

XX REUNION NACIONAL ANVEC 85

TITULO ESTUDIO DE LA FRACCION CAPSULAR DEL *Haemophilus pleuropneumoniae*  
AUTOR (es) RONERO A.: CALZADA, P.: TORTORA J.: CIPRIAN, A.: y CAMACHO, J.  
INSTITUCION FES-CUAUTITLAN, UNAM.  
AREA SANIDAD ANIMAL. Tesis

INTRODUCCION.

La neumonía causada por *Haemophilus pleuropneumoniae* representa en la actualidad grandes pérdidas económicas para la porcicultura Nacional; por lo que es necesario incrementar estudios tendientes a dilucidar la patogenia y el control de la enfermedad.

Han surgido una amplia variedad de bacterinas; sin embargo actualmente no existe una bacterina eficaz que permita controlar o erradicar la pleuropneumonía en granjas porcinas.

Se ha sugerido que el material capsular de *Haemophilus pleuropneumoniae* constituye un antígeno protector. La composición química de este antígeno se ha postulado en otras bacterias que está constituido por Polirribofosfato, lo cual sugiere su utilización como inmunógeno en la prevención de pleuropneumonía porcina.

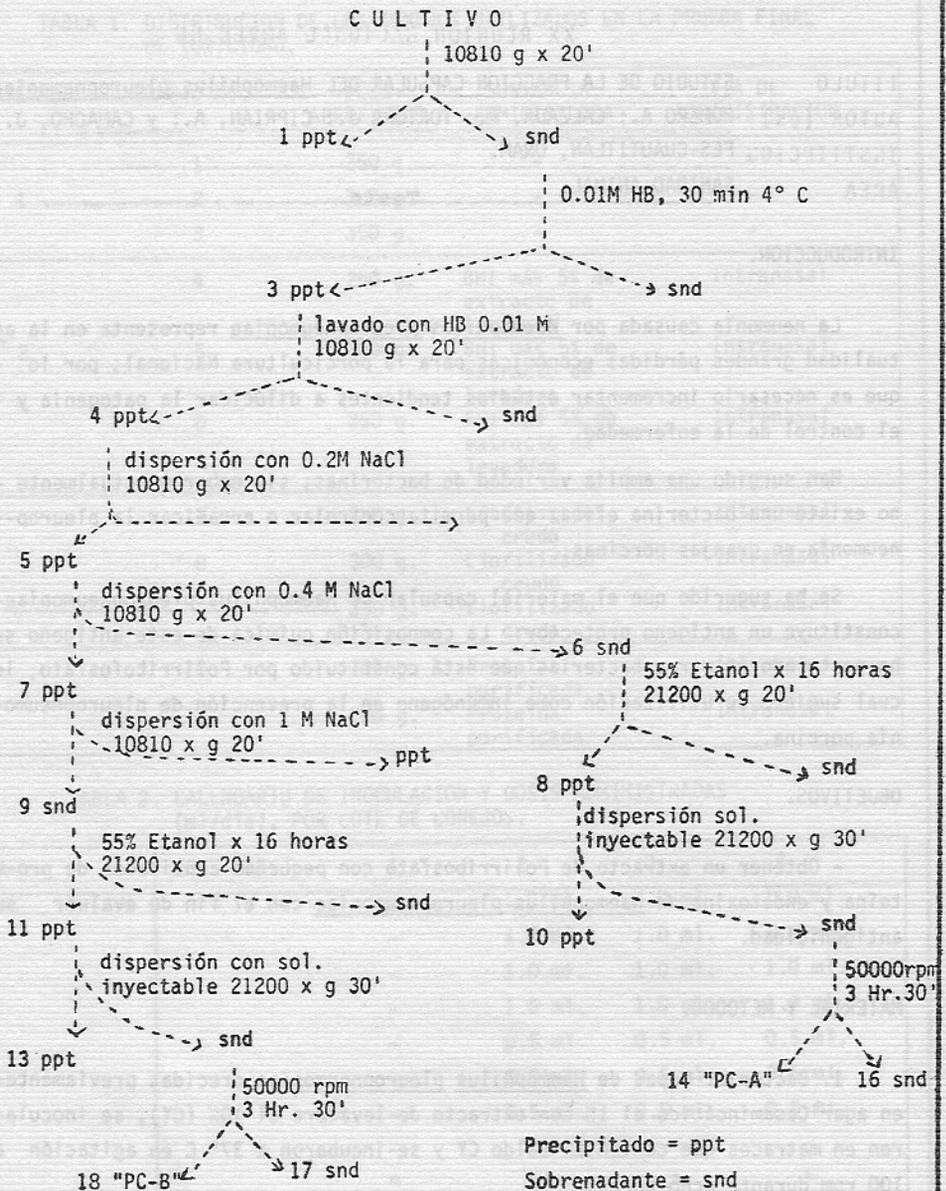
OBJETIVOS.

- Obtener un extracto de Polirribosfato con pequeñas cantidades de proteína y endotoxina de *Haemophilus pleuropneumoniae* con el fin de evaluar su antigenicidad.

MATERIAL Y METODOS.

1. Bacteria: Cepas de *Haemophilus pleuropneumoniae* crecidas previamente en agar Casaminoácido al 1% con extracto de levadura al 10% (CY), se inocularon en matraces que contenían caldo CY y se incubaron a 37° C en agitación a 100 rpm durante ocho horas.

2. Obtención de extractos y ensayo de la antigenicidad: Las seis últimas fracciones obtenidas por el método citado se les determinó (Figura No.1):



Anderson P. and Insel R.A. (1981).  
 J. Infect. Dis. 144; 509-520

Precipitado = ppt  
 Sobrenadante = snd  
 Bromuro de Hexadeciltrimetilamnio = HB  
 Complejo polisacárido = PC

- Las Pentosas por el Método de Orcinol
- Las Proteínas por el método de Kalb Bernlohr ( ).
- La Endotoxina por el Micrométodo de Celación de Lisado de *Limulus Amebocito*.
- La Electroforesis con gel de dodecil sulfato de sodio poliacrilamida - (SDS-PAGE).

Para probar la antigenicidad se inoculó la fracción PC-A y PC-B en conejos de acuerdo al siguiente protocolo de trabajo.

CUADRO No. 1

DIA	INOCULACION.	VIA
0	0.25 ml de la fracción "PC-A" o "PC-B" adyuvante completo de Freud	IM
7	0.25 ml de la fracción "PC-A" o "PC-B" sin adyuvante	IM
15	Sangrado para determinar título de anticuerpos	IC
30	0.25 ml. de la fracción "PC-A" o "PC-B"	IM
50	Desfio con un cultivo vivo de <i>Haemophilus pleuropneumoniae</i> usando una concentración de $1 \times 10^9$ bacterias/ml.	IM
70	Sacrificio de los conejos para inspección de lesiones.	

Se usaron 3 conejos para inocular "PC-A", 3 para "PC-B" y 3 controles.

El título de anticuerpos se determinó por doble difusión y contraelectroforesis.

#### RESULTADOS Y DISCUSION.

En el cuadro No. 2 se resumen los datos obtenidos de la concentración de Proteínas, Pentosas y Endotoxina de las seis últimas fracciones extraídas de *Haemophilus pleuropneumoniae*, además se expresa el título de anticuerpos.

CUADRO No. 2

Fracción Núm.	Descripción	Proteína (ug/ml)	Pentosa (mg/ml)	Endotoxi na (ng/ml)	Título Ac
10	Precipitado obtenido de 21200xg 30'	0.093	0.004	NT	NT
13	Precipitado obtenido de 21200xg 30'	0.223	0.003	NT	NT
16	Sobrenadante después que la fracción 14 fue precipitada.	0.054	0.014	NT	NT
17	Sobrenadante después que la fracción 18 fue precipitada	0.423	0.031	NT	NT

## continuación Cuadro No. 2

Fracción Núm.	Descripción	Proteína (ug/ml)	Pentosa (mg/ml)	Endotoxi- na (ng/ml)	Título AC
14	Precipitado de la fracción 8 (50000 rpm 3 Hr. 30 min. "PL-A")	0.064	0.110	1.2	1:16
18	Precipitado de la fracción 11 (50000 rpm 3 Hr. 30 min. "PC-B")	0.036	0.110	0.12	1:8

\* NT no tratado

Las proteínas presentes en los extractos obtenidos se encontrarón en muy bajas concentraciones y con un amplio rango de pesos moleculares. Los cuales coinciden con los datos obtenidos con otras bacterias. El compuesto polisacárido capsular se obtuvo en los extractos finales lo que sugiere que la precipitación con detergente es una buena forma de obtenerlos.

La endotoxina presente en los extractos se encontró en concentraciones muy pequeñas, lo cual podría deberse al método empleado y esto puede ser significativo si se desea emplearse junto con el PRO como vacuna.

Los anticuerpos presentaron un título 1:16 y 1:18 para PC-A y PC-B respectivamente, los cuales son comparables con los obtenidos en bacterias del género *Haemophilus*; sin embargo, es necesario continuar los estudios de antigenicidad de este polisacárido, a nivel experimental.

#### CONCLUSIONES.

El método de aislamiento del polisacárido capsular bacteriano a partir de sobrenadantes de cultivo, por medio de la precipitación con detergente y extracción con NaCl, es posible aplicarla a *Haemophilus pleuropneumoniae* con buenos resultados y es necesario considerar estudios básicos sobre la síntesis y liberación del polirribofosfato de esta bacteria y su factibilidad de utilizarlo como vacuna en el control de la enfermedad causada por *Haemophilus pleuropneumoniae*. También debe considerarse un estudio económico de costos-beneficio para la producción de vacunas para su aplicación de la industria porcina.