



PRUEBA SEROLOGICA DE INHIBICION DE LA HEMOLISINA (APXI) EN SOPORTE LIQUIDO PARA EL DIAGNOSTICO DE PLEURONEUMONIA CONTAGIOSA PORCINA.

Arroyo, RA., Torres, A.O., Garibay, E.J., Lara, P.H., Mendoza, E.S. y Ciprián, C.A.

Coordinación General de Estudios de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Primero de Mayo S/N, Campo I, Col Atlanta, Cuautitlán Ilzcalli, Estado de México. CP 54700, Tel. y Fax 873-08-34. Cátedra: "Afecciones Virales y Bacterianas del Cerdo".

INTRODUCCION

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP) es una enfermedad devastadora, produce en los cerdos susceptibles una alta mortalidad y pérdidas económicas, debido a una pobre conversión alimenticia en los animales infectados crónicamente. La enfermedad puede variar desde un curso hiperagudo hasta el crónico, en donde la lesión aguda característica es una neumonía hemorrágica necrosante, asociada a una pleuritis fibrinosa y mientras que la lesión crónica se distingue por un tejido pulmonar consolidado, infartado y encapsulado (3,7)s.

En México se ha reportado la presencia de los serotipos 1,2,3,4,5,6,7,8,9 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* predominando el serotipo 1. Por otro lado, se han identificado tres distintos tipos de citotoxinas en *actinobacillus pleuropneumoniae*: Citolisina I (antes Cly I, hoy ApxI), Citolisina II (antes Cly II, hoy APX II) y Citolisina III (antes Cly III, hoy APX III). Se ha encontrado que la citolisina I la producen los serotipos 1,5,9,10 y 11; la citolisina II es escretada por todos los serotipos excepto el 10 y la citolisina III solo la producen los serotipos 2,3,4,6,8 y 12.

Para el diagnóstico serológico de la PCP se cuenta con las siguientes pruebas: aglutinación, aglutinación con partículas de latex, aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol, hemoaglutinación indirecta, fijación de complemento y prueba de ELISA. se requiere de personal especializado para realizarlas.

En México se ha desarrollado una prueba de diagnostico denominada PLEUROTTEST para la detección de anticuerpos contra los serotipos 1,3,5 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* siendo una prueba de aglutinación rápida que es empleada en campo de rutina.

En la actualidad se ha desarrollado pruebas para la deteminacion de anticuerpos en contra de las citolisinas. La prueba de inhibición de la hemolisis en agar sangre (BAHIA) consiste en neutralizar las citolisinas que producen las cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* por un suero de un animal infectado; cerdo que previamente han sido expuestó a PCP y cuyo suero posee anticuerpos en contra la o las citolisinas. La lectura de esta prueba es positiva cuando la hemolisis se ve inhibida en las placas de agar sangre, por lo tanto el animal esta infectado (o vacunado con inmunógenos a base de citolisinas) y la prueba es negativa cuando la hemolisis se presenta en las placas de agar sangre, lo que nos sugiere que el animal no ha sido infectado.

La prueba de inhibición de la citolisina en un soporte liquido consiste en realizar diluciones dobles del suero en un buffer definido adicionando un extracto crudo de citolisina y adicionando una suspensión de eritrocitos de carnero y se determina el titulo de anticuerpos a la dilución más alta de suero que inhibe la actividad de la citolítica sobre los glóbulos rojos.

El obietivo del presente trabajo es la comparación de dos pruebas para determinar la presencia de anticuerpos.

MATERIALES Y METODOS

Sueros: Se trabajaron los sueros de animales vacunados (semana 6 y 14) y no vacunados previamente de 2 granjas.

Se tomaron muestras de sangre de los mismos animales, a las edades de 6, 8, 11 y 13 semanas, en el caso de la granja del Estado de Jalisco, y en el caso de los animales de la granja del estado de Michoacán a las 6, 8, 14 y 16 semanas, considerándose el sangrado basal de la semana 6 para la determinación de anticuerpos.

En los 4 muestreos de la granja del Estado de Jalisco se recolectaron 209 sueros y de la granja del Estado de Michoacán se recolectaron 219 sueros, a los cuales se les determinaron los títulos de anticuerpos contra la citolisina ApxI por la prueba de inhibición de la Hemolisina (IH). Además, los sueros se sometieron a la prueba de PLEUROTTEST para diagnosticar los serotipos de *A. pleuropneumoniae*.

La hemolisina para la prueba de IH se obtuvo de acuerdo a la técnica descrita por Maudsley y Kadis (1986) que se resume a continuación:

Se prepara un cultivo de 6 hrs. de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en medio líquido suplementado con extracto de levadura fresca, se separó la biomasa por centrifugación conservándose el sobrenadante en el cual se encontró la hemolisina. Posteriormente, se concentró y purificó parcialmente por medio de una membrana de esclusión de pesos moleculares tabajándose con la fracción retenida la cual contenia la hemolisina Apx I, conservándose a -70 °C o con la adición de un inhibidor de proteasas (leupeptin) hasta el momento de su empleo en las pruebas serológicas.

El desarrollo de la prueba de IH se realizó de acuerdo a la técnica decrita por Udeze y Kadis (1992).

RESULTADOS Y DISCUSION.

En la granja de Michoacán, con la prueba de aglutinación se identificaron anticuerpos maternos hacia los serotipos 1 y 5 de *A. pleuropneumoniae* en la semana 6, mientras que en la semana 16 se identificaron anticuerpos propios del cerdo hacia el serotipo 1 (ver gráfica 1); en el caso de los anticuerpos inhibidores de la hemolisina de los grupos no vacunado y vacunado tuvieron el mismo comportamiento, asi en la semana 6 tuvieron 2.2 (log 10) hasta 2.8 (log 10) en la semana 16 (gráfica 1). En la granja de



Jalisco, no se detectaron anticuerpos contra los serotipos trabajados con PLEUROTTEST, solo en la semana 11 se detectaron los serotipos 1 y 7 de *A. pleuropneumoniae*, mientras que en la semana 13 solo se detectó el serotipo 1 (gráfica 2); en el caso de los anticuerpos inhibidores de la hemolisina de los grupos vacunados (I/M y S/C), solo hubo un aumento de anticuerpos (en la semana 8: 3.6 log₁₀) en los animales vacunados por vía S/C; en los todos los grupos tuvieron el mismo comportamiento en la semana 6, 11 y 13 (gráfica 2). Con la prueba de aglutinación se están detectando anticuerpos infectantes de animales que ya tienen los pulmones dañados (además de que esta identificando al serotipo), lo que probablemente este sucediendo en la semana 16 (Michoacan) y semana 11 y 13 (Jalisco), mientras que los resultados que se muestran con la prueba de inhibición de la hemólisis, la infección posiblemente este ocurriendo en la semana 14 (Michoacán) y semana 8 y 11 (Jalisco), gráficas 1 y 2.

LITERATURA CONSULTADA

Ciprián C.A., Medina, A.G., Fuentes, R.M., Pijoan, A.C., Torres, A.O., Colmenares, V.G. And Carnacho, M.J. (1988) "Serotyping of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* isolates from pigs in México. *Vet. Méx.*, 19:205-210.

Devenish J., Brown J.E., & Rosendal S. (1992) "Association of the RTX Proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with Hemolytic, CAMP, and Neutrophil-Cytotoxic Activities" *Infect and Immunity* 60 (5): 2139-2142.

Díaz, C., Gonzales, M., Jimenes, E. and Stephano, A., (1988). "Serotyping of *haemophilus pleuropneumoniae* isolates from pigs in México" *Proceeding 1 OTh Int. Pig. Vet. Soc. Rio De Janeiro, Brazil.* p 75.

Maudsley J.R. & Kadis S. (1986) "Growth and hemolysin production by *Haemophilus pleuropneumoniae* cultivated i a chemical defined medium" *Can J: Microbiol* 32 p: 801-805.

Nakai, T., Ono, E., Ike, K., and Kume, K. ((1992) "Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by use of purified capsular polisaccharide or lipulusaccharide. " *Proceeding 12Th Int. Pig. Vet. Soc. The Hauge, The Netherlands.* P 186.

Udeze F.A. & Kadis S. (1992) "Effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Hemolysin on Porcine Neutrophil Function" *Infect and Immunity* 60 (4): 1558-1567.

Utrera, V. and Pijoan, C. (1992) "Agar hemolysis inhibition assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pig serum" *Proceeding 12Th Int. Pig. Vet. Soc. The Hauge, The Netherlands.* P 218.