

## OBTENCIÓN DE UN CONJUGADO DE *Haemophilus parasuis* PARA EL DIAGNOSTICO POR INMUNOFUORESCENCIA DE LA ENFERMEDAD DE GLASSER

López, Ma.R, Mendoza S, Esquivel, MaE, Oliva, D., Mendoza, D-S, Hernández, R, Juvenal, S., Hernández- Baumgarten E., Trujillo D., Ciprián C. A.,  
FES-Cuautitlán, Posgrado. UNAM. seme@servidor.unam.mx

### Introducción

La enfermedad de Glasser's es una enfermedad que se ha contemplado como una infección esporádica asociada a factores predisponentes como estrés, afecta a toda la población de cerdos, sin embargo es observado generalmente en cerdos de 2 a 8 semanas de edad (1,2,3). *Haemophilus parasuis* es el agente etiológico de la enfermedad de Glasser's, se caracteriza por una poliserositis y poliartritis fibrinopurulenta (4, 5). En los últimos años se ha observado que en las granjas con una elevada norma de sanidad a incrementado la incidencia de mortalidad y morbilidad de una manera significativa. Una de las dificultades para el correcto diagnóstico de *H. parasuis* es la carencia de métodos rápidos y sencillos, así como capaces de diferenciar los serotipos presentes, es sumamente importante ya que se ha demostrado que pueden existir diferentes serotipos de la bacteria en una misma explotación. El método definitivo para llegar al diagnóstico de la enfermedad es el aislamiento de *H. parasuis* a partir de tejidos o de hisopos. Reportes recientes indican la existencia de una prueba de inmunofluorescencia para detectar anticuerpos contra *H. parasuis*. Desafortunadamente estas técnicas aún no están disponibles en el país, por lo que es necesario realizar proyectos que lleven al desarrollo de pruebas de diagnóstico sencillas capaces de realizarse en el campo y pueda diferenciar los diferentes serotipos existentes en el país. (1). El objetivo del presente trabajo fue preparar un conjugado de *Haemophilus parasuis* para el diagnóstico por inmunofluorescencia de la enfermedad de Glasser's.

### Material y Métodos

Se inmunizó un cerdo de 21 días de edad con una cepa de *Haemophilus parasuis* con un calendario de vacunación establecido durante dos meses, para la obtención del suero se sacrificó y sangró en blanco al cerdo. Posteriormente se determinaron los niveles de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA. Para la obtención del conjugado se llevaron a cabo una serie de pasos que permitieron la separación de inmunoglobulinas y así realizar la conjugación con el isotiocianato de fluoresceína. Dentro de los métodos que se llevaron a cabo, se realizó una cuantificación de proteínas por el método de Bradford, como también la realización de una electroforesis en gel de poliacrilamida con nitrato de plata para la identificación de las inmunoglobulinas presentes en el suero, para la separación de las inmunoglobulinas se llevó a cabo una cromatografía de columna por afinidad. Al terminó de esto, se llevó a cabo la prueba confirmativa en la cual se determinó el título de los anticuerpos por medio de una prueba de Inmunofluorescencia Directa (IFD). Se hicieron cortes de tejido con pulmones positivos a *H.*

*parasuis*, las cuales fueron fijados con acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  / 10 min, se colocó una gota del conjugado sobre el tejido, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  / 45 min, se realizaron lavados con PBS y agua destilada, por último se le adiciona glicerina buferada al 50% 1:1 en PBS y se observó al microscopio de fluorescencia.

### Resultados y Discusión

Se obtuvieron 0.88 mg de proteínas las cuales se tomaron como satisfactorias para la realización del proyecto. Con la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida y teñidas con nitrato de plata mostraron la presencia de las diferentes inmunoglobulinas en el suero, esto ayudó a determinar la eficiencia de la técnica que se estableció para la separación de las inmunoglobulinas. Se determinaron los niveles de anticuerpos por medio de ELISA desde el inicio de la inmunización hasta el sacrificio: desde lecturas del 21.3 (sospechoso) hasta 39.7% (positivo), mostrando un aumento considerable de la relación positivo/muestra hacia *H. parasuis*. La prueba de IFD, en los pulmones sanos se observó la ausencia de fluorescencia; mientras que un bronquio de pulmón de cerdo infectado con *H. parasuis*, se observó fluorescencia en la luz del bronquio a un título de 1/90. De la misma manera que la anterior se observó fluorescencia en el tejido. Aún no se conoce de manera específica el lugar donde se establece *H. parasuis* ya que se observó fluorescencia en diversas zonas como son los epitelios del bronquio, alveolos y otra zonas. Dado que los resultados de IFD para detectar *Haemophilus parasuis* en los tejidos infectados fueron satisfactorios podemos establecer que la IFD puede ser útil como técnica de diagnóstico para la enfermedad de Glasser's y esto es debido a las ventajas que ella representa. Cabe señalar que es necesario realizar una estandarización de este método para poder detectar el lugar donde principalmente se muestra la fluorescencia y así poder dar un diagnóstico adecuado en los cerdos.

### Bibliografía.

1.- Mendoza E, Ciprián A. Tercer Ciclo Nacional De Enfermedades Respiratorias Del Cerdo, UNAM, Academia Veterinaria Mexicana, México Fesc, 2001, p. 85, 111, 115, 117.2.-X. Rúbies, P. Kielstein, L1 Costa, P.Riera, Veterinary Microbiology 66: 245-248, 1999.3.-C.E. Hill, D.S. Metcalf and J.J. MacInnes, Veterinary Microbiology, 96: 189-202, 2003.4.-Carol A. Lichtensteiger and Eric R.Vimr, Veterinary Microbiology 93: 79-87, 2003.5.-Oliveira S. Galino L, Piojan C. J.Vet. Diag. Invest, 13(6); 495-501, 2001.

**Agradecimientos:** Por su asistencia técnica al Sr. Gabino Sánchez, Ing. Draucin Jiménez, MVZ David Trujillo

**Apoyo:** Cátedra "Afecciones Bacterianas y Virales del Cerdo" Proyecto PAPIIT IN223203-2