

ALTORES: AGUIRRE ~i. R. M., ROMERO R. A. LABORATORIO 8~ COORDINACION DE ESTUDIOS DE POSGRADO, CAMPO 1 ! FESCUAUTITLAN~ UNAM.

INTRQIII~ N.

La pleuropneumonia contagiosa porcina (PCP) representa un problema muy serio para la industria porcina debido al elevado costo que esta ocasiona. Sin embargo, como sabemos, hasta ahora no se ha logrado encontrar un método de diagnóstico o de control realmente eficaz contra la enfermedad, es por esto que debemos buscar nuevos caminos para lograr el control y la erradicación de la misma.

En el presente trabajo, se pretende identificar algunas de las HSP que son expresadas por el *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 ya que nunca se ha determinado la presencia de estas proteínas en esta bacteria, las cuales por la sintomatología de la enfermedad que causa en el cerdo (fiebres muy elevadas~ deben ser producidas y participar en la defensa de la bacteria contra la respuesta del huésped. La identificación, caracterización y aislamiento de estas proteínas, permitirán la creación de un nuevo tipo de inmunógeno que participe en la erradicación de esta enfermedad en cerdos contagiados y la prevención de la misma en cerdos sanos así como nuevos métodos de diagnóstico de dicha enfermedad.

OBJETIVO

- Inducir e identificar las proteínas de shock térmico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1.

ME TODOLOGIA.

A) INDUCCION DE LA EXPRESION C~E LAS PROTEINAS DE SHOCK TERMICO (3,5~. a) Se sembró el *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 en 15 cajas de agar BHI suplementado con NAD. b) Se incubaron las cajas durante 24 horas a una temperatura de 37~C. c) Concluida la incubación se procedió a cosechar las 15 cajas con solución salina fisiológica.

d) Se resuspendieron perfectamente las bacterias en la solución salina. e) Se añadieron 10 ml de la cosecha a 6 tubos de polipropileno para centrifuga refrigerada (~50 ml) los cuales contenían 20 ml de caldo BHI. f) Se incubaron todos los tubos a 39 C durante los siguientes de acuerdo a los datos de la tabla 1.

TABLA I. TIEMPO DE INCUBACION DE LA COSECHA DE *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.

No. TUBO	1	2	3	4	5	6
TIEMPO (Hrs)	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0

Se siguió el mismo procedimiento para las temperaturas de 42 y 50 C.

B) OBTENCION DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES 16).

Para obtener las membranas de la bacteria, al término de cada uno de los tiempos de incubación se les dio el siguiente tratamiento: a) Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. b) Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con solución salina fisiológica. c) Se resuspendió la pastilla en 10 ml de solución salina fisiológica. d) Se sonicó durante 10 minutos o hasta que no quedaban células completas. Centrifugamos durante 15 minutos a 3000 rpm para separar las células completas que hayan quedado. e) Se desechó la pastilla y el sobrenadante se centrifugó a 20 000 rpm durante una hora para separar las membranas. f) Se resuspendieron las pastillas en 1 ml de agua desionizada. g) Se procedió a la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

C- Se realizaron electroforésis en geles de poliacrilamida SDS a las muestras obtenidas de acuerdo al procedimiento de Laemmli (1).

D- Se determinó la antigenicidad de las proteínas encontradas por medio de la técnica de inmunoelectrotransferencia.

RESULTADOS Y DISCUSION.

A- OBTENCION DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES

1. Lisado de las bacterias. Se obtuvo un concentrado de células con una consistencia viscosa, de color ligeramente amarilla.
2. Separación de las membranas. Se obtuvieron aproximadamente de 20-30 mg de una pastilla amarillenta, la cual se resuspendió en 100 µl de agua desionizada.
3. Análisis del extracto membranal. Para determinar la concentración de proteínas en las muestras se hicieron curvas patrón.

Los pesos moleculares de cada una de las bandas observadas a 39~ 42 y 50 C se resumen en las tablas II, III y IV respectivamente.

CONCLUSIONES

1. En los patrones electroforéticos se detectaron cinco bandas comunes y claramente definidas la 39 ~ 42 C) estas proteínas corresponden a los pesos moleculares de 27, 37, ~(), 72 y 95 KD.
2. La temperatura de inducción de las HSP en el *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 fué de 42 C.
3. Se obtuvieron dos HSP aparentemente anti-énicas, cuyos pesos moleculares fueron de 42 y 107 Kd.
4. Se observaron cinco bandas más en condiciones de shock las cuales se sugiere sean proteínas de shock térmico, estas proteínas corresponden a los siguientes pesos moleculares: 145, 135, 130, 122 y 118 kd

REFERENCIAS.

1. Garvey, Cremer, and Sussdorf, METHODS IN IMMUNOLOGY, W.A. Publishers, third edition, 1987, pP. 54~.
2. Lindquist S., et al., 1988. THE HEAT SHOCK PROTEINS. Annu. Rev. Genet. 22:631-677.
3. Miron Talia, et al, 1991, A 25 KD INHIBITOR OF ACTIN POLIMERIZATION IS A LOW MOLECULAR MASS HEAT SHOCK PROTEIN. The Journal of Cellular Biology. 114:225-261.
4. Negre-e-Abascal -/ cols., 1994, Actinobacillus pleuropneumoniae VIRULENCE AND GENE CLONING Arch. Med. Res.. 25:229-233.
5. Ritossa F., et al. 1962. A NEW PUFFING PATTERN INDUCED BY TEMPERATURES SHOCK AND DNA IN *Drosophila*. Experientia. 18:571-573.
6. Romero Rojas A. Camacho Machin J. 1992. PATRONES ELECTROFORETICOS Y ANTIGENICOS DE LOS SEROTIPOS 1,2,5 Y 7 DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Veterinaria Mexico, 2: 1 125-1 130.