

TITULO: PATRONES ELECTROFORETICOS DE EXTRACTOS MEMBRANALES DE 4 SEROTIPOS DE Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae USANDO TRITON X100 COMO AGENTE SOLUBILIZANTE

AUTORES: ROMERO R.A., CAMACHO M.J. y MONTARAZ C.J.A.

INSTITUCION: COORDINACION GENERAL DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSGRADO FES-CUAUTITLAN, UNAM.

AREA: SANIDAD ANIMAL

INTRODUCCION:

Son grandes las pérdidas que representan las enfermedades neumónicas del cerdo a los porcicultores; entre los agentes causantes destaca el Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae (Hp). Han sido variados los estudios realizados a los antígenos importantes de esta bacteria, los cuales incluyen la cápsula (1,2,3), el LPS (3) y la hemolisina (4,5), sin embargo el problema es más complejo debido a la presencia de diversos serotipos (6).

OBJETIVOS:

- a) Obtener extractos membranales de Hp serotipos 1,2,5 y 7 utilizando Tritón X100 como agente solubilizante.
- b) Establecer el patrón electroforético de las proteínas que se encuentran en extractos membranales de Hp serotipos 1,2,5 y 7.

METODOLOGIA:

Se prepararon cultivos de Hp 1,2,5 y 7 en BHI complementado (7), los cuales fueron lisados por shock osmótico (8), posteriormente habiendo asegurado la ruptura de las células, las suspensiones resultantes se centrifugaron a 20000 rpm durante 45 min. Se eliminaron los sobrenadantes y a las pastillas se les determinó el contenido de proteínas y carbohidratos, conociendo esto se agregó a las preparaciones 1 ul de Tritón X100 al 2% en amortiguador de Tris 10 mM con pH=7.4; se mezclaron perfectamente y se incubaron durante 30 min. a 36°C, después se centrifugaron a 10,000 rpm para separar las partículas insolubles.

Después de todo este procedimiento las muestras se corrieron en geles discontinuos de poliacrilamida (9) al 12%.

RESULTADOS:

- 1) En este trabajo se obtuvo un patrón electroforético diferente para cada serotipo de Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae.
- 2) Se detectaron en los patrones electroforéticos varias bandas comunes de proteínas con pesos moleculares de 25Kd, 30Kd, 43Kd, 47Kd, 50Kd y 66Kd respectivamente.
- 3) Cuatro de estas bandas (30Kd, 43Kd, 50Kd y 66Kd) se observaron más fuertemente teñidas y bien definidas en todos los serotipos.
- 4) Las proteínas serotipo específicas tienen los siguientes pesos moleculares:
 - a) Para el serotipo 1: 24Kd, 27Kd, 35Kd y 83Kd.
 - b) Para el serotipo 2: 25Kd, 33Kd, 44Kd, 46Kd, 49Kd, 54Kd, 57Kd, 59Kd, 63Kd, 74Kd, 85Kd, 89Kd, 98Kd y 100Kd.
 - c) Para el serotipo 5: 31Kd y 68Kd.
 - d) Para el serotipo 7: 29Kd, 38Kd, 40Kd, 41Kd, 54Kd, 56Kd, 60Kd, 69Kd y 72Kd.

CONCLUSIONES

- 1.- Se encontraron diferencias entre los patrones electroforéticos de los extractos membranales de Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae serotipos 1,2,5 y 7.
- 2.- Se encontraron muchas bandas comunes en los cuatro serotipos, sobresaliendo por la intensidad con que se tiñeron cuatro con pesos moleculares aproximados de 33Kd, 43Kd, 50Kd y 66Kd.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Romero, R.A., Calzada F.P. y Camacho M.J. (1985). Aislamiento y ensayo de la antigenicidad del Polisacarido Capsular del sobrenadante de un Cultivo de H. pleuropneumoniae, serotipo 5. Tesis de Licenciatura, FES-Cuautitlán, UNAM. México.
- 2.- Altaman E. et al. (1987). Structural studies of the capsular polisaccharide from H. pleuropneumoniae serotype 5.
- 3.- Fenwick B.W. et al. (1986). Immunoresponses to the lipopolysaccharide and capsular polisaccharide of H. pleuropneumoniae in convalescent and immunized pigs. Inf. Imm. 575-582.

- 4.- Bendixen H. (1981). Toxicity of H. pleuropneumoniae for porcine lung macrophages periteral blood monocytes and testicular cells Inf. Imm. 33,3. 673-676.
- 5.- Kume substance from H. pleuropneumoniae and porcine pulmonary macrophages in vitro. Inf. Imm. 51,563-579.
- 6.- Shultz, R.A. (1985). Compendium on Swine H. pleuropneumoniae. Annual Meeting of the American Association, Des Moines, Iowa.
- 7.- Mittal K.R. et al. (1983). Determination of antigenic specificity and relationship among H. pleuropneumoniae by an indirect hemagglutination test. J. Clin. Microb. 17, 787-790.
- 8.- Williams C.H. and Chase M.W. (1967). Methods in Immunology and Immunochimistry, Vol. I. Academia Press, 1a. ed.
- 9.- Laemmli V.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature (London) 227, 680-685.