

Proteínas compartidas por los serotipos 2, 4, 5 y 11 de *Streptococcus suis*.

Galván PRE*, Ramírez BJA, Cortés CI, y Tato ZP. *Departamento de Producción Animal: Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México rosarioe@servidor.unam.mx; Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México.

Introducción. *Streptococcus suis* se ha asociado con casos de meningitis, artritis, septicemia y muerte súbita. A la fecha se han descrito 35 serotipos y su identificación se basa exclusivamente en las diferencias antigénicas de los polisacáridos capsulares. Respecto a los componentes no capsulares se han descrito el Factor extracelular (EF), la proteína liberadora de muramidasa (MRP) y la suilisina que no se encuentran en todas los serotipos de *S. suis*. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar las proteínas de 4 serotipos de *S. suis* y determinar las proteínas compartidas.

Material y Métodos. Se utilizaron cepas de referencia de *S. suis* de los serotipos 2, 4, 5 y 11 gentilmente donadas por el Dr. Carlos Pijoan. Estos serotipos corresponden a los más frecuentemente aislados en nuestro país (Galván et al. 1997). Se obtuvieron antígenos de las 4 cepas siguiendo el método de los polvos acetónicos bacterianos (Tato et al. 1979). Las cepas se cultivaron en caldo Todd-Hewitt a partir de un inóculo de toda la noche a 37°C. Las bacterias se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento (5-6 h) por centrifugación, se extrajeron los antígenos, se esterilizaron por filtración a través de membranas de miliporo 0.22µ, se liofilizaron y se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (1976). Se obtuvieron sueros hiperinmunes en conejos para cada complejo antigénico. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (Laemmli 1970). Después de la electroforesis, una porción del gel se tiñó con azul de Coomassie y el resto se transfirió a papel de nitrocelulosa utilizando una cámara semiseca de transferencia (Bio-rad). Se cortaron tiras de 0.4 cm que se incubaron con los antisueros correspondientes a una dilución 1:100 (PBS-Tween 20). Se lavaron con PBS-Tween 20 y PBS solo. Posteriormente, se les agregó el anticuerpo (anti-IgG de conejo) conjugado con peroxidasa en una dilución 1:1500 (PBS-Tween) y se incubaron por 2 h a 37°C. Las tiras de nitrocelulosa se lavaron y revelaron utilizando una solución que contenía: ortocloronaftol y peróxido de hidrógeno al 0.3%. Para determinar la presencia de factor extracelular (EF) en los extractos antigénicos, se realizaron ensayos de inmunotransferencia utilizando para revelar un anticuerpo específico contra el factor extracelular (1:5000) gentilmente donado por el Dr. Marcelo Gottschalk.

Resultados. Análisis de los complejos antigénicos de *Streptococcus suis*. La electroforesis de los complejos antigénicos de las cepas de referencia de *S. suis* mostró que tenían al menos 27 bandas con pesos moleculares entre 205 y 7 kDa. El complejo antigénico obtenido del serotipo 2 mostró 21 bandas; el del 4, 25; el del 5, 27; y el del 11, 23 bandas (Fig. 1). **Determinación de proteínas reconocidas por sueros homólogos.** Los ensayos de inmunoelectrotransferencia mostraron que el suero anti-serotipo 2 reconoció 14 bandas del complejo antigénico homólogo con pesos moleculares entre 141 y 15 kDa mientras que, el anti-serotipo 4 reconoció 7 entre 112 y 24 kDa, el anti-serotipo 5, 18 entre 198 y 15 kDa y el anti-serotipo 11, 13 bandas con pesos entre 120 y 15 kDa. Los patrones de reconocimiento que se observaron entre los antígenos de las cepas de referencia con sus sueros homólogos mostraron que se comparten al menos 6 proteínas entre ellas con pesos moleculares de 74, 54, 40, 38, 33 y 24 kDa. Es importante hacer notar que 4 de estas proteínas (74, 54, 40 y 33 kDa) fueron antígenos inmunodominantes en todas las preparaciones (Fig. 2). **Determinación de la presencia de factor extracelular.** Se determinó la presencia de factor extracelular (EF) en las preparaciones antigénicas de los serotipos 2, 5 y 11 utilizando un anticuerpo anti-EF y se encontró que en el serotipo 2, el anticuerpo reconoció una proteína de aproximadamente 110 kDa y 3 proteínas de menor peso molecular (98, 45 y 32 kDa). Las proteínas de 45 y 32 kDa también fueron reconocidas en el serotipo 5. En los serotipos 2, 5 y 11 se reconoció además una proteína de 30 kDa que también apareció en los controles incubados solo con el segundo anticuerpo. **Determinación de proteínas reconocidas por sueros heterólogos.** Las 6 proteínas reconocidas por los sueros homólogos, también se reconocieron en los ensayos de reactividad cruzada. Al probar el suero anti-serotipo 2 con los diferentes complejos antigénicos se observó que: se reconocen 10 bandas en el complejo antigénico del serotipo 4; 15 en el del 5; y 13 en el del 11. Ocho proteínas fueron reconocidas en todas las preparaciones antigénicas por el suero anti-serotipo 2 (107, 74, 54, 49, 40, 38, 33 y 24 kDa). El suero anti-serotipo 4 al reaccionar con los complejos antigénicos mostró que: 8 bandas del serotipo 2 se reconocieron; 10 en el 5, y 9 en el 11. El suero anti-serotipo 5 con los complejos antigénicos mostró que: 16 bandas se reconocieron en el serotipo 2; 20 en el 4 y 12 en el 11. Once proteínas se reconocieron en todas

las preparaciones antigénicas (74, 65, 54, 49, 40, 38, 33, 30, 24, 20 y 15 kDa). El suero anti-serotipo 11 reconoció en los antígenos del serotipo 2, 19 bandas; en el 4, 13 bandas; y en el 5, 17 bandas. Ocho de estas proteínas fueron reconocidas por el suero anti-serotipo 11 en todas las preparaciones antigénicas (76, 74, 54, 49, 40, 38, 33, 24). **Reactividad de los sueros hiperinmunes contra bacterias completas hacia las preparaciones antigénicas.** Se realizaron ensayos de inmunoelectrotransferencia con el fin de determinar si los sueros hiperinmunes preparados contra bacterias completas reconocían algunos antígenos en las preparaciones antigénicas de los serotipos 2, 4, 5 y 11 (Fig. 3). Los resultados mostraron que, el suero obtenido con bacterias completas del serotipo 2 reconoció 18 bandas en el complejo antigénico del mismo serotipo; el suero anti-serotipo 4, 15 bandas; el suero anti-serotipo 5, 15 bandas; y el suero anti-serotipo 11, 15 bandas. Los resultados mostraron que se reconocen por todos los sueros, las proteínas de 120, 74, 70, 60, 40, 36, 33 y 24 kDa; 3 de ellas corresponden a los antígenos inmunodominantes (74, 33 y 24 kDa).

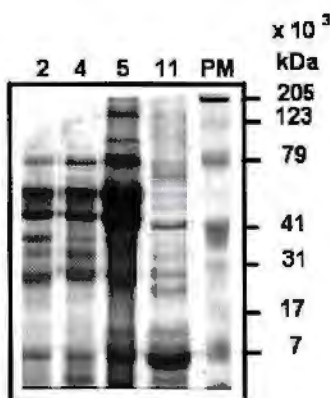


Figura 1

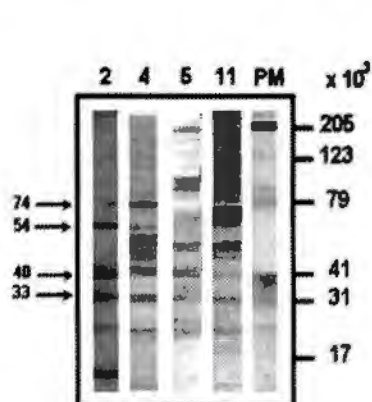


Figura 2

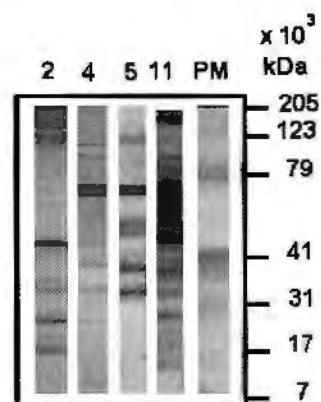


Figura 3

Discusión. La contribución de este trabajo es la determinación de 6 proteínas que son compartidas entre los serotipos 2, 4, 5 y 11 que son reconocidas también en pruebas de reactividad cruzada y que sueros obtenidos con bacterias completas reconocen 3 de ellas. Las preparaciones antigénicas del serotipo 2 contienen el factor extracelular como había sido reportado (Gottschalk *et al.* 1998). Sin embargo, un hallazgo interesante es el hecho de que con el anticuerpo anti-EF se revelaron 3 proteínas de menor peso molecular, dos de ellas también se encontraron en el serotipo 5. Cinco proteínas fueron reconocidas por los sueros anti-bacteria completa, lo cual sugiere que algunas de las proteínas incluidas en los complejos inmunogénicos son proteínas de superficie. Es importante realizar trabajo con cepas de campo y otros serotipos para determinar si las proteínas que se han identificado son compartidas por otros serotipos.

Conclusiones. Se concluye que los serotipos estudiados comparten al menos 6 proteínas con pesos moleculares de 74, 54, 40, 38, 33 y 24 kDa, cuatro de ellas fueron antígenos inmunodominantes (74, 54, 40 y 33 kDa). De estas proteínas, 3 fueron reconocidas por sueros anti-bacteria completa (74, 33 y 24 kDa) correspondiendo a antígenos inmunodominantes.

Implicaciones. El conocimiento de las proteínas compartidas podría ser útil para el diagnóstico y el control o prevención de las infecciones producidas por estos microorganismos. En cuanto al diagnóstico, se podría implementar un ELISA de captura con anticuerpos dirigidos contra los antígenos inmunodominantes que permitiera hacer un diagnóstico temprano y oportuno de las infecciones por *Streptococcus suis*. Finalmente, si estos antígenos inducen inmunidad, se podría tener una vacuna que protegiera contra cualquier serotipo.

Bibliografía

Bradford MM. 1976. *Anal Biochem.* 72:248-254; Galván PE, *et al.* 1997. *Memorias del XXXII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Especialistas en Cerdos A.C.*, p. 108; Gottschalk, M. *et al.* 1998. *Can. J. Vet. Res.* 62:75-79; Laemmli, UK.. 1970. *Nature* 227:680-685; Tato P., *et al.* 1979. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*. 130A:47-60.