

## PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA ANTIGÉNICAMENTE IMPORTANTES DEL *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Romero Torres E., Vasconcelos R., Ponce Hernández C., Mendoza Elvira S.E., Romero Rojas A.  
Laboratorio 8, Biología Molecular, Coordinación de Estudios de Posgrado Campo 1, Facultad de Estudios Superiores-  
Cuautitlán, U.N.A.M., Av. 1o. de Mayo S/N, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, C.P. 54700.

La neumonía en el cerdo representa uno de los más graves problemas infecciosos de esta especie animal. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Ap) es el agente etiológico de la pleuropneumonía contagiosa porcina (PCP). Este es un padecimiento de distribución mundial que impacta negativamente a la economía de las granjas afectadas por la elevada mortalidad de los animales en crecimiento. Los sobrevivientes son portadores asintomáticos que infectan a otros puercos y que tienen una baja conversión alimenticia (1,2). Es difícil controlar la propagación de la PCP, debido a que no hay formas sensibles y específicas para determinar exactamente si hay o no cerdos infectados en una piara, siendo el medio más frecuentemente de propagación de la enfermedad la transmisión directa de un cerdo infectado a uno susceptible a través posiblemente de aerosoles (2,3). Tratando de dilucidar las características antigénicas del Ap se han realizado estudios de la cápsula (4), el lipopolisacárido (5) y la hemolisina (6), no obstante es poco lo que se sabe de las proteínas de membrana. Nicolet (7) realizó por primera vez el estudio de las proteínas que se encuentran en la membrana celular del Ap por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida y encontró que los patrones de estos serotipos eran iguales concluyendo que la diferencia entre los serotipos se encontraba en la cápsula. Rapp y Ross (8) retomaron la técnica para estudiar las membranas de esta misma bacteria pero hicieron modificaciones importantes en la forma de obtener las membranas. Sus resultados demuestran la presencia de proteínas comunes entre los diferentes serotipos de 42.5, 39, 29 y 16 kD y algunas proteínas seroespecíficas que se encontraban en el mismo rango de peso molecular. Rapp y MacInnes (9, 10) establecieron en trabajos diferentes la presencia de proteínas inmunogénicamente importantes (45, 49.5, 66.5 y 17.32 y 42 kD respectivamente). En 1989, Romero y col., (11) demostraron la presencia de 4 proteínas comunes en preparados de membranas del Ap serotipos 1,2,5 y 7 de PM aproximados de 30,43,50 y 66 las cuales fueron reconocidas por antisueros de conejos. Estas proteínas se presentaron consistentemente en trabajos recientes que han establecido la presencia de proteínas de estrés (12,13). El OBJETIVO de este trabajo es el de purificar e identificar completamente a estas proteínas presentes en los extractos enriquecidos de membranas para su posterior clonación y uso como inmunógenos y/o en sistemas de diagnóstico.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Cepas. El Ap biotipo 2 (2B2) fue donado por la Dra. Mireya de la Garza del Laboratorio de Biología Celular del CINVESTAV.

**Obtención de Extracto Membranal.** Un cultivo de 18hr. de Ap fue inoculado en placas de BHI con NAD al 0.001%. Después de 18h de incubación a 37°C se cosechó el cultivo con solución salina fisiológica. Las bacterias se sonicaron (3x60Hz/5min). Las suspensiones fueron primero centrifugadas a 4,000rpm/15min para eliminar cualquier célula completa. Posteriormente los lisados se centrifugaron a 20,000rpm/1h. Se eliminaron los sobrenadantes y se trabajó con las pastillas. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

**Electroforesis de los Extractos Membranales.** Se empleó un sistema de geles discontinuos de acuerdo al procedimiento de Laemmli (14).

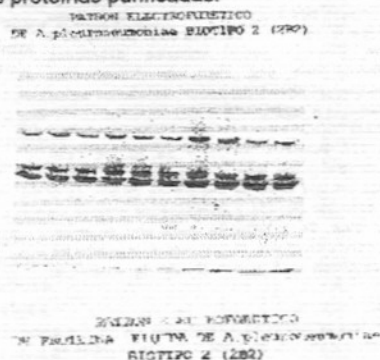
**Electroelución de las proteínas de los geles.** Las proteínas se obtuvieron a partir de los geles de poliacrilamida utilizando una cámara de electroelución diseñada en el laboratorio, siguiendo las condiciones marcadas por BIO-RAD. (15).

**Producción de Sueros Hiperinmunes.** La proteína purificada se inoculó con adyuvante completo de Freund en ratones Balb/c siguiendo un protocolo de inmunización previamente establecido (11). Titulando los sueros con la técnica DOT-ELISA.

**Inmunoelctrotransferencia.** Los antisueros producidos se enfrentaron a extracto membranar completo utilizando la técnica de Towbin y col. (16).

**RESULTADOS.** Hasta el momento se tienen purificadas dos proteínas de 81 y 66kD, esperando completar la purificación de otras 4 ó 5 en poco tiempo. En las figuras se muestran algunos de los resultados.

**CONCLUSIONES.** 1) Se reprodujo el patrón electroforético anteriormente reportado, 2) Se purificaron las proteínas de 81 y 66kD por electroelución, 3) Se produjeron antisueros policlonales contra estas proteínas, 4) Los antisueros son específicos contra las proteínas purificadas.



### BIBLIOGRAFIA.

- Herrera G. y col., (1995). Rev. Lat-Am. Microbiol., 37:147-152.
- Negrete E. y col., (1994). Arch. Med. Res. 25:229-233
- Willson P. y col., (1987). Can. Vet.J. 28:111-116
- Altman E. y col., (1987). Eur. J. Biochem. 170:185-192
- Maudsley J. y col., (1986). Inf.Imm. 51:501-506
- Kume K. y col., (1986). Inf.Imm. 51:563-579
- Nicolet J. y col., (1980). Int.J.Sys.Bact. 30:1
- Rapp V., y col., (1986). Inf.Imm. 52:414-420
- MacInnes J. (1987). Inf.Imm. 55:1626-1634
- Rapp V. y Ross R. (1986) Inf.Imm. 54:751-760
- Romero R.A. (1989). Tesis de Maestría, FES-C, UNAM.
- Gutierrez R. (1995). Tesis de Licenciatura, FES-C, UNAM.
- Ramírez R.E. (1996). Tesis de Licenciatura, FES-C, UNAM
- Laemmli U.K. (1970). Nature 227:680-685
- BIO-RAD catálogo 165-2976 y 165-2977, Electroelución.
- Towbin H. y col., (1979). Proc.Natl.Acad.Sci. 76:4350-4353