

**XXXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdo, A.C.
Enfermedades bacterianas**

DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA LA TOXINA ApXI DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EN LECHONES DE 4 A 10 SEMANAS DE EDAD, UTILIZANDO LA PRUEBA DE NEUTRALIZACION DE HEMOLISINAS.

J. PALACIOS¹; HERNANDEZ R.²; SUAREZ F.²

1/Schering-Plough Lab. Ave. 16-Sept. # 301 Mexico D.F. 2/ Depto. Microbiología Fac.Med.Vet. y Zoot. UNAM

Dentro de los mecanismos de patogénesis de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se destaca la importancia de las exotoxinas producidas por este microorganismo. Actualmente estas se denominan ApXI, ApXII y ApXIII y pertenecen a la familia de toxinas RTX encontradas en algunas bacterias patógenas Gram-Negativas (1).

La toxina ApXI tiene una elevada capacidad tóxica y hemolítica. Esta toxina es producida principalmente por los serotipos 1, 5a, 5b, 9, 10 y 11 y es considerada como el factor más importante de la alta virulencia de éstos.

La toxina ApXII es débilmente hemolítica y moderadamente citotóxica y es producida por todos los serotipos excepto por el 10. La toxina ApXIII la cual no es hemolítica pero es extremadamente citotóxica y es producida por los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8.

Actualmente el uso de pruebas serológicas para la detección de respuesta humoral hacia APP involucra diferentes pruebas como la coagulación, ELISA y fijación de complemento las cuales se enfocan a la detección de las respuestas humorales contra los antígenos capsulares de APP, sin embargo el conocimiento de la respuesta hacia proteínas generadas durante la infección como las exotoxinas resulta de interés en la dinámica de la infección sobre todo en la fase de destete en la cual se registra la infección por este microorganismo (2).

OBJETIVO: Detectar la respuesta serológica hacia la toxina ApXI en lechones de 4 a 10 semanas de edad provenientes de granjas con problemas clínicos de APP y sin ellos mediante la Prueba de Neutralización de hemolisinas.

MATERIAL Y METODO: Se colectaron un total de 783 sueros provenientes de lechones de 4 a 10 semanas de edad en dos tipos de granja, aquellas con problemas de mortalidad por complejo neumónico en donde existía el diagnóstico de pleuroneumonía por APP y registraban más del 3% de mortalidad en las fases de destete/engorda y las que eventualmente presentaban el problema en las fases de engorda con mortalidad inferior al 3%.

Las cantidades de sueros en cada caso se muestran en el siguiente cuadro.

EDAD(sem)	< 3%	> 3%	TOTAL
4	117	71	188
6	115	81	196
8	134	79	213
10	107	79	186

Todas las muestras fueron tomadas asepticamente por punción yugular. El suero fue separado por centrifugación y mantenido en congelación a -70°C hasta su proceso en el laboratorio. Las muestras que presentaron Hemólisis fueron descartadas. La técnica utilizada para la detección de anticuerpos contra la hemolisina fue la descrita por Fenwick y cols. de acuerdo al siguiente esquema (3).

Se obtuvo un cultivo de APP Serotipo 1 crecido en RPMI suplementado con suero fetal al 2.5% y NAD al 0.025%.

La actividad hemolítica del sobrenadante se determinó utilizando glóbulos rojos de ovino. Una unidad hemolítica se definió como la cantidad de hemolisina requerida para lisar 50% de una suspensión de eritrocitos al 1%.

La prueba se realizó en microplacas fondo U, el suero se inactivó a 56°C durante 30 minutos y se mezcló con la hemolisina semipurificada para dar una concentración final de Suero Hemolisina de 1:10, 1:15 y 1:20; para cada prueba se determinó un estándar de la actividad hemolítica de la hemolisina sola.

Se incubó una hora a 37°C y se agregó una suspensión al 1% de eritrocitos de ovino en un buffer de 10 mM Tris y 0.9% NaCl e incubada 2 hs. a 37°C.

Las microplacas se centrifugaron 600 rpm x 6 min. para sedimentar los eritrocitos no lisados y el sobrenadante se transfirió a otra placa, el grado de lisis se determinó midiendo el contenido de hemoglobina con un lector de ELISA a 405 nm.

Los resultados se expresaron como el número de unidades hemolíticas neutralizadas por 1 ml. de suero basados en la curva estándar de la hemolisina.

La interpretación de los resultados se realizó de una manera cualitativa tomando en cuenta los valores de la titulación de la hemolisina en cada muestra contra el valor del suero negativo de acuerdo al siguiente valor, 0-3000 (Negativos) 3000-6000 (Sospechosos) y > 6000 (Positivos). A los sueros sospechosos se les corrió la prueba una vez más.

Con objeto de medir la respuesta hacia los antígenos capsulares se realizó un pool de sueros de cada edad para ser expuestos al antígeno de "Pleurotest".

RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados generales de respuesta humoral hacia hemolisinas nos muestran una disminución en el porcentaje de animales positivos. El 83.5% de los lechones de 4 semanas mostraron anticuerpos con una tendencia hacia la disminución a las 10 semanas en donde el 14.5% mostraron esta respuesta (gráfica 1).



Las diferencias se observaron entre las granjas con mortalidad (>3%) y aquellas sin problemas clínicos, en estas últimas la presencia de animales positivos fue negativa a las 10 semanas en tanto que las granjas con problemas mostraron una respuesta positiva en un 34.2% a la misma edad (gráficas 2 y 3).

Analizando algunas granjas del grupo con más del 3% de mortalidad encontramos que principalmente el incremento en la respuesta se observa entre las 8 y 10 semanas de edad lo que sugiere que los lechones entran en contacto con la exotoxina presentando una infección clínica o subclínica lo cual repercute en mortalidad durante la semana 12 y 13 de edad (gráfica 4).



La diferencia de reacción hacia los antígenos capsulares nos mostró en las granjas con < 3% de mortalidad un 65.2% de reacción positiva, los serotipos detectados fueron 1 (34.6%), 3 (11.5%), 5 (11.5%) y 7 (7.6%) mientras que en las granjas con > del 3% fue de un 80.5% detectando los serotipos 1 (25%), 3 (18%), 5 (25%) y 7 (12.5%). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de Chi Cuadrada mostrando una correlación entre mortalidad y reactores positivos de P = 0.034 en la octava semana y de P < 0.005 en la semana 10 de edad.

Concluimos que la utilización de la prueba de neutralización de hemolisinas como herramienta diagnóstica para detectar puntos de infección puede ser útil en el control de la pleuroneumonía contagiosa durante el periodo de destete para tomar las medidas correctivas de manejo, inmunización o medicación, aunque se deberá complementar con otro tipo de prueba ya que solo detecta ciertos serotipos y pueden presentarse reacciones cruzadas con otros antígenos.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Frey J (1994) Exotoxin antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haemophilus Actinobacillus & Pasteurella Intl Conference
- 2 - Fenwick BW (1992) Critical comparison of the serologi tests used to diagnose porcine pleuropneumoniae. Proc 12th Int Congr Pig Vet Soc
- 3 - Fenwick BW et al. (1989) Development and evaluation of a serum hemolysin neutralization assay for the diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. Proc Res Work Anim Dis