

5201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

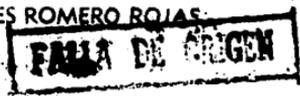
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“DIAGNOSTICO DE Actinobacillus pleuropneumoniae EN CERDOS UTILIZANDO EL METODO DOT-ELISA”

T E S I S
 QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
 P R E S E N T A N :
GABRIELA BARCENAS MORALES
MARIA DEL CARMEN RODRIGUEZ PEREZ
 ASESORES:

M. C. JOSE CAMACHO MACHIN

M. C. ANDRES ROMERO ROJAS





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE .

	Pag.
I. LISTA DE ABREVIATURAS	I
II. INDICE DE TABLAS	II
III. INDICE DE FIGURAS	IV
IV. RESUMEN	VI
1. INTRODUCCION	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Antecedentes	3
1.3. <u>Actinobacillus pleuropneumoniae</u>	4
1.4. Pleuropneumonia contagiosa porcina	7
1.4.1. Morbilidad y mortalidad	8
1.5. Transmisión	8
1.6. Patogenia	9
1.7. Signos clinicos	10
1.8. Control e inmunidad	11
1.9. Diagnóstico de la Pleuropneumonia contagiosa porcina	13

1.10. Dot-ELISA	17
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIALES Y METODOS	23
3.1. Material biológico	23
3.1.1. Cepas	23
3.1.2. Sueros	23
3.2. Medios de cultivo	24
3.3. Reactivos	24
3.4. Pruebas bioquímicas para la identificación del microorganismo	24
3.5. Preparación del antígeno de A. <u>Pleuropneumoniae</u>	26
3.5.1. Bacteria completa	26
3.5.2. Obtención de extracto membranal	27
A) Método de lisado por shock osmótico	27
B) Método de lisado por congelación- descongelación	27
C) Método de lisado por agitación	28

3.6. Adsorción del antígeno en el papel de nitrocelulosa (NC)	29
3.6.1. Por Filtración	29
3.6.2. Por Inmersión	29
3.6.3. Por Gota	30
3.7. Comprobación de la adsorción del antígeno en el papel de NC	30
3.7.1. Azul brillante	30
3.7.2. Negro de amido	31
3.7.3. Rosa de bengala	31
3.8. Bloqueo de los sitios libres del papel de NC con leche descremada al 5%	31
3.9. Ensayo inmunoenzimático (Dot-ELISA)	32
3.9.1. Titulación de los conjugados	32
3.9.2. Reacción con los sueros problemas	33
4. RESULTADOS	38
4.1. Pruebas bioquímicas para la identificación del microorganismo	38

4.2. Preparación del antígeno de	
A. <u>Pleuropneumoniae</u>	38
4.2.1. Bacteria completa	38
4.2.2. Obtención del extracto membranal	38
4.2.3. Separación de las membranas celulares	40
4.2.4. Análisis de la suspensión de membrana celular	40
4.3. Adsorción del antígeno en el papel de NC	40
4.4. Bloqueo de los sitios libres del papel de NC con leche descremada al 5%	46
4.5. Ensayo inmunoenzimático (Dot-ELISA)	46
4.5.1. Titulación de los conjugados	46
4.5.2 Reacción con los sueros problemas	50
5. DISCUSION.	66
6. CONCLUSIONES.	71
7. APENDICE.	72
8. BIBLIOGRAFIA.	75

I. LISTA DE ABREVIATURAS.

A. pleuropneumoniae - Actinobacillus pleuropneumoniae

NAD - Nicotinamida adenin dinucleótido

BHI - Infusión de cerebro y corazón

S. aureus - Staphylococcus aureus

2-ME - 2-Mercaptoetanol

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (enzima ligada a un inmunoabsorbente inerte).

NC - Nitrocelulosa.

rpm - revoluciones por minuto.

PBS - Buffer de fosfatos.

TBS - Solución amortiguadora de trietanolamina.

nm - nanómetros.

ul - microlitros.

ug - microgramos.

Corr - correlación.

b - punto de intersección con el eje de la Y.

m - pendiente.

PCP - pleuropneumonia contagiosa porcina.

AS - Antígeno: bacteria completa crecida en medio sólido.

AL - Antígeno: bacteria completa crecida en medio líquido.

AMC - Antígeno: Membrana celular.

AG - Antígeno.

II. INDICE DE TABLAS

TABLA	Pag.
1. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL <u>A. pleuropneumoniae</u>	5
2. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS A LA CEPA DE <u>A. pleuropneumoniae</u> UTILIZADA EN ESTE TRABAJO	39
3. VALORES DE ABSORBANCIA (Long. onda = 590 nm) OBTENIDOS EN LAS TECNICAS DE LISADO DE LA BACTERIA	41
4. VALORES PARA LA CURVA PATRON DE PROTEINA (Long. onda = 595 nm) CALCULADOS SIGUIENDO LA METODOLOGIA DE BRADFORD, USANDO ALBUMINA SERICA BOVINA COMO PROTEINA PATRON	43
5. CONTENIDO DE PROTEINAS DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES EN CADA pH TRABAJADO (6.5, 7.2 Y 7.9) CALCULADOS USANDO LA METODOLOGIA DE BRADFORD	45
6. RESULTADOS DE LA PRUEBA DOT-ELISA REALIZADA CON LOS SUEROS PROBLEMAS USANDO LOS DISCOS CORRESPONDIENTES A LAS TECNICAS DE ADSORCION (POR FILTRACION, POR INMERSION Y POR GOTA), DE LAS TRES DIFERENTES SUSPENSIONES DE ANTIGENO (AS, AL Y AMC) Y CON EL pH DEL BUFFER = 6.5	54

7. RESULTADOS DE LA PRUEBA DOT-ELISA REALIZADA CON LOS SUEROS PROBLEMAS USANDO LOS DISCOS CORRESPONDIENTES A LOS LOTES CON LOS DIFERENTES pH (6.5, 7.2 Y 7.9) EMPLEANDO LOS TRES TIPOS DE SUSPENSIONES DE ANTIGENO (AS, AL Y AMC) ADSORBIDOS POR GOTA	57
8. NUMERO DE SUEROS CON LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE LOS ANTIGENOS (AS, AL Y AMC) A LOS pH TRABAJADOS (6.5, 7.2 Y 7.9)	60
9. NUMERO DE SUEROS CON LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE LOS pH (6.5, 7.2 Y 7.9) Y CON LOS TIPOS DE ANTIGENOS (AS, AL Y AMC) TRABAJADOS	61
10. ANALISIS DE χ^2 PARA LOS SUEROS PROBADOS CON DOT-ELISA, UTILIZANDO LOS DIFERENTES ANTIGENOS (AS, AL Y AMC) A LOS pH TRABAJADOS (6.5, 7.2 Y 7.9)	62
11. PORCIENTOS DE SUEROS POSITIVOS A <u>A. pleuropneumoniae</u> CON DOT-ELISA A LOS DIFERENTES pH (6.5, 7.2 Y 7.9) CON LOS TRES TIPOS DE SUSPENSIONES DE ANTIGENOS (AS, AL Y AMC) ADSORBIDOS POR GOTA	64
12. PORCIENTOS DE SUEROS POSITIVOS A <u>A. pleuropneumoniae</u> CON DOT-ELISA A LOS DIFERENTES pH (6.5, 7.2 Y 7.9) CON LOS TRES TIPOS DE SUSPENSIONES DE ANTIGENO (AS, AL Y AMC) ADSORBIDOS POR GOTA Y CON LA PRUEBA DE AGLUTINACION 2-ME	65

III. INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pag.
1. TECNICA DOT-ELISA	34
2. TECNICAS DE LISADO BACTERIANO	42
3. CURVA PATRON DE PROTEINAS	44
4. RESULTADOS DE LAS TINCIONES CON AZUL BRILLANTE, NEGRO DE AMIDO Y ROSA DE BENGALA, DE LAS TRES TECNICAS DE ADSORCION DE ANTIGENO EN EL PAPEL DE NC (POR FILTRACION, POR INMERSION Y POR GO- TA), UTILIZANDO MUESTRAS DE LOS LOTES DE DIS- COS CORRESPONDIENTES AL pH=6.5 Y CON LAS TRES FORMAS DE ANTIGENO TRABAJADOS (AS, AL Y AMC)	47
5. RESULTADOS DEL BLOQUEO CON LECHE DESCREMADA DE LOS DISCOS EN LAS TECNICAS DE ADSORCION DEL ANTIGENO (POR FILTRACION, POR INMERSION Y POR GOTA), CORRESPONDIENTES A LOS pH=6.5, 7.2 Y 7.9	48
6. TITULACION DE LOS SUEROS ANTICONEJO PEROXI- DADO Y ANTICERDO PEROXIDADO	49

7. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS BLANCOS CONSIDERADOS DURANTE LA REALIZACION DE LA TECNICA DOT-ELISA. DONDE LOS DISCOS PERTENECEN AL LOTE DEL ANTIGENO DE BACTERIA - COMPLETA CRECIDA EN MEDIO SOLIDO. ADSORBIDO POR GOTTA Y A pH = 6.5 51
8. RESULTADOS DE LOS DISCOS (POR AMBOS LADOS) CORRESPONDIENTES A LOS LOTES DE LAS TECNICAS DE ADSORCION (POR FILTRACION, POR INMERSION Y POR GOTTA), DE LAS TRES DIFERENTES SUSPENSIONES DE ANTIGENO (AS, AL Y AMC) A pH-6.5. OBTENIDOS POR EL ENFRENTAMIENTO DE TRES SUEROS PORCINOS NEGATIVOS Y POSITIVOS A A. pleuropneumoniae (PROBADOS PREVIAMENTE CON LA TECNICA DE AGLUTINACION CON 2-MERCAPTOETANOL) 52

IV. RESUMEN

La porcicultura nacional es una de las industrias más importantes del país. sin embargo son grandes las pérdidas que representan las enfermedades neumónicas del cerdo que están disminuyendo el inventario nacional hasta en un 30% de su población; entre los agentes etiológicos causantes de neumonia destaca el Actinobacillus pleuropneumoniae. Las pruebas serológicas constituyen una herramienta valiosa en el manejo del problema infeccioso en las granjas, pues permiten detectar a los animales enfermos crónica y subclínicamente. Esto permite eliminar a las posibles fuentes de infección, para los animales sanos, pero es claro que las pruebas disponibles hasta ahora no reúnen los requisitos necesarios para un control seroepizootiológico confiable y deben desarrollarse pruebas de sencilla realización y alta sensibilidad sin que se altere la especificidad.

En este trabajo se realizó la estandarización de la prueba Dot-ELISA para la detección de anticuerpos contra Actinobacillus pleuropneumoniae, empleando diferentes tipos de antígenos y condiciones de pH, así como diferentes técnicas de adsorción de las suspensiones de antígeno. Los resultados mostraron diferencias en cuanto a los resultados del ensayo de Dot-ELISA entre las técnicas de adsorción siendo la más adecuada por Gota, también existieron variaciones significativas con el antígeno AL (Antígeno: bacteria completa crecida en medio líquido) a pH 6.5 y 7.9 que presentaron porcentos de detección de sueros positivos

bajos, con este mismo antígeno a pH 7.2 el porcentaje de detección de sueros positivos fué elevado pero se obtuvieron variaciones significativas, lo mismo sucedió con el antígeno AS (Antígeno: bacteria completa crecida en medio sólido) a pH 6.5. Mientras que los porcentajes de detección de sueros positivos que tienen un valor intermedio y que presentaron variaciones poco significativas correspondieron a las condiciones siguientes: antígeno AMC (Antígeno: membrana celular) a pH 6.5 y a pH 7.9, antígeno AS a pH 7.2 y a pH 7.9. Con respecto al antígeno AMC a pH 7.2 presentó un porcentaje de detección de sueros positivos elevado y no se observaron variaciones significativas en los resultados. Comparando los resultados positivos obtenidos con las pruebas Dot-ELISA y Aglutinación con 2-ME se obtuvo el 100% de detección de sueros positivos con 2-ME probados previamente, lo que sugirió que estas condiciones son las más adecuadas para la realización de la prueba Dot-ELISA para la detección de anticuerpos contra A. pleuropneumoniae. Se detectaron 3 sueros que presentaron ser negativos para la prueba de Aglutinación con 2-ME pero positivos para la prueba Dot-ELISA con la mayoría de los antígenos y pH trabajados esto sugirió que realmente estos sueros son positivos pero no fueron detectados con la prueba de aglutinación con 2-ME debido a la sensibilidad más baja que presenta.

1. INTRODUCCION.

1.1. Generalidades.

Las limitaciones en la producción animal están en parte, asociadas a las enfermedades infecciosas. Consecuentemente en las últimas décadas el crecimiento de la población mundial, no ha venido respaldado por un crecimiento similar en la producción de alimentos, especialmente en la producción de carne y leche (5).

En las granjas porcinas la producción animal está regularmente afectada por las enfermedades infecciosas, encontrando principalmente dos tipos de afecciones: entéricas y respiratorias. En los países de América y Europa entre las causas de morbilidad y mortalidad en el ganado porcino se encuentran las respiratorias, que se han reconocido como un factor importante en la producción porcina intensiva (21, 42, 60).

En los últimos años, la atención sobre problemas respiratorios en cerdos ha sido enfocada a las neumonías, que aunque de etiología variable se atribuyen principalmente a bacterias de los generos Pasteurella, Bordetella y Actinobacillus, sin que se reste importancia a Micoplasmas, virus o interacciones entre estos (25, 82).

La neumonía en el cerdo representa uno de los más graves problemas infecciosos de esta especie animal. Típicamente entre el 30-60% de los cerdos de abasto presentan alguna lesión neumónica (41).

El costo de esta enfermedad para la industria porcina es enorme, debido al carácter crónico que usualmente presenta, lo que ocasiona importantes pérdidas por deficientes ganancias de peso y retraso de crecimiento. Recientemente se ha calculado que, por cada 10% de tejido pulmonar afectado, el cerdo sufre un retraso de crecimiento (medido por su ganancia media diaria) del 5%, aunque esto parece ser más cierto cuando la lesión es del 15% o más de extensión (80). Anexando a las pérdidas económicas asociadas a la muerte de animales, los elevados gastos de medicamentos, se le ha considerado como la principal causa de disminución de la productividad, especialmente en cerdos de engorda (29, 30, 81).

En México, las neumonías representan grandes pérdidas económicas para la porcicultura. Estudios realizados en distintos estados de la República Mexicana revelaron que un 50% de los cerdos sacrificados en rastro presentaban lesión pulmonar (32), tan solo en el rastro de Ferrería en la ciudad de México, en 1978 el 10% a 12% de los animales sacrificados presentaban neumonía y para 1986 la cifra aumentó al 28.2% (34, 44, 57).

1.2. Antecedentes.

El microorganismo causante, aislado de pulmones neumónicos de cerdos y capaz de reproducir la enfermedad fué denominado inicialmente Haemophilus parahemolyticus (Olander, 1963), debido a sus características bioquímicas, como el requerimiento del factor V (NAD=Nicotinaminadenosin dinucleótido) y la producción de una marcada hemólisis en agar sangre, este primer reporte fué realizado en California, E.U. (58). Ese mismo año, Shope investigó en Argentina un brote de pleuropneumonia de tipo agudo en cerdos y se denominó Haemophilus pleuropneumoniae. Después de una serie de estudios realizados a las bacterias mencionadas anteriormente, se concluyó que se trataba de la misma bacteria (64, 78).

Actualmente se ha sugerido que se reclasifique la bacteria y se le coloque dentro del género Actinobacillus. Esta última proposición se basa en el hecho de que tanto las biovariedades factor V dependientes (biovar 1) como las biovariedades factor V independientes (biovar 2) de Haemophilus pleuropneumoniae, presentan una mayor similitud fenotípica y un mayor porcentaje de hibridación de DNA con Actinobacillus lignieressi que con Haemophilus influenzae. Así mismo los patrones de movilidad electroforética de las proteínas de membrana externa que presenta H. pleuropneumoniae guardan una mayor similitud con los presentados por algunas especies del género Actinobacillus como A. suis, A. equilli, A. lignieressi y con Pasteurella haemolytica.

que con los patrones observados para H. influenzae y H. parvus. Debido a esto la clasificación actual de este microorganismo es: Actinobacillus pleuropneumoniae (65, 75).

1.3. Actinobacillus pleuropneumoniae.

A. pleuropneumoniae es una bacteria pleomórfica que se observa generalmente como bacilo corto gram negativo, encapsulado de aproximadamente 0.5 a 1.5 um, de largo por 0.3 um de diámetro, inmóvil, no esporulado, aerobio y anaerobio facultativo, y crece en medios enriquecidos que contienen factor V (NAD), pero no requiere el factor X (Hemina) (7, 31). Por lo tanto, el hecho de que Staphylococcus aureus, libere al medio el factor V, permite que el A. pleuropneumoniae se pueda desarrollar en la proximidad de las colonias de éste, dicho fenómeno se conoce como satelitismo (7,31).

Las características bioquímicas de este microorganismo se muestra en el Tabla 1 (7, 31, 65).

Nicolet (1971), utilizó pruebas de aglutinación y la prueba de Quellung (hinchamiento de cápsula), para definir tres serotipos de A. pleuropneumoniae, basándose en los antígenos tipo-específicos asociados a la cápsula. Posteriormente Gunnarsson et al (1978), amplió a cuatro y cinco serotipos. Nielsen y Rosendal propusieron la existencia de los serotipos 6 y 7 respectivamente (50, 72). En la actualidad se reconoce

TABLA 1. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL A. pleuropneumoniae.

Factor U	+
Factor X	-
Catalasa	d
Nitratos	+
Oxidasa	d
Urea	+
Indol	-
Citratos	-
Voges-Proskauer	-
Reajo de metilo	-
Hemolis beta	+
Lactosa	-
Ribosa	-
Xilosa	+
Arabinosa	-
Inositol	-
Dextrosa	+
Fruetosa	+
Maltosa	l
Manitol	l
Fosfatasa alcalina	+

(7, 31)

Factor U = MHD
 Factor X = Hemina
 Ligero = l
 Duboso = d

mundialmente la existencia de 9 serotipos, aunque Nielsen (54) en reportes recientes dice haber encontrado los serotipos 10, 11 y 12 (52, 55).

Por lo general los antígenos que proporcionan la especificidad de tipo en las bacterias se encuentran localizados en la superficie de éstas. Para A. pleuropneumoniae se consideró que debido a que la especificidad de tipo puede conservarse en la fase acuosa de una extracción agua-fenol, es probable que los antígenos tipo-específicos sean polisacáridos y/o lipopolisacáridos. Esto parece reafirmarse con la posibilidad del uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación, dado que se sabe que la mayoría de los casos los antígenos o principios activos que sensibilizan eritrocitos son polisacáridos (16).

Se han observado reacciones serológicas cruzadas in vitro, entre los diversos serotipos de A. pleuropneumoniae, lo cual es probablemente debido a que posee más de un componente antigénico tipo-específico. De esta manera, la expresión variable de estos antígenos ha permitido observar, por ejemplo: reacciones cruzadas entre los serotipos 6 y 8 en pruebas de inhibición de la hemaglutinación; entre los serotipos 3 y 8 en pruebas de inmunodifusión doble (24, 51); de serotipos 4 y 5 con el 6 en pruebas de inmunofluorescencia (72). Con esta última prueba se encontró cruzamientos serológicos del serotipo 4 con el 5 y el 7; y del serotipo 2 con el 6 (67, 68).

mundialmente la existencia de 9 serotipos, aunque Nielsen (54) en reportes recientes dice haber encontrado los serotipos 10, 11 y 12 (52, 55).

Por lo general los antígenos que proporcionan la especificidad de tipo en las bacterias se encuentran localizados en la superficie de éstas. Para A. pleuropneumoniae se consideró que debido a que la especificidad de tipo puede conservarse en la fase acuosa de una extracción agua-fenol, es probable que los antígenos tipo-específicos sean polisacáridos y/o lipopolisacáridos. Esto parece reafirmarse con la posibilidad del uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación, dado que se sabe que la mayoría de los casos los antígenos o principios activos que sensibilizan eritrocitos son polisacáridos (16).

Se han observado reacciones serológicas cruzadas in vitro, entre los diversos serotipos de A. pleuropneumoniae, lo cual es probablemente debido a que posee más de un componente antigénico tipo-específico. De esta manera, la expresión variable de estos antígenos ha permitido observar, por ejemplo: reacciones cruzadas entre los serotipos 6 y 8 en pruebas de inhibición de la hemaglutinación; entre los serotipos 3 y 8 en pruebas de inmunodifusión doble (24, 51); de serotipos 4 y 5 con el 6 en pruebas de inmunofluorescencia (72). Con esta última prueba se encontró cruzamientos serológicos del serotipo 4 con el 5 y el 7; y del serotipo 2 con el 6 (67, 68).

1.4. Pleuropneumonia contagiosa porcina.

El Actinobacillus pleuropneumoniae es el agente etiológico de la pleuropneumonia contagiosa porcina la cual es una enfermedad importante que produce un impacto económico significativo, teniendo como características en su forma crónica, la disminución de peso, y una baja conversión alimenticia, lo que provoca mayor costo para el porcicultor los animales que se mantienen vivos que los que mueren por la forma aguda (18,23).

Entre los factores que predisponen a los problemas respiratorios se encuentran cambios bruscos de temperatura, malas condiciones de higiene, estres debido al manejo y adquisición de nuevos animales; uno de los factores más importante es la densidad de la población animal (23, 76). Otros estudios muestran que el manejo y el ambiente juegan un papel importante en la incidencia y gravedad de neumonias (4, 23, 83).

Esta enfermedad está ampliamente distribuida en el mundo (8, 43, 49, 58, 77). en México el primer aislamiento reportado fué un brote en Tlaxcala (32,44) y posteriormente en los importantes estados porcicultores de la zona del Bajío. El serotipo 1 se ha encontrado en Argentina, Holanda y Australia; el serotipo 2 en Suiza, Dinamarca, Suecia y Japón; el serotipo 3 en Suiza, Suecia e Inglaterra; el serotipo 4 en los Estados Unidos, Suecia, Suiza y Francia; y, el serotipo 5 en los Estados Unidos, Canadá, Tai-wan, Finlanda, Holanda y Bélgica (25). En México, ha sido aislado el serotipo 1 (34).

1.4.1. Morbilidad y mortalidad.

En los brotes mexicanos la evaluación de la morbilidad, se ha caracterizado por los siguientes hechos:

- a) Varía según la edad de los animales.
- b) La mayoría de los brotes detectados ha sido en animales de 30 a 50 Kg. de peso.
- c) Puede alcanzar en el lote afectado hasta el 80%, en tanto que la mortalidad, aún en presencia de tratamiento puede ser hasta del 35%.
- d) Ocasionalmente se difunde a animales adultos (3, 32, 76).

1.5. Transmisión.

La transmisión de A. pleuropneumoniae se lleva a cabo principalmente por contacto directo de cerdo a cerdo a través de aerosoles, esta forma de transmisión se intensifica cuando:

- a) Se utilizan corrales o jaulas que permiten el contacto.
- b) Se mezclan constantemente animales de diferentes grupos (76).

Los brotes se presentan súbitamente y se detectan por la muerte de algunos cerdos en la granja ó piara.

1.6. Patogenia.

Se sugiere que la enfermedad se presenta cuando el microorganismo escapa de los mecanismos de defensa del tracto respiratorio superior y llega a nivel alveolar en donde, dependiendo de la habilidad del A. pleuropneumoniae podrá establecerse y multiplicarse por su virulencia asociada a uno o a varios factores que parecen ser, la presencia de cápsula, endotoxinas y/o exotoxinas, y de la falta de una respuesta inmune adecuada por parte del hospedero (26). Se ha probado experimentalmente que el sobrenadante del medio de cultivo libre de bacterias puede inducir neumonia localizada microscópicamente, similar a la causada en cerdos infectados (3).

El A. pleuropneumoniae resulta citotóxico para los macrófagos alveolares del cerdo y células mononucleares de sangre periférica. La toxina de esta bacteria es estable a altas temperaturas (100 C/15 min), y puede ser neutralizada con sueros de cerdos con infección crónica; se encuentra en la pared celular bacteriana y puede producir trombosis vascular y exudación de flujo edematoso y hemorrágico, sin embargo el hecho de que las bacterinas que confieren mayor protección son las que tienen cápsula y no toxoide demuestra que la toxina no es el único factor de patogenia involucrado (73).

Estudios realizados recientemente, propusieron que parte del daño sufrido en el tejido pulmonar puede deberse a la liberación

de enzimas y sustancias tóxicas a partir de neutrófilos que aparecen en la zona afectada en las primeras horas de la infección por A. pleuropneumoniae.

Aquellas células de A. pleuropneumoniae que son ingeridas por los fagocitos no son muertas y siguen reproduciéndose internamente hasta causar la muerte inicialmente al fagocito y posteriormente al hospedero (27).

En general, se considera que la cápsula bacteriana puede facilitar la colonización y conferir cierta protección al microorganismo contra factores inmunológicos del huésped, como son el complemento y los anticuerpos (69).

1.7. Signos clínicos.

La manifestación más aparente de esta enfermedad es la muerte repentina de los animales y la presencia de hemorragia nasal, debidas al proceso inflamatorio del parénquima pulmonar. Esta enfermedad puede tomar dos formas: Aguda y Sobreaguda. En la forma aguda puede observarse anorexia, disnea con respiración diafragmática rápida, cianosis en orejas y extremidades, vómito ocasional, inmovilidad y muerte con hemorragia nasal en uno a cuatro días, o bien, recuperación espontánea. En la forma sobreaguda la manifestación más marcada es la muerte súbita de los animales y la presencia de hemorragia nasal, poco antes de eso se logran detectar signos en el animal como una elevación de

temperatura (41°C a 43°C), cianosis en piel, abdomen y oreja, hemorragia y espuma nasal, chillidos agudos, y muerte (44, 66).

Las lesiones a nivel patológico ocasionadas por la PCP pueden ser observadas tanto a nivel macroscópico como microscópico. Las lesiones macroscópicas comprenden pericarditis, hidropericardio, hidrotórax de líquido sanguinolento, hemorragias en miocardio, adherencias pleurales, infartos en lóbulos pulmonares diafragmáticos y friabilidad en la zona infartada. Las lesiones microscópicas indican zonas de infarto, edema vascular, infiltración peribronquial y perivascular de células mononucleares (linfocitos y macrófagos) y hemorragias en alveolos (76, 82).

1.8. Control e inmunidad.

Para el control y la prevención de la PCP deben tomarse en cuenta varios factores, entre ellos la inmunidad de la granja.

Se ha observado que los animales que sobreviven después de un brote natural por A. pleuropneumoniae, desarrollan inmunidad especie-específica ante el microorganismo y adquieren resistencia a la enfermedad. De esta forma la granja adquiere cierto grado de inmunidad de población.

Las cerdas que han sido expuestas a este microorganismos, proporcionan a sus lechones inmunidad pasiva que los mantiene

protegidos durante las primeras 3 a 4 semanas de vida. Debido a esto, se pueden observar brotes en grupos de lechones de entre 3 a 6 semanas de edad. Quizás es en la unidad de engorda en donde se presentan con más frecuencia los brotes agudos, debido al mezclado de animales no inmunes con animales infectados crónicamente que actúan como portadores. A este nivel es difícil el establecimiento de inmunidad del grupo debido principalmente al continuo movimiento de cerdos con introducción de nuevos animales (62, 63).

El serodiagnóstico proporciona la manera más fácil de localizar a los animales crónicamente enfermos; la exclusión de tales animales portadores, con la introducción de animales seronegativos que se sometan a cuarentena y a los cuales se les realice un par de pruebas serológicas con intervalos de aproximadamente tres semanas, puede resultar un factor de control importante (53).

La vacunación que se ofrece hoy en día previene la mortalidad pero no evita la aparición de la forma crónica de la enfermedad ni de portadores sanos. La enfermedad se convierte en un problema difícil de controlar aunque, las combinaciones de ampicilina y penicilina han sido eficaces en la mayoría de los brotes tratados, esto es sólo al inicio, ya que posteriormente su efectividad decrece (76).

El uso de bacterinas que contienen además de la bacteria involucrada, lipopolisacárido de alguna enterobacteria como

Escherichia coli (cepa J-5) han mostrado prevenir o disminuir la mortalidad en buen grado. Cabe mencionar que una vacunación con bacterinas hechas a base exclusivamente de la cepa de la región con revacunaciones frecuentes podría dar resultados satisfactorios (9, 10, 11, 12, 13).

La introducción de inmunógenos a base de fracciones (cápsula, endotoxinas o exotoxinas) acompañados de adyuvantes emulsionados (aceite en agua), podrán en un futuro proporcionar mejores resultados en la prevención de la enfermedad (22, 69).

Por otra parte, el manejo en la granja es de suma importancia para el control de la neumonía: 1) Evitando áreas o unidades con sobrepoblación, 2) Disminuyendo el mezclado de animales con los de otras granjas y 3) Tratando de implementar un método controlado de movimiento de animales. El uso de bardas de concreto sólidas, que no permitan un contacto directo entre animales de corrales vecinos, y un ambiente con higiene, temperatura y humedad adecuados en la explotación, coadyubará a mejorar el control de las neumonías (62, 63).

1.9. Diagnóstico de la Pleuropneumonia contagiosa porcina.

El diagnóstico presuntivo de la PCP puede darse con base en los signos observados en la forma aguda, más las lesiones encontradas en el examen posmortem, la confirmación del diagnóstico resulta del aislamiento de microorganismo causante (48). En el

examen posmortem las lesiones pulmonares descritas anteriormente, junto con la pleuritis, resultan sumamente características, casi patognomónicas. Sin embargo, una eficaz detección e identificación del agente etiológico en la infección puede ser de gran valor en el diagnóstico y tratamiento rápido y efectivo de la enfermedad. Como tanto que los portadores como los enfermos crónicos son de importancia para la prevalencia de la PCP, el diagnóstico de laboratorio es el procedimiento más confiable para el control de esta afección (29, 48, 74, 79).

En el laboratorio el aislamiento y la caracterización del A. pleuropneumoniae, es necesario para excluir a cualquier otro agente como probable causa de neumonía. El aislamiento primario a partir del exudado bronquial, nasal y en particular de las lesiones neumónicas, se realiza eficientemente por el método de diluciones en líquido, reportado por Pijoan et.al. (61), posteriormente se siembra en agar sangre a 5%, inoculando por estriado continuo y colocando sobre éste una estria de S. aureus como cepa nodriza. El aislamiento debe mostrar colonias pequeñas cercanas a la estria de la cepa nodriza, las cuales deben presentar hemólisis beta y de esta forma prevé un diagnóstico indicativo rápido.

La identificación bacteriológica total se realiza mediante las pruebas bioquímicas resumidas en la Tabla 1 mostrada anteriormente (7, 31).

Las pruebas serológicas que permiten detectar a la bacteria

a partir de los exudados y homogenados de pulmón son las siguientes: inmunofluorescencia directa e indirecta (15, 67, 71), aglutinación en placa (35, 39, 45, 67), aglutinación lenta en tubo (14, 35, 76), precipitación en tubo capilar (35, 45), inmunodifusión (15, 71), hemoaglutinación indirecta (51) y por coaglutinación (36, 38).

Durante las infecciones naturales o experimentales la respuesta humoral y celular inmunes son estimuladas al parecer por la presencia del lipopolisacárido y el polisacárido capsular de A. pleuropneumoniae (12). los anticuerpos circulantes pueden ser detectados alrededor de una semana después de la exposición al agente. Estos anticuerpos son demostrables con las pruebas de fijación de complemento (30, 46, 59), aglutinación lenta en tubo y aglutinación con 2-mercaptoetanol (35, 37) y por la prueba de ELISA (47).

Los niveles de anticuerpos son máximos en 3 y 4 semanas después de la infección y persisten por varios meses, pero desaparecen después de la total resolución de las lesiones.

Las pruebas serológicas constituyen una herramienta valiosa en el manejo del problema infeccioso en la granja, pues permiten detectar a los animales enfermos crónica y subclínicamente. Esto permite eliminar a las posibles fuentes de infección, para los animales sanos. De la misma manera se puede evitar la introducción de ciertos portadores a granjas libres de la enfermedad, reduciendo la probabilidad de que se presenten los brotes agudos en animales sin inmunidad previa.

Las pruebas que se han utilizado con relativa eficiencia para el control epizootiológico de la enfermedad son la fijación de complemento y la aglutinación con 2-mercaptoetanol (37,74), por su realización más fácil y barata que las pruebas de ELISA. Sin embargo, estas pruebas no son tan sensibles y algunos portadores pueden pasar inadvertidos, así como problemas de especificidad sobre todo con cerdos adultos.

Otros reportes han indicado que las pruebas Fijación de complemento y Aglutinación en placa pueden dar resultados falsos-positivos o reacción cruzada con serotipos de A. pleuropneumoniae y otras especies de Haemophilus (68).

En el caso de la Fijación de complemento existe un problema adicional, la actividad procomplementaria del suero porcino ocasiona el requerimiento de suero fresco de ternera para la prueba y la actividad anticomplementaria presente también interfiere frecuentemente en la evaluación e interpretación de la prueba (37). Los títulos presentados por la prueba de Fijación de complemento no parecen correlacionar bien con la verdadera inmunidad del animal, pues aún en animales que presentan un bajo título de anticuerpos, posterior a una exposición bajo condiciones experimentales, se presenta protección ante el reto con bacterias de serotipo homólogo (67).

Una ventaja de la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación indirecta es que los anticuerpos que producen los cerdos por la vacunación no se detectan por esta prueba, pero

si los anticuerpos que aparecen como resultado de una infección (56).

Es claro que las pruebas disponibles hasta ahora no reúnen los requisitos necesarios para un control seroepizootiológico confiable y deben desarrollarse pruebas de sencilla realización y alta sensibilidad sin que se altere la especificidad.

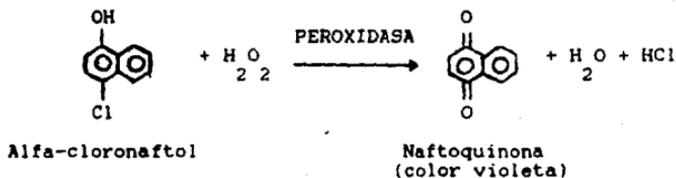
1.10. Dot-ELISA.

El análisis inmunoenzimático (AIE) recientemente descrito en el campo biomédico, parece tener un gran potencial para ser utilizado a gran escala en la patología clínica veterinaria. Actualmente existen dos tipos de este análisis: a) el AIE heterogéneo, donde el antígeno o el anticuerpo conjugado con la enzima es separado del complejo enzima-antígeno-anticuerpo, antes de medir la actividad enzimática, y b) el AIE homogéneo, en el cual la actividad enzimática del antígeno marcado es medida de presencia del complejo antígeno-anticuerpo. En ambos casos es posible medir antígenos o anticuerpos y el procedimiento y lectura se pueden realizar sin equipo especializado, o bien puede llevarse a una completa automatización.

El análisis de la enzima ligada a un inmuoabsorbente inerte (ELISA) o "Enzyme Linked Immunosorbent Assay", corresponde a un AIE heterogéneo. O sea que el antígeno o el anticuerpo primero se fija a un soporte inerte y luego se hace reaccionar con el

antígeno o anticuerpo correspondiente, que estará marcado con una enzima (conjugado); se lava el conjugado que no reaccionó y se mide la capacidad de hidrólisis de la enzima sobre su correspondiente sustrato. Generalmente se determina el grado de transformación de un sustrato incoloro a un producto coloreado, el cual se puede observar a simple vista o medirse en un espectrofotómetro (20).

Uno de los métodos más usuales de las técnicas de ELISA es el indirecto, donde el antígeno es fijado o inmovilizado en un soporte de fase sólida, se incuba con el suero que contiene el anticuerpo, se lava y se añade el conjugado, que consiste en anti-inmunoglobulina conjugada con la enzima, de tal manera que reaccione contra el anticuerpo del complejo antígeno anticuerpo primario; se lava y se adiciona el sustrato; la cantidad de conjugado que se unió al primer anticuerpo se mide por la cantidad de sustrato degradado, llevándose a cabo la siguiente reacción:



Grado de hidrólisis = Cantidad de anticuerpo presente en la muestra.

(40).

El ensayo de ELISA fué introducido como un método muy sensitivo para el trabajo diagnóstico de muchas enfermedades en bacteriología, virología y parasitología. En el cual la ELISA también fué estudiada para el serodiagnóstico de infecciones de Actinobacillus en cerdos (17). El método de ELISA proporciona mejores resultados de serotipificación-especificidad en comparación con el método de Fijación de complemento (19). Así, la ELISA marca la posible diferenciación entre infecciones causadas por los diferentes serotipos de A. pleuropneumoniae. Por lo tanto, para dicho diagnóstico la ELISA es una alternativa muy buena que se atribuye a su sensibilidad y especificidad (17). Sin embargo, ésta tiene sus propias limitaciones: requiere un sofisticado equipo para su realización, relativamente una gran cantidad de antígeno purificado y la adsorción pasiva de algunos antígenos en poliestireno puede ser variable. Así como también, inconveniencias en el manufacturamiento en las placas microtituladoras de poliestireno puede resultar dentro y fuera del laboratorio variaciones en el ensayo.

Una alternativa de la fase sólida para la técnica ELISA es el papel de Nitrocelulosa (NC), el cual tienen características de adsorción superior a otros soportes tales como el vidrio y poliestireno. Originalmente la NC se reportó en técnicas de inmunotransferencia (immunoblotting) cuantitativas, el papel NC ha sido subsecuentemente usado en la técnica ELISA para la detección y análisis de una variedad de proteínas, incluyendo inmunoglobulinas aplicadas en pequeñas cantidades (puntos). Recientemente, el

papel de NC es usado en una variedad de formas y tamaños para la detección inmunológica de algunos patógenos humanos y sus antígenos; por esta razón en la técnica Dot se usa para la detección de diversos antígenos usando como reactivos anticuerpos marcados con enzimas (Dot-ELISA) (1).

En un estudio de la técnica Dot-ELISA para la detección de anticuerpos del virus Pseudorabies en suero porcino, se reporta que la sensibilidad y la especificidad de esta técnica fueron de magnitud similar, 98.8% y 98.3% respectivamente, las cuales resultaron aproximadamente 1% más bajas que la técnica ELISA (1, 85).

La técnica Dot-ELISA cuenta con algunas ventajas entre ellas tenemos que no requiere un equipo sofisticado, ni gran entrenamiento técnico de personal, puede ser desempeñada en 4-5 horas por personas con poca experiencia previa, y los reactivos son bastante estables; pruebas que investigaron la estabilidad del antígeno seco en tiras, indicaron su resistencia a la distribución por correo en climas tropicales y pudieron mantenerlo a 4 °C por un razonable periodo antes de su uso. Por todo lo mencionado anteriormente del antígeno, la elaboración de una prueba apropiada para la detección de anticuerpos contra A. pleuropneumoniae ayudaría ampliamente a controlar la enfermedad causada por dicha bacteria presentando una alta aplicación como una rápida y fácil prueba de campo en el diagnóstico de esta enfermedad (1, 20).

2. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

Estandarización de la prueba de Dot-ELISA para la detección de anticuerpos en suero contra Actinobacillus pleuropneumoniae, agente causante de la pleuropneumonía contagiosa porcina, con el fin de establecerla como un método de diagnóstico rápido y de fácil desarrollo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Comparar las técnicas de lisado: método de Shock Osmótico, Congelación-Descongelación y Agitación, para elegir aquella que presente un grado de lisis mayor.
- Comparar las técnicas de adsorción: por Filtración, por Inmersión y por Gota del antígeno al papel de Nitrocelulosa, analizando sus ventajas y desventajas.

- Obtener el tipo de antígeno que presente mayor afinidad por los anticuerpos contra Actinobacillus pleuropneumoniae presentes en los sueros problemas.

- Determinar el pH adecuado para favorecer la reacción antígeno-anticuerpo.

- Analizar los resultados obtenidos en la técnica Dot-ELISA con respecto a la prueba de aglutinación con 2-Mercaptoetanol.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

3.1.1. CEPAS.

La cepa de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1 (3193) y la cepa Cowan de Staphylococcus aureus utilizada para la prueba de satelitismo fueron proporcionadas por el Profr. José Tomás Hernández Méndez de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

3.1.2. SUEROS.

Los sueros porcinos positivos y negativos a A. pleuropneumoniae con la técnica de Aglutinación con 2-Mercaptoetanol fueron donados por la Q.F.B. Lourdes Ontiveros Corpus y el Q.F.B. Victor Manuel Tenorio del Instituto Nacional de Investigación Agropecuarias y Forestales Palo Alto. Los sueros de conejo positivo y negativo a A. pleuropneumoniae fueron proporcionados por el M. en C. Andrés Romero Rojas de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo utilizados fueron de tipo convencional con excepción del BHI complementado (Ver apéndice).

3.3. REACTIVOS.

Todos los reactivos empleados para la elaboración de este trabajo fueron de marca Baker, Merck y Sigma de grado reactivo, y los medios de cultivo fueron marca Bioxon. Los conjugados (antisuero anticonejo peroxidado y antisuero anticierdo peroxidado) fueron donados por los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios, NVSL; Unidad de Reactivos Virales, Ames, Iowa, E.U.).

3.4. PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO.

A) Tinción de Gram (7, 31).

B) Reacción de CAMP.

Es la capacidad para mejorar la hemólisis producida por una toxina del S. aureus (cepa nodriza). Se realizó haciendo una inoculación a lo largo de toda una placa de agar sangre colocando posteriormente un inóculo de la cepa nodriza en forma

perpendicular al estriado de la bacteria examinada. Una prueba CAMP (+) fué aquella que mostró una hemólisis completa en la zona de las colonias cercanas a la cepa nodriza.

C) Prueba de Ureasa.

Se inculó un tubo con agar urea de Christensen sin NAD con un cultivo de la bacteria crecida 18 hrs. en agar BHI complementado. Se cosechó la bacteria con NaCl 0.15 M, lavando por centrifugación dos veces 15 min. a 4000 rpm. Una o dos gotas de la suspensión gruesa obtenida se colocaron en los tubos de urea; la obtención de un color rojo o rosado indicó ureasa positiva.

D) Prueba de Satelitismo.

Se realizó haciendo una inoculación a lo largo de toda una placa de agar BHI colocando posteriormente un inóculo de la cepa nodriza en forma perpendicular al estriado de la bacteria examinada. Una reacción positiva fué cuando el A. pleuropneumoniae creció en la periferia de la cepa nodriza.

E) Hidrólisis de Carbohidratos.

Se inocularon tubos conteniendo 0.5 ml. de caldo base rojo de fenol, 1% del azúcar a probar y 10 ug./ml. de NAD con un cultivo de A. pleuropneumoniae de 18-24 hrs. de crecimiento. El cambio de coloración en el medio de rojo a amarillo indicó una prueba positiva al carbohidrato que contenía ese tubo (7, 31).

3.5. PREPARACION DEL ANTIGENO DE A. pleuropneumoniae.

Se utilizó la cepa de A. pleuropneumoniae serotipo 1 en las siguientes formas:

3.5.1. Bacteria completa.

A) Medio agar BHI complementado.

Se sembró la bacteria a lo largo de toda la placa de agar BHI complementado en forma masiva, dejándolo incubar a 37 °C. Posteriormente se cosechó con buffer de fosfatos (PBS) estéril a los pH correspondientes: 6.5, 7.2 y 7.9 (Ver apéndice). Se realizaron dos lavados de la siguiente manera: se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos, el paquete bacteriano obtenido se resuspendió en PBS estéril al pH correspondiente, se centrifugó nuevamente resuspendiendo el paquete en PBS al pH trabajado. La suspensión bacteriana obtenida se ajustó a un valor de absorbancia de 1.5 a 590 nm (70).

B) Medio líquido BHI complementado.

Se cosechó el crecimiento de A. pleuropneumoniae de una placa de BHI complementado como se explicó en el inciso A, con 10 ml de este cosechado se inocularon 250 ml de caldo BHI complementado. Se dejó incubar 18 hrs a 37 °C en agitación. El crecimiento bacteriano se lavó y se ajustó de la misma forma que en el inciso A.

3.5.2. Obtención del extracto membranal.

Se siguió la metodología descrita en 3.5.1. inciso A. Con la suspensión bacteriana obtenida se realizaron las siguientes técnicas de lisado de la bacteria:

A) Método de lisado por shock osmótico.

La suspensión bacteriana se lavó una vez con PBS pH 7.2 estéril, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el paquete en agua desionizada estéril, se agitó en vortex 10 minutos, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, se guardó el sobrenadante (residuo de células), se resuspendió el paquete en 10 ml de PBS pH 7.2 estéril y se leyó absorbancia a 590 nm. Nuevamente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, descartando el sobrenadante y al paquete se le repitió el mismo procedimiento a partir del momento en que se agregó el agua desionizada estéril, hasta que el valor de la absorbancia permaneció constante (70).

B) Método de lisado por congelación-descongelación.

La suspensión bacteriana se lavó una vez con PBS pH 7.2 estéril, se resuspendió el paquete en 10 ml de PBS estéril, se congeló a -56°C durante 30 minutos, después se descongeló rápidamente llevándolo a 37°C , centrifugando la suspensión bacteriana a 3000 rpm durante 15 minutos. Se separó el sobrenadante y el paquete fué resuspendido en 10 ml de PBS pH 7.2 para leer absorbancia a 590 nm. Después se centrifugó a 3000 rpm. durante 15

minutos, se descartó el sobrenadante y al paquete se le repitió el mismo procedimiento a partir del momento en que se le agregó el PBS para posteriormente congelarlo y descongelarlo, hasta que el valor de la absorbancia permaneció constante (84).

C) Método de lisado por agitación.

La suspensión bacteriana se lavó una vez con PBS pH 7.2 estéril. Posteriormente se resuspendió el paquete en 10 ml de PBS pH 7.2. Se añadieron perlas de vidrio lisas y se agitó durante 5 minutos, se separó la suspensión bacteriana de las perlas de vidrio y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos; se separó el sobrenadante y el paquete se resuspendió en 10 ml de PBS pH 7.2 para leer absorbancia a 590 nm. Nuevamente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, descartando el sobrenadante y al paquete celular se le repitió el mismo procedimiento a partir del momento en que se le agregó el PBS para posteriormente ponerlo en contacto con las perlas de vidrio, hasta que el valor de la absorbancia leído permaneció constante (84).

Para la obtención del extracto membranal se eligió el sobrenadante obtenido por la técnica de lisado que presentó un grado de lisado mayor. Posteriormente el sobrenadante de las bacterias lisadas fué centrifugado a 4000 rpm durante 15 minutos, para eliminar cualquier célula aún completa. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 20,000 rpm (centrifuga Sorvall, rotor

SS-34) durante 45 minutos, se separó la pastilla (membrana celular) y se reasuspendió en PBS al pH correspondiente. Para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford (6).

3.6. ADSORCIÓN DEL ANTIGENO EN EL PAPEL DE NITROCELULOSA (NC).

A las diferentes suspensiones de antígeno obtenidas en 3.5 se les realizó las siguientes técnicas de adsorción:

3.6.1. Por Filtración.

Se filtró la suspensión del antígeno a través del papel de NC (poro=0.22 μ m) utilizando un filtro Millipore hasta la saturación del papel (aproximadamente de 1.5 a 2 ml). Posteriormente se dejó secar la membrana y se cortaron discos de aproximadamente 5 mm de diámetro, los cuales se conservaron a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización. Se consideró como blanco el papel de NC por el cual se filtró PBS al pH correspondiente empleando las mismas condiciones anteriores.

3.6.2. Por Inmersión.

Se sumergió el papel de NC en la suspensión del antígeno durante 45 minutos. Posteriormente se descartó la solución del antígeno y el papel se dejó secar a temperatura ambiente. Se cortaron discos de aproximadamente 5 mm de diámetro. Se consideró

como blanco el PBS al pH correspondiente en vez de la suspensión de antígeno.

3.6.3. Por Gota.

Se cortaron discos de papel de NC de aproximadamente 5 mm de diámetro. se colocaron 5 ul de la suspensión de antígeno sobre el centro de cada disco de papel, dejándolo secar a temperatura ambiente sobre una placa de vidrio. Se consideró como blanco el PBS al pH correspondiente en vez de la suspensión de antígeno.

3.7. COMPROBACION DE LA ADSORCION DEL ANTIGENO EN EL PAPEL DE NC.

De cada uno de los lotes de las diferentes técnicas de adsorción del antígeno se tomaron tres discos al azar, a los cuales se les realizó las siguientes técnicas de tinción:

3.7.1. Azul brillante.

Se preparó el colorante que consistió en una solución de azul brillante al 0.25%. Se sumergieron los discos de papel de NC en el colorante durante 15 minutos. Se decoloraron durante 15 minutos con una solución de metanol:agua destilada:ácido acético (5:5:1), realizando varios lavados hasta que se aclaró el blanco, dejando secar a temperatura ambiente.

3.7.2. Negro de amido.

Se sumergieron los discos de papel de NC durante 7 minutos en el colorante (1.25 g de negro de amido en una mezcla de 50 ml de ácido acético glacial más 185 ml de agua destilada). Se decoloró con ácido acético al 5%, dejando posteriormente secar a temperatura ambiente.

3.7.3. Rosa de bengala.

Se sumergieron los discos de papel de NC en el colorante (4 g de rosa de bengala en 386 ml de agua destilada) durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS al pH correspondiente. Se dejaron secar a temperatura ambiente (2).

3.8. BLOQUEO DE LOS SITIOS LIBRES DEL PAPEL DE NC CON LECHE DESCREMADA AL 5%.

Se sumergieron los discos de papel de NC en una solución de leche descremada al 5% en TBS al pH correspondiente (Ver apéndice), durante 1 hora en agitación y se dejó reposar durante 30 minutos, se lavaron los discos de papel con TBS al pH trabajado y se dejaron secar.

3.9. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (DOT-ELISA).

Los reactivos utilizados en esta técnica fueron:

- Suero de conejo.
- Suero de cerdo.
- Suero anti-conejo peroxidado.
- Suero anti-cerdo peroxidado.
- TBS al pH correspondiente.
- Solución reveladora (Ver apéndice).

3.9.1. Titulación de los Conjugados.

Se colocaron 5 μ l de suero de conejo o de cerdo (según el conjugado a titular) en cada disco de papel de NC, se dejaron secar a temperatura ambiente. Después se bloquearon los sitios libres como se mencionó en 3.8. Posteriormente se sumergieron en diferentes diluciones del conjugado durante 1 hr. Se lavaron 3 veces con solución TBS-Tween 20 al 0.05%, la tercera vez se dejaron los discos 10 minutos con la solución de lavado. En seguida se agregaron 150 μ l de la solución reveladora, incubándose 30 minutos a temperatura ambiente. Se descarta la solución reveladora, se lavaron los discos con TBS y se dejaron secar a temperatura ambiente. El título que se eligió fué aquel en donde el color del revelado fuera bien detectable.

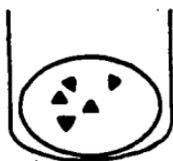
3.9.2. Reacción con los sueros problema.

Se colocó un disco del papel sensibilizado con el antígeno en cada tubo de ensayo, se agregaron 100 ul del suero problema (utilizando una dilución de 1/9 para todos los sueros, se trabajaron en total 93 sueros y cada uno por triplicado); seguido de un periodo de incubación de 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente los discos se lavaron 3 veces con 750 ul de solución TBS-Tween 20 al 0.05%, la tercera vez se dejaron los discos 10 minutos con la solución de lavado. En seguida se agregaron 100 ul de la solución de conjugado (a la dilución adecuada en TBS-leche descremada al 1%), incubándose 1 hr a temperatura ambiente. El procedimiento de lavado descrito anteriormente se repitió luego de la incubación con el conjugado. Por último se agregaron 150 ul de solución de revelado, incubándose 30 minutos a temperatura ambiente. La solución reveladora se descartó, se lavaron los discos con TBS y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los discos positivos se tñieron color violeta (Figura 1) (28).

La prueba se realizó con los discos de los siguientes lotes:

- 1) Suspensión de antígeno bacteria completa crecida en medio sólido (ajustada a una absorbancia de 1.5), adsorbida por Filtración con pH 6.5 del buffer trabajado.
- 2) Suspensión de antígeno bacteria completa crecida en medio sólido (ajustada a una absorbancia de 1.5), adsorbida por Inmersión con pH 6.5 del buffer trabajado.

FIGURA 1. TECNICA DOT-ELISA (40).



1. Inmovilización del antígeno al papel de NC (fase sólida).

2. Bloqueo y lavado.



3. Incubación con la muestra que se sospecha tiene anticuerpos específicos en contra del antígeno.

4. Lavado para la eliminación de anticuerpos no adsorbidos.



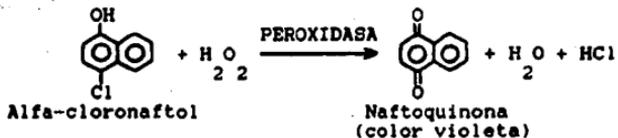
5. Incubación con el conjugado anti-globulina-enzima.

6. Lavado para la eliminación de exceso de conjugado.



7. Incubación con el sustrato enzimático (○) y detección del producto (●).

Grado de hidrólisis = Cantidad de anticuerpo presente en la muestra.



- 3) Suspensión de antígeno bacteria completa crecida en medio sólido (ajustada a una absorbancia de 1.5), adsorbida por Gota con pH 6.5 del buffer trabajado.
- 4) Suspensión de antígeno bacteria completa crecida en medio líquido (ajustada a una absorbancia de 1.5), adsorbida por Filtración con pH 6.5 del buffer trabajado.
- 5) Suspensión de antígeno bacteria completa crecida en medio líquido (ajustada a una absorbancia de 1.5) adsorbida por Inmersión con pH 6.5 del buffer trabajado.
- 6) Suspensión de antígeno bacteria completa crecida en medio líquido (ajustada a una absorbancia de 1.5) adsorbida por Gota con pH 6.5 del buffer trabajado.
- 7) Suspensión de antígeno membrana celular (con una concentración de proteínas de 2.163 ug/ml) adsorbida por Filtración con pH 6.5 del buffer trabajado.
- 8) Suspensión de antígeno membrana celular (con una concentración de proteínas de 2.163 ug/ml) adsorbida por Inmersión con pH 6.5 del buffer trabajado.
- 9) Suspensión de antígeno membrana celular (con una concentración de proteínas de 2.163 ug/ml) adsorbida por Gota con pH 6.5 del buffer trabajado.
- 10) Suspensión de antígeno bacteria completa crecida en medio sólido (ajustada a una absorbancia de 1.5) adsorbida por Gota con pH 7.2 del buffer trabajado.

- 11) Suspensión de antígeno bacteria completa crecida en medio líquido (ajustada a una absorbancia de 1.5) adsorbida por Gota con pH 7.2 del buffer trabajado.
- 12) Suspensión de antígeno membrana celular (con una concentración de proteínas de 3.796 ug/ml) adsorbida por Gota con pH 7.2 del buffer trabajado.
- 13) Suspensión de antígeno bacteria completa crecida en medio sólido (ajustada a una absorbancia de 1.5) adsorbida por Gota con pH 7.9 del buffer trabajado.
- 14) Suspensión de antígeno bacteria completa crecida en medio líquido (ajustada a una absorbancia de 1.5) adsorbida por Gota con pH 7.9 del buffer trabajado.
- 15) Suspensión de antígeno membrana celular (con una concentración de proteínas de 5.020 ug/ml) adsorbida por Gota con pH 7.9 del buffer trabajado.

Cada vez que se realizó el ensayo se consideraron los blancos correspondientes, descritos a continuación:

A) Disco de NC sin antígeno + Suero positivo + Conjugado + Solución reveladora.

B) Disco de NC sin antígeno + Suero negativo + Conjugado + Solución reveladora.

C) Disco de NC con antígeno + Suero positivo + Conjugado + Solución reveladora.

D) Disco de NC con antígeno + Suero negativo + Conjugado + Solución reveladora.

E) Disco de NC sin antígeno + T. B. S. + Conjugado + Solución reveladora.

F) Disco de NC con antígeno + T. B. S. + Conjugado + Solución reveladora.

4. RESULTADOS.

4.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO.

En la Tabla 2 se resumen los resultados de las pruebas realizadas para identificar al microorganismo en estudio A. pleuropneumoniae. Comparando estos resultados con los reportados en la literatura observamos que concuerdan completamente.

4.2. PREPARACION DEL ANTIGENO DE A. pleuropneumoniae.

4.2.1. Bacteria completa.

Después de sembrar a la bacteria en los medios de BHI complementado tanto sólido como líquido, se obtuvo un cosechado de células con una consistencia viscosa, color ligeramente amarillo, el cual se diluyó hasta una absorbancia de 1.5 a 590 nm para cada tipo de medio.

4.2.2. Obtención del extracto membranal.

Una vez cultivada la bacteria en medio de agar BHI complementado, se obtuvo una suspensión bacteriana con las mismas

**TABLA 2. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS
A LA CEPA DE *B. pleurocyaneum* UTILIZADA EN -
ESTE TRABAJO.**

PRUEBA	RESULTADO
TINCION DE GRAM	NEGATIVO
MORFOLOGIA	MOJALO PUNTO FLEMENICO FORMADO EN OCASIONES CE- BROS.
VERDEA	POSITIVO
SATELITISMO	POSITIVO
CAMP	POSITIVO
INDOL	NEGATIVO
Voges-Proskauer	NEGATIVO
DEGRADACION DE CARB:	
D-GALACTOSA	JUDOSO
D-FRUCTOSA	POSITIVO
L-ARABINOSA	NEGATIVO
D-XILOSA	POSITIVO
D-LACTOSA	NEGATIVO
D-MANITOL	POSITIVO

características mencionadas en 4.2.1. Los lisados bacterianos fueron obtenidos tal y como se describió en la metodología para cada una de las técnicas de lisado, obteniéndose los resultados reportados en la Tabla 3 y en la Figura 2.

4.2.3. Separación de las membranas celulares.

Una vez realizados los lisados bacterianos por el método shock osmótico, éstos se centrifugaron para separar las membranas celulares bajo las condiciones ya establecidas en metodología, obteniéndose una pastilla amarillenta que fué resuspendida inicialmente en 1 ml de PBS a los tres pH trabajados (6.5, 7.2 y 7.9); para determinar la cantidad de proteínas contenidas en estos extractos se utilizó el método de Bradford (6).

4.2.4. Análisis de la suspensión de membrana celular.

Para la determinación de las concentraciones de proteínas de las muestras, se hizo una curva patrón la cual se muestra en la Figura 3. Los valores de esta curva se reportan en la Tabla 4. Los valores de las concentraciones de proteínas obtenidos en los extractos membranales se resumen en la Tabla 5.

4.3. ADSORCIÓN DEL ANTIGENO EN EL PAPEL DE NC.

Después de preparar las suspensiones de antígeno a los pH trabajados, se adsorbieron en los discos de papel de NC empleando las técnicas por Filtración, por Inmersión y por Gota.

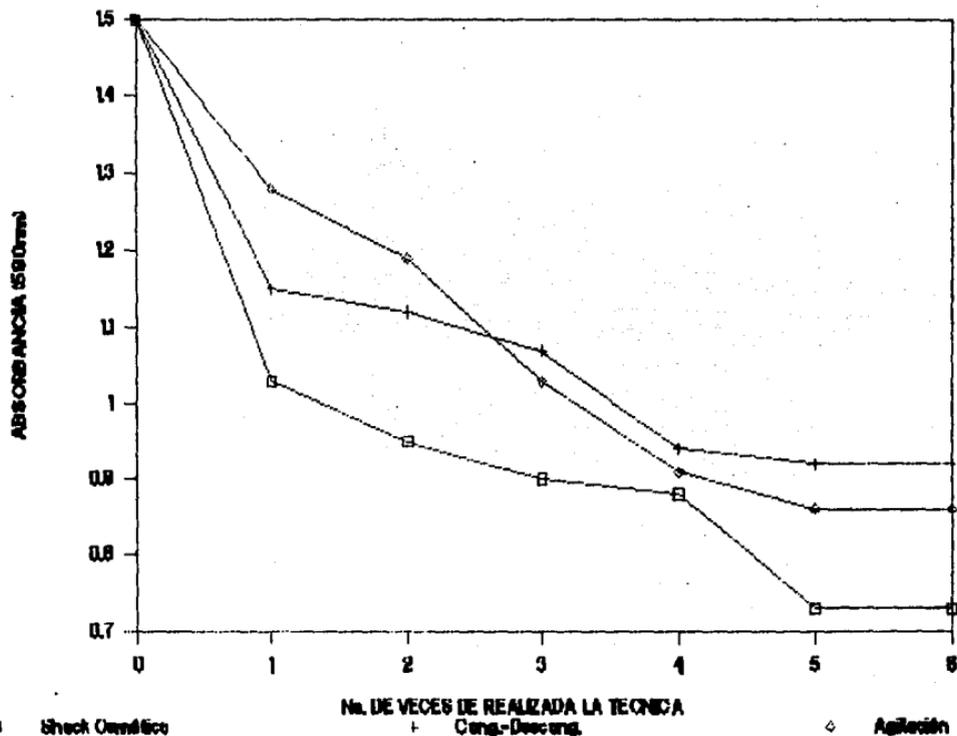
TABLE 3. VALORES DE ABSORBANCIA ($\lambda=590 \text{ m}\mu$) OBTENIDOS
EN LAS TECNICAS DE LISADO DE LA BACTERIA.

TECNICAS DE LISADO ^{**}			
N	SHOCK OSMOTICO	CONSEJACION RECONSEJACION	AGITACION
0	1.58 \pm 0.000	1.58 \pm 0.000	1.58 \pm 0.000
1 a.	1.83 \pm 0.015	1.15 \pm 0.005	1.28 \pm 0.030
2 a.	0.95 \pm 0.011	1.12 \pm 0.005	1.19 \pm 0.055
3 a.	0.99 \pm 0.000	1.87 \pm 0.005	1.83 \pm 0.020
4 a.	0.88 \pm 0.005	0.94 \pm 0.005	0.91 \pm 0.015
5 a.	0.73 \pm 0.030	0.92 \pm 0.010	0.86 \pm 0.010
6 a.	0.73 \pm 0.025	0.92 \pm 0.011	0.86 \pm 0.005

N = NUMERO DE VECES DE REALIZADA LA TECNICA.

** = VALORES REPORTADOS EN UNIDADES DE ABSORBANCIA.

FIGURA 2. TECNICAS DE LISADO BACTERIANO



**TABLA 4. VALORES PARA LA CURVA PATRON DE PROTEINA ($\lambda=595$ nm)
 CALCULADOS SIGUIENDO LA METODOLOGIA DE BRAFORD, -
 USANDO ALBUMINA SERICA BOVINA COMO PROTEINA PATRON
 (FIGURA 2).**

CONC. PROTEINA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ABSORBANCIA
20	0.00
40	0.14
60	0.19
80	0.23
100	0.28

(6)

FIGURA 3. CURVA PATRON DE PROTEINAS (Prot.Patrón = ABS)

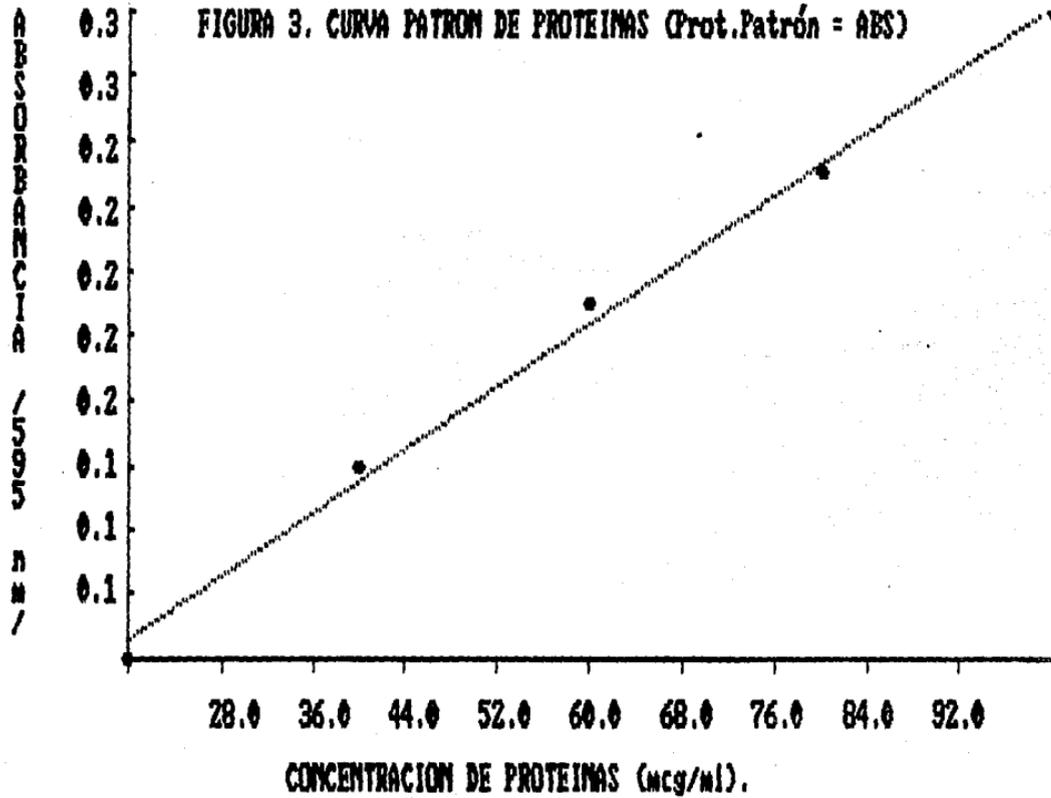


TABLA 5. CONTENIDO DE PROTEINAS DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES EN CADA pH TRABAJADO (6.5, 7.2 Y 7.9) CALCULADOS USANDO LA METODOLOGIA DE BRADFORD.

pH DEL BUFFER (PBS)	CONC. PROTEINAS ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
6.5	2.163
7.2	3.796
7.9	5.828

Para comprobar la adsorción completa del antígeno se realizaron las técnicas de tinción: Azul brillante, Negro de amido y Rosa de bengala, con las muestras de discos de los lotes correspondientes al pH = 6.5. Estos resultados se muestran en la Figura 4, donde se puede apreciar que la técnica más conveniente fue la tinción de Azul brillante, la cual se realizó para los otros pH trabajados (7.2 y 7.9).

4.4. BLOQUEO DE LOS SITIOS LIBRES DEL PAPEL DE NC CON LECHE DESCREMADA AL 5%.

Una vez realizado el bloqueo de los discos de papel de NC, se prosiguió a comprobar dicho bloqueo mediante la técnica de tinción de Azul brillante. Estos resultados se resumen en la Figura 5.

4.5. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (Dot-ELISA).

4.5.1. Titulación de los conjugados.

Las titulaciones de los conjugados que se usaron para detectar los anticuerpos de cerdo y de conejo se muestran en la Figura 6, los resultados de estas pruebas dieron una dilución de 1:200 como la adecuada para ambos conjugados, y así detectar perfectamente los anticuerpos que reaccionaron con el antígeno.

FIGURA 4. RESULTADOS DE LAS TINCIONES CON AZUL BRILLANTE, NEGRO DE ANIDO Y ROSA DE BENGALA, DE LAS TECNICAS DE ADSORCION DEL ANTIGENO EN EL PAPEL DE NC - (POR FILTRACION, POR INMERSION Y POR GOTAS), UTILIZANDO MUESTRAS DE LOS - LOTES DE DISCOS CORRESPONDIENTES AL pH=6.5 Y CON LAS TRES FORMAS DE ANTIGENOS TRABAJADOS (AS, AL Y ANC).

TECNICA DE TINCION			
TECNICA DE ADSORCION	AZUL BRILLANTE	NEGRO DE ANIDO	ROSA DE BENGALA
<p>FOR FILTRACION</p> <p>AS AL ANC AS AL ANC AS AL ANC</p>	<p>FOR INMERSION</p> <p>AS AL ANC AS AL ANC AS AL ANC</p>	<p>FOR GOTAS</p> <p>AS AL ANC AS AL ANC AS AL ANC</p>	

AS = ANTIGENO: BACTERIA COMPLETA CECIDA EN MEDIO SOLIDO.
 AL = ANTIGENO: BACTERIA COMPLETA CECIDA EN MEDIO LIQUIDO.
 ANC = ANTIGENO: MEMBRANA CELULAR.

FIGURA 5. RESULTADOS DEL BLOQUEO CON LECHE DESCRENADA DE LOS DISCOS EN LAS TÉCNICAS DE ADSORCIÓN DEL ANTIGENO (POR FILTRACIÓN; POR INMERSIÓN Y POR GOTAS), CORRESPONDIENTES A LOS pH= 6.5, 7.2 Y 7.9.

TECNICA DE ADSORCION			
pH DEL BUFER (TBS)	POR FILTRACION	POR INMERSION	POR GOTAS
6.5	 AS AL ANC	 AS AL ANC	 AS AL ANC
7.2	 AS AL ANC	 AS AL ANC	 AS AL ANC
7.9	 AS AL ANC	 AS AL ANC	 AS AL ANC

AS = ANTIGENO; BACTERIA COMPLETA CRECIDA EN MEDIO SOLIDO.
 AL = ANTIGENO; BACTERIA COMPLETA CRECIDA EN MEDIO LIQUIDO.
 ANC = ANTIGENO; MEMBRANA CELULAR.

**FIGURA 6. TITULACION DE LOS SUEROS ANTICONEJO
PEROXIDADO Y ANTICERDO PEROXIDADO.**

CONJUGADO	D I L U C I O N			
	1:100	1:200	1:300	1:400
SUERO ANTICONEJO PEROXIDADO.	●	●	●	●
SUERO ANTICERDO PEROXIDADO.	●	●	●	●

4.5.2. REACCION CON LOS SUEROS PROBLEMAS.

Después de realizar la metodología de la técnica Dot-ELISA con el total de los sueros trabajados para cada uno de los lotes de discos bajo las diferentes técnicas de adsorción, y al correspondiente pH, se obtuvieron los siguientes resultados: en la Figura 7 se reportan los discos de los blancos considerados durante la realización de la técnica Dot-ELISA del lote perteneciente al antígeno de Bacteria Completa Crecida en Medio Sólido, adsorbido por la técnica por Gota y a pH = 6.5. Sin embargo, se corrieron los mismos blancos para cada vez que se realizó la técnica Dot-ELISA considerando el tipo de antígeno, técnica de adsorción y pH trabajado.

La Figura 8 muestra los resultados que sirvieron para elegir la técnica de adsorción del antígeno al papel de NC, se muestran algunos de los discos por ambos lados correspondientes a las técnicas de adsorción utilizadas por Filtración, por Inmersión y por Gota para las tres diferentes suspensiones de antígeno (AS=bacteria completa crecida en medio sólido, AL=bacteria completa crecida en medio líquido y AMC=membrana celular) a pH = 6.5 pertenecientes a tres sueros porcinos negativos y a tres sueros porcinos positivos a A. pleuropneumoniae probados previamente con la técnica de Aglutinación con 2-Mercaptoetanol.

En la Tabla 6 se reportan los resultados de la prueba de Dot-ELISA realizada con los sueros problemas en los discos preparados bajo las tres técnicas de adsorción (por Filtración, por Inmersión y por Gota) de los diferentes tipos de antígeno (AS,AL

FIGURA 7. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS BLANCOS CONSIDERADOS DURANTE LA REALIZACION DE LA TECNICA DOT-ELISA, DONDE LOS DISCOS PERTENECIENTES AL LOTE DEL ANTIGENO DE BACTERIA COMPLETA CRECIDA EN MEDIO SOLIDO, ADSORBIDO POR LA TECNICA POR GOTA Y A pH = 6.5.

B L A N C O S	OBSERVACION	RESULTADOS
NC ₇₃₅ + SUEÑO POSITIVO + CONJUGADO + SOLN. REVELADORA		NEGATIVO
NC ₇₃₅ + SUEÑO NEGATIVO + CONJUGADO + SOLN. REVELADORA		NEGATIVO
NC _{AG} + SUEÑO POSITIVO + CONJUGADO + SOLN. REVELADORA		POSITIVO(+))
NC _{AG} + SUEÑO NEGATIVO + CONJUGADO + SOLN. REVELADORA		NEGATIVO(-)
NC ₇₃₅ + Y. B. S. + CONJUGADO + SOLUCION REVELADORA		NEGATIVO
NC _{AG} + Y. B. S. + CONJUGADO + SOLUCION REVELADORA		NEGATIVO

(+) = CONTROL POSITIVO.

(-) = CONTROL NEGATIVO.

FIGURA 8. RESULTADOS DE LOS DISCOS (POR AMBOS LADOS) CORRESPONDIENTES A LOS LOTES DE LAS TÉCNICAS DE ADSORCIÓN (POR FILTRACIÓN, POR INMERSIÓN Y POR GOTAS), DE LAS TRES DIFERENTES SUSPENSIÓNES DE ANTIGENO (AS, AL Y ANC) A pH=6.5, OBTENIDOS POR EL ENFRENTAMIENTO DE TRES SUE- RO PORCINOS NEGATIVOS Y POSITIVOS A *S. pleuropneumoniae* (PROBADOS PREVIAMENTE CON LA TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN CON 2-MERCAPTOETANOL).

		TÉCNICAS DE ADSORCIÓN		
		ANTIGENO	POR FILTRACIÓN	POR INMERSIÓN
S U E R O S N E G A T I V O S	BACTERIA COM- PLETA CRECIDA EN MEDIO SO- LIDO (AS)			
	BACTERIA COM- PLETA CRECIDA EN MEDIO LI- QUIDO (AL)			
	MEMBRANA CELULAR (ANC)			
S U E R O S P O S I T I V O S	BACTERIA COM- PLETA CRECIDA EN MEDIO SO- LIDO (AS)			
	BACTERIA COM- PLETA CRECIDA EN MEDIO LI- QUIDO (AL)			
	MEMBRANA CELULAR (ANC)			

△ = CORRESPONDE AL LADO OPUESTO DE LA SUPERFICIE DEL "ISMO DISCO.

y AMC) a pH del buffer = 6.5.

Con respecto a la Tabla 7 se reportan los resultados de la interpretación de los discos correspondientes a los lotes de los diferentes pH (6.5, 7.2 y 7.9), con los tres tipos de suspensiones de antígeno (AS, AL y AMC), pertenecientes a la técnica de adsorción del antígeno por Gota, enfrentados con el total de sueros problemas.

En la Tabla 8 se muestran los resultados del número de sueros con las diferentes combinaciones de los antígenos (AS, AL y AMC) a los pH trabajados (6.5, 7.2 y 7.9). Las combinaciones de los resultados de los sueros que interesan para realizar la comparación con el análisis de χ^2 son: (+ - -), (- - +) y (- + -).

En la Tabla 9 se muestran los resultados del número de sueros con las diferentes combinaciones de los pH (6.5, 7.2 y 7.9) con los tipos de antígenos trabajados (AS, AL y AMC). Con respecto a las combinaciones de los resultados de los sueros que interesan son los mismos que se consideraron anteriormente.

En la Tabla 10 se reporta el análisis estadístico de χ^2 para los sueros probados con la técnica Dot-ELISA, utilizando los diferentes antígenos (AS, AL y AMC) a los pH trabajados (6.5, 7.2 y 7.9).

TABLA 6. RESULTADOS DE LA PRUEBA DOT-ELISA REALIZADA CON LOS SUEROS PROBLEMAS USANDO LOS DISCOS CORRESPONDIENTES A LAS TECNICAS DE ADSORCION (POR FILTRACION, POR INMERSION Y POR GOTTA), DE LAS TRES DIFERENTES SUSPENSIONES DE ANTIGENO (AS, AL Y AMC) Y CON pH DEL BUFFER = 6.5.

TECNICA DE ADSORCION									
NUM. DE SUERO.	POR FILTRACION			POR INMERSION			POR GOTTA		
	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC
1	+	-	+	+	-	-	-	-	-
2 ^a	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6	-	-	-	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	+	-	+	-	-	+
8	+	-	-	-	-	-	-	-	+
9	-	+	-	-	-	-	-	-	-
10	-	+	-	-	-	-	-	-	-
11 ^a	+	-	+	+	+	-	-	+	+
12 ^a	-	-	+	+	+	-	+	+	-
13	-	-	+	+	+	+	+	-	+
14 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15 ^a	+	+	+	-	+	+	+	+	+
16 ^a	+	+	+	+	+	+	-	+	+
17 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	-	+	-	-	-	+	-	-
19	+	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	+
21	-	-	+	-	-	-	-	-	+
22	-	-	-	-	-	-	+	-	-

* = SUEROS POSITIVOS CON LA TECNICA DE 2-NE.

+ = RESULTADO POSITIVO.

- = RESULTADO NEGATIVO.

CONTINUACION DE LA TABLA 6.

TECNICA DE ADSORCION									
NUM. DE SUEDO.	POR FILTRACION			POR INMERSION			POR GOTA		
	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60 ^N	-	+	+	+	+	+	+	-	+
61	-	+	-	+	+	-	+	-	-
62	-	-	-	+	+	-	-	+	-
63	-	-	-	-	+	-	-	+	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	+	+	+	-	-	-	+
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68 ^N	+	+	+	+	+	+	+	+	+
69 ^N	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70	-	-	-	-	-	-	+	-	-
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 ^N	-	-	+	+	+	+	+	+	+
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	+	-	-	-	-
75 ^N	+	+	+	+	+	+	+	+	-
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77 ^N	+	+	+	+	+	+	+	+	+
78	-	+	-	-	-	-	+	-	-
79	-	+	-	+	+	-	+	-	-
80	-	-	-	+	-	-	+	-	-
81	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	+	-	-	-	-	-	-	-	+
83 ^N	+	+	-	+	+	-	+	+	-
84	-	-	-	-	-	-	+	-	-
85	-	+	-	-	-	-	+	-	-
86	+	-	-	+	-	-	+	-	-
87	+	-	-	+	+	+	+	-	+
88	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	+	-	-	-	-	-	+	-	-
91 ^N	+	+	+	+	+	+	+	+	-
92 ^N	+	+	+	+	+	-	+	-	-
93	-	+	-	-	-	-	+	-	-

CONTINUACION DE LA TABLA 6.

TECNICA DE ADSORCION									
NUM. DE SUENO.	POR FILTRACION			POR INYECCION			POR COTA		
	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC
23 ^N	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25 ^N	+	-	+	-	-	+	+	-	+
26	-	-	-	+	-	-	+	-	-
27	+	-	-	+	-	+	+	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29 ^N	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	-	-	-	+	+	-	-	-
31	+	-	-	-	-	+	-	-	+
32 ^N	+	-	-	+	+	+	+	+	+
33 ^N	+	+	-	+	+	+	+	+	+
34 ^N	+	+	-	+	+	+	+	+	+
35	-	-	+	+	+	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	+
37	-	-	-	-	+	+	+	+	+
38	-	-	-	+	+	+	-	+	+
39 ^N	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^N	-	-	+	+	+	+	-	-	+
41 ^N	+	+	+	+	+	+	-	+	+
42	-	+	-	-	-	-	-	-	-
43	+	-	+	+	+	-	-	-	+
44 ^N	+	-	+	+	+	+	+	+	+
45	-	-	-	+	-	-	+	-	+
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47 ^N	-	-	+	+	+	-	+	+	-
48	-	-	+	-	-	-	-	+	-
49	-	-	-	-	-	-	-	+	-
50	-	-	+	+	+	+	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	+	+	-
52 ^N	+	-	+	+	+	-	-	+	+
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55 ^N	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	+	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CONTINUACION DE LA TABLA 6.

TECNICA DE ADSORCION									
NUM. DE SUERO.	POR FILTRACION			POR INMERSION			POR GOTA		
	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60 ^A	-	+	+	+	+	+	+	-	+
61	-	+	-	+	+	-	+	-	+
62	-	-	-	+	+	-	-	+	-
63	-	-	-	-	+	-	-	+	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	+	+	+	-	-	-	+
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68 ^A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
69 ^A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 ^A	-	-	+	+	+	+	+	+	+
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	+	-	-	-	-
75 ^A	+	+	+	+	+	+	+	+	-
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77 ^A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
78	-	+	-	-	-	-	+	-	-
79	-	+	-	+	+	-	+	-	-
80	-	-	-	+	-	-	+	-	-
81	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	+	-	-	-	-	-	-	-	+
83 ^B	+	+	-	+	+	-	+	+	-
84	-	-	-	-	-	-	+	-	-
85	-	+	-	-	-	-	+	-	-
86	+	-	-	+	-	-	+	-	-
87	+	-	-	+	+	+	+	-	+
88	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	+	-	-	-	-	-	+	-	-
91 ^A	+	+	+	+	+	+	+	+	-
92 ^A	+	+	+	+	+	-	+	-	-
93	-	+	-	-	-	-	+	-	-

TABLA 7. RESULTADOS DE LA PRUEBA DOT-ELISA REALIZADA CON LOS SUEROS PROBLEMA USANDO LOS DISCOS CORRESPONDIENTES A LOS LOTES CON LOS DIFERENTES pH (6.5, 7.2 Y 7.9) EMPLEANDO LOS TRES TIPOS DE SUSPENSIONES DE ANTIGENO (AS, AL Y AMC) ADSORBIDOS POR GOTA.

TECNICA DE ADSORCION POR GOTA									
NÚM. DE SUERO.	pH DEL BUFER = 6.5			pH DEL BUFER = 7.2			pH DEL BUFER = 7.9		
	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC
1	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2 ^a	+	+	+	+	+	+	-	-	-
3 ^a	+	+	+	+	+	+	+	-	+
4	-	+	+	+	+	+	-	+	+
5	-	-	+	-	-	-	+	-	+
6	-	-	-	-	+	-	+	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	+	-	+	-	-	-	+
9	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	+	-	-
11 ^a	-	+	+	-	+	+	-	-	-
12 ^a	+	+	-	+	+	+	-	-	+
13	-	-	+	-	-	-	-	-	-
14 ^a	+	+	+	+	+	+	-	+	-
15 ^a	+	+	+	+	+	+	-	+	-
16 ^a	+	+	+	-	+	+	+	+	-
17 ^a	+	+	+	-	+	+	+	+	-
18	+	-	-	-	+	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	+	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-	+	-	-

* = SUEROS POSITIVOS CON LA PRUEBA 2-HE.

+ = RESULTADO POSITIVO.

- = RESULTADO NEGATIVO.

CONTINUACION DE LA TABLA 7.

TECNICAS DE ADSORCION POR GOTA									
NUM. DE SUEDO.	pH DEL BUFFER = 6.5			pH DEL BUFFER = 7.2			pH DEL BUFFER = 7.9		
	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC
23 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	-
24	-	-	-	-	-	+	-	-	-
25 ^a	+	-	+	+	+	+	+	+	+
26	+	-	-	-	+	+	-	-	+
27	+	-	-	-	+	-	+	+	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	-	-	-	-	+	-	-	-	-
31	-	-	+	-	-	-	+	-	-
32 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34 ^a	+	+	+	+	+	+	+	-	-
35	-	-	-	-	+	+	-	-	-
36	-	-	+	-	+	-	+	-	+
37	-	-	+	-	+	+	+	-	-
38	-	+	+	-	+	+	+	-	-
39 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^a	-	-	+	+	+	+	-	+	+
41 ^a	-	+	+	+	+	+	+	+	+
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	+	-	-	-	+	-	-
44 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	+	-	-	-	-	-	+	-	+
46	-	-	-	-	-	-	-	-	+
47 ^a	+	+	-	-	+	+	+	-	+
48	-	+	-	+	-	-	-	-	+
49	-	+	-	-	-	-	-	-	-
50	-	+	-	+	-	-	-	-	-
51	+	+	-	-	-	-	+	-	+
52 ^a	-	+	+	+	+	+	+	+	+
53	+	-	-	-	-	-	-	-	+
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56	-	-	-	+	+	-	-	+	+
57	-	-	-	-	+	-	-	-	+
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CONTINUACION DE LA TABLA 7.

TECNICA DE ADSORCION POR GOTA									
NUM. DE SIEMB.	pH DEL BUFIN = 6.5			pH DEL BUFIN = 7.2			pH DEL BUFIN = 7.9		
	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC	AS	AL	AMC
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60 ^a	+	-	+	+	+	+	+	+	+
61	+	-	-	-	+	-	-	-	-
62	-	+	-	-	-	-	-	-	-
63	-	+	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	+	-	-	-	-	-	+
66	-	-	-	-	-	+	-	-	-
67	-	-	-	-	+	-	-	-	-
68 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
69 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70	+	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 ^a	+	+	+	-	+	+	+	-	+
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	+	+	-	+
75 ^a	+	+	-	+	+	+	+	+	+
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77 ^a	+	+	+	+	+	+	-	+	-
78	+	-	-	-	-	-	-	-	-
79	+	-	-	-	-	-	-	-	-
80	+	-	-	-	-	-	-	-	-
81	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	-	-	+	-	-	+	-	-	-
83 ^a	+	+	-	-	+	+	-	-	+
84	+	-	-	-	-	-	-	-	-
85	+	-	-	-	-	-	-	-	-
86	+	-	-	-	-	-	-	+	+
87	+	-	+	+	+	+	+	-	+
88	-	-	-	-	-	-	+	+	-
89	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	+	-	-	-	-	+	-	-	+
91 ^a	+	+	-	+	+	+	-	+	+
92 ^a	+	-	-	+	+	+	+	+	+
93	+	-	-	-	-	+	-	-	-

TABLA 8. NUMERO DE SUEROS CON LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE LOS ANTIGENOS (AS, AL Y ANC) A LOS pH TRABAJADOS (6.5, 7.2 Y 7.9).

COMBINACIONES DE LOS ANTIGENOS	NUMERO DE SUEROS		
	pH 6.5	pH 7.2	pH 7.9
AS-AL-ANC			
+++	17	29	16
++-	6	1	5
+--	10	3	7
-+-	10	6	9
---	6	8	5
AS-AL-			
+-	5	8	3
AS-AL-ANC			
+-	4	1	8
---	27	37	40

^a COMBINACIONES DE LOS ANTIGENOS ANALIZADAS CON χ^2 .

AS = ANTIGENO; BACTERIA COMPLETA CRECIDA EN MEDIO SOLIDO.

AL = ANTIGENO; BACTERIA COMPLETA CRECIDA EN MEDIO LIQUIDO.

ANC = ANTIGENO; MEMBRANA CELULAR.

TABLA 9. NUMERO DE SUEROS CON LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE LOS pH (6.5, 7.2 Y 7.9) Y CON LOS TIPOS DE ANTIGENOS (AS, AL Y ANC) TRABAJADOS.

COMBINACIONES DE LOS pH	NUMERO DE SUEROS		
	AS	AL	ANC
6.5 - 7.2 - 7.9			
+	18	20	17
+	6	8	12
^a +	13	6	5
^a -	10	2	8
-	3	6	9
^a -	7	12	6
+	6	8	5
-	30	39	31

^a COMBINACIONES DE LOS pH ANALIZADAS.

AS = ANTIGENO: BACTERIA COMPLETA CRECIDA EN MEDIO SOLIDO.

AL = ANTIGENO: BACTERIA COMPLETA CRECIDA EN MEDIO LIQUIDO.

ANC = ANTIGENO: MEMBRANA CELULAR.

TABLA 10. ANALISIS DE χ^2 PARA LOS SUENOS PROBADOS CON DOT-ELISA, UTILIZANDO LOS DIFERENTES ANTIGENOS (AS, AL Y ANC) A LOS pH TRABAJADOS (6.5, 7.2 Y 7.9).

VARIABLES	χ^2 CALCULADA
pH 6.5 con antígenos: AS, AL Y ANC	7.01
pH 7.2 con antígenos: AS, AL Y ANC	2.22
pH 7.9 con antígenos: AS, AL Y ANC	2.96
Antígeno AS a pH: 6.5, 7.2 y 7.9	1.00
Antígeno AL a pH: 6.5, 7.2 y 7.9	7.56
Antígeno ANC a pH: 6.5, 7.2 y 7.9	0.74

$\chi^2 = 5.991 \quad gl=2 \quad 0.05 P$

AS = ANTIGENO: BACTERIA COMPLETA CRECIDA EN MEDIO SOLIDO.
 AL = ANTIGENO: BACTERIA COMPLETA CRECIDA EN MEDIO LIQUIDO.
 ANC = ANTIGENO: MEMBRANA CELULAR.

Los porcentos de sueros positivos a A. pleuropneumoniae con Dot-ELISA a los diferentes pH (6.5, 7.2 y 7.9) con los tres tipos de suspensiones de antígenos (AS, AL y AMC) adsorbidos por Gota se muestran en la Tabla 11.

En la Tabla 12 se reportan los porcentos de sueros positivos a A. pleuropneumoniae con Dot-ELISA a los diferentes pH (6.5, 7.2 y 7.9) con los 3 tipos de suspensiones de antígenos (AS, AL y AMC), adsorbidos por Gota, con respecto al total de sueros positivos con la técnica de Aglutinación con 2-Mercapto-etanol.

TABLA 11. PORCIENTOS DE SUEROS POSITIVOS A *A. pleuropneumoniae*
CON DOT-ELISA A LOS DIFERENTES pH (6.5, 7.2 Y 7.9) -
CON LOS TRES TIPOS DE SUSPENSIONES DE ANTIGENOS (AS,
AL Y ANC) ADSORBIDOS POR GOTAS.

	SUSP. DE ANTI GENO	TOTAL DE SUEROS POSITIVOS CON DOT - ELISA	% DE SUEROS POSITIVOS CON DOT - ELISA (100% = 93 SUEROS)
pH B U P P E R 6.5	AS	43	46.23
	AL	34	36.55
	ANC	39	41.93
pH B U P P E R 7.2	AS	34	36.55
	AL	46	49.46
	ANC	44	47.31
pH B U P P E R 7.9	AS	37	39.78
	AL	28	30.10
	ANC	39	41.93

AS = ANTIGENO: BACTERIA COMPLETA CRECIDA EN MEDIO SOLIDO.
 AL = ANTIGENO: BACTERIA COMPLETA CRECIDA EN MEDIO LIQUIDO.
 ANC = ANTIGENO: MEMBRANA CELULAR.

TABLA 12. PORCIENTOS DE SUEROS POSITIVOS A *A. pleuropneumoniae* CON DOT-ELISA A LOS DIFERENTES pH (6.5, 7.2 Y 7.9) CON LOS TRES TIPOS DE SUSPENSIONES DE ANTIGENO (AS, AL Y AMC) - ADSORBIDOS POR GOTTA Y CON LA PRUEBA DE AGLUTINACION 2-ME.

	SUSP. DE ANTIGENO	TOTAL DE SUEROS POSITIVOS A DOT-ELISA / 2-MERCAPTETANOL	% DE SUEROS POSITIVOS CON DOT-ELISA CON RESPECTO A AGLUTINACION CON 2-MERCAPTETANOL (100% = 30 SUEROS)
pH B U F F E R 6.5	AS	25	83.33
	AL	26	86.66
	AMC	24	80.00
pH B U F F E R 7.2	AS	26	86.66
	AL	30	100.00
	AMC	30	100.00
pH B U F F E R 7.9	AS	22	73.33
	AL	22	73.33
	AMC	21	70.00

AS = ANTIGENO: BACTERIA COMPLETA CECIDA EN MEDIO SOLIDO.

AL = ANTIGENO: BACTERIA COMPLETA CECIDA EN MEDIO LIQUIDO.

AMC = ANTIGENO: MEMBRANA CELULAR.

5. DISCUSION.

En este trabajo la técnica de lisado que presentó un grado de eficiencia mayor fué el método de Shock osmótico, ya que al realizar la comparación con las otras técnicas de lisado en la Tabla 3 ésta presentó un valor de absorbancia menor (0.73), por lo tanto fué la utilizada para la preparación del antígeno correspondiente a la membrana celular.

En la Figura 4 se comparan los resultados de las tinciones utilizadas para comprobar la adsorción del antígeno en el papel de NC, aunque las tres técnicas tificaron bien al antígeno adsorbido al papel se utilizó la tinción de Azul brillante porque permitió una mejor diferencia entre la tinción del papel control y el papel muestra. También se observó que entre las tres técnicas de adsorción del antígeno (por Filtración, por Inmersión y por Gota) se encontraron diferencias en cuanto a la intensidad de tinción; los discos pertenecientes a la técnica de adsorción por Filtración presentaron un grado de tinción mayor por uno de los lados, por otra parte en la técnica por Inmersión los discos se tificaron por ambos lados tenuamente, mientras que los discos de la técnica de adsorción por Gota se tificaron intensamente solo en la parte central del disco donde fué colocada la suspensión de antígeno.

Después de haber realizado el ensayo de Dot-ELISA, se apreciaron diferencias en cuanto a la interpretación entre las técnicas de adsorción, la técnica de adsorción por Gota permitió una lectura más sencilla para la interpretación de los resultados, ya que los discos se tiñieron color violeta solamente en la parte central, mientras que con las técnicas de adsorción por Filtración e Inmersión se tiñieron por ambos lados lo que dificultó grandemente la interpretación de los resultados. Esto concuerda con las observaciones realizadas anteriormente en las técnicas de tinción para comprobar la adsorción del antígeno. De acuerdo a todo lo anterior se decidió utilizar la técnica de adsorción por Gota para analizar las variaciones a distintos pH y con las diferentes suspensiones de antígeno (Tabla 7).

Se observó una variación en los resultados cuando la prueba se realizó a pH 6.5, teniendo un efecto sobre el tipo de antígeno utilizado. Cuando se utilizó el antígeno AL, se obtuvieron variaciones significativas en los resultados, lo cual sugiere que el pH sí tiene un efecto sobre este antígeno. Mientras que los tipos de antígenos no se vieron afectados cuando se utilizaron los pH 7.2 y 7.9, ya que no existieron variaciones significativas en los resultados y los antígenos AS y AMC no se ven afectados por el pH utilizado. No obstante, se observó una variación más significativa cuando la prueba se realizó a pH 7.9 que a pH 7.2; del mismo modo, existió una variación más significativa cuando se utilizó el antígeno AS con respecto al antígeno AMC, por lo tanto, se podría sugerir que las condiciones de la prueba más

adecuadas serian a pH 7.2 utilizando el antígeno AMC (Tabla 10), debido a que a pH 7.2 la reacción antígeno anticuerpo se ve favorecida quizás porque la estructura del antígeno no es alterada por este pH.

Los resultados mencionados anteriormente se pueden corroborar con los resultados reportados en la Tabla 11, en donde el antígeno AL a pH 6.5 y 7.9 le corresponde un porciento de detección de sueros positivos bajo (36.55 y 30.10 respectivamente), por lo tanto, la prueba Dot-ELISA en estas condiciones no es la adecuada para nuestro interés, porque podría estar reportando falsos negativos, debido a que la estructura de los determinantes antigénicos del AL a pH 6.5 y 7.9 podrían estar alterada y por lo tanto no ser reconocidos por los anticuerpos contra A. pleuropneumoniae presentes en el suero. Sin embargo, a pH 7.2 con antígeno AL el porciento de detección de sueros positivos fué elevado, ésto podría deberse que en estas condiciones se estuvieran reportando falsos positivos, tal vez porque la estructura del antígeno AL a pH 7.2 se altera de tal forma que es reconocida por anticuerpos no especificos. Mientras que los porcentos de detección de sueros positivos que tienen un valor intermedio: 41.93, 36.55, 39.78 y 41.93, correspondientes al antígeno AMC a pH 6.5, antígeno AS a pH 7.2, antígeno AS a pH 7.9 y antígeno AMC a pH 7.9 concuerdan con las condiciones de pH y tipo de antígeno que presentaron una variación poco significativa (Tabla 10).

En el caso donde se utilizó el antígeno AS a pH 6.5, el

por ciento de detección de sueros positivos fué alto (46.23), debido al mismo efecto que se presenta con el antígeno AL a pH 7.2 (detección de falsos positivos).

Con respecto al antígeno AMC a pH 7.2, el por ciento de detección de sueros positivos fué elevado (47.31), del mismo modo en estas condiciones no se observaron variaciones significativas en los resultados (Tabla 10).

En la comparación de los resultados positivos obtenidos con las pruebas Dot-ELISA y Aglutinación con 2-Mercaptoetanol (Tabla 12) se observa que a pH 7.2 usando el antígeno AMC se obtuvo el 100% de detección de sueros positivos probados previamente con 2-ME, mientras que en las demás condiciones de pH y tipo de antígeno los resultados tienen la misma tendencia de los porcentajes de detección de sueros positivos analizados anteriormente en la Tabla 11.

En el caso de los sueros 4, 38 y 87 que son negativos para la prueba de Aglutinación con 2-Mercaptoetanol, éstos mismos fueron positivos para el ensayo Dot-ELISA con la mayoría de las suspensiones de antígeno y pH trabajados, principalmente con el antígeno AMC a pH 7.2, por lo que pensamos que estos sueros son positivos a A. pleuropneumoniae pero no son detectados por la prueba de Aglutinación con 2-Mercaptoetanol debido a la baja sensibilidad de este método, es decir la habilidad de la prueba Dot-ELISA para detectar cantidades pequeñas de anticuerpos es mayor que la prueba de Aglutinación con 2-ME.

Finalmente, por todo lo analizado anteriormente, las condiciones óptimas en el desarrollo de la prueba Dot-ELISA para la detección de anticuerpos contra A. pleuropneumoniae son a pH 7.2 con el antígeno AMC.

6. CONCLUSIONES.

1.- En este trabajo el método de Shock Osmótico fué la técnica de lisado de bacterias más efectiva.

2.- La técnica por Gota es la más adecuada para la adsorción del antígeno al papel de nitrocelulosa.

3.- El Dot-ELISA realizado a pH 7.2 y con el antígeno de Membrana Celular, es un método de diagnóstico rápido y de fácil desarrollo para la detección de anticuerpos contra Actinobacillus pleuropneumoniae.

4.- La técnica Dot-ELISA presentó una sensibilidad mayor que la de la técnica de Aglutinación con 2-Mercaptoetanol.

7. APENDICE.

A) AGAR BHI COMPLEMENTADO.

Extracto de levadura en polvo	0.25 g.
Agar BHI	1.30 g.
Carbonato de sodio	0.53 g.
Suero estéril de equino	2.50 ml.
NAD al 1% en agua destilada	0.25 ml.
Agua destilada	22.25 ml.

B) BUFFER DE FOSFATOS (FOSFATOS 0.1 N pH 5.78).

Solución A (NaH_2PO_4 0.2 M): disolver 27.6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, completando a un litro.

Solución B (Na_2HPO_4 0.2 M): 53.65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en agua destilada, llevando a volumen final de un litro.

Solución A	Solución B	Agua destilada	pH
(ml)	(ml)	(ml)	
342.5	157.5	500	6.5
140	360	500	7.2
35	465	500	7.9

(33)

B) Solución amortiguadora de trietanolamina (TBS).

NaCl (g)	7.5	7.5	7.5
Trietanolamina (ml)	2.8	2.8	2.8
HCl 1 N (ml)	21.3	17.0	12.6
MgCl ₂ ·6H ₂ O (g)	00.1	00.1	00.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O (ml)	0.02	0.02	0.02
Agua destilada (ml)	975.9	980.2	984.6

(28)

C) Solución de leche descremada al 5% en TBS al pH correspondiente.

Skim-Milk	5 g
TBS	100 ml

D) Solución reveladora.

Alfa-cloronaftol	30.0	mg
Metanol	10.0	ml
TBS al pH correspondiente	50.0	ml
H ₂ O	0.05	ml

(28).

8. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- AFSHAR A. (1986). "Dot-enzyme immunossey for visual detection of antibodies to Pseudorabies in swine serum." Jour. Clin. Microbiol. 23(3):563-567.
- 2.- ALTON G.G. (1975). "Laboratory thecniques in Brucellosis." 2th. ed. Genov World Health Organisation. pp. 110.
- 3.- BENDIXEN H. et al. (1981). "Toxcity of Haemophilus pleuropneumoniae for porcine lung macrophhages, peripteral blood monocytes and testicular cells." Inf. Immun. 33(3):673-676.
- 4.- BJORLUND W.E. (1975). "Studies on pneumonia and athrophic rhinitis in pigs. On variation caused by enviroment, breed and sex." Nord. Vet. Med. 17:137-146.
- 5.- BLAXTER K. (1979). "The limits of animal production." Vet. Rec. 105:5-9.
- 6.- BRADFORD M.N. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microquantites of protein." Anal. Biochem. 72, 248-254.

7.- COWAN S.T. et al. (1974). "Manual for identification of medical bacteria." 2th. ed. Cambridge Univ. Press. 137-142.

8.- CHAN CH. et al. (1978). " Isolation and antigen characterization of H. pleuropneumoniae from porcine pneumonia." Jap. Jour. Vet. Sci. 40:103-107.

9.- FENWICK B.W. et al. (1986). "Mechanisms involved in protection provided by immunization against core lipopolisaccharides of Escherichia coli J-5 from lethal Haemophilus pleuropneumoniae infections in swine." Infect. Immun. 53(2):298-304.

10.- FENWICK B.W. et al. (1986). "Mortality in swine herds endemically infected with Haemophilus pleuropneumoniae: effect of immunization with cross-reacting lipopolisaccharide core antigens of Escherichia coli." Am. J. Vet. Res. 47(9):1888-1891.

11.- FENWICK B.W. et al. (1986). "Vaccine potential of Haemophilus pleuropneumoniae oligosaccharide-tetanus toxoid conjugates." Infect. immun. 54(2):583-585.

12.- FENWICK B.W. et al. (1986). "Immune response to the lipopolisaccharides of Haemophilus pleuropneumoniae in convalescent and immunized pigs." Infect. Immun. 54(2):575-582.

- 13.- FENWICK B.W. et al. (1986). "Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polisaccharide preparation from Haemophilus pleuropneumoniae." Am. J. Vet. Res. 47(7):1433-1441.
- 14.- GUNNARSON A. et al. (1977). "Serologic studies on porcine strain of H. parahemolyticus (pleuropneumoniae): Agglutination reactions." Am. Jour. Vet. Res. 38:1111-1114.
- 15.- GUNNARSON A. et al. (1978). "Serologic studies of porcine strains of H. pleuropneumoniae: antigenic specificity and relationship between serotypes." Am. Jour. Vet. Res. 39(8):1286-1292.
- 16.- GUNNARSSON A. (1979). "Serologic studies on porcine strains of Haemophilus parahemolyticus (pleuropneumoniae), extraction of type-specific antigens." Am. Jour. Vet. Res. 40(4):469-472.
- 17.- GUNNARSSON A. (1980). "The enzyme immunosorbent assay for diagnosis of Haemophilus pleuropneumoniae infections in swine." The National Veterinary Institute of Sweden. s/pp.
- 18.- HENRY S. (1982). "Haemophilus pleuropneumoniae bacterias." Proceeding Minessoto Podk Conference. pp. 106-110.
- 19.- INZANA J. (1987). "Serotype especificity and immunogenicity of the capsular polumer of Haemophilus pleuropneumoniae serotype

- 5." Infection and Immunity. 55(7):1587-1589.
- 20.- IVO DOS S.J. (1987). "Dot-enzyme immunoassay: a simple, cheap and stable test for antibody to human immunodeficiency virus (HIV)." Journ. Immunol. Methods. 99:191-194.
- 21.- JERICHO K.W.F. (1968). "Pathogenesis of pneumonia in pigs." Vet. Rec. 82:509-516.
- 22.- KUME K. (1985). "Efficacy of Haemophilus pleuropneumoniae vaccine in pigs." Jpn. Jour. Vet. Sci. 44(2):201-206.
- 23.- LANDQUIST J.O. (1974). "Animal and environment in the production patterning pigs." Acta. Vet. Scand. Suppl. 51.
- 24.- LARIVIERE S. et al. (1987). "Actinobacillus pleuropneumoniae working team." Meeting in Saint-Hyacinthe. Proceedings.
- 25.- LEMAN A.D. et al. (1981). "Diseases of swine." 5th. ed. The Iowa State University Press, Ames (Iowa), USA.
- 26.- LEMAN A.D. et al. (1986). "Disease of swine." 6th. ed. The Iowa State University Press, Ames (Iowa), USA. pp.426-436.
- 27.- LIGGETT A.D. et al. (1987). "Sequential study of lesion development in experimental Haemophilus pleuropneumoniae." Res.

Vet. Snci. 42(2):204-212.

28.- LIN K. et al. (1963). "Dot-Enzimme linked immunosorbent assay: a microtechique for the rapid diagnosing of visceral Leishmaniasis." J. Immunol. Meth. 64:205-214.

29.- LITTLE T.W.A. (1975). "Respiratory disease in pigs a study." Vet. Rec. 96:540-544.

30.- LOMBIN L.H. et al. (1982). "Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia of swine caused by Haemophilus pleuropneumoniae." Can. J. Comp. Med. 46:109-114.

31.- MACCFADDIN F.J. (1980). "Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clinica." Ed. Panamericana, Buenos Aires, Argentina S.A. pp. 274.

32.- MAQUEDA A.J. (1977). "Incidencia de neumonia enzoótica en varios estados productores de cerdos en la República Mexicana." AMVEC, UAM. México:1.

33.- MARGNI A. (1982). "Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos." Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 500-501.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 34.- MEDINA A.G. (1986). "Serotificación de Haemophilus pleuropneumoniae, aisladas a partir de pulmones de cerdos con pleuropneumonia contagiosa obtenidos en el rastro de Ferrería, D.F." Tesis profesional, Q.F.B., Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Mexico.
- 35.- MITTAL K.R. et al. (1982). "Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae. Jour." Clin. Microbiol. 15(6):1019-2023.
- 36.- MITTAL K.R. et al. (1983). "Detection of type-specific antigens in the lungs of Haemophilus pleuropneumoniae; infected pigs by co-agglutination test." Jour. Clin. Microbiol. 18(6):1355-1357.
- 37.- MITTAL K.R. (1984). "A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of H. pleuropneumoniae infections in pigs." Am. Jour. Vet. Res. 45(4):715-719.
- 38.- MITTAL K.R. et al. (1986). "Use of co-agglutination test for direct detection and serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae." Haemophilus pleuropneumoniae compendium. pp. 28-33.
- 39.- MITTAL K.R. et al. (1987). "Effect of heat treatment on the surface antigens of H. pleuropneumoniae." Vet. Rec. Jan. 17:62-65.

- 40.- MORILLA G.H. (1983). "Manual de inmunología." Primera edición. Editorial Diana, S.A. pp. 62-63, 127-144, 395.
- 41.- MORRISON R.B. et al. (1989). "An etiological investigation in to pneumonia in slaughter weight swine." Can. Jour. Comp. Med. pp. 5-12.
- 42.- MUIRHHEAD M.R. (1979). "Respiratory diseases of pigs." Br. Vet. Jour. 135:497.
- 43.- MYLREA P. et al. (1974). "Pleuropneumonia in pigs caused by H. parahemolyticus." Aust. Vet. Jour. 70:255-259.
- 44.- NECOECHEA R. (1980). "Haemofilosis en México." UAM. pp. 1-7.
- 45.- NICOLET J. (1971). "Sur'I hemophilose du porc. III. Differentiation serologique H. parahemolyticus." Zentralbl. Bakteriol. Abt. 1. Orig. B. 216:487-495.
- 46.- NICOLET J. et al. (1971). "Sur'I haemophilose duporc IV. L'epreure de deviation du complement, un test ole despistage des infections a H. pleuropneumoniae." Schweiz. Arch. Tierhcilkd 113:191-200.
- 47.- NICOLET J. (1981). "An enzyme-linked immunosorbent assay using an EDTA extracted antigen for serology of H. pleuropneumoniae." Am. Jour. Vet. Res. 42:2139-2142.

- 48.- NICOLET J. (1985). "Bacteriology and epidemiology of Haemophilus pleuropneumoniae." Compendium of Haemophilus pleuropneumoniae. Roy Schultz Ed., Avoca, Iowa 51521. pp. 7-19.
- 49.- NIELSEN R. (1970). "Pleuropneumonia of swine fremkaldt af H. pleuropneumoniae." Nord. Vet. 22:246-255.
- 50.- NIELSEN R. (1974). "Serological and immunological studies of pleuropneumonia of swine caused by Haemophilus parahemolyticus." Acta. Vet. Scand. 15:80-89.
- 51.- NIELSEN R. et al. (1984). "Serological characterization of 8 Haemophilus pleuropneumoniae strains and proposal of a new serotype: serotype 8." Acta. Scand. 25:96-106.
- 52.- NIELSEN R. (1985). "Serological characterization of Haemophilus pleuropneumoniae (Actinobacillus pleuropneumoniae) strains and proposal of a new serotype:10." Acta. Vet. Scand. 2:581-585.
- 53.- NIELSEN R. (1985). "Diagnosis, Immunity and Control of Haemophilus pleuropneumoniae." Compendium on swine Haemophilus pleuropneumoniae. Roy Schultz. Ed., Avoca, Iowa. pp. 18-22.
- 54.- NIELSEN R. (1985). "Serological characterization of Haemophilus pleuropneumoniae strains and proposal of a new serotype: serotype 9." Acta. Vet. Scand 26:501-512.

- 55.- NIELSEN R. (1986). "Serological characterization of A. pleuropneumoniae strains and proposal of a new serotype: serotype 12." Acta. Vet. Scand. 27:453-455.
- 56.- NIELSEN R. (1987). "Seroepidemiology of Actinobacillus pleuropneumoniae." Les Infections Respiratoires Chez le porc. Proceedings, Montreal Canada.
- 57.- OCHOA G. (1978). "Aislamiento y caracterización de agentes bacterianos de pulmones neumónicos de cerdo." Tesis profesional, MVZ. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México.
- 58.- OLANDER H.J. (1963). "A septicemic disease of swine and its causative agent Haemophilus pleuropneumoniae." USA, Thesis PhD. University of California, Davis.
- 59.- ONTIVEROS C.L. et al. (1988). "Producción de antígenos de H. pleuropneumoniae para las pruebas de Fijación de Complemento y Aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol." Memorias XXIII Congreso AMVEC, León, Gto.
- 60.- PIJOAN C. et al. (1979). "Aislamiento de Haemophilus parahaemolyticus en cerdos con neumonia." Tec. Mec. México. 34:85-87.
- 61.- PIJOAN C. et al. (1983). "Dilution technique for isolation

of Haemophilus from swine lungs collected at slaughter." J. Clin. Microbiol. 18(1):143-145.

62.- PIJOAN C. (1985). "Etiología, Inmunidad y patogenia de las enfermedades respiratorias del cerdo." Med. Vet. 1(11):517-524.

63.- PIJOAN C. et al. (1985). "Enfermedades respiratorias bacterianas del cerdo: control por antibióticos y vacunas en el cerdo." Reunión anual de la Asoc. de porcicultores (ANAPORC). Barcelona, España. pp. 63-72.

64.- PITTMAN M. (1953). "A classification of the hemolytic bacteria of the genus Haemophilus haemolyticus Bergey et al. and Haemophilus paraheamolyticus." Jour. Bact. 65:750-751.

65.- POHL S. et al. (1983). "Transfer of Haemophilus pleuropneumoniae and the Pasteurella haemolytica -like organism causing porcine Necrotic pleuropneumonia to the genus Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatness." J. Syst. Taxon. 33:510.

66.- RAMIREZ N.R. (1980). "Neumonía hemorrágica en cerdos:neumonía por Haemophilus parahemolyticus." UAM-Xoch. México.

67.- RAPP V.J. et al. (1985). "Serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody test in swine." Am. J. Vet. Res. 46(1):185-192.

68.- RAPP V.J. et al. (1985). "Characterization of Haemophilus spp. Isolated from healthy swine and evaluation of cross-reactivity of Complement-Fixing antibodies to Haemophilus pleuropneumoniae and Haemophilus taxon "minor group"." Jour. Clin. Microbiol. 22(6):945-950.

69.- RAPP V.J. (1987). "Prospects for immunization against porcine pleuropneumonia. Les infections respiratoires chez le porc." Vet. Med. School. University of Montreal, Canada, June 22, Proceedings.

70.- ROMERO R.A. (1988). "Análisis de extractos membranales de haemophilus pleuropneumoniae." Tesis de Maestría en Microbiología. FES-Cuautitlán UNAM.

71.- ROSENDAL S. et al. (1981). "Serotyping and detection of Haemophilus pleuropneumoniae by indirect fluorescent antibody technique." Can. J. Comp. Med. 45:271-274.

72.- ROSENDAL S. et al. (1982). "H. pleuropneumoniae serotyping." Jour. Clin. Microb. 16(5):840-843.

73.- SANDFORD E. (1982). "Porcine H. pleuropneumoniae, pathology diagnosis and possible pathogenesis." Amer. Ass. of swine Pract. Annv. Meeting, Iowa, USA. pp 88-94.

74.- SCHULTZ R.A. et al. (1982). "Prevalence of antibodies to Haemophilus pleuropneumoniae in Iowa swine." Am. Jour. Vet. Res. 43:1848-1851.

75.- SCHULTZ R.A. (1983). "Serotyping of 50 different isolates of H. pleuropneumoniae from swine pneumonia in Iowa and surrounding states." VMSAC 78:1451-1453.

76.- SCHULTZ R.A. (1985). "Compendium on swine Haemophilus pleuropneumoniae." SDS. Biotech. Corporation, Ames, Iowa, USA.

77.- SHIEFER B. et al. (1974). "H. parahemolyticus saskatchewan I. Bacteriological and experimental studies." Can. Jour. Comp. Med. 38:105-110.

78.- SHOPE E. (1964). "Porcine contagious pleuropneumonia I and II experimental transmission, etiology and pathology." Jour. Exp. Med. 19:357-368.

79.- STONE B. (1984). "H. pleuropneumoniae hotline." Pig. American October 35.

80.- STRAW B. (1983). "Effect of animal factors, management and disease on productivity of finishing pigs." Thesis PhD, University of Minnesota.

81.- STRAW B.E. et al. (1983). "Pneumonia and atrophic rhinitis in pigs from a test station." Jour. AVMA. 182:607-611.

82.- TAYLOR D.J. (1981). "Pig diseases. 2nd." The Burlintong Press (Cambridge) LTV, Foxton, Cambridge, Great Britain.

83.- TIELSEN M.J.M. (1987). "Buildings, environmental conditions and diseases." Proc. AVEA and Prod. pp.747.

84.- WILLIAMS A. (1967). "Methods in immunology and immunochemistry." Volume I. Academic Press, 1a. Ed. pp. 13-27.

85.- ZALIS M. (1987). Routine Dot-blot assay of multiple serum samples using a simple apparatus. Jour. Immun. Met. 101:261-264.