

UTILIZACION DE UN CONJUGADO INMUNOFLUORESCENTE (POLIVALENTE) PARA LA IDENTIFICACION EN PULMONES DE Actinobacillus pleuropneumoniae.

Gonzalez E. G.¹, Castro. E. G.¹, Felix S. N.¹, Reyes M. E.³ y Valdivia A. G.^{2,1}.

1.-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, Carpio y Plan de Ayala, Col. Sto. Tomás, Ap.4870, CP 06400 Méx. DF

2.-Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan UNAM, Av. Quetzatcoalt s/n Cuautitlan Izcalli Méx.

3.-Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos SSA. Carpio Col. Sto Tomas Méx DF.

a) INTRODUCCION:

En el género Haemophilus se incluyen tres especies diferentes de importancia veterinaria en la industria porcícola:

Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae, Haemophilus suis y Haemophilus parasuis, las cuales se pueden diferenciar con base en pruebas bioquímicas, como la de la urea y porfirina, requerimientos nutricionales (factores de crecimiento y prueba de CAMP) y con base en la enfermedad que producen.

La pleuropneumonía es una enfermedad que afecta a los cerdos en período de engorda produciendo lesiones localizadas a nivel de tracto respiratorio. Se caracteriza por neumonía fibrinosa, pleuritis y acumulación de líquido en tórax. Puede producir pericarditis ocasional e infarto rojo en los lóbulos infectados, que se caracteriza por friabilidad en las zonas infartadas.

La virulencia de las diferentes capas de A. pleuropneumoniae varía considerablemente, por lo tanto, las características del problema de un lote a otro o de una granja a otra, también suelen ser diferentes. Las variaciones en la virulencia pueden relacionarse a la composición y estructura de la cápsula o bien con la cantidad de cápsula adherente a la célula.

El diagnóstico de A. pleuropneumoniae se ha realizado por la utilización de pruebas serológicas tales como: aglutinación en placa, aglutinación en tubo, inmunodifusión, inmunofluorescencia, inmunoelectroforesis, precipitación en anillo, hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación; pero el diagnóstico definitivo de la pleuroneumonía porcina se realiza mediante el aislamiento e identificación del agente etiológico.

En A. pleuropneumoniae se ha demostrado la presencia de un antígeno tipo específico que es termolábil y un antígeno común que es termoestable. Por otra parte, se han encontrado proteínas de membrana externa asociadas a la antigenicidad.

El determinante antigénico principal de A. pleuropneumoniae es la cápsula (polisacárido capsular), el cual confiere especificidad a la bacteria. El material capsular no es dializable, precipita con acetona, no coagula cuando se calienta a 100°C por 30 minutos, no solidifica al refrigerarse y requiere la presencia de un antígeno termolábil que le sirva como acarreador para producir anticuerpos. La pérdida de la cápsula contribuye a la variación de fase de las colonias lisas a rugosas y en la pérdida de la virulencia; además la cápsula facilita la colonización bacteriana.

Con base en las características de este material capsular se ha

clasificado a A. pleuropneumoniae en 11 serotipos diferentes los cuales se han denominado con números arábigos del 1 al 11, encontrándose ampliamente distribuidos en el mundo.

Para la tipificación de A. pleuropneumoniae se utilizan métodos inmunológicos como: aglutinación en tubo, hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación, etc; también se utilizan métodos como inmunodifusión, inmunoelectroforesis, inmunofluorescencia, ELISA, etc., empleando para ello compuestos especiales que proporcionan sensibilidad y especificidad a las pruebas.

b) OBJETIVO:

Desarrollar una metodología para la obtención de un producto biológico que permita la identificación en forma rápida, sensible y específica de A. pleuropneumoniae a partir de muestras biológicas.

MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron cepas de referencia de A. pleuropneumoniae que correspondieron a los serotipos del 1 al 9. Además de las cepas de Staphylococcus aureus COWAN I (ENCB 206) y de Pasteurella multocida y P. haemolytica. (ENCB 3309, 3310) donadas por el Laboratorio de Bacteriología Veterinaria de la ENCB.

Las cepas se reconstituyeron y se caracterizaron plenamente. Se utilizaron conejos Nueva Zelanda para la obtención de los sueros anti-A. pleuropneumoniae, mediante la administración de antígeno fresco y desecado. Se usaron diferentes dosis y concentración de antígeno para el esquema de inmunización y se obtuvieron sueros para cada uno de los serotipos. Análogamente, se procedió a preparar un suero polivalente mezclando igual cantidad de sueros de cada serotipo.

Esta mezcla de suero se utilizó para purificar gammaglobulinas por el método de Tiselius y Kabat utilizando sulfato de amonio sobresaturado. Las gammaglobulinas obtenidas se titularon y evaluaron siguiendo un método espectrofotométrico y aglutinación en tubo. Los sueros se adsorbieron en forma homoespecífica y en forma heteroespecífica.

Posteriormente, estos anticuerpos se conjugaron con isotiocianato de fluoresceína, se filtraron a través de una columna de cromatografía utilizando Sephadex G-25, se envasaron y liofilizaron.

La técnica de Inmunofluorescencia (IF) se estandarizó utilizando cepas conocidas y pulmones neumónicos a los cuales se les comprobó el agente etiológico por aislamiento e identificación bacteriológica.

Se utilizaron 20 pulmones provenientes de cerdos con cuadro de neumonía para hacer la técnica de IF, posteriormente de ellos se realizó una rutina bacteriológica.

RESULTADOS

Se obtuvieron 8 sueros hiperinmunes diferentes, inmunizando conejos con antígenos frescos y desecados preparados con las cepas de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 9 de A. pleuropneumoniae. Se utilizó un suero polivalente mezclando cantidades equivalentes de cada suero específico.

La IF probó ser 100 % específica para el género Haemophilus cuando se realizó con cultivos de cepas de referencia y cepas silvestres de Actinobacillus y otros géneros bacterianos.

Cuando se realizó a partir de pulmones se encontró que en el 100% de los aislamientos positivos a Actinobacillus fué positiva la fluorescencia. Se determinaron 3 pulmones con aislamiento negativo pero positividad a IF (los tres pulmones presentaron lesiones sugestivas de pleuropneumonia). No se encontró positividad en pulmones que sólo contenían Pasteurella, Streptococcus o Staphylococcus.

e) DISCUSION:

El tener un diagnóstico rápido y definitivo del agente etiológico ofrece a su vez rapidez en el tratamiento adecuado de la enfermedad, disminuyendo así las consecuentes pérdidas económicas. Después de realizar varias pruebas se encontró que algunos antígenos frescos son malos inmunógenos ;sin embargo, el antígeno desecado de todos los serotipos es el más recomendable, se conserva estable por mucho tiempo y se obtiene un mejor título homólogo del antisuero .

Con la obtención de un suero polivalente y de sueros monovalentes se podrá identificar rápidamente al microorganismo hasta género y especie ya que este suero no da cruce antigénico con otras especies donde los signos clínicos son similares a los que produce A. pleuropneumoniae, tal es el caso de Pasteurella multocida y Pasteurella haemolytica. Sin embargo, es necesario que sea probado con otras especies del mismo género tales como H.Suis y H.parasuis, aunque la signología que éstos microorganismos producen sea diferente a la de A. pleuropneumoniae .

f) BIBLIOGRAFIA

Harrell W.K., Ashworth H., Britt L. 1980 . Procedural Manual for Production of Bacterial, Fungal, Parasitic Reagents. 3th Ed. pp 21-23,45

Mittal, K.R., Higgins,R. and Luriviere S, 1983 Determination of antigen specificity and relationships among Haemophilus pleuropneumoniae serotypes by an indirect haemagglutination test. J. Clin. Microbiol. 17:787-790.

Nielsen, R. 1982. Haemophilus pleuropneumoniae infection in pigs. Thesis. Commissioned by C.F. Mortesen A/S, Bulowsvej S.C. DK 1870 ,Copenhagen V. Denmark.