



## ESTUDIO ELECTROFORÉTICO DE CEPAS DE REFERENCIA, DE CAMPO Y VACUNALES DE LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA.

MENDOZA, E. S., AGUILERA, C. E., CORREA, G. P., HERNANDEZ BAUMGARTEN, E. Y CIPRIAN, C. A. COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTUTLAN, UNAM. APARTADO PORTAL 222, CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO; CENID-MICROBIOLOGIA VETERINARIA, INIFAP.

AREA: SANIDAD ANIMAL.

CATEDRA: AFECCIONES RESPIRATORIAS DEL CERDO Y FIEBRE PORCINA CLASICA.

### INTRODUCCION.

Es importante tener en cuenta que en un programa de erradicación de una enfermedad infecciosa, en este caso la Fiebre Porcina Clásica (FPC), no se logrará con la sola vacunación de vacunas atenuadas: se requerirá de otros elementos cuando se lleve a controlar por completo y el principal elemento es contar con una herramienta de diagnóstico serológico. Sin embargo, hoy en día no se cuenta con una técnica serológica que permita diferenciar en los cerdos los anticuerpos vacunales de los infectantes.

En un trabajo previo de mendoza y cols. (1992), encontraron diferencias entre cepas de campo, vacunales y de referencia en lo que se refiere a su comportamiento durante su proliferación en líneas celulares y en cultivos primarios de órganos linfoides. Al virus de la FPC se le han encontrado tres proteínas estructurales en la envoltura viral, dos de ellas son glicoproteínas (gp) y se denominan: E1 o gp 55 (55,000 D) y E2 o gp 46 (46,000 D); la tercera que no está glicosilada fue denominada C o p 36 (36,000 D). Se le ha atribuido a la proteína 31K un factor importante en la infección, sin embargo, no es clara su participación. Wensvoort y colaboradores en Holanda (1989) purificaron la cepa Brescia del virus de la FPC a partir de lisados de cultivo celulares infectados empleando gradientes y encontraron que la fracción proteínica (primer "pico") aislada a una densidad bouyate de 1.13 a 1.15 g/ml presentaba altos títulos infectantes, mientras que el segundo "pico" de 1.12 a 1.14 g/ml presentaba alta afinidad en el ensayo de captura de antígeno; la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS realizada en 7 fracciones de estos dos "picos", reveló que en las tres primeras de alta infectividad solo se encontraron la gp54 y la gp51, mientras que en las de bajas afinidad e infectividad revelaron solo la gp31.

### OBJETIVO:

Seleccionar las fracciones importantes de las seis cepas de estudio del Virus de la Fiebre Porcina Clásica y realizar estudios comparativos y encontrar diferencias entre seis cepas de campo, vacunales y de referencia del virus de la Fiebre Porcina Clásica mediante estudios de electroforesis en geles de poliacrilamida.

### MATERIAL Y METODOS:

#### MATERIAL BIOLÓGICO:

Se utilizaron 6 cepas en total, tres cepas vacunales: Cepa Minnesota, Cepa PAV-1 y Cepa PAV-250; una Cepa de referencia: ALD y dos cepas de campo: 89-126 y 89-55.

#### SELECCION DE FRACCIONES:

de cada cepa fueron seleccionadas las fracciones más importantes que se puede observar en el Cuadro 1.

#### ELECTROFORESIS DE LAS FRACCIONES EN GELES DE POLIACRILAMIDA DUODECIL-SULFATO DE SODIO (SDS)

De las fracciones obtenidos para cada cepa, se trataron con un detergente iónico (NP 40). Para la preparación del gel de poliacrilamida al 7.5 % y 12 % con SDS y del gel concentrador al 5 % según Laemmli, así como de los reguladores de corrimiento y de muestra, con dos mercaptoetanol, finalmente se realizaron dos tinciones con azul coomassie y con nitrato de plata.



## ESTUDIO ELECTROFORÉTICO DE CEPAS DE REFERENCIA, DE CAMPO Y VACUNALES DE LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA.

MENDOZA, E. S., AGUILERA, C. E., CORREA, G. P., HERNANDEZ BAUMGARTEN, E. Y CIPRIAN, C.A. COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTUTLAN, UNAM. APARTADO PORTAL 222, CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO; CENID-MICROBIOLOGIA VETERINARIA, INIFAP.

AREA: SANIDAD ANIMAL.

CATEDRA: AFECCIONES RESPIRATORIAS DEL CERDO Y FIEBRE PORCINA CLÁSICA.

### RESULTADOS

De los resultados obtenidos de las electrofosis pudo observar que las bandas se observaron mejor definidas con la tinción con nitrato de plata. Los pesos moleculares se calcularon a partir de la regresión lineal (Grafica No. 1) que se realizó a partir de los datos de los RF, de cada muestra, los resultados de los PM correlacionados se muestran en el Cuadro 2 y en la Grafica No. 2.

### DISCUSION

La cepa Brescia purificada a partir de sobrenadantes de cultivos celulares infectados o de células infectadas, en un gradiente de glicerol / tartrato de Na-K mostró que la fracción de una densidad boyante de 1.13 - 1.15 g/ml presentaba altos títulos infectantes, mientras que en la fracción de 1.12 - 1.14 g/ml presentaba alta afinidad en el ensayo de captura de antígeno (ECA).

En cuanto al análisis de fracciones, Wensvoort y cols., (1989) encontraron siete fracciones individuales presentes en estos dos "picos" y les realizó una electroforesis con un gel de poliacrilamida-SDS; las primeras tres fracciones que pertenecieron al pico de alta infectividad solo encontraron la gp54 y la gp51; mientras que en las otras fracciones con altas señales (afinidad) del ECA y baja infectividad, revelaron solo la gp31.

Los resultados en este trabajo de investigación mostraron diferencias; Con respecto a la electroforesis podemos observar la separación de las bandas, observando también la proteína 31K, con la tinción de nitrato de plata se tiñen algunas bandas verdosamente o en algunas acaciones grisáceas correspondientes a las glicoproteínas. De aquí podemos concluir que la mejor tinción para observar tanto a las proteínas como a las glicoproteínas del virus fué la tinción con Nitrato de Plata, que aunque además de ser un poco peligrosa y muy tardada se visualiza claramente las bandas. Con respecto a la tinción con Azul de Coomassie nos da una idea del bandeado que tenemos pero nunca tan fino como tinción con nitrato de plata. Cabe mencionar que los PM se calcularon mediante el cálculo del RF para posteriormente calcular mediante una regresión lineal su PM de cada una de las seis cepas del VFPC (Gráfica No 1). Los PM que se observan en cada cepa son los importantes y la literatura lo reporta para el VFPC (Wensvoort y cols, 1989), como las mencionadas proteínas estructurales, EI, E2, C, proteínas de cápside y la proteína 31 K. Por el momento no hay diferencias significativas entre cada cepa, aunque la cepa PAV -250 muestra alguna diferencias con respecto a las demás que probablemente pueda deberse a que ha perdido algo a lo largo de su atenuación de cepa para usarla como vacuna probablemente a partir de la PAV-1, si las diferencias persisten con la inmunotransferencia quizá pueda servirnos como cepa marcadora.

### BIBLIOGRAFIA :

- 1.- Terpstra, C ; Bloemradd, M. and Gielkens, A.L. 1984. The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of monoclonal antibodies. in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Thesis. p. 41-50.
- 2.- G. Wensvoort, C. Terpstra, E. P. de Kluyver, C. Kragten, J. C. Warnaar. (1989). Characterization of pestivirus strains with monoclonal against Hog Cholera Virus. in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Thesis. p. 41-50.
- 3.- Wensvoort, G. Terpstra, C., boonstra, J., Bloemraad, M. and Van Zaane, D. (1986). Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. Veterinary Microbiology 17, 129-140.
- 4.- Wensvoort, G. (1989). Epitopes on structural proteins of Hog Cholera (Swine Fever) virus. Thesis doctor. Utrecht, Mach, 1989.
- 5.- Mendoza, E. S., Correa, G. P., Hernández-Baumgarten, E., y Ciprián, C. A. (1992). Perspectiva de un Método de diagnóstico serológico rápido para Fiebre Porcina Clásica. I XXI Congreso Nacional AMVEC 1992, Acapulco, Gro., México.
- 6.- Purchio, A. F., Larson, R. y Collett, M. (1984). Characterization of Bovine Viral Diarrhea virus proteins of Virology. Vol. 50 (2) pp. 666-669.



## ESTUDIOS DE LA INTERACCION DE ESTREPTOCOCOS Y LACTOBACILOS EN SU CAPACIDAD DE BLOQUEAR LA ACTIVIDAD PATOGENA DE *E. coli*.

AUTORES: GARCIA, M.C; TORRES, J; LARA, V Y ALVAREZ, C.I.

INSTITUCION: FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN. UNAM

DIRECCION: FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN. UNIDAD DE POSGRADO.

APARTADO POSTAL #25. EDO. DE MEXICO. CP. 54700.

### RESUMEN:

Se determinó el efecto inhibitorio de las cepas de lactobacilos y enterococos porcinos "in vitro" e "in vivo". Se aislaron 45 cepas y se seleccionaron 18 por su capacidad de liberar metabolitos y de inhibir el crecimiento de las cepas de *E. coli* toxigénicas (LT y Shiga-like IIv). Las 18 cepas seleccionadas tuvieron una actividad significativa estadísticamente tanto en la inhibición del crecimiento como en el de bloqueo del efecto de las toxinas LT y Shiga-like IIv de *E. coli*. Por lo tanto son cepas que podrían ser incluidas en la elaboración de un probiótico.

### INTRODUCCION.

Las interacciones microbiales representan una de las más importante contribuciones a la homeostásis de la flora bacteriana en el intestino. Todos los componentes del intestino interactúan y contribuyen a la supervivencia del huésped. Cuando se llegan a presentar desórdenes gastrointestinales la homeostásis puede ser desestabilizada y ocasionar problemas intestinales tales como las diarreas. Dichas interacciones han sido estudiadas de diferentes formas, uno de los métodos más importantes es la exploración directa sobre el intestino del animal. Así se ha concluido que algunos *Lactobacillus* sp y *Enterococcus* sp actúan en el intestino destruyendo enterobacterias. La asociación de *E. coli* toxigénica y diarrea es bien conocida y es una de las principales causas de mortalidad en lechones recién nacidos y actualmente hay una tendencia al empleo de PROBIOTICOS para el control de las mismas de aquí la importancia de valorar éstas cepas para lograr una eficiencia de éstos productos.

OBJETIVO : Aislar y seleccionar cepas de lactobacilos y enterococos capaces de bloquear el efecto tóxico de las toxinas LT y Shiga-like en asas ligadas de conejo y de inhibir su crecimiento con el fin de ser incluidas en la elaboración de un probiótico.

### MATERIAL Y METODOS:

#### PRUEBA DE INHIBICION:

1. IN VITRO: Las cepas de *Lactobacillus* sp y *Enterococcus* sp fueron aislados de intestinos de cerdo y seleccionadas en su capacidad de producir halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* y las cepas seleccionadas por 4 horas.

2. IN VIVO: Se realizaron asas ligadas en conejos, donde se probaron al azar dos cepas de lactobacilos y una de enterococos valorando su efecto frente a cepas de *E. coli* productora de la toxina Shiga-like IIv. Los resultados fueron leídos a las 18 horas post-inoculación.

ANALISIS ESTADISTICO: Se utilizó un análisis de varianza para un diseño completamente aleatorio para el estudio *in vitro* y un diseño en bloques completos al azar en el estudio *in vivo*.

### RESULTADOS Y DISCUSION:

INHIBICION "IN VITRO" : De las 45 cepas aisladas del intestino de lechones se seleccionaron 18 cepas que presentaron halo de inhibición al cuantificarla todas las cepas redujeron significativamente tanto a la *E. coli* productora de LT ( $P < 0.0001$ ), como de Shiga-like IIv ( $P < 0.0003$ ). La actividad de las cepas fué igual entre ellas por lo cual fueron seleccionadas al azar 3 cepas para continuar el estudio. Se obtuvieron en promedio  $1.43 \times 10^8$  a la novena ( $\pm 3.9 \times 10^8$  a la octava) y  $3.23 \times 10^8$  a la septima ( $\pm 25.5 \times 10^5$ ) UFC de *E. coli* productora de LT, en cultivo individual o combinado con una de las cepas a probar, respectivamente. Los resultados fueron similares con la *E. coli* productora de Shiga Like IIv, en este caso se obtuvieron en promedio  $1.11 \times 10^9$  UFC de *E. coli* en el cultivo control comparado con promedio de  $1.7 \times 10^7$  UFC en el cultivo mezclado.

#### INHIBICION "In vivo".

El efecto bloqueante de la toxina LT se observó estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ) con la mezcla de dos lactobacilos y un enterococo y la acción bloqueante de la toxina Shiga-like IIv fué igualmente significativa ( $P < 0.017$ ). Al utilizar la *E. coli* productora de LT se obtuvo una reducción promedio del 60% ( $\pm 12.9$ ) de líquido acumulado en el asa, mientras que con la cepa productora de Shiga Like IIv el líquido acumulado se redujo en promedio un 34.7% ( $\pm 5\%$ ).



## ESTUDIOS DE LA INTERACCION DE ESTREPTOCOCOS Y LACTOBACILOS EN SU CAPACIDAD DE BLOQUEAR LA ACTIVIDAD PATOGENA DE E. coli.

PERFIL SEROLOGICO DE LECHONES DE MADRES PRIMERIZAS Y MULTIPARAS UTILIZANDO UN ENSAYO DE NEUTRALIZACION DE HEMOLISINA PARA DETECTAR ANTICUERPOS CONTRA *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Gutiérrez Pabello, J.A.1, Doporto, J.M.2, Monroy, M.A.2, Hernández, C.R.1 y Carreón, N.R.1 1 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México, D.F. 04510 2 Grupo Roussel, México, D.F.

### INTRODUCCION

El uso de pruebas serológicas para la identificación de patógenos específicos es una herramienta muy importante en el control y prevención de las enfermedades. En casos donde se sospeche de infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, las pruebas serológicas con alta sensibilidad y especificidad son importantes debido a la dificultad para aislar este microorganismo de cerdos portadores clínicamente sanos. El propósito de este trabajo fue determinar el estado serológico de lechones nacidos de cerdas primerizas y multiparas en relación a la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

### MATERIAL Y METODOS

Muestras.- Las camadas de dos cerdas primerizas y cuatro multiparas fueron sangradas 6 veces a 1,5,9,13,19 y 25 semanas de edad. La obtención de las muestras de sueros se llevo a cabo siguiendo los pasos descritos por Sassdorf. Se utilizó una prueba de Neutralización de Hemolisina para procesar todos los sueros. El desarrollo de la prueba se realizó de acuerdo a lo descrito por Fenwick (1989). (2,3,4)

### RESULTADOS

El 100% de las cerdas, el 68% de los lechones procedentes de las cerdas primerizas y el 93% de los lechones de las cerdas de más de un parto fueron clasificados como positivos a la semana número uno. Para la semana 5 ninguno de los lechones mostró títulos positivos y se mantuvieron seronegativos hasta la semana 13. La seroconversión apareció cuando los animales se trasladaron al área de finalización. Para la semana 25, el 20% de la población muestreada fue positiva y el 26% fueron considerados sospechosos. La enfermedad clínica no se presentó durante el estudio y cuando se realizó la inspección de los pulmones de los animales al momento del sacrificio, no se encontró lesión alguna de pleuropneumonia.

### DISCUSION

Actualmente no es suficiente el conocer si un animal tuvo experiencias con un antígeno dado. Es importante determinar si este era de origen vacunal o de campo. Para tal efecto se cuenta en México con dos técnicas; Pleurotest, que es una prueba de aglutinación que identifica anticuerpos capsulares con capacidad aglutinante y Neutralización de Hemolisina que detecta anticuerpos neutralizantes de la citolisina con capacidad hemolítica por las bacterias vivas y no por los preparados muertos de las bacterias. El ensayo de neutralización de hemolisina sirve como una prueba tamiz debido a su alta sensibilidad y es recomendable utilizar una segunda prueba confirmatoria con una mejor especificidad. (1,2).

Los resultados de este estudio manifiestan la presencia de inmunidad de hato en los animales muestreados. Es importante recordar que la expresión de la enfermedad clínica depende de las prácticas de manejo, de condiciones ambientales y de la inmunidad de hato. Por lo que es recomendable para las granjas que no tienen la presentación clínica de la enfermedad y que son serológicamente positivas, evitar el aumento de los niveles de estrés o la presencia de otras enfermedades. El porcentaje de lechones seropositivos fue mayor en animales de cerdas con más de un parto, lo que sugiere una mayor exposición al microorganismo por parte de estas cerdas en comparación con las primerizas. La seropositividad de los lechones en las primeras semanas es debida a la transferencia de anticuerpos vía colostro, sin embargo los títulos positivos encontrados después de la semana 13 sugieren que los animales sufrieron la infección.

### LITERATURA CITADA

1. Ciprian, A., Colmenares, G. Y Mendoza, S.: La enfermedad en México *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Primer simposium internacional de *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. Guadalajara, Jalisco 1990. AMVEC, México.
2. Fenwick, B.W., Smeltzer, S.M., Viker, K.: Development and evaluation of a serum hemolysin neutralization assay for the diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. Proceedings of the 7th conference of research workers in animal disease, Chicago, 1989.
3. Fenwick, B.W.: Serological based diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Memorias del curso *Actinobacillus pleuropneumoniae* diagnóstico bacteriológico y serológico. FMVZ, UNAM 1992.
4. Sassdorf, D.H., Garvey, S.J. and Cremer, N.E.: Methods in immunology. W.A. Benjamin Inc 1977.