

DETECCION DIRECTA Y SEROTIPIFICACION DE Actinobacillus pleuropneumoniae POR LA PRUEBA DE COAGLUTINACION.

Jiménez, E., Galvan, E.*, Haro, M., Flores, I., Islas, C.
 Depto. Producción Animal: Cerdos. F.M.V.Z. U.N.A.M.

Una de las principales enfermedades respiratorias que afectan a los cerdos es la pleuroneumonía causada por el Actinobacillus pleuropneumoniae, identificándose 12 serotipos (1,4,7). Para la serotipificación se han desarrollado pruebas como la aglutinación en placa y tubo, hemoaglutinación indirecta, inmunodifusión, precipitación en anillo, inmuno electroforesis y coaglutinación (4,5,7).

En México se han identificado los serotipos 1 al 9 por medio de la prueba de aglutinación en placa (1,2), siendo esta menos rápida y más difícil de leer e interpretar que la prueba de coaglutinación. Esta prueba es más segura para la tipificación de cepas mucoides y rugosas, ya que usando tratamiento de calor en suspensiones de células enteras, se reducen las aglutinaciones cruzadas (4,5,6,7,8,9).

El objetivo del presente trabajo fué el de tipificar cepas de Actinobacillus pleuropneumoniae provenientes de aislamientos y a través de muestras de pulmón en formól por medio de la prueba de coaglutinación.

Material y Métodos. Se utilizaron 119 aislamientos de Actinobacillus pleuropneumoniae recuperados de cerdos diagnosticados con pleuroneumonía y 56 muestras de pulmón conservadas en formól remitidos al Depto. de Producción Animal: Cerdos, de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M.

A todas las cepas y muestras de pulmón se les realizó la prueba de coaglutinación que requiere de los siguientes pasos.

1. Preparación del antígeno para serotipificación. El crecimiento de un cultivo de 18 hrs en agar tripticosa soya con 10% de suero de equino y 10% de extracto de levadura, se suspendieron en 3 ml de solución salina fisiológica conteniendo 0.3% de formalina (3,4,5).

2. Preparación del extracto de pulmón para la detección del antígeno. Se maceran de 2 a 5 gr del pulmón en 3 ml de solución salina fisiológica, se recolecta la suspensión y se hierve 30 minutos. El sobrenadante se utiliza para la prueba de coaglutinación (3,4,5)

3. Preparación del reactivo de coaglutinación. La cepa de Staphylococcus aureus cepa Cowan, se siembra en agar tripticas soya, se incuba toda la noche a 37° C, se cosecha en solución salina fosfatada bufferada (PBS) con pH de 7.4, se lava dos veces con PBS y se suspende en PBS con 0.5% de formalina, se deja a temperatura ambiente tres horas y se lava después dos veces con PBS, ajustandose a una concentración de 10% (vol/vol) y se trata a 80° C por 5 minutos en baño maría.

A 1 ml de la suspensión de Staphylococcus se le adiciona 0.1 ml del antisuero del serotipo específico (serotipos del 1-9) se deja 30 minutos a temperatura ambiente, se lava dos veces y se resuspende en PBS que contenga 0.05% de azida de sodio y 0.1% de albúmina bovina.

-Una gota de esta suspensión se coloca en una laminilla más una gota de antígeno; se mezclan y se examinan a la luz. Una reacción negativa es cuando no ocurre aglutinación macroscópica dentro de los 4 minutos siguientes. En la reacción positiva hay aglutinación a los pocos segundos (5,6,7,8,9).

Algunos antígenos que daban aglutinación cruzada, se les dió tratamiento de calor, hirviendolos 15 minutos o poniendolos un minuto a la flama directa, observándose una aglutinación marcada y clara con el serotipo específico.

Resultados. Los resultados obtenidos se pueden observar en los cuadros 1 y 2.

Discusión. El principal serotipo encontrado fué el 1, tanto en las cepas aisladas (47%) como en las muestras de pulmón en formol (11%), coincidiendo este resultado con lo reportado en otras investigaciones. Sin embargo el serotipo 8 se ha incrementado en los últimos dos años, aislandose 21 cepas provenientes de los estados de: Jalisco (13), Michoacán (1) y Puebla (7), siendo diferente con los resultados cuando se ha utilizado la prueba de aglutinación en placa donde sólo se han encontrado sólo dos cepas, una de Michoacán y otra de Jalisco. En las muestras de pulmón en formol, se detectó el antígeno en Puebla (6), Jalisco (5), Yucatán (2) y Veracruz (1).

Se recomienda hacer combinación de otras pruebas para confirmar estos resultados, así como realizar pruebas serológicas, para que de acuerdo a los serotipos se utilicen las bacterinas adecuadas.

CUADRO No.1 SEROTIFICACION DE CEPAS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

	NUMERO DE CEPAS									
	MUESTRAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
JALISCO	34	8	-	6	-	1	1	5	13	-
MICHOACAN	30	26	-	-	-	1	-	-	1	2
PUEBLA	19	3	-	-	5	2	-	2	7	-
GUANAJUATO	11	10	-	-	-	1	-	-	-	-
EDO. MEXICO	9	6	-	1	-	1	-	1	-	-
SONORA	5	2	-	-	3	-	-	-	-	-
TAMAULIPAS	4	-	-	-	-	4	-	-	-	-
QUERETARO	2	1	-	-	1	-	-	-	-	-
YUCATAN	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-
S.L.P.	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-
SINALOA	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-
COAHUILA	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
TOTAL	119	56	0	7	10	13	1	9	21	2
PORCENTAJE	100	47.1	0	5.9	8.4	10.9	0.8	7.6	17.6	1.7

CUADRO No.2 PRUEBA DE COAGLUTINACION PULMONES/FORMOL

	NUMERO DE MUESTRAS									NEGAT	N.T.*	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
JALISCO	14	1	-	1	3	1	-	-	5	-	2	1
PUEBLA	13	2	-	-	-	-	-	-	6	-	5	-
TAMAULIPAS	5	-	-	-	5	-	-	-	-	-	3	-
COAHUILA	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
S.L.P.	3	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
GUANAJUATO	3	1	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-
VERACRUZ	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
TLAXCALA	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SINALOA	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
MICHOACAN	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YUCATAN	2	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
QUERETARO	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EDO. MEXICO	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
TOTAL	56	11	0	2	8	4	0	1	14	0	14	2
PORCENTAJE	100	19.6	0	3.6	14.3	7.1	0	1.8	25	0	25	3.6

*NO TIFICADAS

LITERATURA CITADA.

- Díaz, R.C., González, M., Jiménez, E., Stephano, A.: Identificación de diferentes serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* aisladas en México de cerdos con pleuroneumonía de 1985 a 1988. Vet. Méx. 20: 157-160 (1989)
- Medina, A.G., Ponce, C., Torres, O., Camacho, J., Ciprian, A., Pijoan, C.: Serotificación de *H. pleuropneumoniae* aislados en el rastro de Ferrería, México. Memorias Reunión de la Investigación Pecuaria en México. México. 1985.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Larivieri, S.: Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. J. Clin. Microbiol. 18: 1351-1354 (1983).
- Mittal, K.R., Higgins, R., Larivier, S., Martineau, G.P.: Use of Co-agglutination Test for Direct Detection and Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. In: Compendium on Swine *Haemophilus pleuropneumoniae*. Edited by Schultz, R.A. 28-33. S. Printing Ames, Iowa. 1985.

5. Mittal, K.R., Higgins, R., Larivier, S.: An evaluation of agglutination and coagglutination test for direct detection and serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae isolates. Am. J. Vet. Res. 48: 219-226 (1987).
6. Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S.: Serologic studies of Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae strains of serotype 3 and their antigenic relationships with other A. pleuropneumoniae serotypes in swine. Am. J. Vet. Res. 49:152-155 (1988).
7. Mittal, K.R., Higgins, R., Larivier, S.: Quantitation of serotype-specific antigens by coagglutination and immunodiffusion test for differentiating Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae strains belonging to crossreacting serotypes 3-6 and 8. J. Clin. Microbiol., 26: 985-989 (1988).
8. Saito, A., Lema, R., Apolloro, R., Moro, L., Oliveira, A.: Isolation and serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae from nasal cavities or lung of pigs. Proceedings of The 10th International Pig Veterinary Society Congress. I.P.V.S. Rio de Janeiro, Brazil, 73 (1988).
9. Vena, M.A., Miquet, J.M., Nardene, Y.: Detección y tipificación de cepas Argentinas por coagglutinación. Proceedings of The 10th International Pig Veterinary Society Congress. I.P.V.S. Rio de Janeiro, Brazil, 80 (1988).