

CARACTERIZACION PARCIAL DE LAS PROTEASAS DE SECRECION DE ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE. SEROTIPO1.

Autores: Negrete, AE, Tenorio, GV; Serrano, LJ y De la Garza, M
Instituciones: Depto. Biología Celular CINVESTAV del IPN,
Ap. Post. 14-740 México D.F. 07000, MEXICO.

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

AREA: SALUD ANIMAL

Becario CONACYT 62280

Introducción

Pleuropneumoniae (AP) es el agente causal de la pleuropneumonia contagiosa porcina (PCP), la cual es una de las principales causas a nivel mundial. En esta bacteria a pesar de que se conocen diversos mecanismos de virulencia, entre los cuales se encuentran: citotoxinas (2,3), lipopolisacárido, cápsula (1,4), fimbrias (11) y un factor de permeabilidad (9), el proceso de daño a células y tejidos no es totalmente entendido (6). La presencia de proteasas de secreción que degradan IgA en esta bacteria, es confusa debido a los reportes contradictorios al respecto. (8,10).

Objetivo

Determinar la presencia de proteasas de secreción en esta bacteria (Ap serotipo 1), las cuales podrían ser otro factor de virulencia.

Metodología

Ap serotipo 1, se incubó durante 48 horas en caldo BHI adicionado de CaCl (10mM) y extracto fresco de levaduras (10%) como fuente de NAD. El sobrenadante de cultivo se precipitó con (NH)₄SO₄ al 70% de saturación. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) al 10% copolimerizados con gelatina porcina al (0-1%) o con hemoglobina (Hb) porcina, bovina o humana (0.05%), asimismo estas proteasas se incubaron en presencia de diversos inhibidores para determinar el efecto sobre estas proteínas. Posteriormente a la corrida electroforética, los geles se incubaron en amortiguador Tris-HCl 0.1M adicionado de calcio (10mM) y se tiñeron con azul de Coomassie. La actividad proteolítica se determinó como zonas claras de proteólisis en un fondo azul. Por otro lado se determinó la actividad de estas proteasas sobre IgA porcina, incubando a diferentes tiempos a 37 grados centígrados y por transferencia de estas proteínas a geles copolimerizados con IgA porcina.

Resultados

En geles SDS-PAGE copolimerizados con gelatina porcina (0.1%) o Hb porcina, bovina o humana (0.05%), se pudo observar la presencia de diversas bandas con actividad proteolítica a diversos PM > 200, 120, 90, 70 y 50 kDa. En presencia de Hb se observó un menor número de bandas proteolíticas y una menor actividad. Las proteasas fueron activadas en el intervalo de pH de 4-8 y con un pH óptimo de 6-7. Todas las actividades proteolíticas fueron inhibidas en presencia de EDTA 10 mM y su actividad se revierte al estar en presencia de calcio. Otros inhibidores no tuvieron algún efecto sobre estas proteínas.

La degradación de IgA porcina fue observada desde las primeras horas de incubación.

Las actividades proteolíticas únicamente fueron observadas en sobrenadantes de cultivo y no en extractos celulares, estas actividades se observaron desde las primeras horas de incubación y su actividad se mantuvo por más de 1 mes a 20 grados centígrados.

Discusión

La presencia de proteasas de secreción como un mecanismo de virulencia ha sido demostrada en diversas bacterias patógenas (5.7). Asimismo se ha demostrado que todas las bacterias patógenas de mucosas producen proteasas de secreción que degradan IgA (12). En *Ap* observamos la presencia de proteasas de secreción que degradan IgA. Además de gelatina y hemoglobina porcinas. La inhibición de estas actividades proteolíticas por EDTA 10 mM nos habla de la presencia de proteasas del tipo metaloproteasas que concuerda con las descritas para otras bacterias patógenas (5.7).

Además que todas las actividades fueran inhibidas por EDTA nos podría hablar de proteasas del mismo tipo, o que todas ellas provienen de una sola. Por otro lado, la degradación de hemoglobina por estas proteínas, nos indica que este podría ser otro mecanismo de adquisición de hierro para esta bacteria, además de los ya reportados (13-14).

Referencias

- 1.- Infect. Immun (1990) 58: 3323-3330
- 2.- J. Microbiol (1990) 28: 232-236
- 3.- Vet. Microbiol. (1991) 28: 61-73
- 4.- Infect. Immun (1986) 54: 575-582
- 5.- Mol. Microbiol. (1991) 5: 2315-2321
- 6.- Curr. Microbiol. (1992) 60: 1558-1567
- 7.- Infect. Immun. (1989) 57: 732-738
- 8.- Infect. Immun. (1979) 26: 143-149
- 9.- Curr. Microbiol (1987) 15: 141-144
- 10.- Infect. Immun. (1984) 45: 276-277
- 11.- Vet. REcord (1991) 45: 357-358
- 12.- Ann. REV. Microbiol (1983) 37: 603-622
- 13.- Infect. Immun. (1989) 57: 798-804
- 14.- Mol Microbiol (1990) 4: 1173-1179

Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue aislar *Actinobacillus pleuropneumoniae* del aparato respiratorio de cerdos clínicamente sanos usando un medio selectivo.

Material y Métodos

Se obtuvo el aparato respiratorio de 30 cerdos clínicamente sanos enviados al sacrificio. El material fue colectado en 37 cajas diferentes y provino de 4 granjas distintas. Se inoculó el medio selectivo propuesto por el autor y se incubó (1983) con una asada tomada directamente de la lámina y con la cara interna de trozo de quita órnido esterilizada. Las cajas fueron incubadas a 37 grados centígrados durante 24 horas en condiciones de veoloxia. Las colonias se observaron y se sembraron para identificación. La identificación se realizó por medio de pruebas bioquímicas y de sensibilidad a antibióticos. Se obtuvieron 11 cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de las 37 cajas. Estas cepas fueron identificadas por medio de pruebas bioquímicas y de sensibilidad a antibióticos. Se obtuvieron 11 cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de las 37 cajas. Estas cepas fueron identificadas por medio de pruebas bioquímicas y de sensibilidad a antibióticos.