

CLONACION DE GENES PARA OBTENCION DE ANTICUERPOS  
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE; I OBTENCION  
BIBLIOTECA DE GENES EN EL PLASMIDO puc19.

AUTORES; TENORIO GUTIERREZ V.R.\* Garía Cuellar C. \*\* Alvarez de la cuadra J.\*\* Y de la Garza Amaya M.\*\*  
INSTITUCIONES: \*cenid-Microbiología, INIFAP-S.A.R.H, km 15.5 Carretera México-Toluca, 05110 México, D.F. \*\* Dpto. Biología Celular, CINVESTAV, aP. postal 14-740, 07000 México, D.F., \*\* CIATEJ, Av. Normalista 800 44270 Guadalajara, Jal.  
AREA : SALUD ANIMAL. \*CONACYT 50131

I N T R O D U C I O N

Actinobacillus (Haemophilus) Pleuropneumoniae (Ap) es el agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP). La evolución de la enfermedad varía desde hiperaguda hasta crónica, caracterizándose la 1a. por neumonía hemorrágica necrotizante, asociada con pleuritis fibrinosa (4). En los últimos años la prevalencia de la enfermedad se ha incrementado dramáticamente, debido en parte al estrés propiciado con los programas de producción intensiva, y a que no se cuenta con métodos de diagnóstico o con inmunógenos de protección adecuados.

Hasta ahora se ha observado que la inmunidad conferida por una bacteria resulta más eficaz, en comparación con la proporcionada por otros inmunógenos (5), pero esta reduce poco las pérdidas económicas, ya que evita la muerte de los cerdos pero no reduce la morbilidad (7).

Para controlar la diseminación de PCP es necesario detectar a los portadores, y para esto se han desarrollado pruebas serodiagnósticas para buscar anticuerpos contra Ap. La sencibilidad y especificidad de estas pruebas son buenas con animales infectados en condiciones controladas, no obstante, la especificidad es insatisfactoria cuando se prueban sueros de animales de campo.

Todo ha sido dificultado el diagnóstico y control de la PCP. Si se adiciona a lo anterior el no contar con antígenos capaces de detectar las enfermedades en sus primeras etapas, así como la existencia en animales de campo de reacciones cruzadas (6), se complica aún más el problema. Las técnicas experimentales de ingeniería genética aplicadas a la biotecnología ofrecen soluciones potenciales a todos estos problemas, ya que representan la metodología que conduce a una mayor producción de antígenos (1).

Para obtener antígenos por ingeniería genética es necesario contar primero con un banco o biblioteca de genes. Estos es un conjunto de clonas que contienen fragmentos de DNA que representan todo el genoma de un microorganismo. A través del aislamiento de un número suficiente grande de clonas, se puede pensar que la secuencia que codifica para el

antígeno importante del mismo, este presente en alguna clona del banco.

## O B J E T I V O

El propósito de este trabajo fue construir una biblioteca de genes de *A. Pleuropneumoniae* serotipo 1, descrito como el causante principal de Pleuroneumonía en México (2).

## M E T O D O L O G I A

El DNA cromosómico se obtuvo de una cepa aislada de un cerdo con PCP. Este DNA se restringió parcialmente con la endonucleasa *Sau* 3AI, para obtener fragmentos de un tamaño promedio 2 kilopares de bases; tales fragmentos fueron unidos con el plásmido pUC19, previamente linearizado con la enzima *Bam* HI. La unión de ambos DNAs se hizo con la enzima ligasa fago T4. Con el producto de esta unión se transformó la cepa Q358 de *E. coli* y se seleccionaron las clonas con plásmidos en agar de Mc Conkey con ampicilina.

## R E S U L T A D O S

Se obtuvieron 10 176 transformantes en medio con ampicilina. De ellas 3 172 no fermentaron lactosa, por contener plásmidos híbridos. Para confirmarlo se extrajeron los plásmidos de algunas clonas tanto fermentadoras de lactosa como no fermentadoras. Se encontró que las no fermentadoras contenían plásmidos de mayor tamaño que el vehículo original; por lo tanto, portaban insertos de *A. Pleuropneumoniae*.

## D I S C U S I O N

Con las clonas lactosa negativas y ampicilina resistentes, se tienen representado todo el genoma de *A. Pleuropneumoniae* serotipo 1, ya que la posibilidad de que no se encuentre una secuencia en particular es prácticamente igual a cero (3).

La biblioteca genómica podrá utilizarse para realizar tamizados con diferentes tipos de sueros, y permitirá encontrar clonas con importancia especial por contener antígenos responsables de la inmunidad del cerdo.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Arnon, R.M., Shapira, M. and Jacobs, C.O.: Synthetic cactines. *J. Immunol. Methods.*, 61:261-273 (1983).
- 2.- Ciprián, C.A., Medina, A.G., Fuentes, R.M., Pijoan A.C., Torres, A.O., Colmenares, V.G. y Amacho, M.J. Serotipificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en México. *Vet.Mex.*, 19:205-210 (1988).
- 3.- Clarke, L. and Carbo, J.: A colony bank containing sythetic



Colei hybrid plasmid representative of the entire E. coli genome., Cell 9:91-99 (1976)

4.- Nicolet, J. and Sholl, E.: Haemophilus Infection. In: Disease of Swine, 5th ed. Edited by; Leman, A.d., Glock, R.D., Mengeling, W.L., Peny, R.H., Sholl, E. Straw, B., 368-377. Iowa State University Press. Ames, Iowa 1981.

5.- Nielsen, R. : Pleuropneumonia of swine caused by Haemophilus parahaemolyticus. Studies on the protection obtained by vaccination. Acta Vet.Med., 23: 337-348 (1976).

6.- Nielsen, R. Haemophilus parahaemolyticus serotypes. Pathogenicity and cross immunity. Nord.Vet.Med., 31:413-417 (1979).

7.- Noguera, S.M. y Regules, Ch.L. Producción in vivo del cuadro de neumonía fibrinonecrótica por una toxina de Haemophilus pleuropneumoniae serotipo 5. Tesis de Licenciatura. Fac. de Estudios Sup. Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán. Izcallí, Edo. de México. 1985

Proyecto apoyado por International Fundation for Science B 1333-1.