

## ESTUDIO DE LA COMPOSICION DE UNA BACTERINA CONTRA *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Romero RA\*<sup>1</sup>, Cruz ST<sup>1</sup>, Colmenares VG<sup>2</sup>, Mendoza ES<sup>1</sup>, Lara PH<sup>3</sup>, Díaz EE<sup>3</sup>,  
Ciprián CA<sup>1</sup>FES-C, UNAM, <sup>2</sup>INIFAP, <sup>3</sup>Boehringer-Ingelheim, Mexico.

### Introducción.

La pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP) es una enfermedad muy severa y de importancia económica que es producida por doce serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. El curso clínico de la enfermedad se caracteriza por presentarse de varias formas: peragudo, agudo o crónico, dependiendo de las cepas o serotipos involucrados, de la dosis infectante, del *status* inmune de los animales infectados y del stress por las condiciones de manejo entre otras. La cápsula de polisacáridos; las proteínas de membrana externa; el lipopolisacárido o endotoxinas y las toxinas o enzimas excretadas han sido implicadas en la patogénesis de la PCP. Sin embargo, anticuerpos dirigidos contra los componentes de la envoltura celular no parecen mediar la eliminación bacteriana de los pulmones infectados cuando son vacunados con bacterinas tratadas con calor o con formaldehído, las cuales inducen anticuerpos contra los componentes celulares, pero solo proveen una mínima protección sero-específica contra una infección aguda. Esas observaciones indican que algunos factores producidos por las bacterias viables juegan un papel prominente en la producción de la enfermedad. La bacterina consta de cultivos de diferentes serotipos, que se encuentran y afectan a varios países de Latinoamérica y otros mas. En este reporte nosotros mostramos por análisis químicos, bioquímicos y biológicos la composición de la bacterina, detectando proteínas, carbohidratos, concentración de endotoxina, así como el peso molecular de las proteínas presentes en los sobrenadantes de los seis serotipos presentes en la bacterina.

### Material y Métodos

- A. Estudios de los cultivos. Las muestras fueron tomadas en las unidades de producción, tanto de la biomasa como del sobrenadante en tres tiempos diferentes durante la producción del biológico.
- B. Dependencia al NAD. *Actinobacillus pleuropneumoniae* fue cultivado en BHI (brain-heart infusion agar, BHI, Difco Labs, Detroit, Michigan, USA), y fue enriquecido con sangre de bovino desfibrinada al 5%. El factor V fue suplementado con 10 ug/ml NAD (sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA) para detectar la actividad hemolítica y el satelitismo.
- C. Las pruebas de ureasa, oxidasa y catalasa, así como la fermentación de azúcares, se realizó utilizando medios y reactivos especiales de GIBCO.
- D. La determinación del pH se realizó utilizando un potenciómetro "pH meter Corning/m 7".
- E. La determinación de carbohidratos se realizó utilizando la técnica fenol-sulfúrico. El contenido de carbohidratos se determinó utilizando el procedimiento de Fenol-Sulfúrico. Un mililitro de fenol acuoso al 5% se adiciono a 1.0 ml de solución de carbohidratos conteniendo de 10 a 100mg del carbohidrato. La solución es mezclada y se adicionaron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se mezcla. La absorbancia se midió a 470 nm (3)
- F. La determinación del contenido de proteínas en las muestras se realizó utilizando la técnica de Bradford. El análisis se llevo a cabo añadiendo 100 ml de la solución muestra conteniendo 10-200 mg de proteínas a 5ml de reactivo de azul de Coomassie. Después de 5 min, se midió la absorbancia a 595nm (1)
- G. La cantidad de endotoxina se determinó utilizando el método del lisado de Amebocito de *Limulus*, la micro técnica se realiza en placas de petri desechables libres de pirógenos, los cuales se cuadrícula y en cada cuadro se coloca 0.1ml de la muestra problema con sus respectivas diluciones decimales y 0.1ml del lisado de amebocito, incubandose posteriormente durante 1 hora a 37°C. La presencia de endotoxina provoca la formación de un gel firme que puede detectarse fácilmente invirtiendo el tubo (4)
- H. Electroforesis con SDS-PAGE El peso molecular de las proteínas presentes en los sobrenadantes se determinó utilizando la técnica de electroforesis en geles de acrilamida-dodecilsulfato de sodio en condiciones discontinuas y reductoras (2)



I. Determinación de hemolisina. Es un método en placas de microtitulación que se realiza como sigue: 500 ml de eritrocitos lavados y estandarizados al 1% en 0.15M de NaCl fueron mezclados con 500 ml de diluciones seriadas dobles de las muestras preparadas en solución salina con TRIS y  $Ca^{2+}$  (TBCS) (20 mM Tris + HCl, 5mM  $CaCl_2$  y 150 mM NaCl, pH = 7.8). Se incubaron a 60 min/37 °C, los tubos se centrifugaron (8,000 x g, 1min) y los sobrenadantes se midieron a A 545. El nivel de actividad citolítica de la preparación de hemolisina para los PMN porcinos (actividad leucocida) fué determinada por el ensayo de MTT, la cual se basa en la capacidad de las enzimas mitocondriales de células viables para transformar el colorante de formazan. Diluciones seriadas dobles de las muestras (100 ml) en TBCS fueron preparadas en placas de 96 pozos. La suspensión de PMN se ajustó a  $5 \times 10^6$  céls/ml y alícuotas de 100 ml se añadieron a cada dilución de la toxina. Después de 60 min de incubación a 37 °C, 20 ml de solución de MTT a PBS (pH=7.4) (5mg/ml) se añadieron a cada pozo. El formazán fue cuantificado midiendo la absorbancia a 590nm con un lector de ELISA automatizado (6).

### Resultados y Discusión

Los resultados mostraron que los cultivos de *A. pleuropneumoniae* pertenecen al serotipo estipulado y que en los sobrenadantes se encontraron, por las técnicas utilizadas que contenían concentraciones variables de proteínas, lipopolisacáridos y carbohidratos y que contenían concentraciones constantes de hemolisinas y que al parecer fueron las mismas toxinas, tal como se muestra en el cuadro 1.

**CUADRO 1.** Estudio realizado con el medio de cultivo y los sobrenadantes de los medios en donde se desarrollaron los serotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 7.

MUESTRA	E. KD	pH	P	LPS	CHS	UH
Medio/ cultivo		7.4	10	60	200	0
Sobrenadantes						
SER. 1: 9 Hr	110-120	5.8	320	760	1495	225
SER. 2: 7 Hr	110-120	6.0	120	600	1400	260
SER. 3: 7 Hr	110-120	6.2	133	700	1300	240
SER. 4: 7 Hr	110-120	6.4	400	500	1200	250
SER. 5: 7 Hr	110-120	5.9	129	400	1700	260
SER. 7: 9 Hr	110-120	6.1	137	800	1438	300

E. Electroforesis. KD. Kilodaltones. P. Proteínas mg/ml. LPS. Lipopolisacáridos ng/ml. CHS. Carbohidratos mg/ml. UH. Unidades hemolíticas.

### Implicaciones.

Es importante remarcar que existe una alta proporción de diferentes factores de virulencia en la bacterina, como serían citotoxinas, polisacáridos y endotoxina, los cuales juntos colaboran para inducir una buena inmunidad protectora en los cerdos vacunados con la bacterina. Sin embargo, es importante demostrar si el cerdo responde y reconoce estos factores, y si los cerdos vacunados resisten a un desafío experimental con *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

### Referencias.

- 1.- Bradford MN. 1976. Anal. Biochem. 72:248-254;
- 2.- Laemmli UK. 1970. Nature 227:680;
- 3.- Robyt JF and White BJ. 1987. Ed. Waveland Press, Inc.;
- 4.- Rojas-Corona, *et al.*, 1969. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132:599-601;
- 5.- Udeze FA and Kadis S. 1992. Infect. & Imm. 60(4):1558-1566.
6. Kanderski, K & Moiby R. 1987. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 95:175-179).