. Grupo III (cerdos no supervivientes). Pulmón. Pleuritis fibrinosa caracterizada por el depósito de fibrina junto con células inflamatorias sobre la pleura. El parénquima pulmonar muestra congestión y edema alveolar. H-4. 17,4X

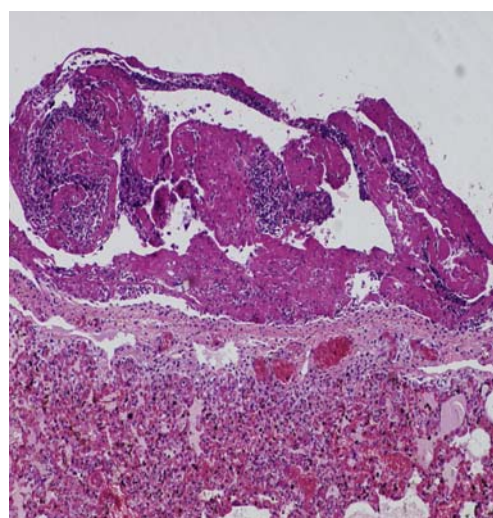


Figura 98. Grupo III (cerdos no supervivientes). Encéfalo. Meningitis purulenta. H-E. 20X

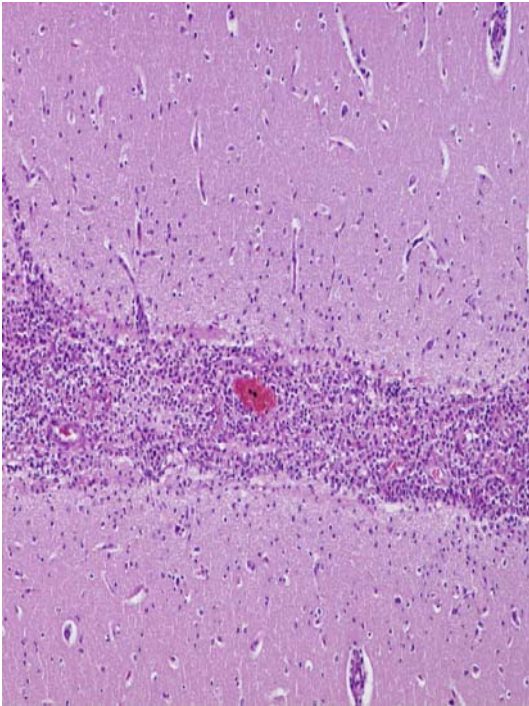


Figura 99. Grupo III (cerdos no supervivientes). Encéfalo. Detalle del infiltrado inflamatorio de la imagen anterior, en el que se observa la presencia de fibrina y restos celulares entremezclados con células inflamatorias, predominantemente neutrófilos y macrófagos. También se identifican microtrombos de fibrina (→) en vasos. H-E. 50X.

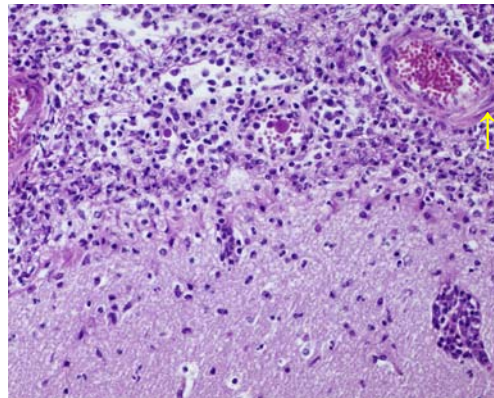


Fig 100 A. Grupo III (cerdos no supervivientes). Pulmón. Alteraciones vasculares en el parénquima pulmonar caracterizadas por congestión y hemorragias de distribución aleatoria. También se identifican áreas de consolidación localizadas en los lóbulos apicales e intermedio.

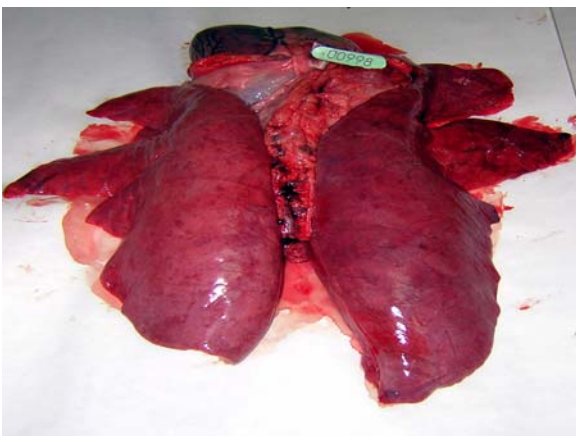


Fig. 100 B. Grupo III (cerdos supervivientes). Pulmón normal.

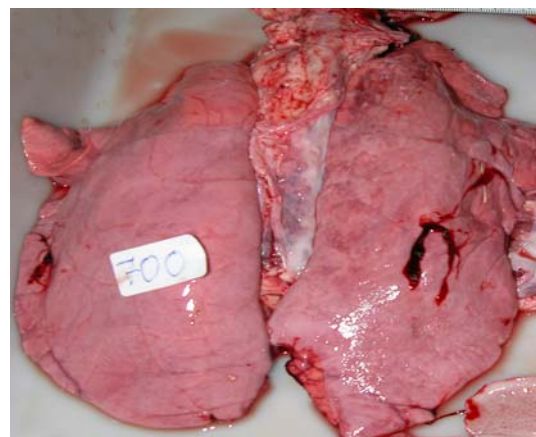


Figura 101. Grupo IV. Corazón. Se observan petequias (→) en el surco coronario y depósitos de fibrina en la superficie epicárdica (★)

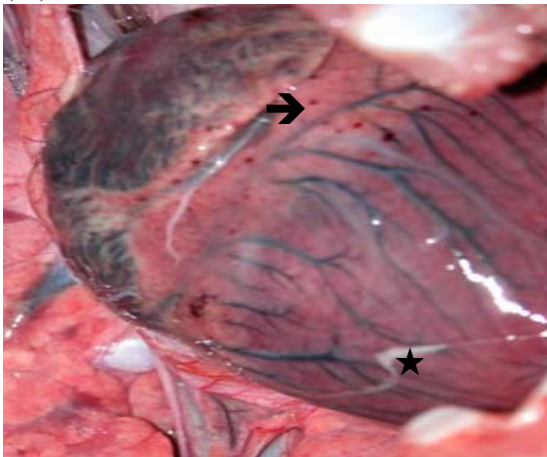


Fig. 102. Grupo IV- Riñón. Presencia de microtrombos de fibrina (→) en el glomérulo renal. H-E. 100X

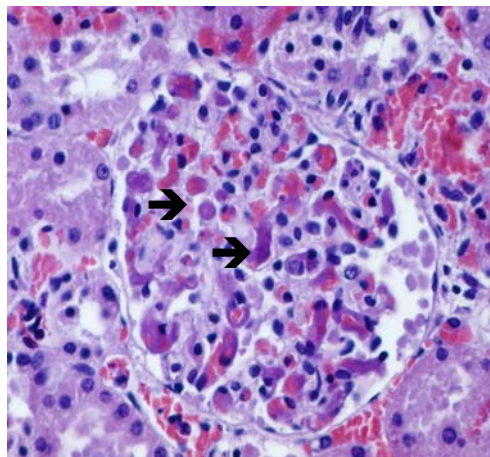


Figura 103 A. Grupo IV. Bazo. Depleción linfocitaria severa de la pulpa blanca (→). Se identifican trábeculas conjuntivas (★) y elipsoides (→). H-E. 10X.

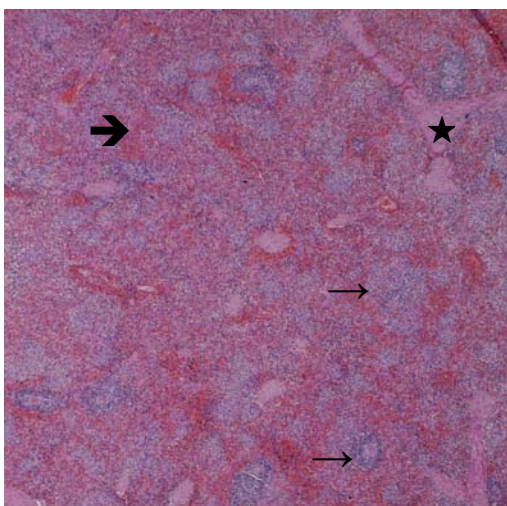


Figura 103 B. Grupo IV. Bazo. Detalle de la figura anterior. Depleción linfocitaria grave (★) en torno a la arteria central (→) con restos celulares, fibrina y glóbulos rojos. H-E. 20X.

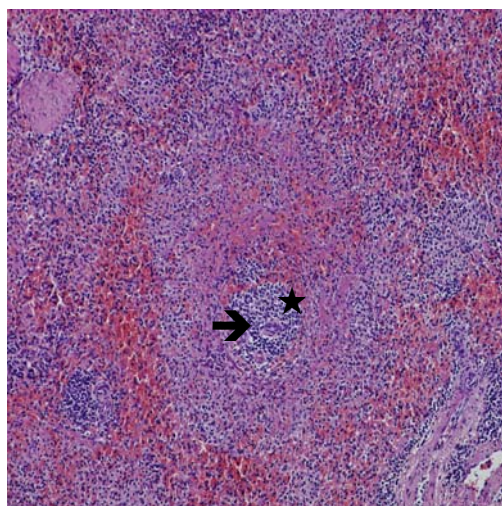


Figura 104. Grupo IV. Pulmón. Neumonía exudativa. Se identifican áreas de consolidación del parénquima (★) en los lóbulos apical e intermedio con depósito de fibrina en la superficie de la pleura (➔).

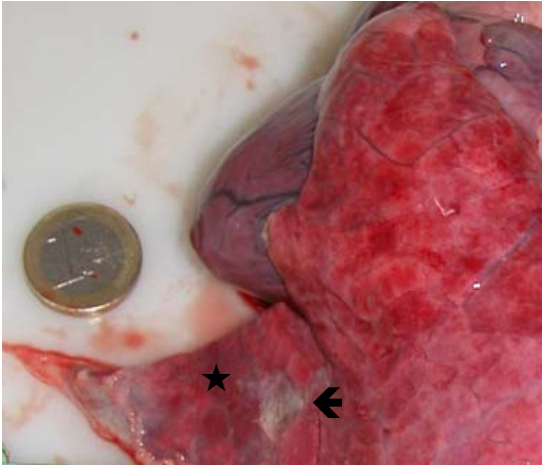


Figura 105. Grupo IV (cerdos no supervivientes). Pulmón. Trombosis vascular (◀). H-E. 50X.

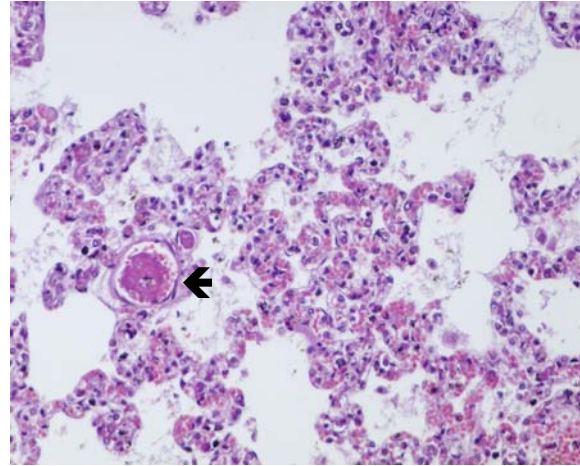


Figura 106. Grupo IV (cerdos no supervivientes). Ganglio linfático mesentérico. Linfadenitis aguda caracterizada por hiperemia vascular. H-E. 25X

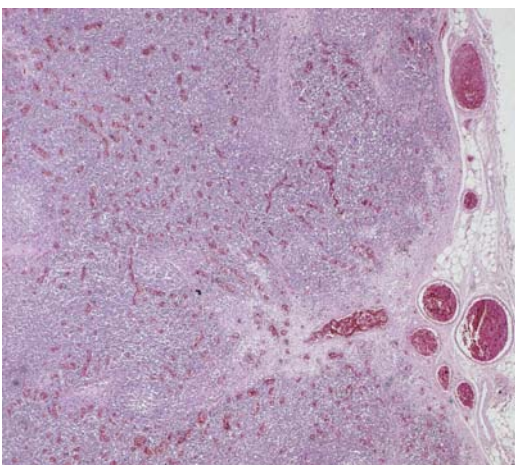


Figura 107. Grupo VII. Bazo. Estructura normal, en la que se identifica la pulpa blanca constituida por corspúsculos esplénicos (B) en torno a la arteria central y la pulpa roja (R). H-E 10X.

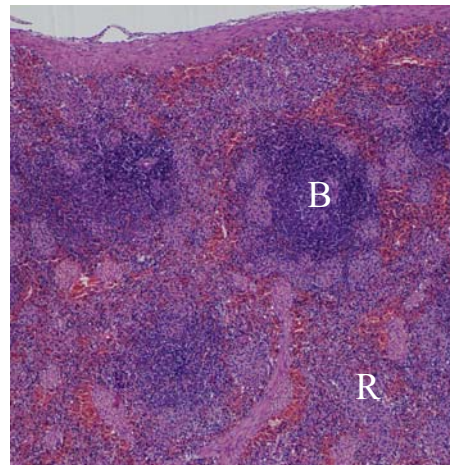




Figura 108. Grupo VII. Riñón. Nefritis intersticial no purulenta de distribución multifocal. H.-E. 10X

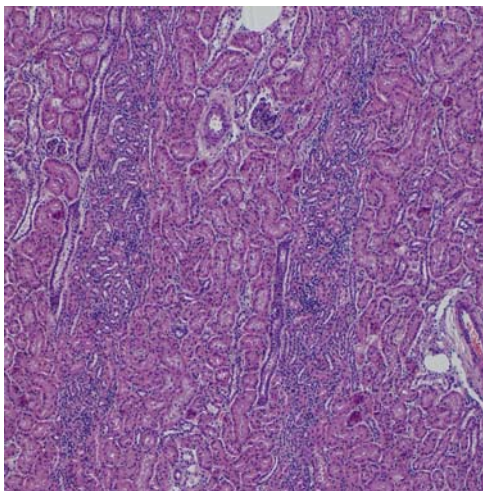


Figura 109. Grupo VI. Pulmón. Neumonía intersticial con distribución lobulillar. H-E. 100X

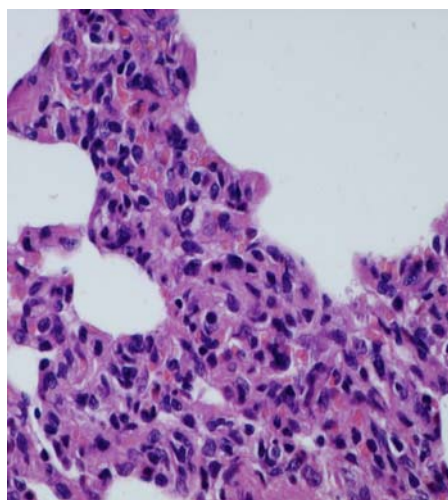


Figura 101. Grupo VII. Pulmón. Neumonía intersticial caracterizada por una imagen lobulillar macroscópica y aumento difuso del volumen pulmonar.



### ANEXO N° III: Evolución de las inmunoglobulinas IgM, IgGt IgG1 e IgG2 en todos los cerdos del estudio

Figura 111. Evolución de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo I, infectado con una DL de *H. parasuis*. **D**, desafío; **D.P.I.**, días post-infección

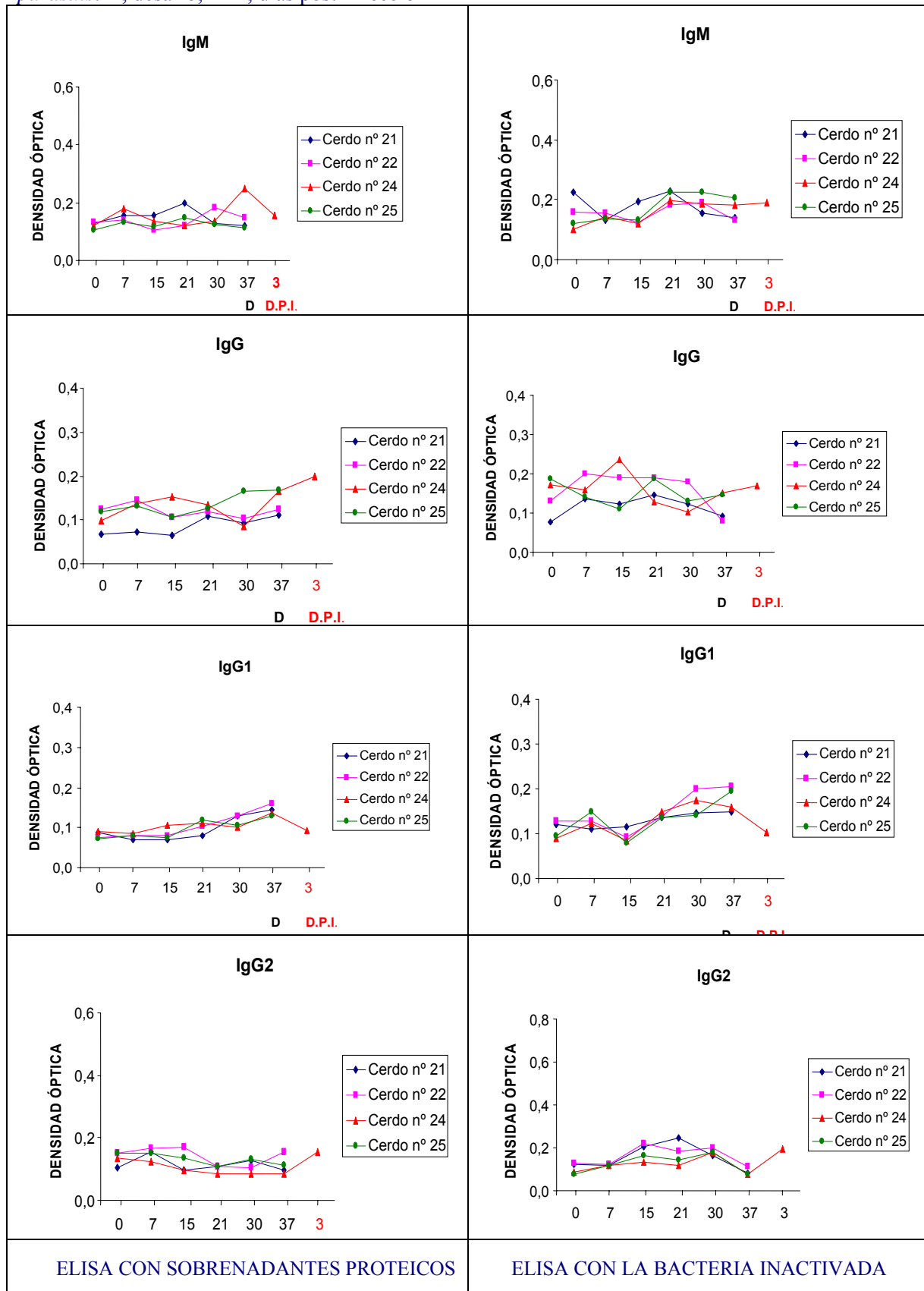


Figura 112. Evolución de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo II, inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. **D**, desafío; **DPI**, días post-infección

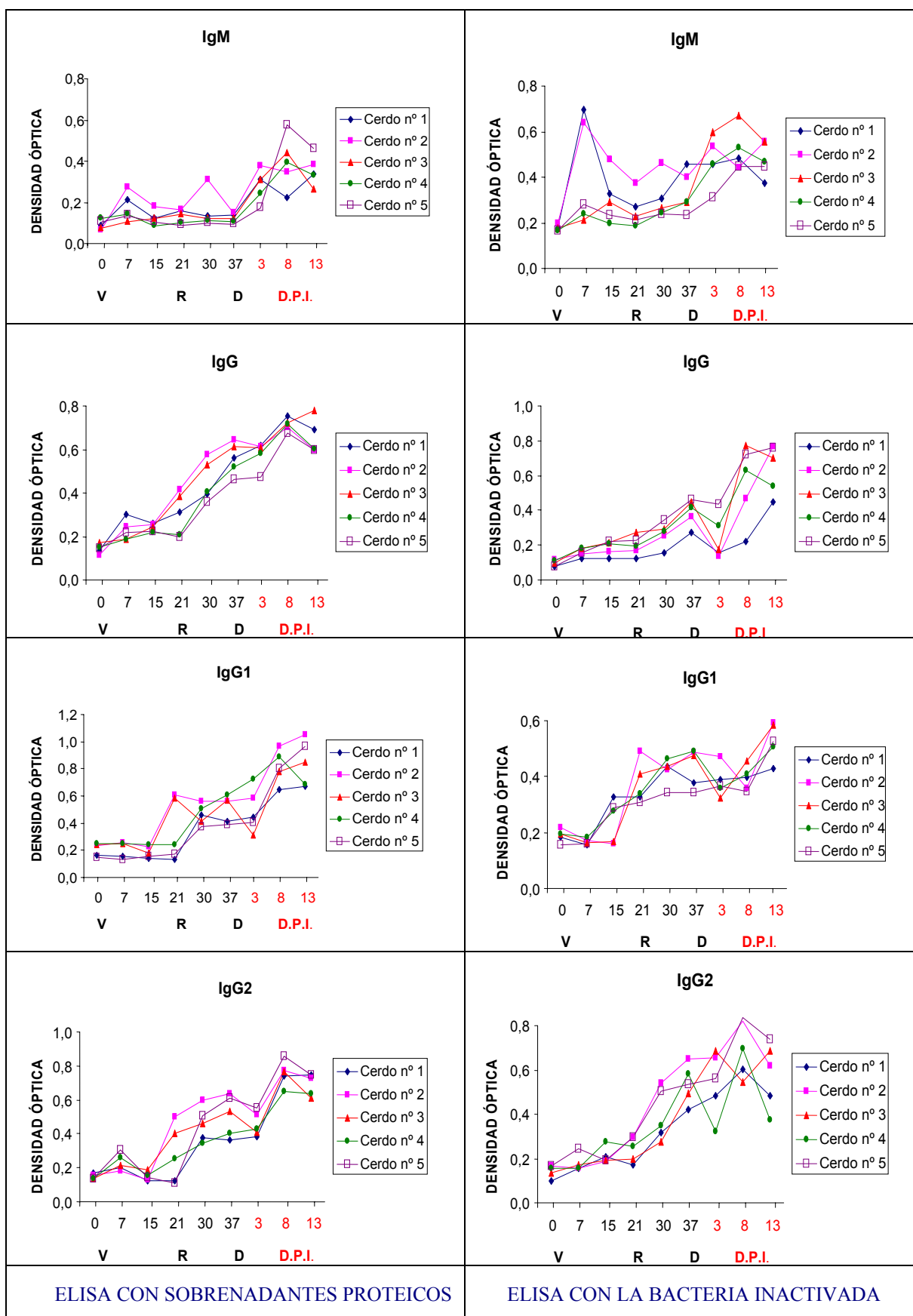


Figura 113. Evolución de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo III, inmunizado con una vacuna con OMPs y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. V, vacunación; R, revacunación; D, desafío y D.P.I., días post-infección

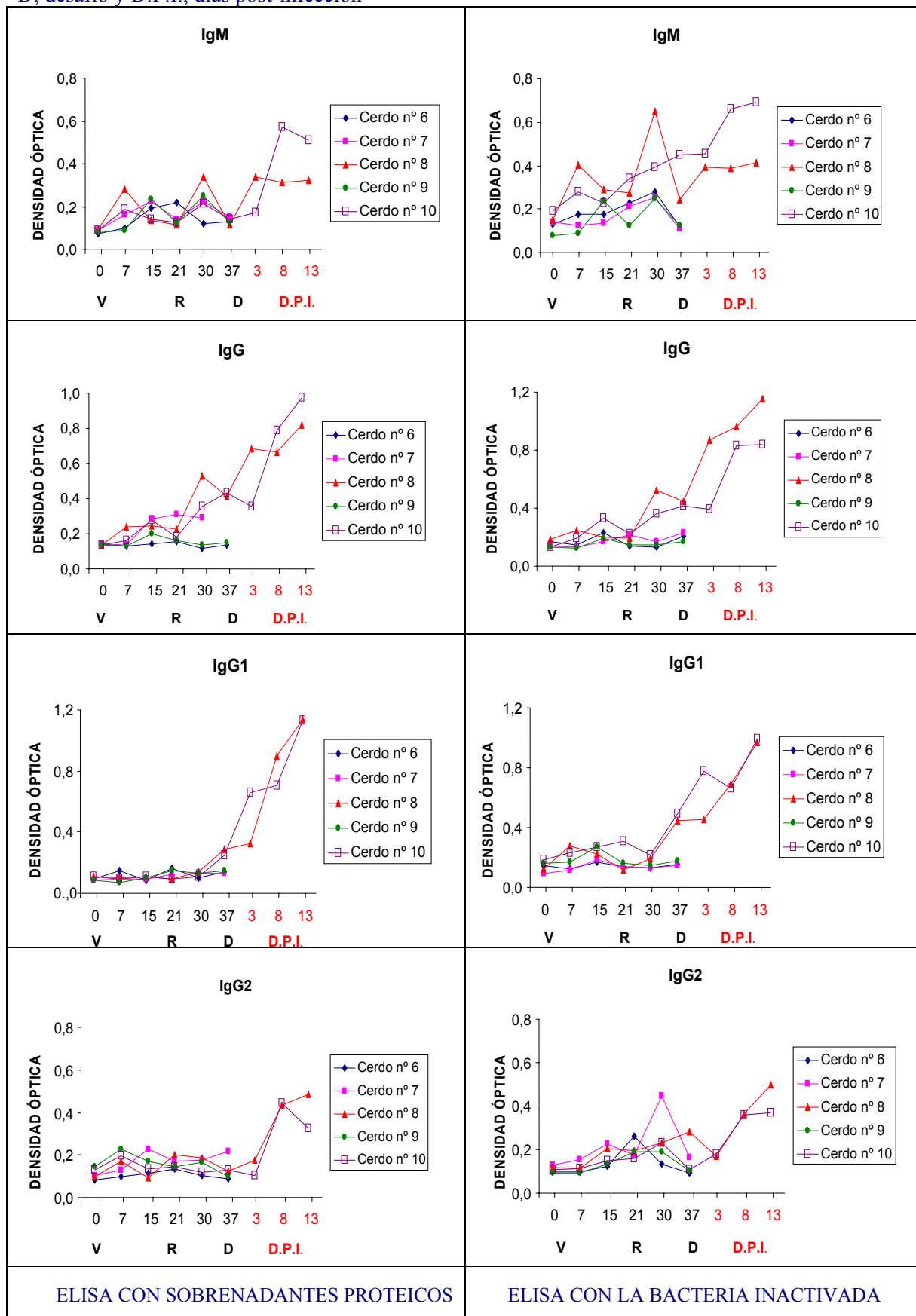


Figura 114. Evolución de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo IV, inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. V, vacunación; R, revacunación; D, desafío

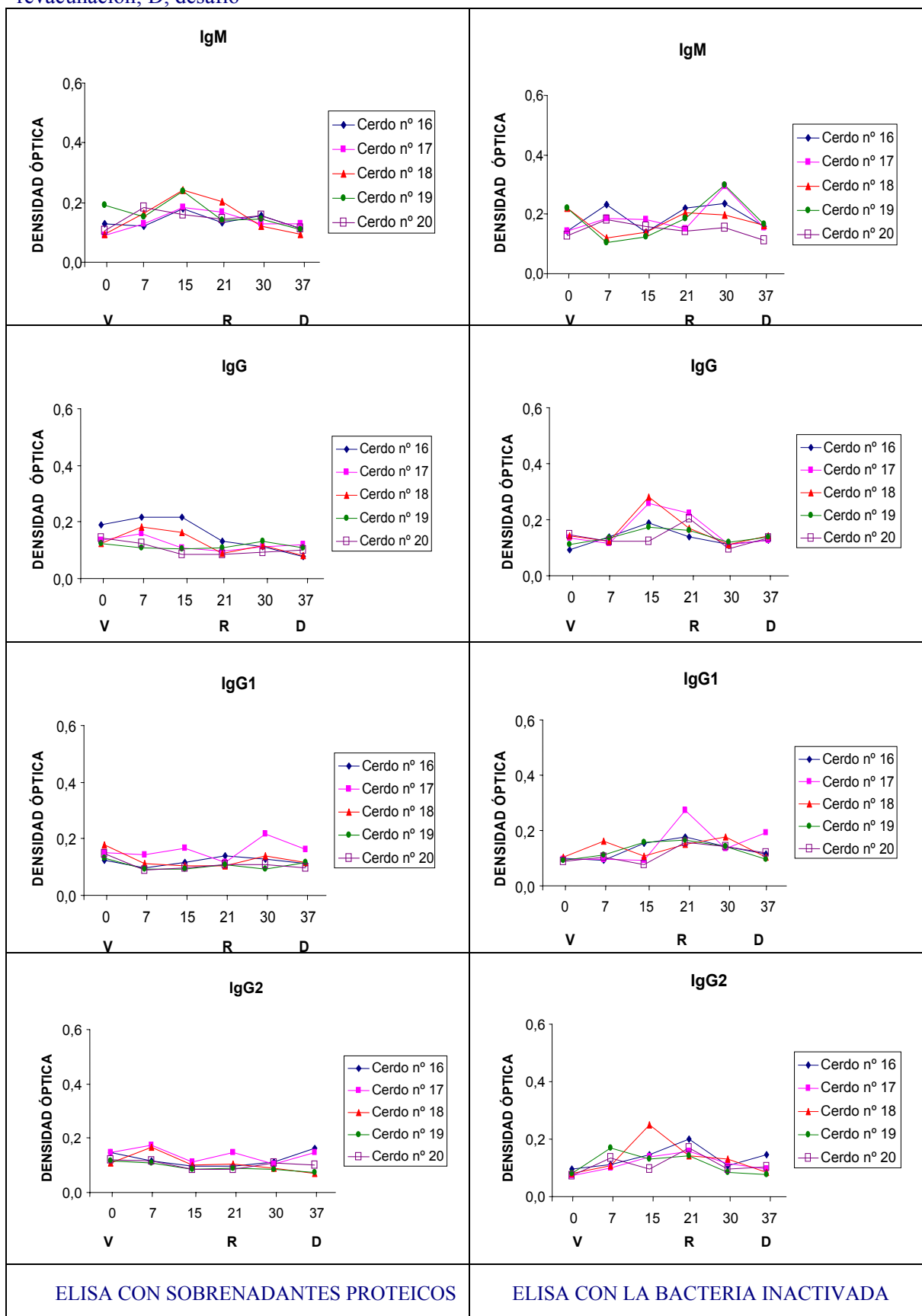


Figura 115. Evolución de las IgM, IgG, IgG1 e IgG2 en el grupo V, inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una DL de *Haemophilus parasuis*. V, vacunación; R, revacunación; D, desafío y D.P.I, días post-infección.

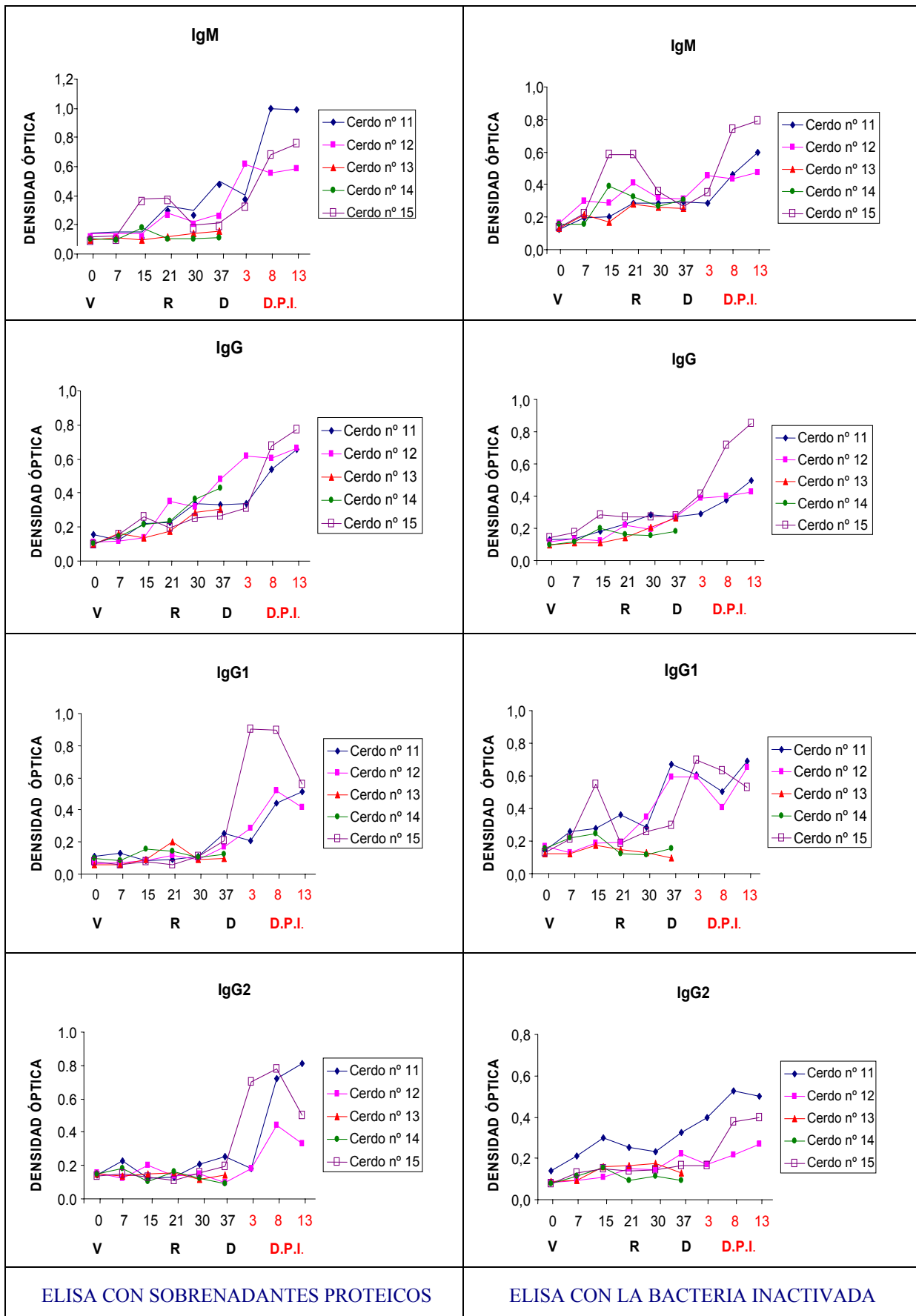


Figura 116. Evolución de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo VI, inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una DL de *H. parasuis*. V, vacunación; R, revacunación; D, desafío y D.P.I., días post-infección

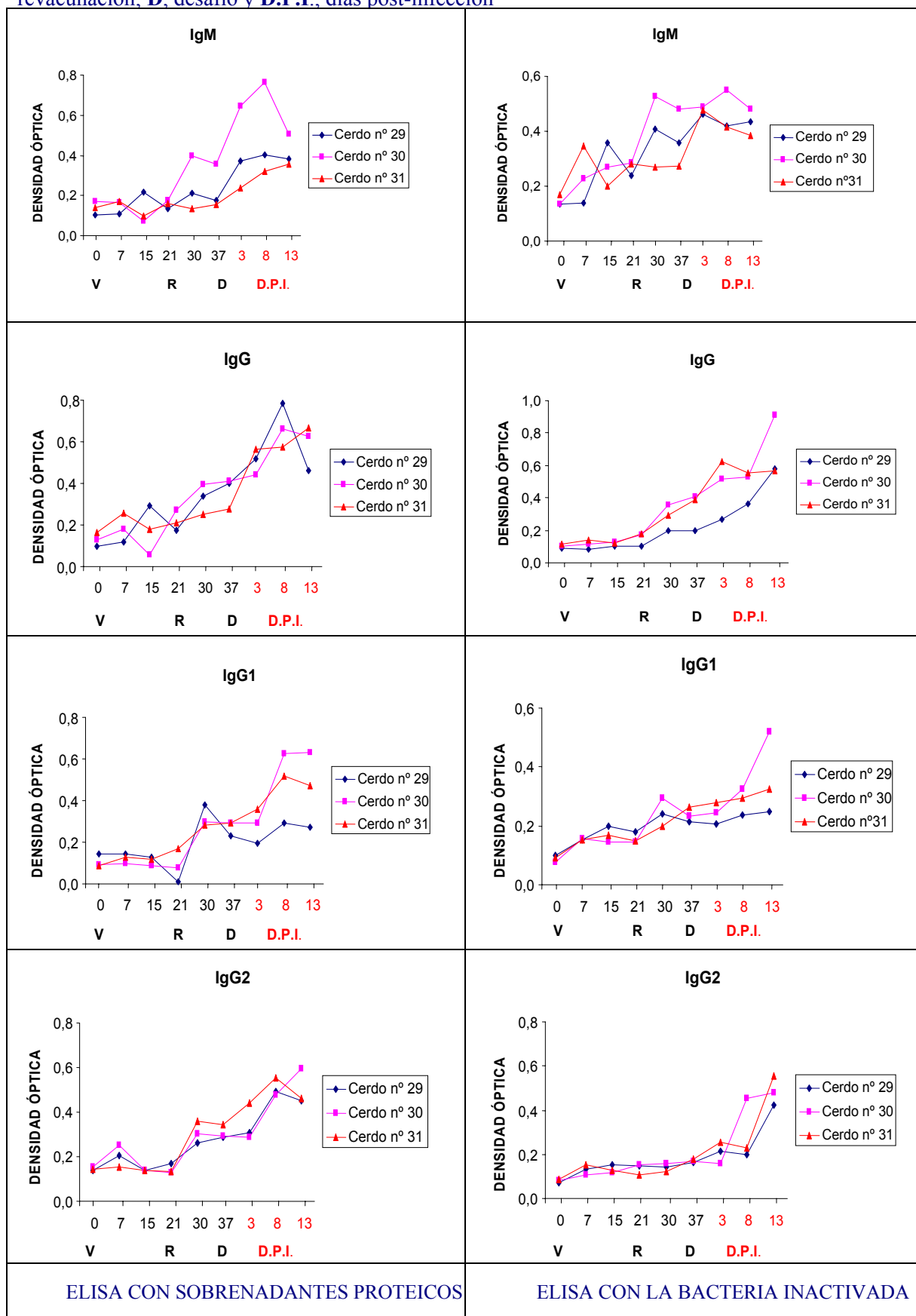
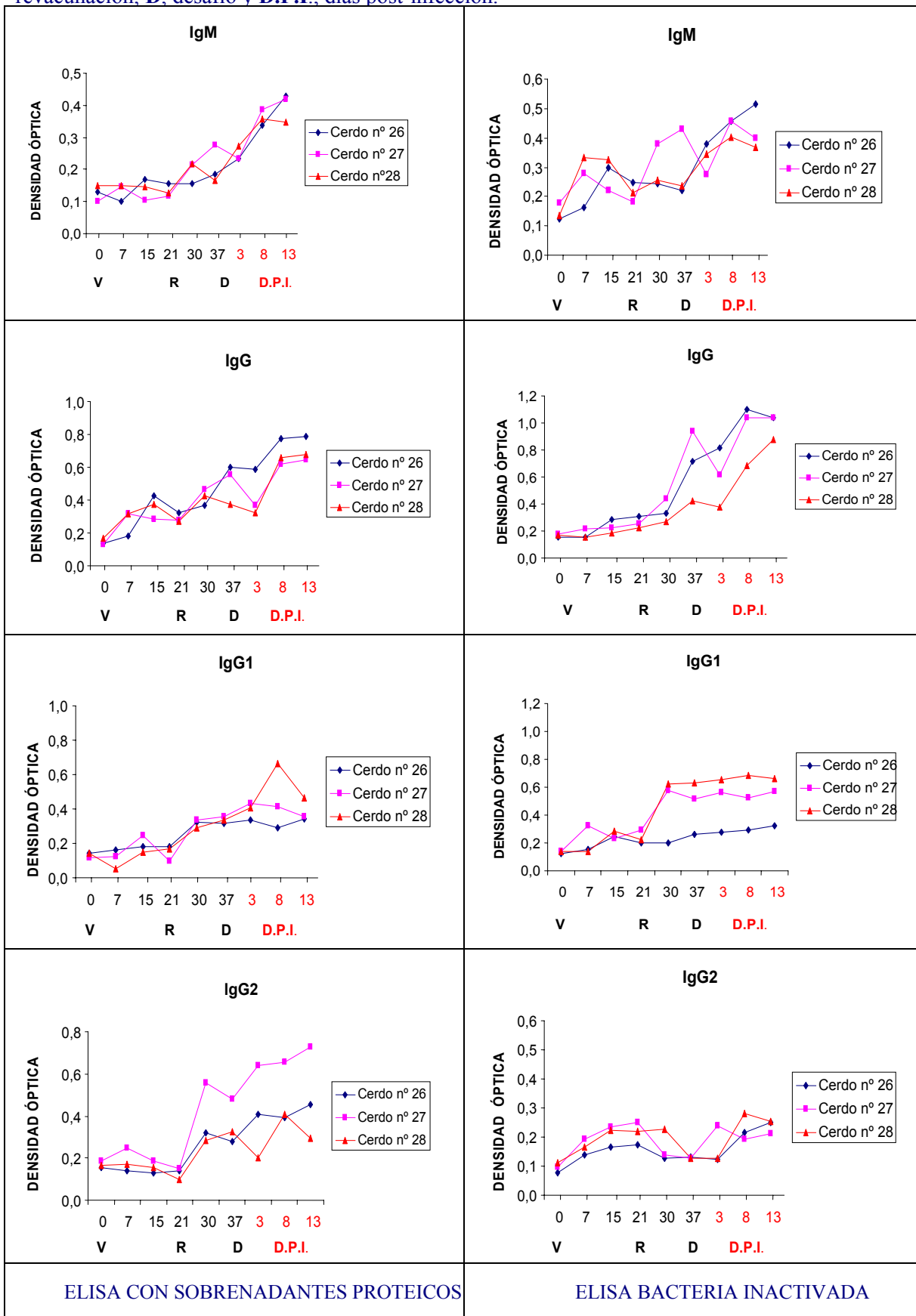


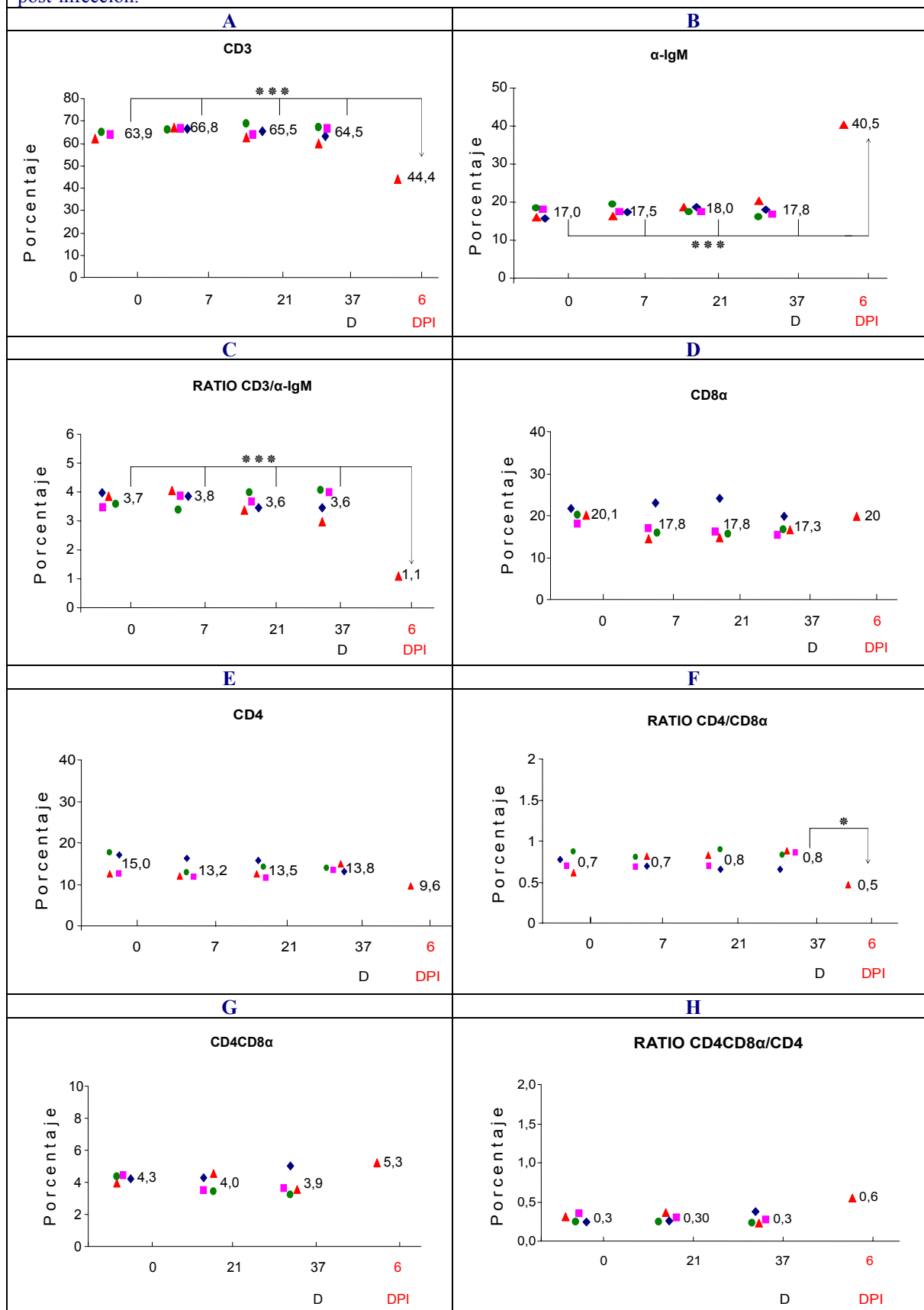
Figura 117. Evolución de las IgM, IgGt, IgG1 e IgG2 en el grupo VII, inmunizado con la bacterina comercial B y posteriormente infectado con una DL de *Haemophilus parasuis*. **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección.





### ANEXO N° IV: Evolución de las poblaciones linfocitarias en las pruebas de inmunización e infección

Fig. 118. Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo infectado con una DL (grupo I) V, vacunación; R., revacunación; D, desafío y D.P.I, días post-infección.



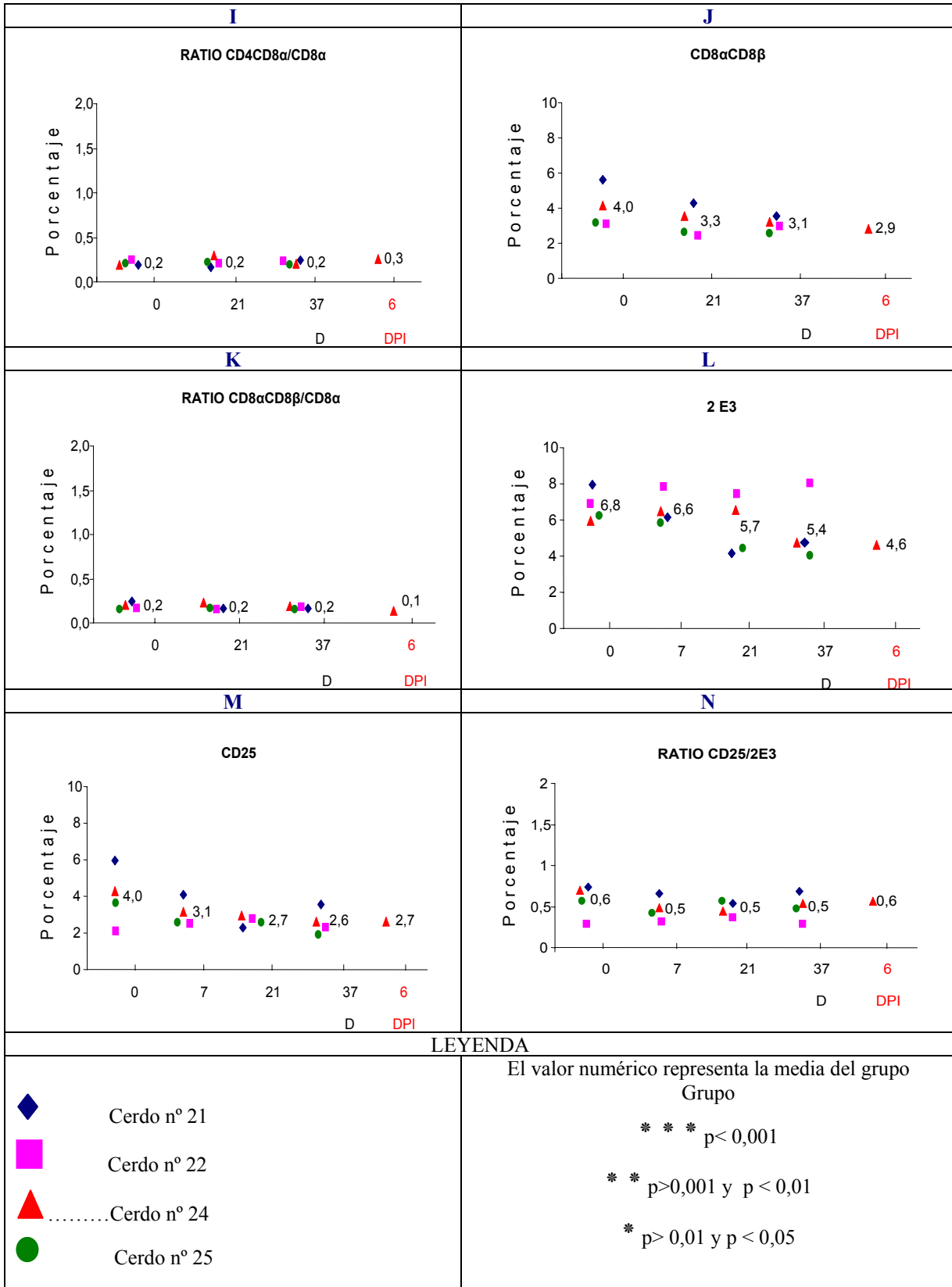
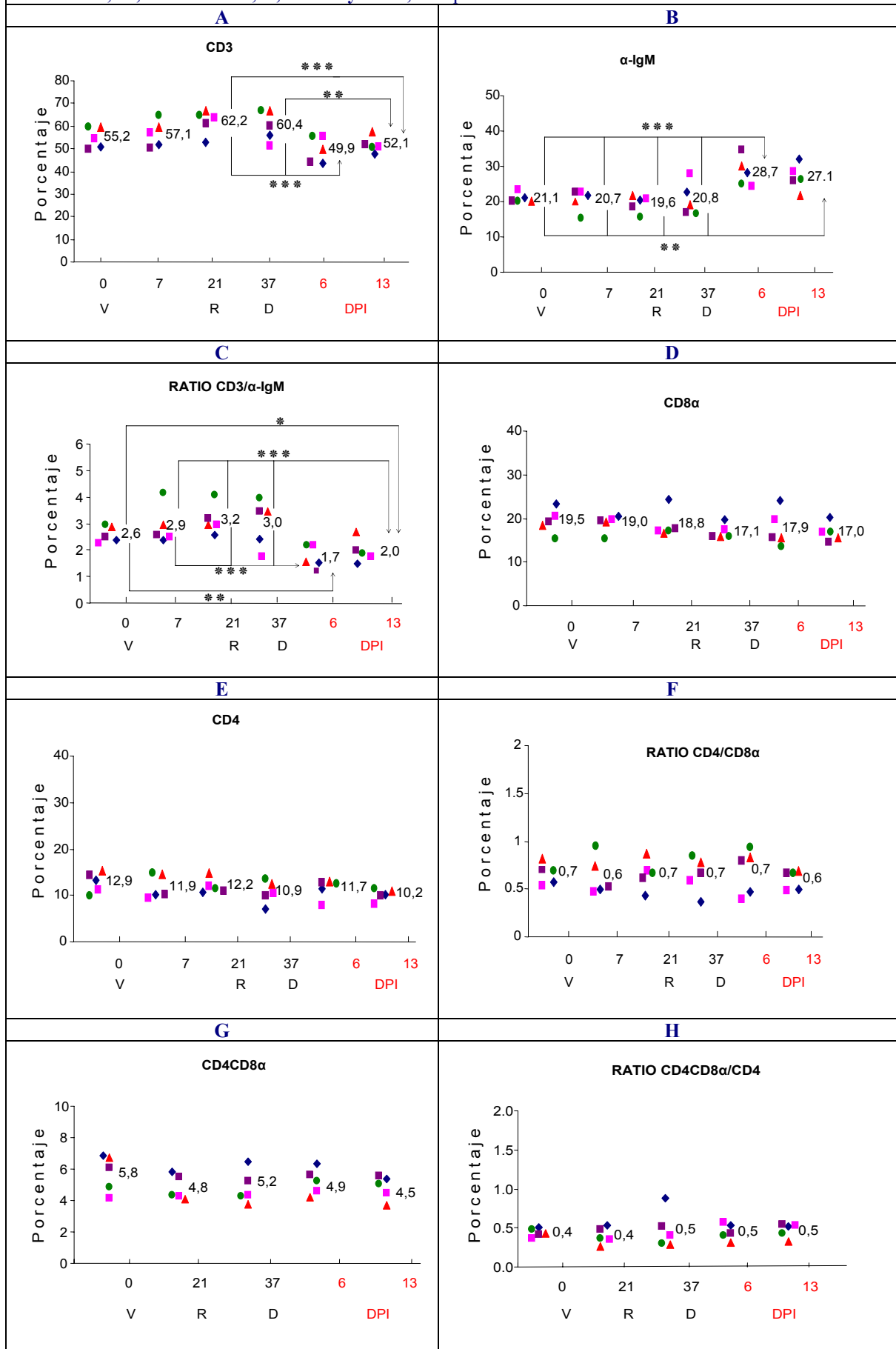


Fig. 119. Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo inmunizado con una bacterina y posteriormente infectado con una DL (grupo II). **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I.**, días post-infección



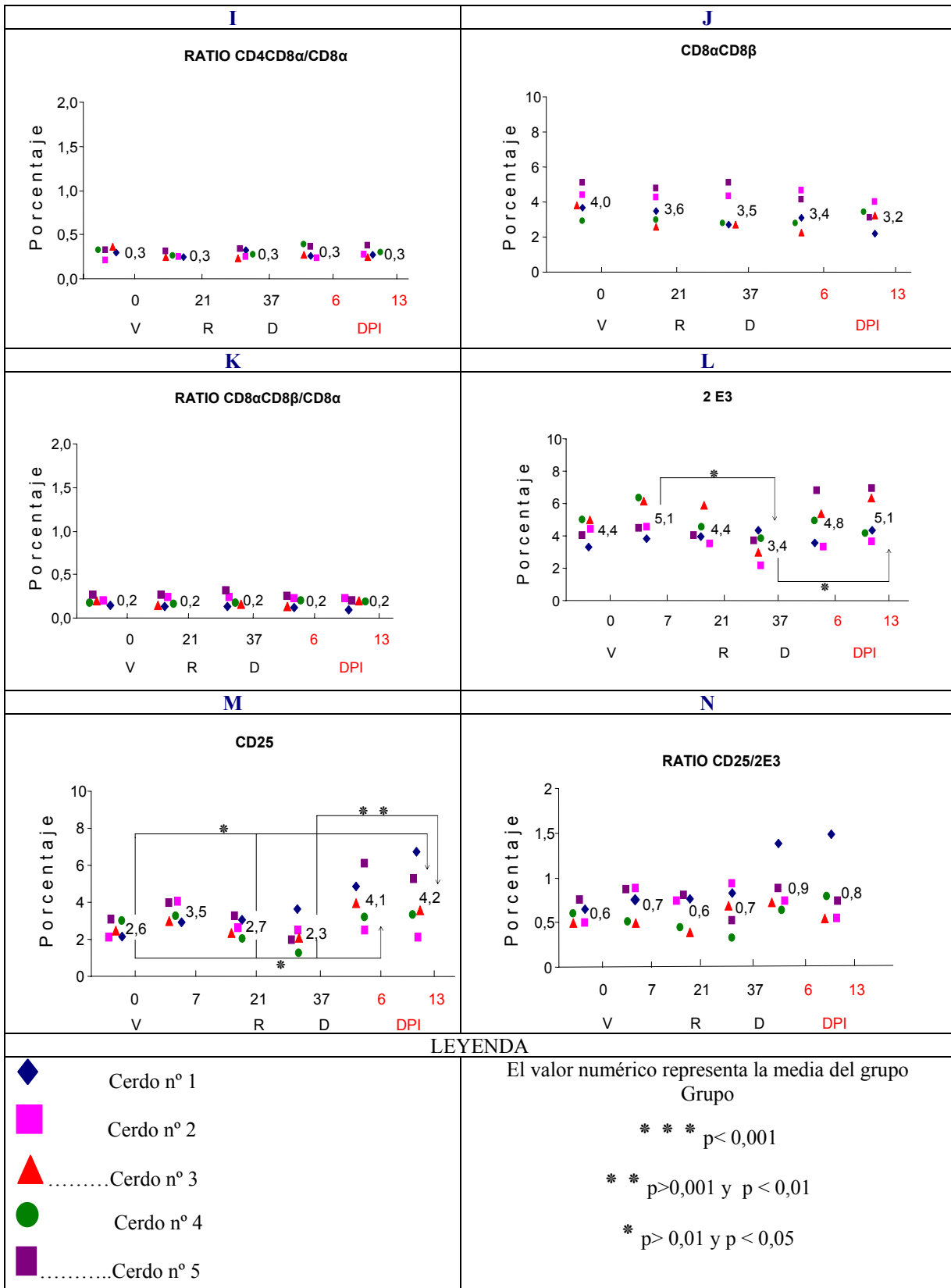
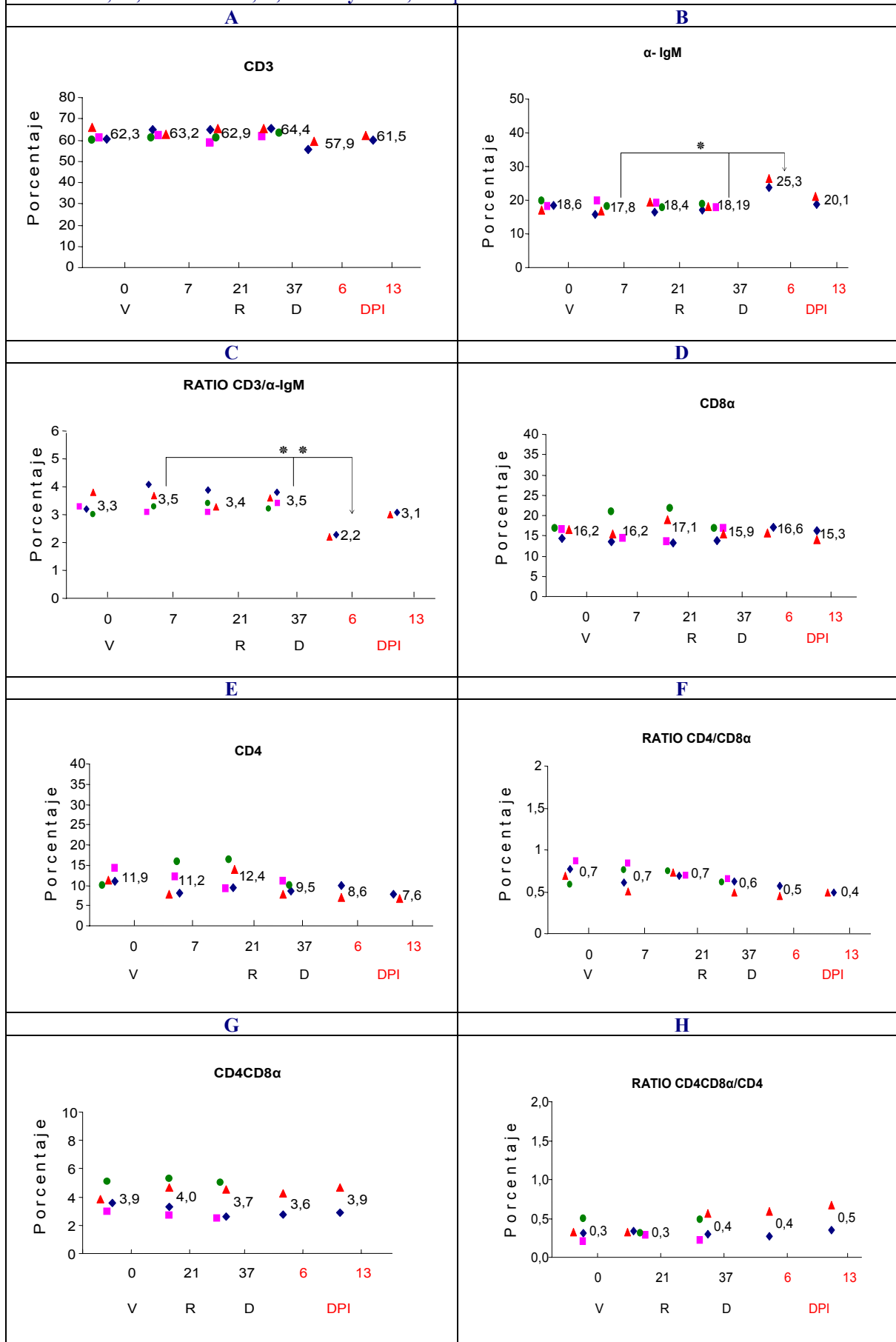


Fig. 120. Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo inmunizado con una vacuna con OMPsy posteriormente infectado con una DL (grupo III) V, vacunación; R., revacunación; D, desafío y D.P.I, días post-infección



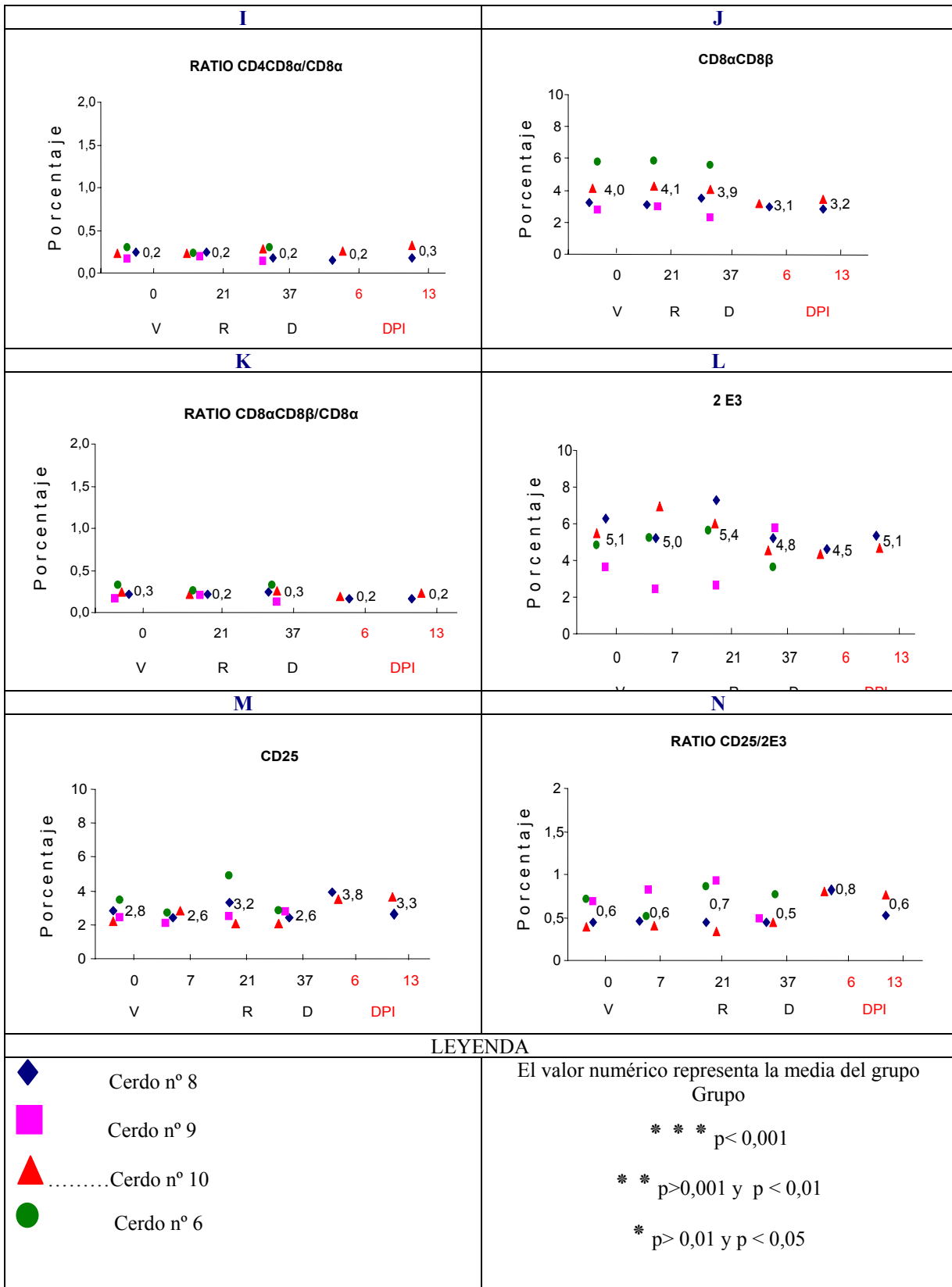
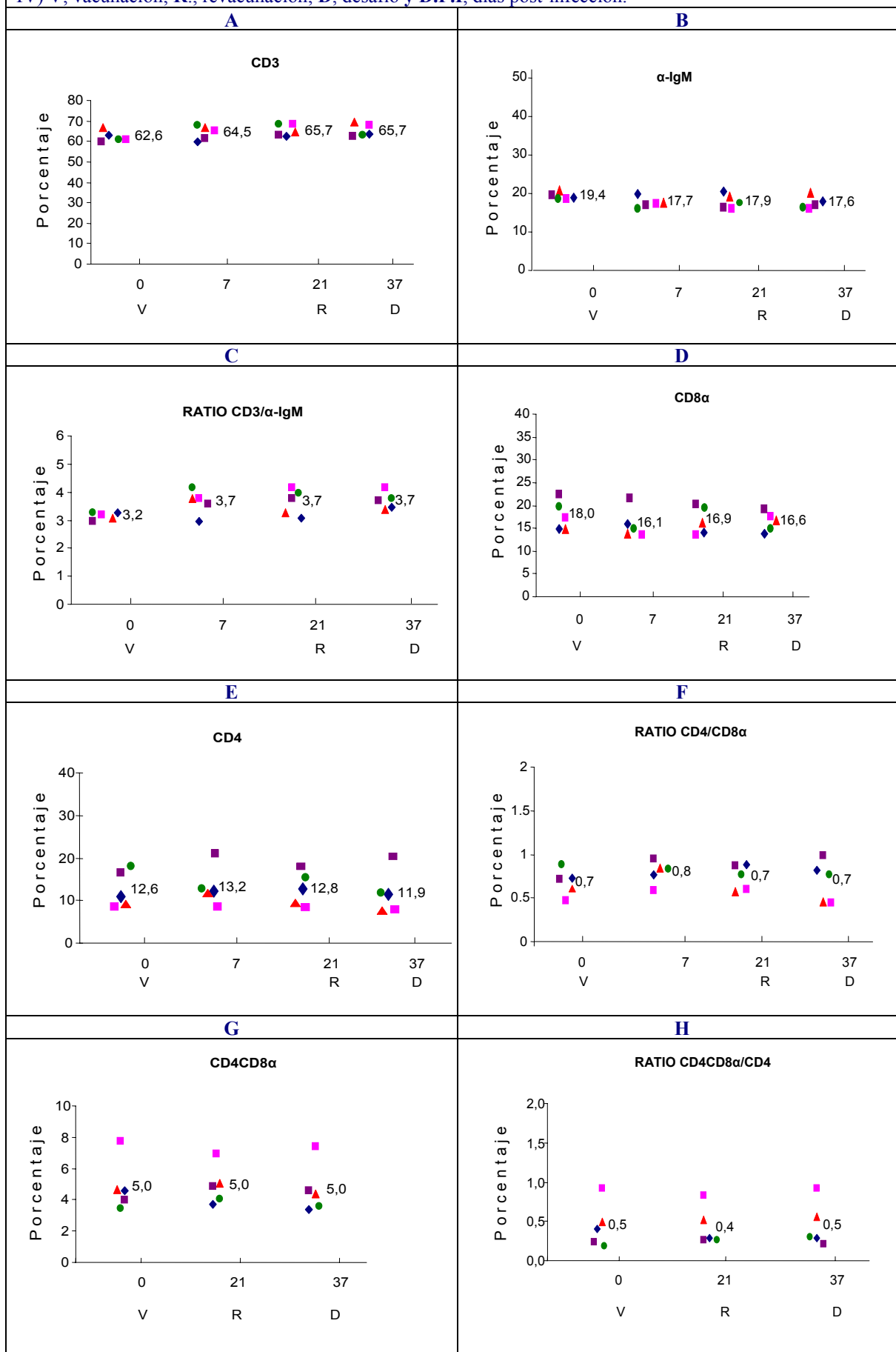


Fig. 121. Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo inmunizado con una vacuna recombinante y posteriormente infectado con una DL (grupo IV) **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I**, días post-infección.



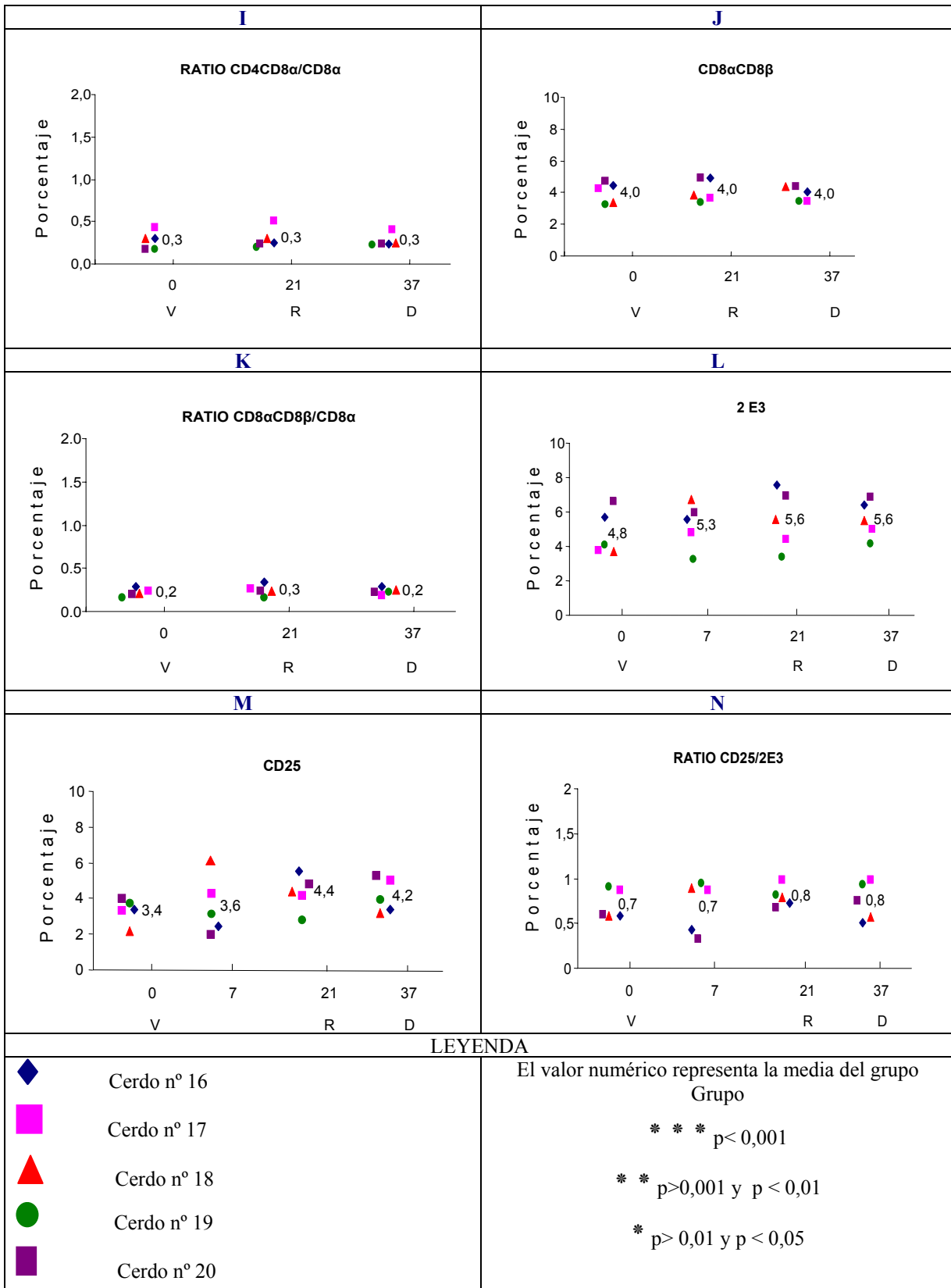
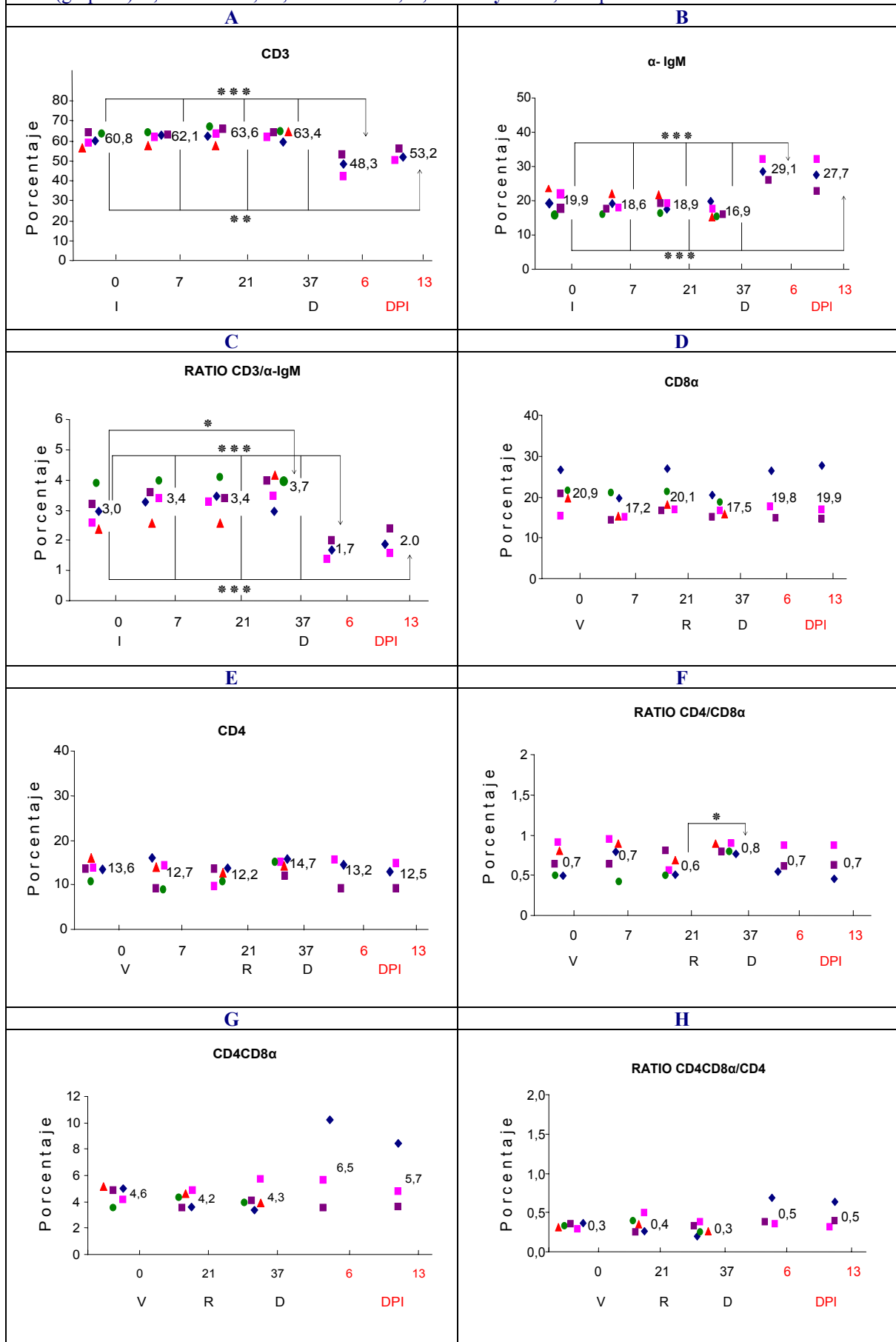




Figura 112. Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo inmunizado por exposición a una dosis subletal y posteriormente infectado con una dosis letal (grupo V) V, vacunación; R., revacunación; D, desafío y D.P.I, días post-infección..



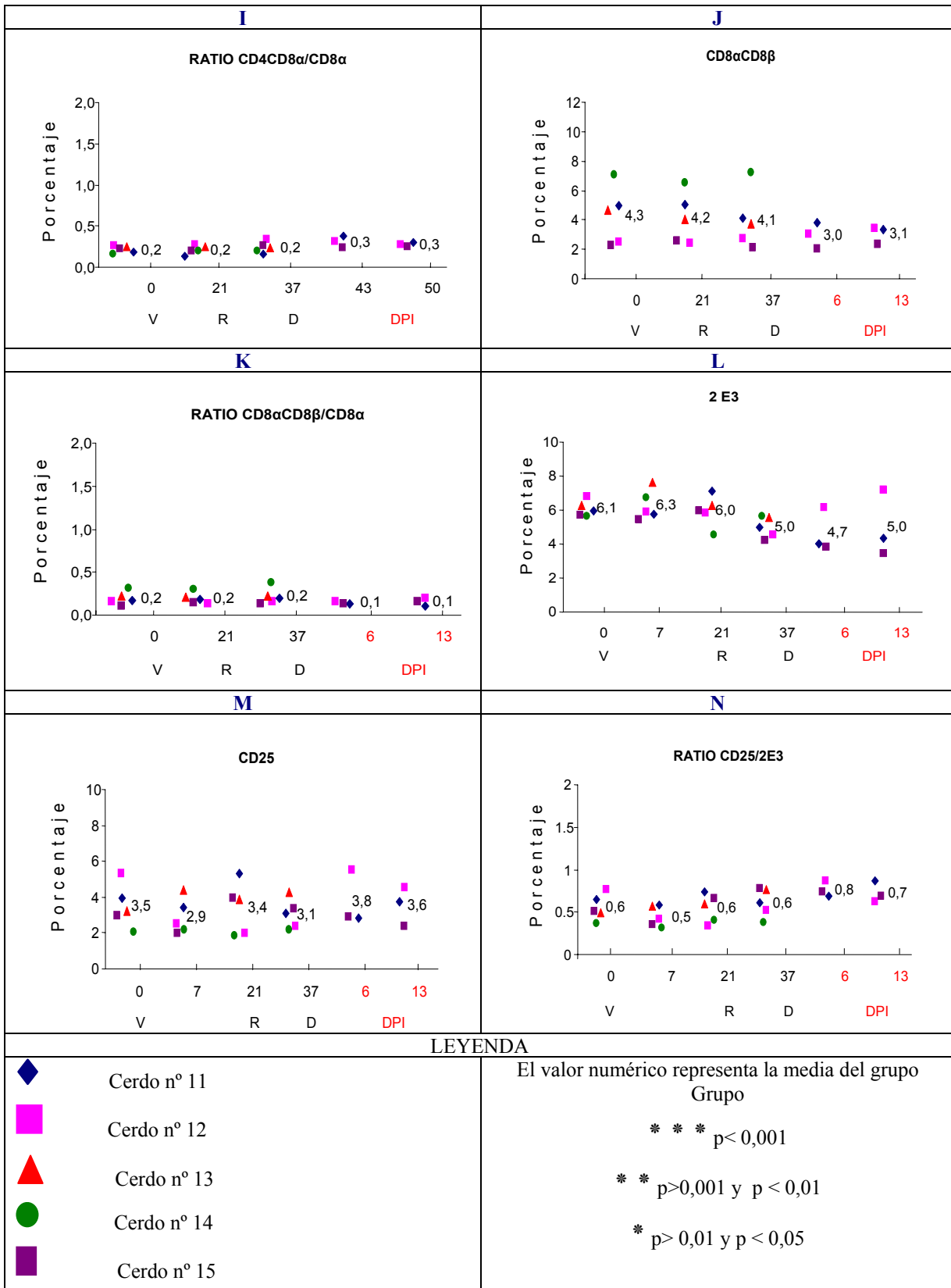
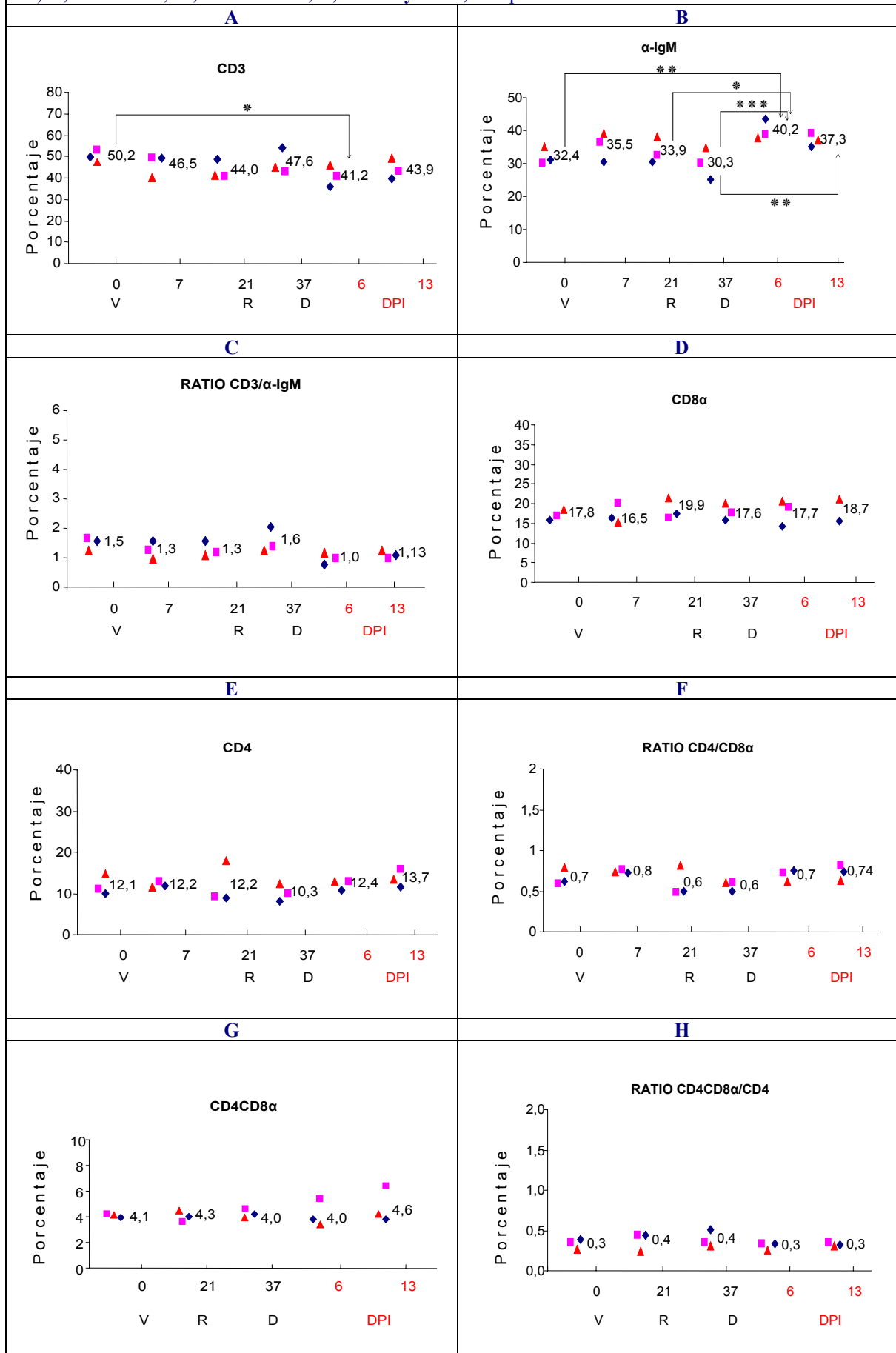


Figura 123. Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo inmunizado con la bacterina comercial A y posteriormente infectado con una DL (grupo VI) **V**, vacunación; **R**, revacunación; **D**, desafío y **D.P.I**, días post-infección.



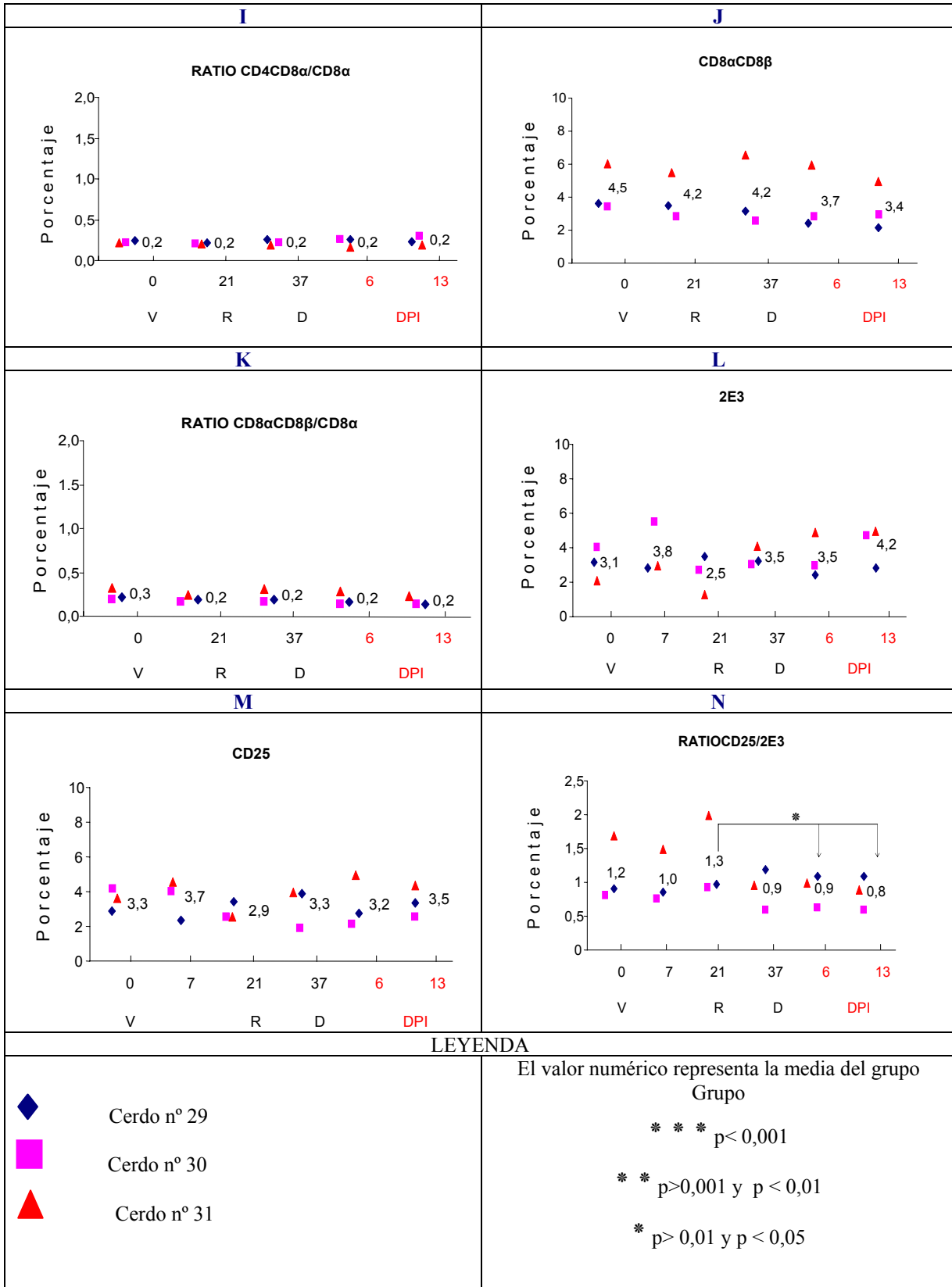
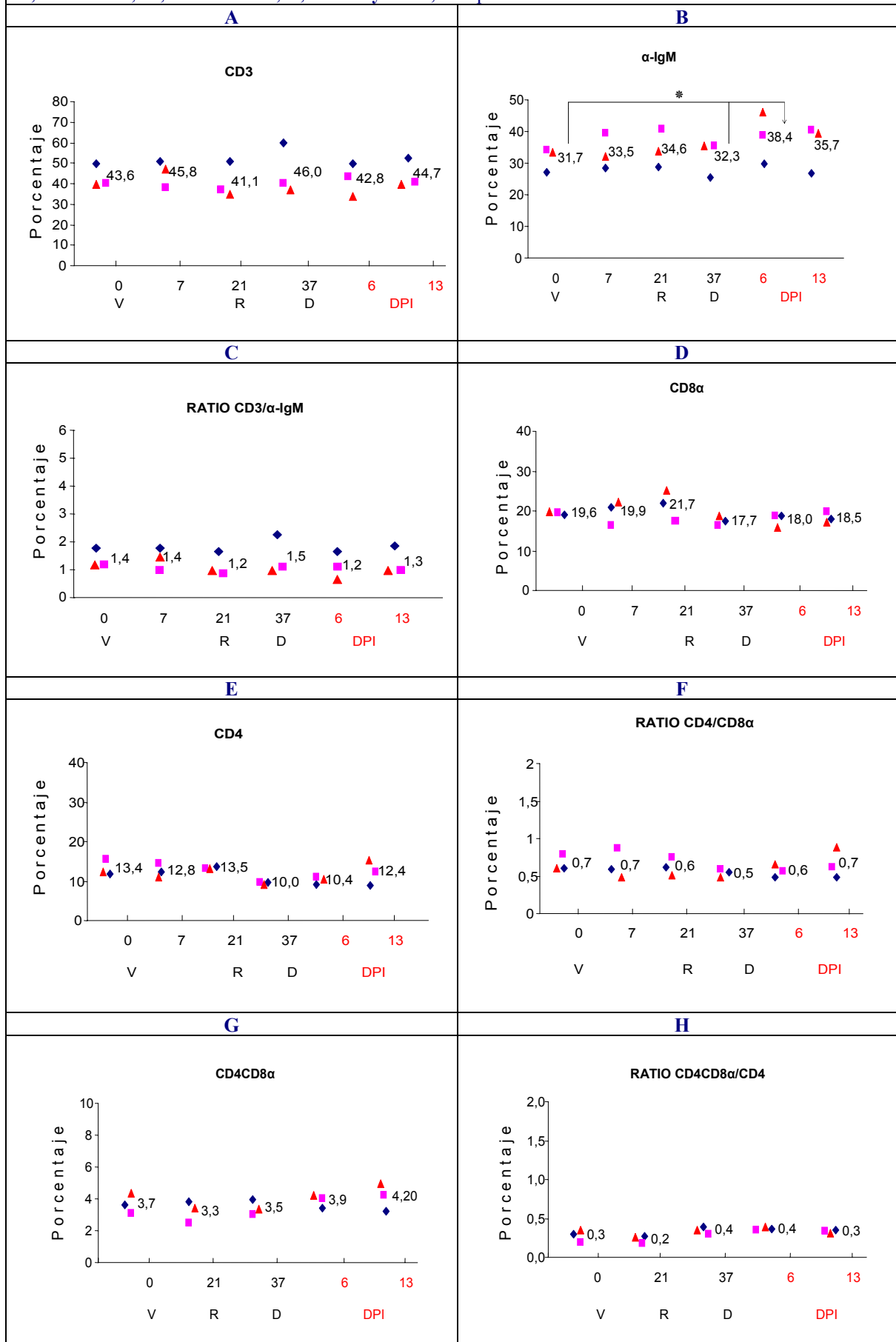
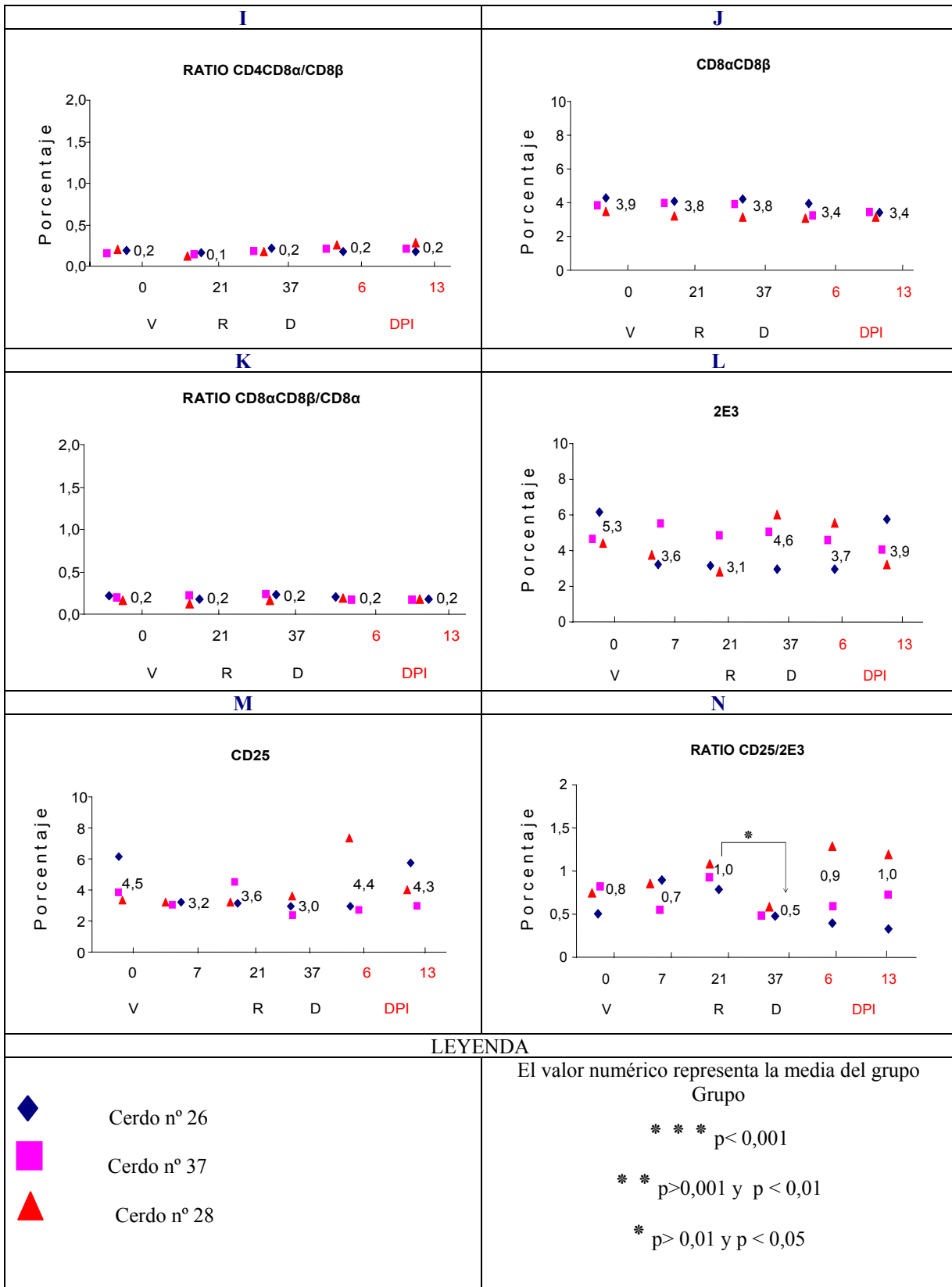


Fig. 124. Evolución del porcentaje de expresión relativo de los antígenos de diferenciación leucocitaria y sus ratios en el grupo inmunizado con la vacuna comercial B y posteriormente infectado con una DL (grupo VII) V, vacunación; R., revacunación; D, desafío y D.P.I, días post-infección.







# RESUMEN



La situación actual del sector porcino, organizado en producciones intensivas, unido a la tendencia de reducir la carga microbiana en las explotaciones, ha provocado la disminución de la protección frente a determinadas enfermedades, que previamente se habían considerado secundarias a otros procesos patológicos, como la ocasionada por *Haemophilus parasuis*, cuya incidencia ha aumentando notablemente en los últimos años.

Hasta la fecha, la información sobre la patogenia de la enfermedad provocada por esta bacteria y su interacción con el sistema inmune del hospedador es escasa, lo que dificulta el desarrollo de estrategias de prevención y control adecuadas. La falta de protección cruzada entre los serotipos, junto con el aumento de su resistencia a los antimicrobianos, hacen que resulte necesario el estudio de los mecanismos implicados en la respuesta inmune y en el desarrollo de la enfermedad, así como la evaluación de nuevas estrategias de inmunización.

Con el fin de reproducir la enfermedad se utilizaron varios modelos experimentales: ratones, cobayas y cerdos privados de calostro, resultando estos últimos los más apropiados, puesto que desarrollaron un cuadro clínico y lesional característico de la enfermedad, que nos permitió estudiar la patogenia y la respuesta inmune frente a la bacteria.

Se abordaron diferentes procedimientos de inmunización. Continuando con el trabajo realizado en nuestro laboratorio, se desarrollaron una bacterina, una vacuna con proteínas de membrana externa de *H. parasuis* y una vacuna recombinante con la proteína de fusión TbpB-His, construida frente al extremo

N-terminal de la proteína TbpB (una proteína de membrana externa implicada en la captación de hierro del hospedador). Para la formulación de la bacterina se seleccionaron las cepas de campo, una de cada uno de los serotipos 2, 4, y 5, los más prevalentes en España, por ser las que presentaban mejores características de crecimiento *in vitro*. Para la elaboración de la vacuna con proteínas de membrana externa enriquecidas en TbpB se desarrolló un protocolo para la extracción de estas proteínas en condiciones restrictivas de hierro, basado en la adición del detergente deoxicolato sódico a una concentración que permitía la solubilización de la totalidad de las proteínas sin alterar la estabilidad de la membrana. Tanto para esta vacuna como para la recombinante, advertimos que la ultrafiltración permitía aumentar su concentración proteica sin provocar reacciones adversas.

Una vez seleccionados los antígenos, se procedió a la elección de un inactivante químico apropiado. Nos decantamos por el thimerosal, puesto que de los diferentes comparados era el que precisaba una menor concentración y un menor tiempo de tratamiento para conseguir la inactivación bacteriana total (1%, durante 2 horas a 37°C), con la ventaja adicional de ejercer un efecto degradante prácticamente nulo sobre los antígenos.

Por otro lado, se desarrolló un protocolo de inoculación de la bacteria, mediante punción entre dos anillos traqueales, resultando un método sencillo, que no provocaba efectos adversos en los animales, por lo que se empleó para realizar las inmunizaciones con una dosis subletal de la bacteria y las infecciones con una dosis letal. Se realizaron pruebas de

inmunización y posterior infección con una dosis letal en cerdos privados de calostro con los cuatro protocolos de inmunización citados, reservando un grupo control sin inmunizar y, paralelamente se establecieron dos grupos con cerdos de cría convencional, que se inmunizaron con dos bacterinas comerciales. Sólo en los tres grupos inmunizados con las bacterinas (tanto las dos comerciales como la de elaboración propia) la totalidad de los animales sobrevivió a la infección, sin presentar las lesiones características de la enfermedad. Todo lo contrario sucedió con los animales que no fueron inmunizados y con los que recibieron la vacuna recombinante, que murieron como consecuencia de la infección, con un proceso septicémico agudo, tal y como se desprendió del estudio anatomopatológico. En los dos grupos restantes, inmunizados por exposición a una dosis subletal y con una vacuna con proteínas de membrana externa se observaron diferencias interindividuales importantes: mientras algunos animales sobrevivieron, generalmente sin presentar lesiones, otros murieron con un proceso septicémico similar al descrito previamente. Sólo se pudo recuperar la bacteria a partir de los animales que murieron, si bien la concentración de estos aislamientos fue disminuyendo progresivamente, desde una distribución multisistémica a una casi exclusiva de las serosas.

El estudio de la respuesta humoral reveló que todos los animales que sobrevivieron al desafío, con independencia del tipo de inmunización recibida, habían desarrollado previamente anticuerpos: tanto IgM como IgGt (IgG1 e IgG2). La cinética de producción de anticuerpos se caracterizó por una mayor

intensidad de la respuesta mediada por las IgGt tras la revacunación, todavía más evidente después del desafío, cuando se alcanzaron las concentraciones máximas de estas inmunoglobulinas. El subisotipo IgG1 se indujo principalmente frente a los antígenos proteicos mientras que el IgG2 se sintetizó frente a las células completas. El desarrollo IgG1 tras el desafío fue superior en los lotes inmunizados por exposición a una dosis subletal y con una vacuna con proteínas de membrana externa, mientras que en los grupos vacunados con bacterinas predominaron las IgG2. En los cerdos que murieron, sólo se pudo valorar la respuesta humoral antes del desafío, que fue prácticamente nula, especialmente en el caso de los animales no inmunizados y los que recibieron la vacuna recombinante, que nunca presentaron seroconversión frente a los antígenos de *H. parasuis*.

El análisis de la respuesta celular puso de manifiesto que no se producían cambios en las poblaciones leucocitarias de la sangre periférica tras las inmunizaciones pero sí después del desafío. A partir de este momento, el estudio se centró exclusivamente en los cerdos supervivientes ya que sólo uno de los animales que murieron como consecuencia de la infección consiguió sobrevivir el día en el que se realizó la primera valoración de esta respuesta.

En todos los cerdos se observó la proliferación de monocitos y granulocitos en respuesta a la infección. Con respecto a las subpoblaciones linfocitarias, aumentó la expresión relativa del marcador  $\alpha$ IgM (linfocitos B), lo que se ha relacionado con el inicio de la respuesta adaptativa y, en menor medida, disminuyó la del CD3 (linfocitos T) y

el ratio CD3/IgM, principalmente a los 6 días, y de forma más acusada en el cerdo que murió tras la infección. No se produjeron cambios reseñables en las subpoblaciones de linfocitos T, salvo por un descenso de la ratio CD4/CD8 $\alpha$  en el cerdo que murió.

Para completar este estudio, se llevaron a cabo pruebas de proliferación *in vitro* con sangre completa de cerdos SPF, en los que las bacterias inactivadas por calor resultaron mejores inductoras que las proteínas de la membrana externa. La respuesta también fue muy acusada frente a los extractos eluidos que contenían, entre otros componentes, la proteína de fusión TbpB-His.

La variación en los niveles de las proteínas de fase aguda, pig MAP, haptoglobina (HPT), proteína C-reactiva (CRP) y apolipoproteína A-I en respuesta a la infección presentó en todos los animales una duración e intensidad directamente relacionadas con la gravedad del cuadro clínico: por tanto, resultó inferior en los cerdos que sobrevivieron, cuyos niveles se reestablecían a los 3 días, especialmente en los cerdos de cría convencional, que sólo presentaron variaciones en las concentraciones de la CRP y la HPT. La única excepción fue uno de animales supervivientes inmunizado con una dosis subletal, que presentó una segunda respuesta de mayor intensidad, a partir de los 6 días, lo que podría relacionarse con la meningitis que padecía

Con el fin de caracterizar el papel de las citocinas en el desarrollo de la respuesta inmune, se estudio su expresión tras el desafío en diversos órganos linfoides, como el bazo y los ganglios retrofaríngeos, así como en otros

órganos diana, como el pulmón y el cerebro. En concordancia con lo descrito por otros autores, se encontró una gran variabilidad entre los animales de un mismo grupo, por lo que esta investigación se amplió con un estudio comparativo entre los animales que murieron y los que sobrevivieron a la infección.

Se obtuvieron diferencias importantes respecto a la IL-4, cuya expresión se detectó casi exclusivamente en los supervivientes, salvo en el caso del cerebro, en el que no se detectó prácticamente en ningún animal. Se trata de una citocina que induce la respuesta de tipo Th2, mediada por anticuerpos, que ya hemos descrito previamente en estos animales.

La IL-1, con la excepción del pulmón, presentó una expresión mayor en los cerdos que murieron. Esta citocina interviene en el desarrollo de la inflamación, proceso que observamos principalmente en este grupo de cerdos, salvo en el caso del pulmón, puesto que se advirtieron procesos neumónicos en todos los animales, aunque la causa no fuera siempre achacable a *H. parasuis*.

La expresión de la IL-6 en el pulmón resultó superior en los animales que murieron, al contrario que en los ganglios. Se trata de una citocina que interviene en el desarrollo de la inflamación, pero también en la inducción de una respuesta de tipo Th2, que podría estar iniciándose en los ganglios de los cerdos supervivientes. Su expresión en el bazo y el cerebro, con muchas diferencias interindividuales, no permitió establecer una relación clara con la respuesta a la infección.

Los niveles de la IL-10 no presentaron diferencias reseñables en el pulmón y en el cerebro, pero sí en los ganglios y el bazo, con

una expresión mayor en los animales supervivientes, lo que de nuevo se podría relacionar con la inducción de una respuesta de tipo Th2 asociada a esta citocina.

Finalmente, las citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , generalmente presentaron una expresión mayor en los animales supervivientes, excepto en el cerebro de los cerdos inmunizados con la bacterina no comercial. Se trata de dos citocinas que, además de su papel en la inflamación, intervendrían en el desarrollo de una respuesta adaptativa en los animales supervivientes estimulando la presentación antigénica y la activación celular, además también la participación del IFN- $\gamma$  en el desarrollo de una respuesta de tipo Th1.



# SUMMARY

The current situation of porcine husbandry, organized in intensive productions, together with the tendency of reducing the microbial charge in farms, have caused a decrease in protection to some diseases, which have been previously considered secondary to other infectious diseases. This is what is happened with the disease caused by *H. parasuis*, whose incidence has risen in the last years.

To date, the information about the pathogeny of this disease and the interaction between *H. parasuis* and the porcine immune system is limited, which makes difficult the development of control and prevention measures. The absence of cross protection between serotypes, together with the increase in antimicrobial resistances, evidence that studies about the mechanism involved in the immune response and disease pathogenicity are required, as well as the evaluation of new immunization strategies.

Some animal models were used to try to reproduce the disease: mice, guinea pigs, and colostrum deprived piglets. This latter model was the most suitable because the piglets showed clinical signs and lesions typical of the disease, which allow us to study the pathogenic mechanism and the immune response developed against *H. parasuis*.

Some different immunization protocols were evaluated. Following our previous work, a bacterin, and OMPs-vaccine and a recombinant vaccine with the fusion protein, containing the N-terminus domain of the *H. parasuis* TbpB protein (which is involved in the iron uptake systems) were developed. Three field strains, belonging to serotypes 2, 4

and 5, the more prevalent ones in Spain, were selected for the preparation of the bacterin, according to their best growth features *in vitro*. The OMPs-vaccine was formulated with cell-free supernatants containing outer membrane proteins extracted under iron restricted conditions, by adding a suitable concentration of sodium deoxycholate, which allowed a complete release of these proteins without affecting the integrity of the outer membrane. The ultrafiltration enables to increase the protein concentration during the antigen processing of both the recombinant and the conjugate vaccines.

The next step was to choose an appropriate chemical agent capable to inactivate *H. parasuis*. Thimerosal was the product selected, because lower time and concentration of treatment (1‰, for two hours at 37°C) were sufficient to ensure a total bacterial inactivation, with the additional advantage of not reacting with *H. parasuis* antigens.

On the other hand, a protocol for the inoculation of pigs with *H. parasuis* was developed by puncture between two tracheal rings, being an easy method without adverse reactions. A sublethal dose of *H. parasuis* for immunization and a lethal one for infection were selected.

Several trials with groups of colostrum deprived piglets were developed. They consisted in four immunizations, one for each of the protocols described, which were followed by a posterior infection with a lethal dose in all cases. In parallel, two similar experiments were performed with naturally farrowed pigs, which were also infected with a

lethal dose after its immunization. In this case, two commercial bacterins were used. All pigs survived after the infection only in the bacterin-vaccinated groups, without typical lesions of the disease. Quite the opposite happened with the non-immunized animals or with those immunized with a recombinant vaccine, which died as a consequence of the infection, showing an acute septicaemia, as it could be deduced from the anatomopathological study. In the remaining groups, immunized by an exposure to a sublethal dose or with an OMPs-vaccine, significant differences were found between the animals located in the same group: while some pigs survived, usually without lesions, other animals died showing a septicemic process similar to the previously described. *H. parasuis* was only recovered from the samples belonging to the animals which died after the infection, although the isolation rate reduced progressively, from a systemic to an almost exclusively serous-distribution.

The study about the humoral response revealed a specific antibody production, IgM and IgGt (IgG1 and IgG2), which was present in all pigs surviving the challenge, irrespective of the type of immunization received. The kinetic of this response was characterized by a higher intensity of the IgGt induction after the second vaccination, even more evident after the challenge, when the highest concentrations of these immunoglobulins were reached. The IgG1 subclass was mainly induced against protein antigens, while IgG2 was developed against whole bacterial cells. The IgG1 production was prevalent in the groups immunized by an exposure to a sublethal dose or with an OMPs-vaccine, whereas in all the

bacterin-vaccinated pigs, the IgG2 subclass was. The humoral response in pigs which died only could be studied before the challenge, and it was practically inexistent, especially in the non-immunized pigs or in those vaccinated with a recombinant protein. Both groups showed no seroconversion to the *H. parasuis* antigens.

The analysis of the cellular response showed the absence of changes in the leukocyte populations in peripheral blood as a consequence of the immunization, however these changes were observed after the challenge. From this moment, the study was carried out exclusively on the survival pigs, because only one of the pigs which died after infection remained alive the first measure day.

Monocyte and granulocyte proliferations were noticed in all pigs from the different trials as a response to the infection. With regard to the lymphocyte subpopulations, the relative expression of the antigen  $\alpha$ IgM (B cells) was increased, which could represent the transition from innate to adaptive immune response; and to a lesser extent, the relative percentage of CD3<sup>+</sup> cells (T cells), and the CD3/ $\alpha$ IgM rate decreased, mainly six days after the infection, especially in the pig which died after the challenge. No remarkable changes in the T lymphocyte subpopulations were observed, except for a decrease in the CD4/CD8 $\alpha$  rate from the pig which died.

In order to complete this study, *in vitro* proliferation assays with whole blood from SPF pigs were developed, revealing the better role as inducers of the whole bacterial cells compared to OMPs. The proliferation was also outstanding in response to the extracts



containing the TbpB-His recombinant protein, among other components.

The concentration changes in pig MAP, haptoglobin (HPT), C-reactive protein (CRP), and apolipoprotein A-I, in response to the infection showed in all animals a duration and an intensity directly related to the presence and intensity of clinical signs. Therefore these changes were lower in those pigs that survived, whose proteins levels were re-established three days after the challenge, especially in naturally farrowed pigs, in which only changes in the CRP and HPT concentrations were noticed. One pig from the group immunized with a sublethal dose exposure showed a higher intensity second response from the 6<sup>th</sup> day after the infection. This fact could be related to the meningitis which was detected in this animal.

In order to characterize the role of cytokines in the immune response, its expression after the challenge in some lymphoid organs (spleen and retropharyngeal lymph nodes) and target (brain and the lungs) was tested. According to the others authors, a high variability between the animals belonging to the same group was found, and for this reason, the research was extended with a comparative study between the animals which died after the infection and those surviving.

Remarkable differences were obtained with IL-4, whose expression was almost detected in those pigs which survived, except for the brain, because in this organ this cytokine was found only in two animals of the study. This is a cytokine inducing a Th2 response, which we has been previously described in these animals, in our study.

IL-1 showed a higher expression in the pigs died. This cytokine supports inflammation, which was mainly noticed in this group of pigs, except for lungs, since pneumonia was observed in all animals, although its etiology could not always be associated with *H. parasuis* infection.

The lung IL-6 expression was higher in the pigs that died, contrary to that observed in the lymph nodes. This is a pro-inflammatory cytokine, but it also contributes to the induction of a Th2 response, which could be starting in lymph nodes from survival pigs. Its spleen or brain expression, with a lot of inter-individual differences, did not allow us to establish a clear connection with the response to infection.

The lung or brain IL-10 levels did not show remarkable differences, but did in spleen and lymph nodes, with a higher expression in survival pigs. This fact could be again related with the induction of a Th2 response, associated to this cytokine or with its anti-inflammatory properties.

Finally, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , showed usually higher levels in survival pigs, except for brain in the group vaccinated with a non-commercial bacterin. Both are pro-inflammatory cytokines, that could also contribute to the induction of the adaptive response in the survival animals by stimulating the antigen presenting process and cell activation, as well as a Th1 response in case of the IFN- $\gamma$ .