

PROTEASAS SECRETADAS POR ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE
SEROTIPO 1

AUTORES: *NEGRETE, AE; Tenorio, GV; Serrano, LJ; Cíprían, CA y De la Garza M.

INSTRUCCIONES

Depto. Biología Celular CINVESTAV del IPN, ap. Post. 14-740 México, D.F. 07000, México.

FES-Cuautitlán, UNAM, Ap. Post 222, Cuautitlán Izcalli, 54740 Edo de México, México.

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología, INIFAP-SARH, km 15.5 carretera México Toluca, 05110 México, D.F.

AREA: SALUD ANIMAL.

INTRODUCCION

A. Pleuropneumoniae (Ap), agente causal de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP), es una de las principales causas de pérdida económica a nivel mundial. La PCP produce alta morbilidad y mortalidad y se caracteriza por lesiones fibrinosas y Hemorrágicas del conducto respiratorio. Esta bacteria puede ocasionar una enfermedad aguda o crónica y se han demostrado diferentes mecanismos de patogenicidad involucrados en el daño al cerdo, entre los cuales se encuentran: producción de hemolisinas (3,4,5) y un factor de permeabilidad (8), así como la presencia de fimbrias para su adhesión al tejido pulmonar (6), lipopolisacárido (2) y cápsula.

El papel de las proteasas en Ap como mecanismos de patogenicidad ha sido poco estudiado y existen trabajos contradictorios a este respecto (7,9).

OBJETIVO

Determinar la producción de proteasas de Ap y su posible papel en la virulencia.

METODOLOGIA

Ap serotipo se incubó durante 48 hrs. en caldo BHI adicionado de CaCl₂ (10mM), extracto fresco de levaduras (10%) y albúmina sérica bovina (0.01%). El sobrenadante de cultivo se precipitó con (NH₄)₂ SO₄ al 70 % de saturación. Las proteínas se separaron por corrimiento electroforético en gales de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) al 10 % copolimerizada con gelatina de cerdo (0.01 %) o hemoglobina de bovino (0.01%) durante 16 hrs. a 25 mA. Los geles se activaron en un amortiguador Tris adicionado calcio (10mM), se tiñeron con

azul de Coomassie y se destiñeron para observar la actividad de las proteasas sobre el sustrato.

RESULTADOS

En los geles SDS-PAGE copolimerizados con gelatina o hemoglobina (0.01 %) se ha podido observar la presencia de una proteasa de más de 200 kD de PM en sobrenadantes de cultivo de Ap serotipo 1. Esta proteasa es activa a pH ácido (5.5) o a pH neutro (7.0). La proteína puede sufrir degradación a subunidades de menor PM, las cuales mantienen aún su actividad sobre ambos sustratos. La actividad para esta molécula o sus subunidades se ha podido observar aún después de un mes en congelación (-20 C). Esta proteasa solamente se observa en los sobrenadantes, por lo que se trata de una proteína de secreción.

DISCUSION

Ya que la gelatina proviene de colágena conectivo y la hemoglobina es un componente fundamental en eritrocitos, la degradación de estos sustratos nos sugiere que la proteasa en estudio puede estar involucrada en los mecanismos de virulencia de esta bacteria. Se ha llevado a cabo el aislamiento de colágena de pulmón de cerdo para determinar su actividad sobre este sustrato.

La presencia de proteasas como factores de virulencia ha sido demostrada por otros autores en los sobrenadantes de cultivo de diferentes bacterias patógenas tales como haemolytica o pseudomonas aeruginosa, entre otras (1,10,11,12).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Infect. Immun. (1992) 60 : 56-62
- 2.- Infect. Immun. (1990) 58 : 3323-3330
- 3.- Can J. Microbiol. (1991) 37 : 317-321
- 4.- Vet. Microbiol. (1991) 28 : 61-73
- 5.- J. Clin Microbiol. (1990) 28 : 232-236
- 6.- Vet. Microbiol. (1991) 27 : 133-143
- 7.- Infect. Immun. (1979) 26 : 143-149
- 8.- Curr. Microbiol. (1987) 15 : 141-144
- 9.- Infect. Immun. (1984) 45 : 276-77
- 10.- Ann. Rev. Microbiol. (1983) 37: 603-622
- 11.- J. Gen. Microbiol. (1990) 136 : 2173-2178
- 12.- Infect. Immun. (1987) 55 : 986-989