

10524
35



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

"PURIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LA ANTIGENICIDAD DE UNA
PROTEÍNA DE MEMBRANA DE 37KD DEL *Actinobacillus*
pleuropneumoniae SEROTIPO 1"

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
DIEGO FRANCISCO HERNÁNDEZ RAMÍREZ

ASESOR: Dr. ANDRÉS ROMERO ROJAS
COASESORA: QFB ERNESTINA RAMÍREZ RIVAS

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO. 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de

Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Purificación y estudio de la antigenicidad de una proteína de
membrana de 37kD del Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1

que presenta el pasante: Diego Francisco Hernández Ramírez

con número de cuenta: 9402864-3 para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

AT E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de octubre de 2002

PRESIDENTE

Dr. Susana E. Mendoza Elvira

VOCAL

Dr. Andrés Romero Rojas

SECRETARIO

M.V.Z. Angel G. Martínez Sosa

PRIMER SUPLENTE

O.F.B. Gabriela Escalante Reynoso

SEGUNDO SUPLENTE

M. en C. Norma G. Delgado Buenrostro

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

AGRADECIMIENTOS

*A mis padres
Por darme la vida y quererme tanto
Por sus consejos para mejorar cada día
Por su apoyo y comprensión que me
Ayudo para salir adelante
Por guiar mis pasos y creer en mí y
apoyarme en los momentos decisivos de mi vida
Gracias*

*A mis hermanos
Daniel y Alberto
De quienes siempre he aprendido algo y
Por todos los momentos que hemos pasados juntos*

*A mi hermana
Claudia
Por todo su apoyo y comprensión
Por ser una gran hermana
Por haberme soportado tanto*

*A mi asesor con especial agradecimiento
Dr. Andrés Romero Rojas
Por permitirme realizar esta tesis
Por su paciencia y consejos
Por su amistad*

*A Ernestina
Por su gran ayuda para realizar la tesis
Por ser una gran amiga y consejos
Por sus valiosas enseñanzas*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*A mis compañeros
Cesar, Ulises, Omar, Enrique, Diego, Raúl,
Alfredo, Miguel Ángel, Norma, Eva, Laura.
Por todos los momentos que hemos pasado juntos
Por haberme soportado estos años
Por su amistad*

*A Juan Carlos
Por sus enseñanzas
Por su gran amistad*

*A la Dra. Susana
Por su apoyo incondicional
para la realización de la tesis*

*A mis sinodales
Dra. Susana E. Mendoza
Dr. Andrés Romero
M. V. Z. Ángel G. Martínez
Q. F. B. Gabriela Escalante
M. en C. Norma L. Delgado
Por que fueron una parte importante en
mi formación como profesionista y persona.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

	pág.
I. Abreviaturas.....	1
II. Resumen.....	2
1. Generalidades.....	3
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Morfología.....	3
1.3 Aislamiento.....	4
1.4 Características bioquímicas diferenciales de las especies de <i>Actinobacillus</i> serotipo 1.....	5
1.5 Factores de virulencia	
1.5.1 Cápsula.....	5
1.5.2 Lipopolisacáridos.....	5
1.5.3 Proteínas de membrana externa.....	6
1.5.4 Proteínas de unión a transferrina.....	6
1.5.5 Proteasas.....	7
1.5.6 Toxinas Apx.....	7
1.5.7 Fimbrias.....	8
1.6 Pleuropneumonias contagiosa porcina.....	9
1.6.1 Transmisión.....	9
1.6.2 Período de incubación.....	9
1.6.3 Morbilidad y mortalidad.....	9
1.6.4 Patogenia.....	9
1.7 Diagnóstico.....	10
1.8 Vacunación.....	11
1.9 Control.....	12
1.10 Justificación.....	13
1.11 Hipótesis.....	13
2. Objetivos.....	14
3. Metodología.....	15
3.1 Reactivos.....	16
3.2 Medios de cultivo.....	16
3.3 Pruebas bioquímicas de identificación del microorganismo.....	17
3.3.1 Tinción de Gram.....	17
3.3.2 Prueba de satelitismo.....	17
3.3.3 Prueba de CAMP.....	17
3.3.4 Prueba de ureasa.....	17
3.4 Cultivo y cosecha de la cepa de <i>A. pleuropneumoniae</i>	18
3.5 Cuantificación de proteínas (método de Bradford).....	18
3.5.1 Preparación del reactivo.....	18
3.5.2 Preparación de los estándares de Proteínas.....	18
3.6 Solubilización de membranas.....	19
3.7 Electroforesis de los extractos membranales.....	19

E

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

3.7.1 Geles discontinuos de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)	19
3.7.1.1 Gel separador	19
3.7.1.2 Gel concentrador	19
3.7.2 Corrimiento de las muestras	20
3.7.2.1 Tinción de los geles (SDS-PAGE.)	20
3.7.3 Curva patrón de movilidad relativa de proteínas	20
3.7.3.1 Cálculo del coeficiente de movilidad relativa de las proteínas (Rf)	21
3.8 Electrotransferencia	21
3.9 Electroelución	22
3.10 Columna de cromatografía (Cromatografía de exclusión molecular)	22
4. Resultados	23
4.1 Pruebas bioquímicas de identificación de <i>A. pleuropneumoniae</i>	23
4.2 Obtención de los extractos membranales	23
4.3 Curva patrón de proteínas (método de Bradford)	23
4.3.1 Cuantificación de las proteínas de los extractos membranales	24
4.4 Obtención del patrón electroforético	25
4.4.1 Patrón electroforético	25
4.4.2 Patrón electroforético del extracto membranar	26
4.5 Determinación de la inmunogénicidad (electrotransferencia) de las proteínas del extracto membranar	27
4.6 Electroelución	28
4.7 Cromatografía de exclusión molecular	28
4.7.1 Electroforesis de las muestras recolectadas	29
4.7.2 Determinación de la concentración final	30
5. Discusión	31
6. Conclusiones	34
7. Bibliografía	35
8. Apéndice	42

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Índice de tablas**pág**

Tabla 1. Características más comunes de la especie de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	5
Tabla 2. Preparación de los estándares para la curva de calibración (método de Bradford).....	18
Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1.....	23
Tabla 4. Valores obtenidos de la curva patrón (método de Bradford).....	23
Tabla 5. Concentración de proteína del extracto membranal de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1.....	24
Tabla 6. Valores del coeficiente de movilidad relativa (Rf) de las proteínas estándares.....	25
Tabla 7. Peso molecular aproximado de las proteínas del extracto membranal de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1.....	27
Tabla 8. Absorbancia de los tubos recolectados de la cromatografía de exclusión molecular.....	28
Tabla 9. Determinación de la concentración final de la proteína purificada.....	30

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5

Índice de figuras	pág
Figura 1. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en microscopia electrónica.....	4
Figura 2. Diagrama de flujo que muestra los diferentes pasos realizados en este proyecto.....	15
Figura 3. Sistema de electroforesis.....	19
Figura 4. Sistema de electrotransferencia.....	21
Figura 5. Patrón electroforético del extracto membranal de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1.....	25
Figura 6. Patrón inmunogénico de las proteínas membranales de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1.....	27
Figura 7. Electroforesis de las muestras dializadas.....	30
Figura 8. Electrotransferencia de la proteína purificada.....	30

Índice de gráficas

Grafica 1. Curva patrón de proteínas (método de Bradford).....	24
Grafica 2. Curva patrón de proteínas estándares (marcadores de peso molecular).....	26
Grafica 3. Curva de absorbancia de los tubo recolectados de La cromatografía de exclusión molecular.....	29

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

I. Abreviaturas

ADN: Ácido deoxirribonucleico
CAMP: Christie, Atkins y Munich-Petersen
HSP: Proteínas de choque térmico
kD: kiloDaltón
LPS: Lipopolisacáridos
mg: miligramos
mL: mililitros
NAD: Nicotinamida Adenin Dinucleótido
nm: nanómetros
OMPs: Proteínas de membrana externa
PBS: Solución amortiguadora de fosfatos
PCP: Pleuropneumonia contagiosa porcina
PM: Peso molecular
PNC: Papel de nitrocelulosa
PPLO: Organismos parecidos a pleuropneumoniae
RTX: Toxina repetitiva
SDS: Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE: Gel de electroforesis de poli(acrilamida-dodecilsulfato de sodio)
SSF: Solución salina fisiológica
Tbp 1: Proteína de unión a transferrina 1
Tbp 2: Proteína de unión a transferrina 2
TBS: Amortiguador salina-tris
TEMED: N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina
TTBS: Solución de lavado tween
ug: microgramos
uL: microlitros

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. RESUMEN

La PCP es causada por *A. pleuropneumoniae*, está es una enfermedad devastadora, que causa grandes pérdidas económicas, debido a su alta mortalidad y a la pobre conversión alimenticia en animales con infección crónica. Los cerdos con mayor susceptibilidad son las piaras que van de 2 a 6 meses de edad. La enfermedad puede cursar en forma hiperaguda, aguda subaguda o crónica.

A. pleuropneumoniae tiene una alta especificidad por el cerdo, al parecer es ocasionada porque el cerdo en su epitelio de la mucosa respiratoria, posee receptores para las fimbrias citoadherentes, la bacteria se adhiere a la mucosa y no puede ser removida, la vacunación sólo disminuye la mortalidad, pero no previene la enfermedad. Ya que los cerdos todavía pueden volverse a infectar y presentar una infección subclínica o crónica. Por lo que, es necesario buscar nuevas formas de tratamiento.

El objetivo del presente trabajo fue identificar y purificar una proteína inmunogénica de membrana del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1. Para tal efecto; se inoculó una suspensión bacteriana en cajas de PPLO complementado con NAD (0.01%) y se incubó a 37°C por 24hrs. Después del tiempo de incubación se obtuvieron las bacterias cosechando con SSF y centrifugando el medio de cultivo a 1000g, posteriormente se hicieron tres lavados con SSF a 1000g durante 10 min. se resuspendió la pastilla obtenida con agua desionizada y se mantuvo en hielo durante 30min, se repitió el mismo paso hasta que la pastilla fue mínima. El sobrenadante, se centrifugó a 17000g durante 1 hora para obtener los extractos membranales, se determinó el peso molecular de las proteínas del extracto membranal por SDS-PAGE y se realizó una electrotransferencia (inmudetección) para determinar la inmunogenicidad de las mismas encontrándose tres bandas bien definidas, de proteínas de peso molecular aproximado de 37, 54, 80 kD que fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de cerdo infectados por *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1. Se realizaron 35 geles de SDS-PAGE, posteriormente la banda correspondiente a la proteína de 37 kD se cortó y se colocó en el tubo para electroelución, obteniéndose una sola banda después de este procedimiento, para la separación del azul de Comassie y el SDS el extracto obtenido de la electroelución se corrió en una cromatografía de exclusión molecular (sephadex G-25) la obtención y purificación servirá para la utilización y el desarrollo en estudios posteriores de nuevas metodologías de vacunación, diagnóstico y tratamiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.GENERALIDADES

1.1 Antecedentes

Las primeras observaciones realizadas de la PCP se reportaron en 1961 por Mathews y Pattinson, posteriormente: Olander en Estados Unidos (1963) aisló una bacteria de un cerdo con neumonía, ésta bacteria requería el factor V (NAD) para su crecimiento, además producía una hemólisis marcada en agar sangre por lo que la denominaron *Haemophilus parahemolyticus*. En ese mismo año se reportaron brotes de una infección sobreaguda similar en Argentina y al agente causal se le denominó *Haemophilus pleuropneumoniae* (Pittman, 1953 y Shope, 1964) llamado así por su diferencia en morfología y bioquímica con *H. parahemolyticus*.^{29, 66}

A finales de los años sesenta y durante los años setenta, debido a las altas incidencias en el mundo, se realizaron grandes investigaciones en Europa con Nicolet (1968), Little y Harding (1971), Gunnarson y col. (1978). En Australia con Mirela y col. (1974), en Taiwán por Hsu y col. (1976) en Estados Unidos con Cole (1978) encontrándose que se trataba del mismo microorganismo, Killian y col. (1978) reportaron 5 serotipos. Posteriormente, en 1982 fueron reportados los serotipos 6 (Nielsen), 7 (Rosendal y Boyd) y 8 (Nielsen y O'connor), en 1985 el 9 y 10 (Nielsen), en 1986 el 11 (Kamp) y 12 (Nielsen). En 1997 se adicionaron dos serotipos el 13 y 14 (Nielsen), en el año 2002 Blackall propone la adición de un nuevo serotipo, el 15 que anteriormente estaba considerado como parte del serotipo 12, pero se encontró que es diferente al serotipo 12 verdadero por su característica genotípica.^{12, 47, 63, 64}

Diversos estudios en México demostraron la alta predominancia del serotipo 1, aunque también se detectaron otros serotipos, pero en menor proporción.²⁰

1.2 Morfología

Actinobacillus pleuropneumoniae, es una bacteria Gram-negativa, pleomórfica (Fig. 1), presentándose generalmente como un coccobacilo, es una bacteria encapsulada que mide entre 0.5 y 1.5 micras de largo por 0.3 micras de ancho, se puede encontrar en pares o cadenas, no produce esporas y carece de flagelos. Sin embargo, posee fimbrias citoadherentes, es anaerobia facultativa. En medios enriquecidos forma colonias pequeñas en forma de gota de rocío y crecen a temperaturas entre 25 a 45°C, siendo la óptima a 37°C y a un pH cercano a la neutralidad.^{4, 21, 57, 59}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig 1. *Actinobacillus pleuropneumoniae* en microscopia electrónica⁴¹

La característica fundamental de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, es la dependencia del factor V, basándose en el requerimiento de este, *Actinobacillus pleuropneumoniae* se divide en dos biotipos que son:

El biotipo 1, cepas NAD-dependientes. Anteriormente conocida como *Haemophilus pleuropneumoniae*. Pero, en estudios realizados sobre bases fenotípicas y genotípicas de la bacteria, hicieron que se transfiriera de *Haemophilus pleuropneumoniae* a la especie *Actinobacillus pleuropneumoniae* NAD-dependientes, debido a su mayor similitud fenotípica y un alto porcentaje de hibridación de ADN con *Actinobacillus lignieressi* que con *Haemophilus influenza*, y el biotipo 2, constituida por la especie *Pasteurella haemolyticus*-semejante que posteriormente se denominó *Actinobacillus pleuropneumoniae* NAD-independiente^{20, 61, 68, 73}

Actualmente se conocen quince serotipos (características dadas por los patrones electroforéticos de las proteínas de la membrana externa). Además se han descrito subdivisiones para los serotipos 1 y 5, llamados 1a, 1b, 5a y 5b, haciéndolo un agente infeccioso importante para la industria porcina.⁴³

1.3 Aislamiento

Para el aislamiento es importante proporcionar *in vitro* el NAD, mediante la utilización de otro organismo (cepa nodriza), se siembra una estria de la cepa nodriza sobre un cultivo sospechoso de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, observándose un crecimiento a las 24 horas alrededor de la cepa nodriza, a este fenómeno se conoce como "satelitismo". Los microorganismos más utilizados como cepa nodriza se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* especies del género *Bacillus* y especies del género *Pseudomonas*, el empleo de *Staphylococcus aureus* permite además de observar el fenómeno de CAMP en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

donde la toxina β (hemolisina) del *Staphylococcus aureus* actúa en forma sinérgica con la cohemolisina de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.^{20, 25, 27, 59}

1.4 Características bioquímicas diferenciales de la especie de *Actinobacillus*

Las características generales de la especie de *Actinobacillus* son mostradas en la tabla 1.

Reacción	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>A. equuli</i>	<i>A. ureae</i>	<i>A. hominis</i>	<i>A. lignieraei</i>	<i>A. maris</i>	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. suis</i>	<i>A. minor</i>
Dependencia factor V	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Fosfatasa alcalina	+	+	+	+	+	-	+	+	ND
Oritrina decarboxilasa	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Hidrólisis esculina	-	-	-	(V)	-	+	-	+	-
Ureasa	-	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	+	-	+	-	-	(+)	+	+
de ácido:									
Arabinosa	-	V	-	-	V	-	-	+	-
Celobiosa	-	-	-	-	-	-	-	+	ND
Galactosa	+	V	-	+	V	-	V	V	ND
Lactosa	-	+	-	(V)	V	-	(+)	(+)	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	V	+	+
Manitol	(+)	+	(+)	+	+	+	+	-	-
Manosa	V	+	V	-	+	+	+	+	+
Melibiose	-	+	-	(+)	-	-	V	+	ND
Rafinosa	-	+	-	+	V	-	V	+	+
Salicina	-	-	-	V	-	-	+	+	ND
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealosa	-	(+)	-	+	-	-	-	+	ND
Xilosa	+	+	-	+	(+)	-	+	+	ND

* Símbolos y abreviaturas: +, reacción positiva; -, reacción negativa; V, reacción variable; ND, no determinada

Tabla 1. características más comunes de la especie de *Actinobacillus*⁵⁷

1.5 Factores de virulencia

Los factores de virulencia ya descritos de *A. pleuropneumoniae*, incluyen la cápsula, los lipopolisacáridos (LPS), las proteínas de membrana, las proteínas de unión de transferrina (Tbp1 y Tbp2), las proteasas, las toxinas ApX y las fimbrias estableciéndose a continuación las características de cada uno de ellos:

1.5.1 Cápsula

La cápsula se encuentra en todas las cepas de *A. pleuropneumoniae*. La estructura química ya está elucidada y consiste de derivados repetitivos de oligosacáridos. Está protegida al *A. pleuropneumoniae* contra la fagocitosis, el daño por el complemento y es requerida como un factor de virulencia de la bacteria^{11, 57}

1.5.2 Lipopolisacáridos

Los LPS son el mayor constituyente de todas las bacterias Gram negativas. Están formados de un polisacárido y un lípido A. Además, de un core y una cadena lateral O, los LPS son considerados como un componente tóxico (endotoxina)¹⁸

Aunque se ha demostrado que los LPS purificados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* tiene un alto potencial de daño al tejido, estos no son los responsables de las lesiones típicas. Pero, pueden contribuir al daño en los pulmones no hemorrágicos. Ya que los LPS aumentan el efecto de las toxinas Apx's sobre los fagocitos. También, están implicadas en la adhesión de *A. pleuropneumoniae* a la mucosa traqueal y traquea, además de las secciones frías del pulmón^{35, 83}

1.5.3 Proteínas de membrana externa

Varias OMPs de *A. pleuropneumoniae* son reconocidas por Anticuerpos presentes en sueros de cerdos infectados. Estas pueden inducirse bajo condiciones de restricción de hierro o adición de maltosa. Aunque, difieren para la mayoría de los serotipos. Presentan varias en común, Romero y col. (1997) encontraron un patrón peculiar de dos proteínas en común entre los serotipos 1, 2, 5 y 7, con pesos de 43 y 50 kD. Se han reportado otras como el péptidoglicano asociado a la lipoproteína PalA de 14 kDa, otra termosensible que varía de 29 a 41 kDa, una principal que varía de 32 a 42 kDa dependiendo del serotipo y una de 48 kDa. Otras posibles proteínas de membrana externa son las Tbp's que son expresadas entre los serotipos. Van-Overbeke (2002) encontró una de aproximadamente 55kD que es expresada por varios serotipos que puede estar relacionada junto con la fimbria tipo 4 a la adhesión^{69, 71, 82, 85}

Para el serotipo 1 se han realizado diversas investigaciones relacionadas a las OMPs. Romero y col. (1997) describen una similitud antigénica entre las proteínas de 30 y 24 kD que respondieron con sueros de dos especies diferentes (cerdo y conejo). Hernández y col. (1997) identificaron proteínas inducidas por choque osmótico en extractos membranales de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 con pesos moleculares de 11.44, 13.4, 13.88, 40.26 y 65.33 kD. Además, se han reportado a las HSP 107 y HSP 42 como proteínas con alta inmunogenicidad cuando son enfrentadas con suero de cerdo infectado^{3, 5, 38, 69, 71}

1.5.4 Proteínas de unión a transferrina

El hierro es esencial para el crecimiento de *A. pleuropneumoniae*. Sin embargo, no está fácilmente disponible en el ambiente extracelular del hospedero, debido a que en él, hay una complejación del hierro con glicoproteínas, transferrinas y lactoferrinas. Por lo que, varias especies de *Actinobacillus*, *Haemophilus* y *Pasteurella* poseen un mecanismo de adquisición de hierro,

6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

involucrando la unión directa a la transferrina del hospedero con proteínas receptoras en la superficie de la bacteria (llamadas proteínas de unión a transferrina) estas proteínas son expresadas bajo condiciones limitadas de hierro^{25, 76}

Las proteínas de unión a transferrina son denominadas: Tbp 1 y Tbp 2, estas son específicas para la transferrina del hospedero. La Tbp 1 de 110 kDa es probablemente transmembranal que sirve como canales de transporte de hierro a través de la membrana externa. Mientras que la Tbp 2 (60-70 kDa) es una lipoproteína enlazada a la membrana externa por residuos de ácidos grasos en su N-terminal⁴¹

El camino de adquisición del hierro fue propuesto por Kirby (1995) involucrando la unión y el retiro de hierro de la superficie por acción coordinada de Tbp1 y Tbp2 seguido por el transporte de hierro a través de la membrana externa vía Tbp 1 y unión de hierro por una proteína periplásmica. Bog (2001) encontró que la Tbp2 no es expresada en medios ricos de hierro por algunos serotipos excepto los serotipos 5a, 5b y 6 donde es débilmente expresada.^{13, 76}

1.5.5 Proteasas

Actinobacillus pleuropneumoniae, secreta proteasas que degradan la colágena porcina, la IgA porcina y humana, además de la hemoglobina humana. La degradación de la IgA facilita la extensión mucosal de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y es una ayuda para la obtención de hierro.^{4, 60}

En estudios *in vitro*, se observó que *A. pleuropneumoniae* libera vesículas, que contienen las proteasas y las toxinas Apx, aunque su mecanismo de activación es desconocido. Se piensa que las proteasas pueden activarse durante la secreción. Esto tal vez debido a la liberación de un inhibidor u otra modificación molecular, como en un proceso proteolítico por la bacteria o por las proteasas liberadas del hospedero durante la lisis celular. En estudios realizados en *Pseudomonas aeruginosa* por Kadurugamuwa y Beveridge (1995) mostraron similares resultados, trabajando con la elastasa y proteasa alcalina que son liberadas en vesículas, sugieren que las enzimas se encuentran en un estado de proenzimas en el citoplasma, y su activación es promovida por la unión de la vesícula a la membrana removiendo el inhibidor y activando las enzimas^{44, 64}

1.5.6 Toxinas Apx

Entre los diferentes serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se encuentran dos exotoxinas hemolíticas (ApxI y ApxII) y una exotoxina no hemolítica (ApxIII) ya descritas. Estas son tóxicas para los macrófagos alveolares y neutrófilos porcinos, pertenecen a la familia de las RTX^{25, 46, 52}

Las RTX son un grupo de toxinas las cuales son diferentes entre bacterias Gram negativas patógenas, que fueron descritas por Frey y col., en 1994. Son

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

formadoras de canales ión-permeables, termolábiles, calcio-dependientes, con dominio hidrofílico N-terminal y ricos en glicina. Su actividad depende de la temperatura (0° a 40°C) siendo más rápida a 37°C. Marer y cols. (1996) encontraron un incremento de poros en membranas hechas de asolectinas o fosfatidiletanolamina, mientras que fueron relativamente inactivadas en membranas hechas de otros lípidos^{10, 52}

La ApxI es una proteína hemolítica y citolítica fuerte con un peso molecular de 105 kDa. Anteriormente llamada hemolisina I o citolisina I, y muestra una gran similitud a la alfa-hemolisina de *E. coli*. Es producida por los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11 así como *A. suis*^{9, 45, 52}

La ApxII es medianamente hemolítica y citolítica la cual anteriormente fue llamada hemolisina II o citolisina II. Tiene un peso molecular de 103 kDa, es producida por todos los serotipos, excepto el serotipo 10, también es producida por *A. suis*^{39, 45}

La ApxIII no es hemolítica. Pero es fuertemente citolítica, anteriormente llamada pleurotoxina, es producida por el biotipo 1 serotipo 2, 3, 4, 6 y 8, tiene un peso molecular de 120kDa. En experimentos realizados enseña una actividad cohemolítica con la esfingomielasa de *Staphylococcus aureus*^{9, 52}

Las Apx's juegan un papel importante en la patogénesis de la PCP. Ellos son la causa de evasión de la primera línea de defensa del hospedero. Las toxinas Apx's forman poros en la membrana de los fagocitos y otras células blanco (células epiteliales), resultando un choque osmótico y la muerte celular. Son los causantes del desarrollo de las lesiones, y además provocan el estallido respiratorio en macrófagos y neutrófilos resultando un exceso en la producción de radicales libres^{10, 25, 36, 45}

1.5.7 Fimbrias

Las fimbrias juegan un papel importante en la adhesión a la mucosa traqueal, ya se ha identificado sobre la superficie celular de *A. pleuropneumoniae*, la fimbria tipo 4 (por microscopia electrónica) con un peso aproximado de 17kDa. Esta es una fimbria altamente conservada entre bacterias Gram-negativas patógenas incluyendo *Moraxella bovis*, *Moraxella nonliquefaciens*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitis*. En un estado inicial de infección, enseña un alto incremento en la interacción bacteria-bacteria, promoviendo así la adhesión y la colonización en el hospedero^{35, 50}

En México se han realizado una serie de trabajos tratando varias especies (cerdos, conejos y ratones) por nebulización con *A. pleuropneumoniae* solo los cerdos se infectaron y murieron con inóculos que variaron de 2×10^4 hasta 2×10^8 UFC/mL, demostrando así su alta especificidad en los cerdos^{3, 96}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.6 PLEUROPNEUMONIA CONTAGIOSA PORCINA (PCP)

1.6.1 Transmisión

La ruta principal de diseminación de *A. pleuropneumoniae* es por vía aerógena y la transmisión directa es por contacto directo entre los cerdos o por gotas en distancias cortas. En brotes agudos la infección puede diseminarse de un corral a otro. La transmisión indirecta es por exudado nasal impregnado en ropa y calzado. La supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en el ambiente es de corta duración, pero si esta protegido con una capa de moco puede sobrevivir por algunos días^{6, 35, 66, 86}

1.6.2 Periodo de incubación

Depende de la cantidad de microorganismo inhalado, del serotipo involucrado, del sistema inmune, las condiciones ambientales y el manejo del animal. En condiciones naturales puede variar de 12 a 24 horas, hasta varias semanas.⁸⁶

1.6.3 Morbilidad y mortalidad

La PCP causada por *A. pleuropneumoniae* es una enfermedad devastadora, que ocasionan grandes pérdidas económicas, debido a su alta mortalidad y a la pobre conversión alimenticia en animales con infección crónica. Los cerdos con mayor susceptibilidad, son las crías que van de 2 a 6 meses de edad. La enfermedad puede cursar en forma hiperaguda, aguda subaguda o crónica. Las dos primeras se caracterizan por una neumonía hemorrágica necrosante, asociada a una pleuritis fibrinosa, mientras la lesión crónica se distingue por un infarto y encapsulamiento del tejido^{7, 29, 56, 62}

1.6.4 Patogenia

A. pleuropneumoniae tiene una alta especificidad por el cerdo, al parecer es ocasionada porque en el epitelio de la mucosa respiratoria, el cerdo posee receptores para las fimbrias citoadherentes, cuando la bacteria ya esta adherida a la mucosa no puede ser removida⁸⁹

Los investigadores sugieren que las endotoxinas son la causa inicial de cambios patológicos. Además, la cápsula que protege a las bacterias de muchos mecanismos de defensa del hospedero, también esta involucrada en la formación de microcolonias que pueden ser aerosolizadas o aspiradas hacia las vías respiratorias bajas logrando una penetración profunda favoreciendo la infección^{11, 15, 47}

Una vez establecida la bacteria en el pulmón, excreta sus exotoxinas RTX (ApxI y ApxII principalmente) y proteasas que son las responsables de las lesiones iniciales de hemorragia y necrosis. Yagihashi y cols. (1984) encontró que una

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

infección previa de *Mycoplasma hyopneumoniae* incrementa la susceptibilidad para la infección con *A. pleuropneumoniae*. Además, la mezcla de infecciones de *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae* son comunes en puercos^{39, 49, 69}

Chiers y cols. demostraron que en las amígdalas a las 24hrs de inoculación (con *A. pleuropneumoniae*) se observa una necrosis del epitelio estratificado, y una alta infiltración de neutrófilos con una dilatación de los vasos en el tejido linfoide²⁴

1.7 Diagnóstico

Los métodos más utilizados para diagnosticar una infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* son:

- Signos clínicos
- Ensayo post-mortem
- Aislamiento de la bacteria en el tracto respiratorio
- Serología

a) Signos clínicos

El diagnóstico presuntivo puede llevarse mediante la observación de los signos clínicos de la enfermedad, los más representativos son: pérdida repentina del apetito, seguida por fiebre alta, en casos agudos también se presenta cianosis de la piel, disnea y tos suprimida, los animales se ven obligados a respirar por el hocico, poco antes de la muerte puede haber una descarga de espuma sanguinolenta por el hocico y fosas nasales, la muerte puede ocurrir en menos de 24 horas después de haber iniciado los signos. En el cuadro sobreagudo también llamado neumonía hemorrágica puede presentarse muerte súbita de los animales sin presentar una sintomatología^{65, 66, 67, 68}.

b) Ensayos post-mortem

Las lesiones producidas por este microorganismo están establecidas principalmente en la cavidad torácica, y varían en relación a la severidad de la enfermedad. Se pueden observar: focos de pleuroneumonía fibrosa necrosante, hemorragia, edema, se puede encontrar exudado espumoso en tráquea y bronquios, amígdalas necrosadas, pericarditis fibrosa, ascitis, también son observados trombos en arterias y alvéolos^{49, 67, 68}

c) Aislamiento

Este es un diagnóstico confirmatorio, se hace mediante el aislamiento y tipificación del microorganismo a partir de los pulmones o en cavidad nasal de cerdo afectados. Pero, el aislamiento por métodos rutinarios de cultivo es difícil, ya que es común el crecimiento de otros microorganismos como *Pausterella multocida*, la cual en algunas ocasiones se ha demostrado que inhibe el crecimiento del *Actinobacillus pleuropneumoniae*, por lo que es necesario un

medio selectivo. Wilson et al. (1987) describe un medio selectivo para *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Este medio contiene 20 µg/mL agar soya tripticasa, 50 µg/mL sangre de carnero, 0.1% NAD, cristal violeta, 16 µg/mL de espectromicina y 60 µg/mL de bacitracina, estos antibióticos son para inhibir el crecimiento de otras bacterias que puedan interferir en la identificación de *A. pleuropneumoniae*^{87, 88}

d) Serología

Para el diagnóstico presuntivo de la PCP se disponen de las siguientes pruebas: aglutinación con partículas de látex, el pleurotest, aglutinación con 2-mercaptoetanol, hemoaglutinación indirecta, fijación del complemento, inmunofluorescencia y ELISA (inmunoabsorción ligado a enzima) Pero, estas pruebas sólo detecta los anticuerpos (el contacto con el antígeno) y no establece el curso de la infección^{29, 80}

1.8 Vacunación

Para la vacunación contra *A. pleuropneumoniae* son comúnmente utilizadas bacterias completas (bacterinas) o fantasmas (formados por la expresión del gen E lítico del fago phiX173 que forma poros transmembranales resultando en la liberación del contenido citoplasmático) Sin embargo, tal vacuna induce protección únicamente contra serotipos homólogos dando una protección incompleta contra la infección. Loftager y cols., (1993) por aerosolización lograron obtener un pobre título de anticuerpos IgG y un discreto aumento de IgA mediante la utilización de una bacterina de *A. pleuropneumoniae* serotipo 2 y Quil A como adyuvante. Bossé y col. (1992) obtuvieron inmunidad contra LPS, cápsula y hemolisina a los siete días de inoculación con un incremento de IgG^{14, 35, 40, 48, 50, 51, 82}

La vacuna combinada de Apx y Tbp dio resultados parcialmente satisfactorios, reduciendo los signos clínicos y mortalidad. Pero los cerdos que son expuestos al agente infeccioso todavía pueden volverse a infectar y presentar una infección subclínica o crónica. Además, la resistencia a la infección y el desarrollo de la enfermedad es en parte atribuido a la resistencia innata y los mecanismos inmunológicos, debido a que estos pueden alterar la selectividad y la eficiencia de la vacunación^{9, 40, 51}

1.9 Control

No es posible un control sólo por vacunación, debido a que se disminuye la mortalidad, pero no se previene la enfermedad. Por lo que, es necesario detectar a los portadores, además del destete temprano (la inmunidad materna dura de 5 a 9 semanas) y la separación de cerdos jóvenes de los otros animales. En piaras de crianza donde es necesario la introducción constante de animales, sólo deben introducirse aquellos seronegativos y deben guardar cuarentena de 30 a 45 días²⁹

Otras medidas incluyen limitación del estrés, separar y no mezclar cardos, mantener la temperatura favorable y ventilación adecuada^{65, 64}



1.10 Justificación

Actinobacillus pleuropneumoniae, es el agente etiológico de la PCP. Esta es una enfermedad distribuida mundialmente y tiene grandes implicaciones en la industria porcina. Se presenta de dos formas, una como enfermedad aguda con un deceso del cerdo en 24-48 horas y la otra como una enfermedad crónica persistente.

La lesión típica incluye una neumonía necrótica y hemorrágica con adhesión pleural fibrinosa. Existen actualmente varios tipos de vacunas que dan una protección limitada. Además, se han realizado grandes esfuerzos para entender la patogénesis de la infección. No obstante el mecanismo involucrado en la interacción bacteria-hospedero es parcialmente conocido, y los factores responsables para varios fenómenos durante la PCP no son claros. Por lo que, es necesario el desarrollo de nuevas herramientas eficientes para el control, prevención y tratamiento de la enfermedad.

1.11 Hipótesis

Si purificamos la proteína inmunogénica de 37kD de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, entonces se podrá realizar un estudio detallado de su función y el posible desarrollo de nuevos tratamientos contra el agente patógeno de la PCP

TESIS
FALLA DE ORIGEN

2. Objetivos

OBJETIVO GENERAL

- Purificar la proteína potencialmente inmunogénica de membrana de 37kD de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 importante para el estudio de control, diagnóstico y tratamiento de la PCP.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la inmunogenicidad de las proteínas de membrana de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, por medio de la utilización de anticuerpos presentes en el suero de cerdo infectado con *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.
- Purificar la proteína inmunogénica membranal de 37 kD de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, por medio del método de electroforesis
- Obtener la proteína purificada de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, por los métodos de electroelución y cromatografía de exclusión molecular

TEC.
FALLA DE ORIGEN

3. Metodología

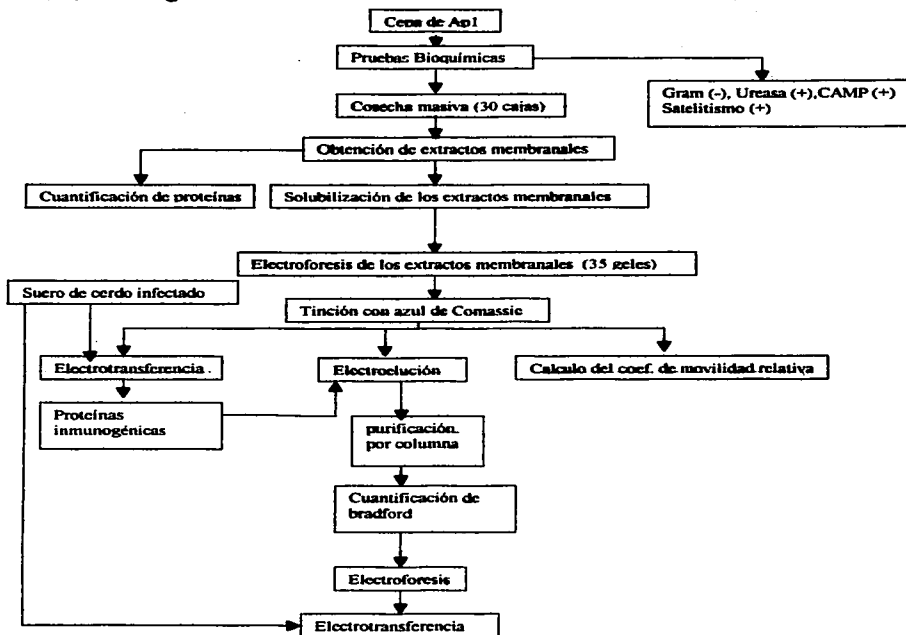


Fig. 2 Diagrama de flujo que muestra los diferentes pasos realizados en este proyecto

FALLA DE ORIGEN

3.1 Reactivos

Los reactivos que se utilizaron son de la marca Baker, Merck y Sigma de grado analítico y el medio utilizado es de la marca Bioxon y Difco. El conjugado de la proteína A peroxidada y los marcadores de peso molecular son de marca Sigma

Soluciones preparadas (ver apéndice 1)

- Solución salina fisiológica
- Solución triton X-100 al 2%
- Reactivo de Bradford
- Amortiguador tris-HCl, pH = 7.4
- Amortiguador tris-HCl, pH = 6.8
- Amortiguador tris-HCl, pH = 8.8
- Dodecilsulfato de sodio al 10%
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
- Persulfato de amonio
- Solución desafiadora I
- Solución desafiadora II
- Amortiguador para electrodos (amortiguador de corrimiento)
- Amortiguador de muestra
- Acrilamida-bisacrilamida 30%
- Salina-tris pH = 7.5
- Solución de lavado Tween 20
- solución bloqueadora
- Amortiguador de corrimiento para transferencia
- Solución reveladora
- Solución cristal violeta-oxalato de amonio
- Solución de lugol
- Solución alcohol-acetona (1:1)
- Solución de safranina al 2.5%
- Nicotinamida adenin dinucleótido al 0.01%
- Reactivo de Bradford
- Solución de albúmina al 0.01%
- Solución digestora (amortiguador de muestra)
- Solución de revelado (alfa-cloronaftol)
- Amortiguador de electroelución
- Solución de sephadex G-25
- Solución amortiguadora de fosfatos

TEST
FALLA DE ORIGEN

3.2 Medio de cultivo

Se utilizaron medios de cultivo convencionales de agar PPLO sólo y con suplemento de NAD al 0.01%, agar urea de Christensen y agar sangre⁷⁰

3.3 Pruebas de identificación del microorganismo

3.3.1 Tinción de Gram^{56, 57}

1. Se preparó un frotis para tinción de cultivo de 24 hrs
2. La fijación se realizó con calor
3. Se añadió la solución de cristal violeta-oxalato de amonio durante 1 min.
4. Se lavó con el chorro de agua
5. Se agregó solución de lugol durante 30 seg.
6. Se dejó escurrir el lugol sin lavar
7. La decoloración se hizo con gotas de alcohol-acetona.
8. Se lavó rápidamente con agua
9. Contrastándose con safranina al 0.5%, durante 1 min.
10. Se lavó y se dejó secar la laminilla
11. Observándose posteriormente en el microscopio con el objetivo de 100x

3.3.2 Prueba de satelitismo^{53, 57}

1. Se inoculó en toda la caja de agar PPLO la cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1
2. Se colocó una estria de la cepa nodriza (*Staphylococcus aureus*) encima del estriado de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1
3. Se dejó incubar a 37°C, reportándose el resultado a las 24 horas

3.3.3 Prueba de CAMP^{53, 57, 66}

La prueba de CAMP es la capacidad para aumentar la hemólisis producida por una toxina de *Staphylococcus aureus* (beta-lisina),

1. Se colocó una estria lineal de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 en la placa de agar sangre
2. Posteriormente se colocó otra estria lineal con la cepa nodriza (*Staphylococcus aureus*) siendo esta perpendicular a la anterior. Pero, sin tocar a la estria de *A. pleuropneumoniae*
3. Se dejó incubar por 24 horas a 37°C, reportándose posteriormente el resultado

3.3.4 Prueba de ureasa^{57, 66, 81}

Se inoculó por punción el agar urea de Christensen y se incubaron a 37°C, observándose el resultado a las 36 hrs,

TELEFONO
FALLA DE ORIGEN

3.4 Cultivo y cosecha de *Actinobacillus pleuropneumoniae*^{82, 86}

1. Se sembró masivamente *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 en 30 cajas de agar PPLO con suplemento de NAD al 0.01%.
2. Se incubaron las cajas durante 24 hrs a una temperatura de 37°C.
3. Concluida la incubación se procedió a cosechar las 30 cajas con solución salina fisiológica
4. Se centrifugo a 1000g durante 10 min.
5. Lavándose posteriormente con SSF y centrifugándose a 1000g durante 10 min (3 veces)
6. Se adicionó agua desionizada durante 30 min.
7. Se centrifugo a 1000g durante 15 min.
8. Se realizaron los dos pasos anteriores (paso 6 y 7) hasta que la pastilla fue mínima
9. Se desecho la pastilla
10. Se centrifugó el sobrenadante a 17000g durante 1 hora
11. Se desechó sobrenadante
12. Se realizó un frotis a la pastilla
13. Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford

3.5 Cuantificación de proteínas (método de Bradford)¹⁶

La cuantificación se realizó por el método de Bradford, preparándose de la siguiente forma:

3.5.1 Preparación del reactivo

Se disolvieron 100mg de azul de Comassie G-250 en 50mL de etanol al 95%, a esta solución se le adicionaron 100mL de ácido fosfórico al 85% y llevándose a un litro.

3.5.2 Preparación de los estándares de proteína

Se preparó un estándar de albúmina al 0.01% y se realizó la siguiente curva de calibración (tabla 2), leyéndose en el espectrofotometro con lámpara luz visible a 595nm

Tabla 2. Preparación de los estándares para la curva de calibración (método de Bradford)

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Albúmina 0.01% (mL)	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
Agua destilada (mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	-	-
Solución problema (mL)	-	-	-	-	-	-	1.0
Reactivo de Bradford (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

FALLA DE ORIGEN

3.6 Solubilización de los extractos membranales^{72, 76}

1. Se resuspendieron los extractos membranales en triton X-100 al 2% en amortiguador Tris 10mM pH =7.4 en proporción de 1 uL de triton por cada ug de proteína
2. Se agitó la muestra y se incubó a 37°C durante 30 min para la solubilización de las membranas.
3. posteriormente se realizó una electroforesis

3.7 Electroforesis de los extractos membranales



Fig. 3 sistema de electroforesis

3.7.1 Geles discontinuos de poliacrilamida-Dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

La preparación de los geles para electroforesis se describe a continuación:

3.7.1.1 Gel separador.

Tris (hidroximetilamino-metano) 1.5M, pH 8.8	2.50mL
SDS 10%	0.10mL
Acrilamida (30% acrilamida y 0.8% bis-acrilamida)	4.00mL
Persulfato de amonio 10%	0.50mL
Agua destilada	3.30mL
TEMED	5.00uL

La mezcla se vertió rápidamente a la cámara de electroforesis guardando una pequeña cantidad para observar el momento de polimerización.

3.7.1.2 Gel concentrador

Tris 0.5M, pH = 6.8	2.50mL
SDS 10%	0.10mL
Acrilamida (30% acrilamida y 0.8% bis-acrilamida)	1.30mL
Persulfato de amonio 10%	0.50mL
Agua destilada	6.10mL
TEMED	5.00uL

FALLA DE ORIGEN

Se adicionó la mezcla sobre el gel de separación con cuidado y rápido, quedando una pequeña cantidad en el matraz, se colocó el peine de 10 dientes (fig. 3) el cual se retiró cuando el gel polimerizó, quedando los pozos bien definidos.

3.7.2 Corrimiento de las muestras

A la solución de las proteínas membranales se le adicionó una solución digestora (en proporción 1:4 respectivamente) se mezcló y posteriormente se calentó en baño María durante 4 min. Con ayuda de una micropipeta se colocaron 20 μ L de muestra en cada pozo, corriéndose en un pozo adyacente una muestra de proteínas de peso molecular conocido, con la finalidad de tomarse como referencia y poder hacer el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas desconocidas presentes en la muestra. La electroforesis se corrió a 100 Volts a temperatura ambiente, hasta el momento en que el colorante que sirvió de referencia (frente de corrimiento) llegó al final del gel de separación, posteriormente se hizo el mismo procedimiento pero con un peine ciego para obtener una mayor cantidad de proteínas membranales^{16, 17}

3.7.2.1 Tinción de los geles PAGE-SDS con azul de Comassie R-250

Se desensamblaron los moldes del gel cuidadosamente, separándose el gel concentrador del gel separador y se colocaron en una solución tefnidora (azul de coumassie R-250 al 0.1%) durante 24 hrs. Una vez transcurrido el tiempo, se sacó y se decoloró cuidadosamente durante 4 horas en la solución desteñidora I.

Posteriormente se transfirió a la solución desteñidora II hasta que el colorante en exceso del gel fue eliminado y las bandas de proteínas se distinguieron perfectamente.

3.7.3 Curva patrón de movilidad relativa de proteínas.

En las proteínas patrón se siguió el mismo procedimiento al anterior, una vez realizado esto, se trazó una gráfica que muestra la relación entre el logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas conocidas (eje de las Y) y el coeficiente de movilidad relativa (Rf) de las proteínas en el gel de poli(acrilamida) (eje de las X) Esta relación es directamente proporcional y por lo tanto debe formar una línea recta

FALLA DE ORIGEN

3.7.3.1 Cálculo del coeficiente de movilidad relativa de las proteínas (Rf) ⁷⁰

La movilidad relativa de las proteínas contenidas en la muestra es el desplazamiento que tienen con respecto a la distancia total que corre la muestra, el dato se obtiene de la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente de movilidad relativa (Rf)} = \frac{D \text{ proteínas}}{D \text{ muestra}}$$

Donde:

D proteínas = distancia recorrida por las proteínas (bandas)

D muestra = distancia recorrida por las muestras (total)

3.8 Electrotransferencia ^{72, 70}

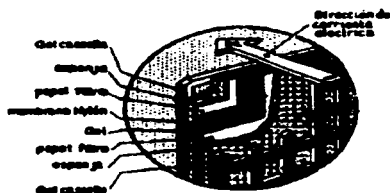


Fig. 4 Sistema de electrotransferencia.

1. Se preparó el sistema de la siguiente forma acrílico / fibra / papel filtro / PNC / gel / papel filtro / fibra /acrílico (fig.4)
2. Se colocó el sistema en la cámara de electrotransferencia con solución amortiguadora de transferencia y se corrió a 20 volts durante 24 horas
3. después se separo el sistema y el PNC se cortó en tiras
4. las tiras de PNC se transfirieron a un tubo de ensaye
5. Se adicionó a los tubos de ensaye solución bloqueadora (TBS pH 7.4 con leche 5%) durante 2 horas
6. Se decantó la solución bloqueadora y lavó con solución de lavado (TTBS) tres veces (10 min cada vez)
7. Se sumergieron las tiras durante 4 horas en solución diluida de suero de cerdo (dilución con SSF en proporción 1:50)
8. Se removió el exceso de suero con solución de lavado tres veces durante 10min cada vez
9. Se colocaron las tiras en un tubo con una dilución 1:100 de proteína A peroxidada durante 2 horas

10 Se eliminó el exceso de proteína A peroxidada con solución de lavado tres veces por 10 min cada vez

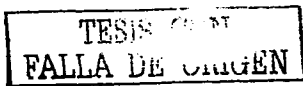
11 Se revelaron las tiras con alfa-cloronaftol

3.9 Electroelución^{17, 75}

1. Se cortó la banda de la proteína a separar en los 35 geles
2. Se montó el equipo de electroelución
3. Se colocó el corte de los diferentes geles (banda de la proteína) dentro del tubo de electroelución
4. Se llenó la cámara con la solución amortiguadora de elución, colocando un agitador magnético en la cámara baja
5. Se conectó el polo positivo en la parte baja de la cámara y el polo negativo en la parte alta. Aplicándose posteriormente un voltaje de 200 Volts durante 4hrs
6. Se transfirió el contenido del recipiente recolector a un tubo eppendorf.
7. Para separar el SDS y el Azul de Comassie se realizó una cromatografía de exclusión molecular

3.10 Columna de cromatografía (cromatografía de exclusión molecular)⁷⁶

1. Se montó la columna de cromatografía con sephadex G-25, empaquetándose con PBS.
2. Se colocó la muestra en la parte superior y se corrió utilizándose PBS como eluyente
3. Se recolectó la muestra en tubos (25 gotas por tubo) midiéndose la absorbancia por UV a 280nm a cada tubo y estableciéndose un rango de recolección de los tubos.
4. Se concentró la muestra por azúcar glass y se realizó una diálisis con PBS
5. Se realizó una electroforesis y electrotransferencia.



4. Resultados

4.1 Pruebas bioquímicas de identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1

Las pruebas se realizaron para confirmar la pureza del microorganismo, los resultados se resumen en la tabla 3

Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1.

Prueba	Resultado
Tinción de Gram	Negativo
Morfología	Bacilo pequeño, pleomórfico
Satelitismo	Positivo
CAMP	Positivo
Ureasa	Positivo

4.2 Obtención de los extractos membranales

Se obtuvo una pastilla de color amarillenta con una consistencia tipo mucosidad, resuspendiéndose posteriormente en 1 mL de SSF, y se le realizó posteriormente una tinción de Gram para ver si todavía quedaba alguna bacteria completa, no se observó ninguna bacteria completa

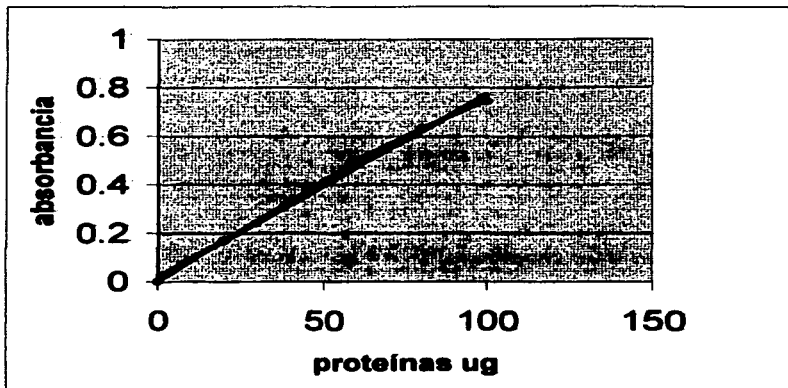
4.3 Curva patrón de proteínas (método de Bradford)

La cuantificación de las proteínas se realizó por el método de Bradford como se explicó en la sección 5.4, leyéndose la absorbancia a 595 nanómetros (nm), los valores obtenidos de la curva patrón son resumidos en la tabla 4, los cuales se muestran en la grafica 1.

Tabla 4. Valores obtenidos de la curva patrón (método de Bradford)

Tubo	Proteínas (ug)	Absorbancia (595 nm)
1	0	0
2	20	0.171
3	40	0.332
4	60	0.494
5	80	0.63
6	100	0.746

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 1. Curva patrón de proteínas (método de Bradford)

4.3.1 cuantificación de las proteínas de los extractos membranales

A la muestra se le realizó una dilución 1:100 y después se leyó por triplicado sacándose un promedio, posteriormente se interpoló en la curva patrón de proteínas determinándose la concentración de proteínas del extracto membranal de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1. el cual el resultado obtenido se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Concentración de proteína del extracto membranal de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.

Muestra	Concentración (mg/ml)
1	1.419

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4 Obtención del patrón electroforético

4.4.1 Patrón electroforético

Los gels se prepararon como se estableció en la sección 5.6, el patrón electroforético se muestra en la figura 5.

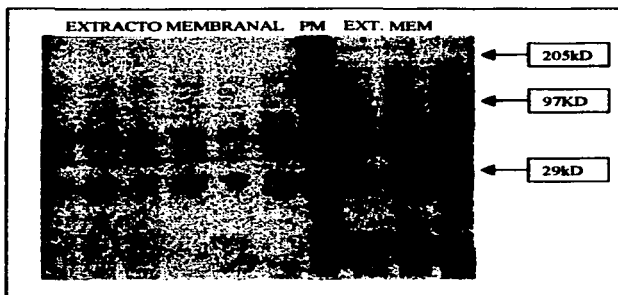


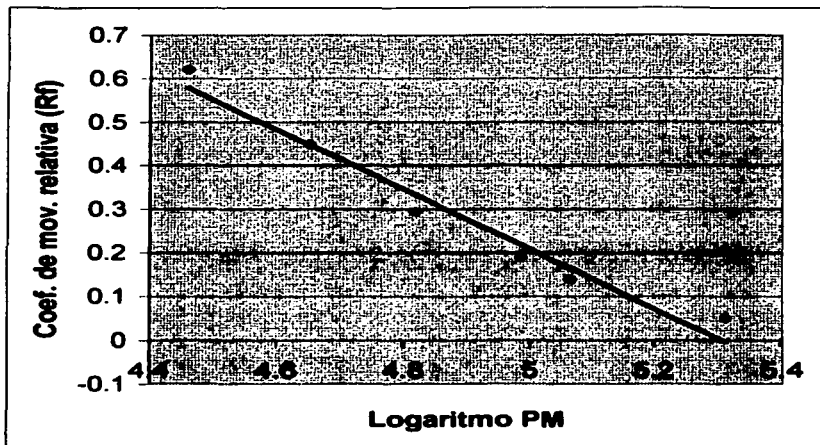
Figura 5. Patrón electroforético del extracto membranal de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.

Los valores del coeficiente de movilidad relativa (R_f) de las proteínas estándar (marcadores de peso molecular) se muestra en la tabla 6 y la curva patrón se muestra en la grafica 2.

Tabla 6. valores del coeficiente de movilidad relativa (R_f) de las proteínas estándar

Proteína estándar	peso molecular	\log_{10} PM	R_f
Miosina	205,000	5.3118	0.0517
Galactosidasa	116,000	5.0645	0.1379
Fosforilasa b	97,000	4.9868	0.1897
Albumina sérica bovina	66,000	4.8195	0.2931
Ovalbumina	45,000	4.6532	0.4483
Anhidrasa carbónica	29,000	4.4624	0.6293

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Grafica 2. Curva patrón de proteínas estándares (marcadores de pesos moleculares)

4.4.2 Patrón electroforético del extracto membranal de *A. pleuropneumoniae* serotipo1

Del patrón electroforético del extracto membranal se obtuvo el Rf de cada una de las proteínas y se interpoló en la curva patrón de proteínas estándares, para la determinación de los pesos moleculares aproximados, el resultado se muestra en la tabla 7

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 7. Pesos moleculares aproximados de las proteínas del extracto membranal de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1

Banda	PM (Daltons)
1	151,585
2	120,207
3	107,077
4	95,345
5	80,112
6	71,367
7	59,965
8	50,396
9	29,512
10	37,722
11	26,650
12	25,142
13	11,838

4.5 Determinación de la inmunogenicidad (electrotransferencia) de las proteínas del extracto membranal de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1

En la electrotransferencia del extracto membranal se observaron 3 proteínas de pesos moleculares aproximados de 37, 50 y 80KD (fig 6)

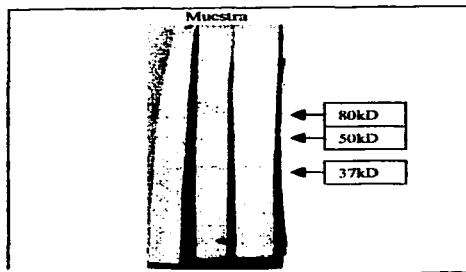


Figura 6 Patrón inmunogénico de las proteínas membranales de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.

4.6 Electroelución

La electroelución se realizó con lo establecido en la sección 5.8, obteniéndose aproximadamente 3 mL de un líquido de color azul (debido al azul de Comassie)

4.7 Cromatografía de exclusión molecular (sephadex G-25)

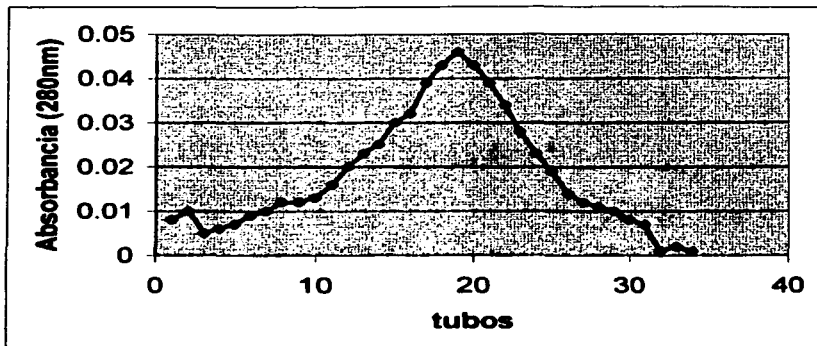
La muestra obtenida se pasó posteriormente a la cromatografía con sephadex G-25 para separar la proteína del azul de Comassie y el SDS

Los resultados de la cromatografía se muestran en la tabla 8 y la curva se muestra en la grafica 3

Tabla 8. Absorbancia de los tubos recolectados de la cromatografía de exclusión molecular

Tubo	Absorbancia	Tubo	Absorbancia	Tubo	Absorbancia
1	0.008	15	0.030	29	0.01
2	0.01	16	0.032	30	0.008
3	0.005	17	0.039	31	0.007
4	0.006	18	0.043	32	0.001
5	0.007	19	0.046	33	0.002
6	0.009	20	0.043	34	0.001
7	0.01	21	0.039	35	0.002
8	0.012	22	0.034		
9	0.012	23	0.026		
10	0.013	24	0.023		
11	0.016	25	0.019		
12	0.020	26	0.014		
13	0.023	27	0.012		
14	0.025	28	0.011		

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 3. Curva de absorbancia de los tubos recolectados de la cromatografía de exclusión molecular de los datos de la tabla 8

4.7.1 Electroforesis de las muestras recolectadas

De los datos obtenidos de la curva de absorbancia de la cromatografía se recolectaron los tubos del 11 al 25, observándose un líquido incoloro, el cual se colocó en azúcar glass para concentrar la proteína, posteriormente se realizó una diálisis, obteniéndose un líquido turbio, este se le realizó una electroforesis obteniéndose una sola banda como se muestra en la figura 7, posteriormente se realizó una transferencia como se muestra en la fig. 8

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Electroforesis de la muestra dializada

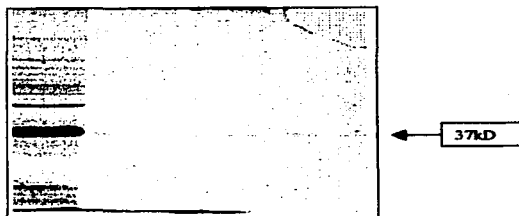
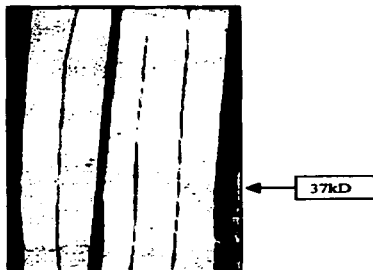


Figura 8 Electrotransferencia de la proteína purificada



4.7.2 Determinación de la concentración final

Se obtuvo un volumen final de 3mL y la concentración final por el método de Bradford, se muestra en la tabla 8.

Tabla 9. Determinación de la concentración final de la proteína purificada

muestra	Concentración (µg/mL)
1	106

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. Discusión

Desde hace años, las proteínas de bacterias Gram-negativas han despertado un gran interés en los investigadores. En particular, las OMPs que han sido estudiadas por su papel en la patogénesis de varias especies. Nosotros estamos interesados en el estudio de las OMPs del *Actinobacillus pleuropneumoniae*, para determinar su importancia en la PCP. Más específicamente, la función de las mismas, su interacción con el hospedero y su posible utilidad como inmunógenos

La expresión de las OMPs en las bacterias Gram-negativas, son fundamentales para muchos procesos biológicos, tales como reconocimiento bacteria-bacteria, transducción de señales, adherencia, colonización, interacciones proteína-proteína y proteína-carbohidratos. Varias investigaciones han demostrado su importancia en el desarrollo de una respuesta inmune^{22, 26, 74, 85}

La mayoría de las bacterias Gram-negativas, cuando se encuentran bajo condiciones de estrés muestran una alteración en la expresión y composición de las OMPs. Algunas proteínas son inducidas por calor y por otros mecanismos incluyendo hipoxia, disminución de nutrientes, radicales de oxígeno. En estudios realizados en diversas especies de bacterias Gram-negativas, se ha descubierto una posible conexión entre las proteínas de membrana con enfermedades autoinmunes (mimetismo celular) esto permite ampliar la investigación y la utilización de las proteínas de membrana, en estudios inmunológicos^{5, 66}

El *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, expresa en diferentes condiciones varias proteínas de membrana: Algunas inducidas por restricción de hierro (Tbp1 y Tbp2), otra que puede estar involucrada para su adhesión *in vivo* (proteína de 55 kD), otras inducidas por choque térmico (HSP 42 y HSP 107) y las inducidas por choque ósmótico (11.44, 13.4, 13.88, 40.26 y 65.33kD) que son proteínas altamente conservadas y abundantes. Pero, existen varias proteínas de membrana externa, que todavía no se conoce su función y su posible utilidad^{5, 19, 38, 69, 85}

En 1991, Thwaits y Kadis reportaron tres proteínas con alta inmunogenicidad durante la infección natural del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, con pesos moleculares aproximados de 39, 50 y 76 kD, que posteriormente purificaron (1993). En nuestra investigación encontramos en el corrimiento electrofóretico dos bandas de proteínas que no mostraron inmunogenicidad. Pero presentaron pesos similares a proteínas reportadas con alta inmunogenicidad durante un estado de estrés, con un peso molecular aproximado de 107kD que podría ser una la HSP107 que es altamente expresada en condiciones de choque térmico, la otra con un peso de 11.838 kD similar a la reportada por Hernández y col. con un peso molecular de 11.43kD aunque podrían expresarse pobremente en estado basal, sin tener una respuesta inmunogénica. Pero, sólo tres proteínas con pesos moleculares de aproximadamente 37.72, 50.39 y 80.11, mostraron alta respuesta con

anticuerpos presentes en el suero de cerdos infectados con *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, Aunque los pesos moleculares en ambos casos son similares no podemos establecer si se trata de las mismas proteína hasta que se realicen estudios de caracterización y funcionalidad, para realizar la comparación de dichas proteínas.^{5, 82}

Thwaits y Kadis en 1993, realizaron estudios sobre tres proteínas de membrana externa, que purificaron de un extracto membranal utilizando triton X-114 para la solubilización de las membranas de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, nosotros utilizamos triton X-100 para solubilizar las membranas, obteniéndose buenos resultados. En sus estudios ellos demostraron la importancia de dichas proteínas en el proceso de opsonización y fagocitosis, encontrando un ligero incremento en la fagocitosis con la proteína de 39 kD comparada con las proteínas de 50 y 76 kD, nosotros observamos alta expresión de la proteína de 37 kD en condiciones *in vitro*, pero no podemos establecer si la expresión puede variar en una infección natural (*in vivo*)⁸²

El método de purificación utilizado en este trabajo fue el de electroelución, que permitió la purificación de la proteína de 37kD, siendo este método sencillo, rápido, de bajo costo y se obtiene una cantidad considerable de proteínas, en comparación con otros métodos como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de líquidos de fase reversa (RPLC) esta última con modificaciones (Geetha y Singh, 2000) que no sólo permiten la purificación sino también los estudios de interacción de las proteínas membranales, ensayos de actividad enzimática, obteniéndose resultados favorables. Pero, se requieren equipos sofisticados con un costo elevado, además de que se obtiene una cantidad pequeña de proteínas. Sá-Pereira (2000) en su estudio de purificación de la proteína xilanasa extracelular de *Bacillus ssp* describe al método de electroelución como un método eficiente, reproducible y que no se requiere primeramente conocer las características de la proteína. Sin embargo, también establece que no es posible predecir la recuperación total de la proteína y cuando una proteína es excretada en cantidades pequeñas la identificación visual puede ser difícil. Thwaits en la purificación de las proteínas de membrana externa (OMP) obtiene un resultado favorable por el método de electroelución, con condiciones de corrimiento de 100V por 5 horas y posteriormente 10V por 12 hrs. Nosotros establecimos otras condiciones de corrimiento en la electroelución a 200V por 4 hrs obteniendo también buenos resultados un rendimiento del 7.4%, debido a que la concentración inicial de proteínas totales fue de 1.479mg/mL, además de obtener una concentración final de 106 µg/mL.^{31, 75, 82, 33}

La purificación y caracterización de la OMP de 37kD permitirá nuevos estudio no sólo inmunológicos sino también biotecnológicos y farmacológicos, ya se ha intentado el desarrollo de vacunas con las OMPs de *A. pleuropneumoniae* inoculándose por vía intramuscular encontrándose un aumento en el título de IgG, la respuesta inmune por vía oral sólo es local y disminuida, la vacunación por vía oral e intramuscular juntas solo causa una exacerbación en el daño agudo

(Aguilar, 1997) por lo que es necesario un estudio más detallado sobre las OMPs de *A. pleuropneumoniae*³⁸

En investigaciones realizadas sobre proteínas de membrana externa de diferentes bacterias se han podido determinar varias características y funciones, así como la utilidad de las mismas. La caracterización de las proteínas, permite hacer posible el incremento de la especificidad inmunológica y manipulación del sistema inmune. En trabajos sobre la proteína de membrana externa A (OmpA) que tiene una alta homología en diferentes bacterias Gram-negativas ha sido utilizada para el desarrollo de vacunas recombinantes. La proteína LamB de *E. coli* que permite la difusión pasiva de moléculas hidrofóbicas, maltosa y maltodextrina consiste de 421aa y es utilizada para el desarrollo de vacunas y adsorbentes celulares. La OMPs de 43 kD de *Vibrio cholerae*, es similar a la proteína LamB en términos de estructura y función, esta es utilizada para modelos en el estudio de interacción proteína-proteína. La Lpp'OmpA desarrollada por Georgiou y cols. en 1996 de aproximadamente 40kD se ha empleado para biocatálisis, biblioteca de péptidos y biosensores^{1, 19, 30, 31, 32, 46, 74}

Las vacunas hechas con las OMPs han demostrado grandes resultados. En el estudio sobre proteínas de membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* se encontró que estas dan una protección efectiva en humanos con una dosis óptima de 0.5 y 1.0 mg. La proteína de superficie A (OspA) de *Borrelia burgdorferi* mostró resultados positivos en forma de lipoproteína OspA en humanos comparada con las pruebas con el mismo antígeno sin lípidos^{37, 42}

Otra utilidad de las proteínas de membrana se da en la exposición de estructuras proteicas recombinantes en la superficie de diferentes microorganismos, esta técnica ha tenido un gran interés, ya que da pauta para la realización de nuevas estrategias en la vacunación debido al desarrollo de diferentes formas de presentación de péptidos, combinando eficiencia y estabilidad. Pero, actualmente se están utilizando para la investigación en biocatálisis, biosensores tecnológicos y diferentes tecnologías de selección de bibliotecas^{2, 30, 74}

Las vacunas con proteínas recombinantes expuestas en la superficie de bacterias, presentan una alta ventaja, ya que inducen una respuesta antígeno-específica ya que las proteínas de membrana externa de diferentes bacterias pueden utilizarse como acarreadores de epítopos de otras proteínas de microorganismos patógenos. Investigaciones realizadas sobre la OmpA y la químera de OmpA de *S. typhimurium* a las cuales se han insertado los epítopos de SERP, HRPII y M3 de *Plasmodium falciparum* en ratones han presentado una producción de anticuerpos específicos del tipo IgG la proteína LamB de *E. coli* con antígeno de HbsAg inoculados en conejos y ratones presentan títulos de anticuerpo específicos. La flagelina (HI-d) de *S. dublin* a la cual se insertó la hemaglutinina de influenza y la gp41 de HIV-1 en conejos y ratones, estos presentaron una producción de anticuerpos específicos y una protección parcial en el caso de la hemaglutinina^{23, 30, 34, 54, 74, 77,}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que:

- Se encontraron en el patrón electroforético un total de 13 bandas visibles en el extracto membranal del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1
- En el enfrentamiento con suero positivo de cerdo contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, se encontró una alta inmunogenicidad en tres proteínas de extracto membranal con pesos moleculares de 37.72, 50.39 y 80.11.
- La banda de 37.72 kD es la proteína que demostró ser la más inmunopredominante del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1
- Se obtuvieron 3mL con una concentración final de 106 ug/mL de la proteína de membrana de 37 kD purificada de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Achtman, M., Kennedy N. & Skurray, R., (1977). CELL-CELL INTERACTIONS IN CONJUGATIONG *Escherichia coli* : ROLE OF traT PROTEIN IN SURFACE EXCLUSION . Proc. Natl. Acad. Sci. **74**: 5104-5108
2. Agterberg, M., Adriaanse, H. & Tommassen, J., (1987). USE OF OUTER MEMBRANE PROTEIN PhoE AS A CARRIER FOR THE TRANSPORT OF A FOREIGN ANTIGENIC DETERMINANT TO THE CELL SURFACE OF *Escherichia coli* K-12. Gene **89**: 145-150
3. Aguilera, E., (1997). DESARROLLO DE UNA VACUNA ORAL EN CONTRA DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1. Tesis, M.V.Z. UNAM
4. Aguilera, F. L., Ciprián, A., Mendoza, S. E. & Romero, A., (1994). RESÚMENES DEL SIMPOSIO DE INMUNOLOGIA DEL APARATO RESPIRATORIO, FESC, UNAM, pp. 27-41
5. Aguirre, R. M., (1997). DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1, Tesis, UNAM, México, pp. 79
6. Andreassen, M., Nielsen, J. P. & Willerberg, P., (2000). A LONGITUDINAL STUDY OF SEROLOGICAL PATTERNS OF RESPIRATORY INFECTIOS IN NINE INFECTED DANISH SWINE HERDS. Preven. Vet. Med. **45** : 221-235
7. Anthony, J. D. & Lewis, E., (1981). ENFERMEDADES EN CERDO, 5ta ed., Ed. Continental, México, pp. 190-199.
8. Appleyard, G. D., Furesz, S. E. & Wilkie, B. N., (2002). BLOOD LYMPHOCYTE SUBSETS IN PIGS VACCINATED AND CHALLENGED WITH *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet. Immuno. and Immunopat. **6574**: 1-7
9. Bauer, M. & Welch, R., (1996). ASSOCIATION OF RTX TOXINS WITH ERYTHROCYTES, Infection and Immunity, **64**: 4665-4672.
10. Bendixen, P.H., Shewen, P., Rosendal, S. & Wilkie, B., (1981). TOXICITY OF *Haemophilus pleuropneumoniae* FOR PORCINE LUNG MACROPHAGES, PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES AND TESTICULAR CELLS. Infection and immunity **33**: 673-676
11. Beybon, L. M., (1993). CHARACTERIZATION OF THE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTYPE K11/01 CAPSULAR ANTIGEN. Eur. J. Biochem. **214**: 209-214.
12. Blackall, P. J., (2002). PROPOSAL OF A NEW SEROVAR OF *Actinobacillus pleuropneumoniae*: SEROVAR 15. Vet. Microbio. **84**: 47-52
13. Bog, Y., Ole, L., Bastholm, L. & Elling, F., (2001). THE TRANSFERRIN RECEPTOR OF *Actinobacillus pleuropneumoniae*: QUANTITATION OF EXPRESSION AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION USING A PEPTIDE-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY. Vet. Microbiol. **81**: 51-64
14. Bossé, J. J., Johnson, R. P., Nemeč, M. & Rosendal, S., (1992). PROTECTIVE LOCAL AND SYSTEMIC ANTIBODY RESPONSES SWINE

- EXPOSED TO AN AEROSOL OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTYPE 1. *Inf. Immun.* **60**: 479-489
15. Bossé, J. & Johnson, R., (1990.) CAPSULAR POLISACCHARIDE ANTIGENS FOR DETECTION OF SEROTYPE-SPECIFIC ANTIBODIES TO *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J. Vet. Res.* **54**: 320-325
 16. Bradford, M. N., (1985). A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTITATION OF MICROQUANTITIES OF PROTEIN. *Anal. Biochem.* **151**: 369-374.
 17. Brinckman, J. & Acil, Y., (1997). SEMIPREPARATIVE ISOLATION OF COLLAGEN TYPES COLLAGEN TYPES I, II, III AND V BY SDS-PAGE AND ELECTROELUTION. *Journal of chromatography* **758**: 313-318
 18. Byrd, W. & Kadis, S., (1989). STRUCTURES AND SUGAR COMPOSITION OF LPS ISOLATED FROM SEVEN *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTYPES. *Infect. and immun.* **57**: 3901-3906
 19. Byrne, B. & Iwata, S., (2002). MEMBRANE PROTEIN COMPLEXES. *Current opinion in Struc. Biol.*, **12**: 239-243
 20. Ciprián, C. A., (1988). SEROTIPIFICACION DE *Haemophilus pleuropneumoniae* AISLADO DE CERDOS EN MÉXICO, *vet. México* **19**: 205-210
 21. Ciprián, C. A., (1990). LA ENFERMEDAD EN MÉXICO *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Compendio sobre *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* 1990, Asociación Mexicana de Veterinarios Especialista en Cerdos, México, pp. 29-42
 22. Chang, H. J., Sheu, S. Y. & Lo, S. J., (1999). EXPRESSION OF FOREIGN ANTIGENS ON THE SURFACE OF *Escherichia coli* BY FUSION TO THE OUTER MEMBRANE PROTEIN *traT*. *J. Biomed. Sci.* **6**: 64-70
 23. Charbit, A., Sobczak, E., Michel, M. L., Molla, A., Tiollais, P. & Hofnung, M., (1987). PRESENTATION OF TWO EPITOPES OF THE preS2 REGION OF HEPATITIS B VIRUS ON LIVE RECOMBINANT BACTERIA. *J. Immunol.* **139**: 1658-1664
 24. Chiers, K. & Haesebrouk, F., (1999). EARLY *in vivo* INTERACTIONS OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* WITH TOLLSILS OF PIGS. *Vet. microbiol.*, **66**: 301-306
 25. Devenish, J., (1992). ASSOCIATION OF THE RTX PROTEINS OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* WITH HEMOLYTIC, CAMP AND NEUTROPHIL-CYTOTOXIC ACTIVITIES. *Infection and Immunity.* **60**: 2139-2142
 26. Fischetti, V. A., Medaglini, D. & Pozzi, G., (1996). GRAM-POSITIVE COMMENSAL BACTERIA FOR MUCOSAL VACCINE DELIVERY. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 659-686
 27. Frey, J. & Perrin, J., (1989). CLONING AND EXPRESSION OF A COHEMOLYSIN, THE CAMP FACTOR OF *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity.* **57**: 2050-2056
 28. Furesz, S. E., Wilkie, B. N. & Mallard, B., (1998). ANTI-HAEMOLYSIN IgG1 TO IgG2 RATION CORRELATE WITH HAEMOLYSIN NEUTRALIZATION TITRES AND LUNG LESION SCORES IN *Actinobacillus pleuropneumoniae* INFECTED PIGS. *Vaccine*, **16**: 1971-1975.

29. Garita, M., (1993). PERFIL SEROLOGICO OBTENIDO CON PLEUROTTEST EN UNA GRANJA CON PROBLEMAS DE PLEURONEUMONIA CONTAGIOSA PORCINA. Tesis, MVZ, México, pp 7-9
30. Gatto, N. T., Dabo, S. M., Hancock, R. E. & Confer, A. W., (2002) CHARACTERIZATION OF, AND IMMUNE RESPONSE OF MICE TO, THE PURIFIED OmpA-EQUIVALENT OUTER MEMBRANE PROTEIN OF *Pasteurella multocida* SEROTYPE A:3 (Omp28). *Vet. Microbiol.* **87**: 221-235
31. Geetha, T. & Singh, S., (2000). APLICATIONS OF IMMOBILIZED STATIONARY-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY: A POTENTIAL *in vitro* TECHNIQUE. *PSTI* **3**: 406-416
32. Georgiou, G., Stephens, D. L. & Stathopoulos, C., (1996). DISPLAY OF BETA-LACTAMASE ON THE *Escherichia coli* SURFACE: OUTER MEMBRANE PHENOTYPES CONFERRED BY Lpp'-OmpA'-BETA-LACTAMASE FUSION. *Protein Eng.* **9**: 239-247
33. Grenwood, J. A., Mills, J. & Jones, C., (1997). PURIFICATION, PROPERTIES AND PHYSIOLOGICAL REGULATION OF PUTATIVE OUTER-MEMBRANE PORIN FOR METHANOL IN *Methylophilus methylotrophus*. *FEMS Microbiol. Letters* **163**: 167-171
34. Hadad, D., Liljeqvist, S., Kumar, S., Hansson, M., Sthal, S. & Perlmann, H., (1995). SURFACE DISPLAY COMPARED WITH PERIPLASMIC EXPRESSION OF A MALARIAL ANTIGEN IN *Salmonella typhimurium* AND ITS IMPLICATIONS FOR IMMUNOGENICITY. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **12**: 175-185
35. Haesebrouck, F., (1997). *Actinobacillus pleuropneumoniae* INFECTIONS IN PIGS: THE ROLE OF VIRULENCE FACTORS IN PATHOGENESIS AND PROTECTION. *Vet. Microbiol.* **58**: 239-249
36. Haslberger, A. G., Col, G. & Feinerova, D., (2000). ACTIVATION, STIMULATION AND UPTAKE OF BACTERIAL GHOSTS IN ANTIGEN PRESENTING CELLS. *J. of Biotech.* **83**: 57-66
37. Häupl, T., Landgraf, S., Netusil, P., Biller, N., Capiaru, C., Desmons, P., Hauser, P. & Burmester, G. R., (1997). ACTIVATION OF MONOCYTES BY THREE OspA VACCINE CANDIDATES: LIPOPROTEIN OspA IS A POTENT STIMULATOR OF MONOKINES. *FEMS Immun. and Med. Microbiol.* **19**: 15-23
38. Hernández, L., Ponce, C., Mendoza, E. S. & Romero, A., (1997). IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS INDUCIDAS POR CHOQUE OSMÓTICO EN EXTRACTOS MEMBRANALES DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1. XXXII Congreso Nac. de la Asociación Mexicana de Vet. Esp. en cerdos, pp. 118
39. Huettli, A. & Hauster, C., (1994). DIFFERENTIAL EXPRESSION OF THE CYTOTOXIC AND HEMOLYTIC ACTIVITIES OF THE ApxIIA TOXIN FROM *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and immunity.* **62**: 2119-2121.
40. Huter, V., Hensel, A. & Brand, E., (2000). IMPROVED PROTECTION AGAINST LUNG COLONIZATION BY *Actinobacillus pleuropneumoniae*

- GHOSTS: CHARACTERIZATION OF GENETICALLY INACTIVATED VACCINE. *J. of biotech.* **83**: 161-172
41. Jacques, M., Foiry, B., Higgins, R. & Mittal, K R., (1988). ELECTRON MICROSCOPIC EXAMINATION OF CAPSULAR MATERIAL FROM VARIOUS SEROTYPES OF *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *J. of Bacteriol.*, **170**: 3314-3318
 42. Jang, I., Kim, I., Park, W. J. & Yoo, K., (1999). HUMAN IMMUNE RESPONSE TO A *Pseudomonas aeruginosa* OUTER MEMBRANE PROTEIN VACCINE. *Vaccine* **17**: 158-168
 43. Jolie, N., (1994). ANTIGENIC DIFFERENCES WITHIN *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTYPE 1, *Vet. Microbiol.* **38**: 329-349
 44. Kadirugamuwa, J. L. & Beveridge, T. J., (1995). VIRULENCE FACTORS ARE RELEASED FROM *Pseudomonas aeruginosa* IN ASSOCIATION WITH MEMBRANE VESICLE DURING NORMAL GROWTH AND EXPOSURE TO GENTAMICIN: A NOVEL MECHANISM OF ENZYME SECRETION. *J. Bacteriol.* **177**: 3998-4008
 45. Kamp, E., Popma, J., Anakotta, J. & Smits, M., (1991). IDENTIFICATION OF HEMOLYTIC AND CITOTOXIC PROTEINS OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* BY USE OF MONOCLONAL ANTIBODY. *Infection and Immun.* **59**: 3079-3085
 46. Katinger, A., Lubitz, W., Szostak, M. & Standler, M., (1999). PIGS AEROGENOUSLY IMMUNIZED WITH GENETICALLY INACTIVATED (GHOSTS) OR IRRADIATED *Actinobacillus pleuropneumoniae* ARE PROTECTED AGAINST A HOMOLOGOUS AEROSOL CHALLENGE DESPITE DIFFERING IN PULMONARY CELLULAR AND ANTIBODY RESPONSE. *J. of Biotech.* **73**: 251-260
 47. Kielstein, P., Wuthe, H., Angen, O., Mutters, R. & Anrens, P., (2001). PHENOTYPIC AND GENETIC CHARACTERIZATION OF NAD-DEPENDENT *Pasteurellaceae* FROM THE RESPIRATORY TRACT OF PIGS AND THEIR POSSIBLE PATHOGENETIC IMPORTANCE. *Vet. Microbiol.* **81**: 243-255
 48. Lang, H., Maki, M., Rantakari, A. & Korhonen, T. K., (2000). CHARACTERIZATION OF ADHESIVE EPITOPES WITH THE OmpS DISPLAY SYSTEM. *Eur. J. Bioch.* **276**: 163-170
 49. Liggett, A. D. & Harrinson, L. K., (1987). SEQUENTIAL STUDY OF LESION DEVELOPMENT IN EXPERIMENTAL *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Research in Vet. Science* **42**: 204-221
 50. Loftager, M. K., Eriksen, I., Aasted, B. & Nielsen, R., (1993). PROTECTIVE IMMUNITY FOLLOWING IMMUNISATION OF PIGS WITH AEROSOL OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTYPE 2. *Res Vet. Sci.* **56**: 281-286
 51. Magnusson, U., Bossé, J., Mallard, B. & Rosendal, S., (1997). ANTIBODY RESPONSE TO *Actinobacillus pleuropneumoniae* ANTIGENS AFTER VACCINATION OF PIGS BRED FOR HIGH AND LOW IMMUNE RESPONSE. *Vaccine*, **15**: 997-1000.
 52. Marer, E. & Reinhard, N., (1996). CHANNEL-FORMING ACTIVITY AND CHANNEL SIZE OF THE RTX TOXINS ApxI, ApxII AND ApxIII OF *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. and immun.* **64**: 4415-4423

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

53. Mc Fadin, (1990) PRUEBA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA, Ed. Panamericana, 1ª ed., México, pp. 183-184
54. McEwn, J., Levi, R., Horwitz, R. J. & Arnon, R., (1992). SYNTHETIC RECOMBINANT VACCINE EXPRESSING INFLUENZA HAEMAGGLUTININ EPI TOPE IN *Salmonella* FLAGELLIN LEADS TO PARTIAL PROTECTION IN MICE. *Vaccine* **10**: 405-411
55. Mandoza, S., (1994) MANUAL BÁSICO DE BACTERIOLOGÍA. FES-Cuautitlan, UNAM, México, pp. 114-116
56. Morilla, A., (1985). AVANCES EN ENFERMEDAD DEL CERDO. Ediciones de la Asociación de Veterinaria Especialista en Cerdos, México, pp. 437-478.
57. Murria, P., (1999) MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, American Society for Microbiology, 7ª ed., USA, pp. 562-566
58. Negrete-Abascal, E. & Garcia, R. M., (2000). MEMBRANE VESICLE RELEASED BY *Actinobacillus pleuropneumoniae* CONTAIN PROTEASES AND Apx TOXINs, *FEMS Microbiol. Letters* **191**: 109-113
59. Negrete-Abascal, E. & Tenorio, V., (1994). *Actinobacillus pleuropneumoniae*: VIRULENCIA AND GENE CLONING. *Archives of Medical Research*, **25**: 229-233.
60. Negrete-Abascal, E., Tenorio, V., Serrano, J. & Garcia, C., (1994). SECRETED PROTEASES FROM *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTYPE 1 DEGRADE PORCINE GELATIN, HEMOGLOBIN AND IMMUNOGLOBIN A, *Can J. Vet. Res.*, **58**: 83-86
61. Nicolet, J. (1985) *Haemophilus pleuropneumoniae*, BACTERIOLOGY AND EPIDEMIOLOGY. COMPENDIUM ON SWINE *Haemophilus pleuropneumoniae* USA, pp. 1-13
62. Nicolet, J., Leman, A. D. & Straw, B. E., (1992). ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE, Disease of Swine. pp.401-8
63. Nielsen, (1986). SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* STRAIN AND PROPOSAL OF NEW SEROTYPE: SEROTYPE 12, *Acta Vet. Scand.* **27**: 453-455
64. Nielsen, (1987). SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* BIOTYPE 2 STRAIN ISOLATED FROM PIGS IN TWO DANISH HERDS. *Vet. Microbiol.* **54**:35-46
65. Nielsen, R., (1985). *Actinobacillus pleuropneumoniae* DIAGNOSIS, IMMUNITY AND CONTROL, COMPENDIUM IN SWINE *Haemophilus pleuropneumoniae*. American association of swine IOWA, USA, pp. 14-18.
66. Pabst, R., (1996). THE RESPIRATORY IMMUNE SYSTEM OF PIG. *Vet. Immunol. And Immunopat.* **54**: 191-195.
67. Perry, M. B., (1990). STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF THE ANTIGENIC CAPSULAR POLYSACCHARIDES AND LIPOPOLYSACCHARIDES INVOLVED IN THE SEROLOGICAL CLASSIFICATION OF *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* STRAIN. *Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.* **4**: 299-308
68. Pohl, S., (1983). TRANSFER OF *Pasteurella haemolyticus-like* ORGANISM CAUSING PORCINE NECROTIC TO THE GENUS *Actinobacillus*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- pleuropneumoniae ON THE BASIS OF PHENOTIPIC AND DEOXYRIBONUCLEI ACID RELATES. *J. Syst. Taxon.* **33**: 510-516
69. Ramírez, R. E., (1997). EFECTO DEL pH EN EL PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS INTRINSECAS DEL *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTYPE 1, Tesis, UNAM, México.
 70. Rogers, R. J., COMPARATIVE VIRULENCE OF FOUR SEROTYPES OF *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Australian Veterinary Journal.* **67**: 187-193.
 71. Romero, A., Camacho, J., Barcenas, G. & Montaraz, J. A., (1997). PATRONES ELECTROFORÉTICOS Y ANTIGÉNICOS DE LOS SEROTIPOS 1, 2, 5 Y 7 DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. México,* **23**: 125-130
 72. Rose, N., (1986). **MANUAL OF CLINICAL LABORATORY IMMUNOLOGY.** American Society for Microbiology, 3a ed., USA, pp. 969
 73. Rosendal, S., (1990). CHARACTERIZATION OF AN ATTENUATED STRAIN OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPIIC 1. *Vet. Res.* **51**: 711-719
 74. Sannulson, P., Gunneriusson, E., Nygren, P. & Stahl, S., (2002). DISPLAY OF PROTEINS ON BACTERIA. *J. of Biotech.* **96**: 129-154
 75. Sá-Pereira, P. & Duarte, J., (2000). ELECTROELUTION AS A SIMPLE AND FAST PROTEIN PURIFICATION METHOD: ISOLATION OF AN EXTRACELLULAR XYLANASE FROM *Bacillus sp.* CCM1 966. *Enzyme and microbiol. tech.* **27**: 95-99.
 76. Scopes, R. K., (1994). **PROTEIN PURIFICATION**, 3ª ed., Springer, USA, pp. 38-43
 77. Schorr, J., Knapp, B., Hundt, E., Kupper, H. A. & Amman, E., (1991). SURFACE EXPRESSION OF MALARIE ANTIGENS IN *Salmonella typhimurium*. INDUCTION OF SERUM ANTIBODY RESPONSE UPON ORAL VACCINATION OF MICE. *Vaccine* **9**: 675-681
 78. Strutzberg, K. & Von-Olleschik, L., (1995). MAPPING OF FUNCTIONAL REGIONS ON THE TRANSFERRIN-BINDING PROTEIN (TfBa) OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* *Infection and Immunity*, **63**: 3846-3850.
 79. Switzer, R., (1999). **EXPERIMENTAL BIOCHEMISTRY, THEORY AND EXERCISES IN FUNDAMENTAL METHODS**, 3a ed., Freeman and Company, USA, pp. 61-75.
 80. Tarasiuk, K. & Pejsak, (1997). NEUTRALIZING ANTIBODY RESPONSE AGAINST THE HEMOLYSIS OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* IN PIGS VACCINATED WITH WHOLE CELL SUBUNIT VACCINE. *Vaccine* *strategies*, **57**: 287
 81. Tascón, R., Vázquez, J. A. & Gutierrez, C., (1997) *Actinobacillus pleuropneumoniae* DOES NOT REQUIRE UREASE ACTIVITY TO PRODUCE ACUTE SWINE PLEUROPNEUMONIAE. *FEMS Microbiol. Letter* **148**: 53-57
 82. Thwaitts, R. N. & Keddis, S., (1993). PURIFICATION OF SURFACE-EXPOSED INTEGRAL OUTER MEMBRANE PROTEINS OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* AND THEIR ROLE IN OPSONOPHAGOCYTOSIS, *Am. J. Vet. Res.* **54**: 1462-1470

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

83. Udeze, F. & Lutimer, K., (1987). ROLE OF *Haemophilus pleuropneumoniae* LIPOPOLYSACCHARIDE ENDOTOXIN IN THE PATHOGENESIS OF PORCINE. *Am J. Vet. Res.*, **48**: 768-773
84. Utrera, V., Trigo, E. & Pijian, (1990). COMPARATIVE STUDY OF HIGH AND LOW VIRULENCE STRAIN OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTYPE 1. *International Pigs Vet. Soc. Bact. Inf. Chapter III*, pp. 66
85. Van-Overbeke, I., Chiers, K., Charlier, C. & Vandenbergh, I., (2000). CHARACTERIZATION OF THE in vitro ADHESION OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* TO SWINE ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS. *Vet. Microbiol.* **2350**: 1-16
86. Vargas, A., (1994) EVALUACIÓN ECONOMICA Y SANITARIA DE LA DESPOBLACIÓN-REPOBLACIÓN PARCIAL COMBINADA CON EL USO PREVENTIVO DE ALIMENTO MEDICADO Y UNA BACTERINA, EN GRANJA PORCINA INFECTADA POR A. *Pleuropneumoniae*, Tesis MVZ, UNAM, México, pp 5-18.
87. Wangnarkap, S. & Pfeiffer, D. U., (1999). AN ON-FARM STUDY OF THE EPIDEMIOLOGY OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* INFECTION IN PIGS AS PART OF A VACCINE EFFICACY TRIAL. *Prevent. Vet. Med.* **39**: 1-11
88. Willson, P., Falk, G. & Klashinsky, S., (1987). DETECTION OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* INFECTION IN PIGS. *Can Vet. J.* **28**: 111-116
89. Yagihashi, T., Nunoya, T., Mutui, t. & Tajima, M., (1984) EFFECT OF *Mycoplasma hyopneumoniae* INFECTION ON THE DEVELOPMENT OF *Haemophilus pleuropneumoniae* PNEUMONIA IN PIGS, *Jpn. J. Vet. Sci.* **46**:405-712
90. Zhang, Y., Tennet, J. M. & Imgham, A., (2000). IDENTIFICATION OF TYPE 4 FIMBRIAE IN *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microb. Letters* **189**: 15-18

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. APENDICE 1

1. Solución salina fisiológica

Cloruro de sodio (NaCl).....8.5g
Aforar a 1 litro con agua destilada

2. Amortiguador tris-HCl 0.5M pH = 6.8

Tris-base.....6.0g
Agua destilada.....60 mL
Ajustar a PH = 6.8 con HCl 1N
Llevar a 100 mL con agua destilada y almacenar a 4°C

3. Amortiguador Tris-HCl 1.5 M pH = 8.8

Tris-base.....18.75 g
Agua destilada..... 60 mL
Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N
Llevar a 150 mL con agua destilada y almacenar a 4°C

4. Acrilamida-bis 30% (solución stock)

Acrilamida.....29.2g
Bis-acrilamida..... 0.8 g
Llevar a 100mL con agua destilada
Filtrar y almacenar a 4°C en oscuridad (30 días máximo)

5. Persulfato de amonio 10%

Persulfato de amonio.....10 g
Llevar a 100 mL con agua destilada

6. SDS 10%

Dodecil sulfato de sodio.....10g
Llevar a 100 mL con agua destilada

7. Salina-Tris (amortiguador) 20mM tris-HCl, 500mM NaCl, pH = 7.5

Tris-base.....4.84 g
NaCl.....54.48 g
Aforar a 2 Lt con agua destilada
Ajustar el pH a 7.5 con HCl 1N

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.Solución de lavado Tween 20

Tween 20.....0.5 mL
Aforar a 1 Lt con TBS

9.Solución bloqueadora

Leche descremada en polvo.....3.0 g
Llevar a 100mL con TBS

10.Amortiguador de corrimiento (transferencia)

Tris-base.....3.0 g
Glicina.....14.4 g
Metanol.....200 mL
Ajustar el pH a 8.3
Aforar a 1Lt con agua destilada

11.Solución amortiguadora de corrida (Electroforesis)

tris.....4.5 g
glicina.....28.8 g
SDS(al 10% en agua).....20mL
Agua destilada.....2.0 Lt
pH = 4.0

12.Solución digestora

Tris 0.5 M, pH = 6.8.....1.0 mL
Agua destilada.....4.0 mL
Glicerol.....0.8 mL
SDS 10%.....1.6 mL
2- β -Mercaptoetanol.....0.4 mL
Azul de bromofrnl.....0.2 mL

13.Solución teñidora

Azul de Comassie.....2.0 g
Agua destilada.....200 mL

14.Solución destañidora I

Metanol.....500 mL
Ácido acético.....100 mL
Se aforó a 1 LT con agua destilada

15. solución desafiadora II

Ácido acético.....70 mL
Metanol.....50 mL
Aforar a 1 Lt con agua destilada

16. Solución reveladora

TBS.....50 mL
Peróxido de hidrógeno.....0.05 mL
Metanol.....10 mL
 α -cloronaftol.....30 mg

17. Solución amortiguadora de corrida (electroelución)

Tris-base.....3.0 g
Glicina.....14.2 g
SDS.....0.5 g
Aforar a 1Lt con agua destilada

18. sephadex G-25

sephadex G-25.....17g
PBS.....750mL

19. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio.....8.0g
Cloruro de potasio.....0.2g
Fosfato de sodio
dibásico anhidro.....1.15g
Fosfato de potasio
Monobásico anhidro.....0.2g
Llevar a 1 litro con agua desionizada