



ESTUDIO DE LAS CITOLISINAS DE LOS SEROTIPOS 1, 3, 5 Y 7 DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*. I. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA.

VAZQUEZ, A., MENDOZA, E.S., GARIBAY, E.J., GONZALEZ, G.S. Y CIPRIAN, C.A.
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN,
UNAM. APARTADO POSTAL 222, CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.
AREA: SANIDAD ANIMAL.
CATEDRA: AFECCIONES RESPIRATORIAS DEL CERDO Y FIEBRE PORCINA CLASICA.

INTRODUCCION.

Actinobacillus pleuropneumoniae es uno de los principales patógenos respiratorios del cerdo, produce pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP). Es importante tener en cuenta y entender los factores de virulencia de los 12 serotipos de *A. pleuropneumoniae* juegan un papel primordial en la patogénesis de la PCP. (1). Se han identificado tres distintos tipos de citotoxinas en *A. pleuropneumoniae*: citolisina I (antes Cl y I, hoy ApxI), citolisina II (antes Cl y II, hoy ApxII) y citolisina III (antes Cl y III, hoy ApxIII). Se ha encontrado que la citolisina I la producen los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11; la citolisina II es excretada por todos los serotipos excepto el 10 y la citolisina III solo la producen los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8 (2).

MATERIAL Y METODOS.

Cepas bacterianas. Se utilizaron cuatro serotipos de *A. pleuropneumoniae*: 1, 3, 5 y 7. Cada serotipo se inóculo a medios de cultivo unos con calcio y otros con hierro y se determinaron las curvas de producción de citolicinas, tomando muestras cada dos horas hasta las 24 horas de incubación.

Purificación de las citolicinas. Los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 60 minutos y los sobrenadantes se filtraron con membranas Millipore de 0.22 μ m de diámetro. Posteriormente este filtrado se ultrafiltró con una membrana de exclusión de 100,000 de P.M. y se trabajó solo con el retenido.

Determinación de la actividad hemolítica. Se emplearon eritrocitos de bovino, los g.r. se lavaron tres veces con PBS y se ajustaron al 1% en 0.15 M. de NaCl. Las muestras (retenidos y filtrados) de los diferentes serotipos y a diferentes tiempos se diluyeron (diluciones dobles) en una solución salina trisbufferado de calcio (TBCS). Se incubaron a 37 C. durante 1 hora, los tubos se centrifugaron a 8,000 g/1 minuto y las lecturas de los sobrenadantes se realizaron con un espectrofotómetro (longitud de onda A-545) (3,4).

RESULTADOS

Se obtuvo una gráfica que nos permitió estandarizar la prueba de la actividad homolítica que se muestra en la Figura 1. Así mismo, en el Cuadro 1 mostramos los datos obtenidos de cada una de las citolicinas de los serotipos 1, 5 y 7 de *A. pleuropneumoniae*.

DISCUSION.

La información obtenida nos muestra lo variable que presentan los serotipos de *A. pleuropneumoniae* para excretar sus toxinas. En el caso de los serotipos 1, 5 y 7 de *A. pleuropneumoniae* se encontró actividad hemolítica y no así en el caso del serotipo 3. Esto era de esperarse ya que las citolicinas I y II que producen los serotipos 1, 5 y 7 son hemolíticas, además de ser citotóxicas, mientras que la citolicina III que solo produce el serotipo 3 no es hemolítica, pero sí fuertemente citotóxica. En las mismas condiciones y utilizando el mismo medio de cultivo, con y sin Ca o Fe, los datos muestran que la actividad hemolítica fue variable.

REFERENCIAS.

1. Inzana, T.J. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb. Pathog.* 11: 305-316 (1991).
2. Kamp, E.M., Popma, J.K., Anokotta, J. and Smits, M.A. Identification of homolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 59: 3079-3085 (1991).
3. Kanclerski, K and Mollby, R. A simple and exact twopoint interpolation method for determination of hemolytic activity in microtiter plates. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B* 95: 175-179 (1987).
4. Udeze, F.A. and Kadis, S. Effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin on porcine neutrophil function. *Infect. Immun.* 60: 1558-1567 (1992).



ESTUDIO DE LAS CITOLISISNAS DE LOS SEROTIPOS 1, 3, 5 Y 7 DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*. I. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA.

VAZQUEZ, A., MENDOZA, E.S., GARIBAY, E.J., GONZALEZ, G.S. Y CIPRIAN, C.A.
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN,
UNAM. APARTADO POSTAL 222. CUAUTITLAN IZCALLI. EDO. DE MEXICO.
AREA; SANIDAD ANIMAL.
CATEDRA: AFECCIONES RESPIRATORIAS DEL CERDO Y FIEBRE PORCINA CLASICA.

CUADRO 1

SEROTIPO 1		ABSORBANCIA	% HEMOLISIS
T0	1:2	0.556	69.89
	1:4	0.44	54.62
	1:8	0.053	3.62
T3	1:2	0.498	62.65
	1:4	0.455	56.59
	1:8	0.106	10.65
	1:16	0.039	1.83
SEROTIPO 5		ABSORBANCIA	% HEMOLISIS
T1	1:2	0.111	11.31
	1:4	0.085	7.88
	1:8	0.035	1.30
SEROTIPO 7		ABSORBANCIA	% HEMOLISIS
T2	1:2	0.629	79.50
Las diluciones que no aparecen dieron una absorbancia de cero			



ESTUDIO DE LAS CITOLISINAS DE LOS SEROTIPOS 1, 3, 5, Y 7 DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*. II. EFECTO POR LAS COMBINACIONES ENTRE ELLAS

Vazquez, A., Mendoza, E.S., Garibay, E.J., Gonzalez, G.S. y Ciprian, C.A.
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN, UNAM. APARTADO POSTAL 222, CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.
AREA: SANIDAD ANIMAL.
CATEDRA: AFECIONES RESPIRATORIAS DEL CERDO Y FIEBRE PORCINA CLASICA.

INTRODUCCION.

Es importante tener en cuenta y entender que los factores de virulencia de los 12 serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* juegan un papel primordial en la patogenesis de la pleuroneumonía contagiosa porcina PCP (1) Se han identificado tres distintos tipos de citotoxinas en *A. pleuropneumoniae*: citolisina I (antes C1 y I, hoy ApXI), citolisina II (antes C1 y II, hoy ApXII) y citolisina III (antes C1 y III, hoy ApXIII). Se ha encontrado que la citolisina I la producen los serotipos 1,5,9,10 y 11; la citolisina II es excretada por todos los serotipos excepto el 10 y la citolisina III solo la producen los serotipos 2,3,4, 6 y 8 (2). Por un lado las citolisinas son las responsables de las lesiones pleuroneumónicas, cada una de ellas con diferentes características patológicas y por el otro, el cerdo en algunas granjas se ha infectado con mas de un serotipo, al respecto se encontró poca información sobre el efecto aditivo o sinérgico de estas citolisinas en condiciones naturales, el entendimiento de este fenómeno biológico permitira utilizar con estrategia posibles inmunógenos a base de citolisinas inactivadas o toxoides.

MATERIAL Y METODOS.

Cepas bacterianas. Se utilizaron cuatro serotipos de *A. pleuropneumoniae*: 1,3,5 y 7. Cada serotipo se inóculo a medios de cultivo unos con calcio y otros con fierro y se determinaron las curvas de producción de citolisinas, tomando muestras cada dos horas hasta las 24 horas de incubación.

Purificación de las citolisinas. Los cultivos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 60 minutos y los sobrenadantes se filtraron con membranas Millipore de 0.22 μ m de diametro. Posteriormente este filtrado se ultrafiltró con una membrana de exclusión de 100.000 de P.M. y se trabajo solo con el retenido.

Determinación de la actividad hemolítica. Se emplearon eritrocitos de bovino, los g.r. se lavaron tres veces con PBS y se ajustaron al 1% en 0.15 M de NaCl. Las muestras (solo de los retenidos) de los diferentes serotipos y a diferentes tiempos se diluyeron (diluciones dobles) en una solución salina trisbufferado de calcio (TBCS). Se incubaron a 37 °C durante 1 hora, los tubos se centrifugaron a 8000 rpm/1 minuto y las lecturas de los sobrenadantes se realizaron con un espectrofotómetro (longitud de onda A-545) (3).

Determinación del efecto aditivo o sinérgico. Los retenidos de los serotipos 1, 3, 5 y 7 se combinaron entre si, quedando de la siguiente manera: 1 y 3; 1 y 5; 1 y 7; 3 y 5; 3 y 7; 5 y 7 y 1, 5 y 7. Así mismo se invirtió el proceso 3 y 1; 5 y 1; 3 y 5; 3 y 7; 7 y 1, 7 y 5, y 7, 5 y 1.

RESULTADOS

En el cuadro 1, se muestran las observancias obtenidas con las diferentes combinaciones entre los serotipos 1, 5 y 7:

DISCUSION

Los resultados obtenidos de las citolisinas de *A. pleuropneumoniae* en forma individual, se comportaron como era de esperarse, sin embargo, no encontramos un efecto adicional cuando se combinaron las citolisinas del serotipo 3 con los demás. Nos sorprende que a pesar de esperar un efecto sinérgico entre las citolisinas de los serotipos 1, 5 y 7, lo encontrado fue un completo antagonismo, ya que no se obtuvo hemolisis en las muestras tratadas. Por el momento desconocemos que fue lo que ocurrio.

REFERENCIAS

1. Inzana, T?J? Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb. Pathog.* 11: 305-316 (1991).
2. Kamp, E.M., Popma, J?K?, Anokota, J. and Smits, M.A. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *A. pleuropneumoniae* by using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 59: 3079-3085 (1991).
3. Kancierski, K. and Mollby, R.A. simple and exact two-point interpolation method for determination of hemolytic activity in microtiter plates. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B.* 95: 175-179 (1987).



**ESTUDIO DE LAS CITOLISINAS SE LOS SEROTIPOS 1, 3, 5, Y 7 DE
Actinobacillus pleuropneumoniae,
II EFECTO POR LAS COMBINACIONES ENTRE ELLAS.**

Vazquez, A., Mendoza, E.S., Garibay, E.J., Gonzalez, G.S. y Ciprian, C.A.
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN,
UNAM. APARTADO POSTAL 222, CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.
AREA; SANIDAD ANIMAL.
CATEDRA: AFECCIONES RESPIRATORIAS DEL CERDO Y FIEBRE PORCINA CLASICA

CUADRO 1

SEROTIPOS	COMBINACIONES	ABSORBANCIA
1		0.556
3		0.000
5		0.111
7		0.629
	1 y 3	0.050
	1 y 5	0.000
	1 y 7	
	3 y 5	0.079
	3 y 7	0.612
	5 y 7	0.000
	1, 5 y 7	
	3 y 1	0.048
	5 y 1	0.000
	3 y 5	0.088
	3 y 7	0.588
	7 y 1	0.000
	7 y 5	
	7, 5 y 1	