

USO DE COAGLUTINACION Y HEMAGLUTINACION INDIRECTA PARA LA  
SEROTIPIFICACION DE Actinobacillus pleuropneumoniae

Gutiérrez. P.J.A.\*Jiménez, G.E. \*\* ; \*\* Ramírez, H.G.\*\*,  
Aparecio, M.M. \*\*; M.R. \*\* Y MERCADILLO, S.A.\*\*

I N T R O D U C C I O N

Actinobacillus pleuropneumoniae puede ser clasificado en 12 serotipos o puede ser no tipificable (5).

La distribución de serotipos varía de país a país y aún entre las diferentes zonas de un país, la serotipificación rutinaria del aislamiento de cepas de campo es muy importante ya que el patrón de serotipos puede cambiar.

Una de las rutas para prevenir y eliminar la pleuropneumoniaporcina es el desarrollo de vacunas efectivas y seguras, dichas vacunas deberán basarse en el patrón de serotipos de cada región.

Una gran cantidad de pruebas serológicas se han desarrollado para la tipificación de A. pleuropneumoniae incluyendo inmunofluorescencia, aglutinación en placa, aglutinación en tubo, coaglutinación, inmunodifusión, hemoaglutinación indirecta, ELISA y aglutinación en látex (2).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la coaglutinación y la hemaglutinación indirecta para la serotipificación de A. pleuropneumoniae.

MATERIAL Y METODOS

Cepas - El aislamiento de las cepas se realizó a partir de pulmones de cerdos con lesiones neomónicas, la cara interna de un trozo de pulmón obtenido estérilmente fué inoculado en una placa de agar sangre cruzando el cultivo con una estría de la cepa nodriza de S. aureus. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 hrs. en condiciones de velobiosis, las colonias sospechosas fueron resemebradas para purificarlas. La identificación se llevó a cabo utilizando técnicas bacteriológicas standar: tinción de Gram. ureasa, carbohidratos como manitol y xilosa (+), traalosa (-), indol (-) y crecimiento a los lados de la cepa nodriza. Después de su identificación se inoculó agar casoy\* adicionado de 10% de suero equino y 0.025% de NAD con cada una de las cepas, el crecimiento fue cosechado en leche descremada estéril y se conservó a - 70°C para su tipificación.

Coaglutinación.- La preparación de los antisueros, reactivos y antígenos fue realizada de acuerdo con el método de Mittal (3).

Una gota de reactivo de coaglutinación fue mezclada en un portaobjetos con un volúmen igual de la suspensión bacterian

o de su extracto salino. La mezcla fue homogeneizada con un aplicador de madera. El portaobjetos fue examinado teniendo como contraste una superficie oscura y se consideró negativo si la aglutinación no ocurrió dentro de los primeros 4 minutos. Una reacción positiva se caracterizó por una aglutinación clásica ocurrida normalmente a los pocos segundos.

Hemaglutinación indirecta.- De cada cepa se preparó una suspensión bacteriana se calentó a 56°C por 30 min. y se centrifugó a 4500 rpm por 20 min. El sobrenadante se usó como antígeno. Volúmenes iguales del antígeno diluido 1:10 PBS y de una solución al 4% de glóbulos rojos de ovino, se mezclaron e incubaron a 37°C por 90 min. Los glóbulos rojos ya sensibilizados se lavaron tres veces y se resuspendieron en PBS a una concentración del 1%.

Los anticuerpos heterófilos se observaron usando glóbulos rojos no sensibilizados al 4%. Se preparó una serie de diluciones dobles de los sueros desde 1:10 hasta 240 en microplacas con fondo en "U" usando un volumen de 0.05 ml. Se agregó el mismo volumen de glóbulos rojos sensibilizados al 1% en cada pozo de la placa. Las placas se agitaron y se dejaron a temperatura ambiente por 2 horas. El de expresó como máxima dilución del suero mostrando un sedimento plano en comparación con el control negativo que mostró el botón de glóbulos rojos sedimentados.

## R E S U L T A D O S

Se aislaron 42 cepas de *A. pleuropneumoniae* de los pulmones neumónicos de cerdo.

Todas las cepas fueron serotipificadas por ambos métodos 19 cepas (45%) fueron clasificadas de común acuerdo por las dos técnicas, trece permanecieron al serotipo 1, cinco al serotipo 5 y una serotipo 4. Ocho cepas poliaglutinaron al usar coaglutinación pero fueron clasificadas en el serotipo 1 por la hemoaglutinación indirecta, aunque con título bajo.

El 7.1 % de las cepas (3) fueron colocadas en diferentes serotipos por cada una de las pruebas usadas.

Finalmente once cepas fueron no tipificables por la hemoaglutinación indirecta y clasificadas en diferentes serotipos por la coaglutinación.

## D I S C U S I O N

En un estudio Mittal (4) reportó que los antígenos particulares de suspensiones celulares del serotipo 6 tratadas con calor dieron lugar a reacciones cruzadas con casi todos los serotipos. En contraste, los antígenos de superficie de suspensiones celulares no calentadas sólo cruzaron antígenicamente con los serotipos 3, 5, y 8. Si al calentar las suspensiones celulares, se aumenta la antigenicidad cruzada con casi todos los serotipos, esos antígenos comunes podrían ser especie específicos y fueron principalmente estables al calor. Además, pueden ser parte de

los antígenos subcapsulares los cuales están fuertemente adheridos a la pared celular y por lo tanto no difunden libremente

Estas afirmaciones coinciden con las hechas por Fenwich y Osburn (1) quienes reportaron que los lipopolisacáridos de A. pleuropneumoniae poseen antígenos que son especie específicos y serotipo específico, mientras que los antígenos capsulares eran serotipos y/o cepa específicos.

En el presente estudio los resultados de la coaglutinación y de la hemaglutinación indirecta no coincidieron en 14 ocasiones (33%).

Una de las posibles explicaciones del desacuerdo puede basarse en la detección de diferentes antígenos por cada una de las pruebas, ya que para la realización de la coaglutinación generalmente se utilizan suspensiones de células completas, por lo que los antígenos que se detectan principalmente son especie y serotipo específicos, en cambio los antígenos usados en la hemaglutinación indirecta son de tipo capsular o sea serotipo y/o cepa específicos.

La coaglutinación no requirió de equipo de laboratorio sofisticado, fué sencilla de realizar y rápida, sin embargo las cepas que poliaglutinan no pueden ser tipificadas y en ocasiones los resultados son difíciles de interpretar debido a la consistencia grumosa tanto del antígeno como del reactivo de Staphylococcus.

Por otra parte la hemaglutinación indirecta requirió de más equipo y consumió mas tiempo que la coaglutinación, pero fue más fácil de interpretar y los resultados se cuantifican al emitirse el título de la reacción dando lugar a la mejor identificación de un serotipo en el caso de reacciones cruzadas las que por lo general son menos que con coaglutinación.

#### LITERATURA CITADA

- 1.- Fenwick, B.W. and Osburn, B.I. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of Haemophilus pleuropneumoniae in convalescent and immunized. Infection and Immunity, 54 (2) 575-582, 1986
- 2.- Inzana T.J. and Mathison, B: Serotype specificity of the capsular polymer of Haemophilus pleuropneumoniae serotype 5. Infection and Immunity, 55 (7). 1580-1587. 1987
- 3.- Mittal. K.R.; Higgings, R. and Haemophilus pleuropneumoniae by coagglutination test. Journal of Clinical Microbiology, 18 (6), 1351-1354, 1983.
- 4.- Mittal, K.R.; Higgins R. and Larivisre, S. Serological Studies of Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae strains of serotype 6 and their antigenic relationships with other serotypes. The Veterinary Record, 122, 199-203. 1988
- 5.- Nielsen, R. Seroepidemiology of Actinobacillus pleuropneumoniae Canadian Veterinary Journal, 29, 580-582. 1988.