

Estudio comparativo de dos técnicas serológicas para la tipificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

José Angel Gutiérrez Pabello*
Elda Ariadne Jiménez Guerra**
Gerardo Ramírez Hernández**
Esperanza Galván Pérez**
Alejandra Mercadillo**

Resumen

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) es el agente causal de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP), este microorganismo puede ser clasificado en 12 serotipos o puede ser no tipificable. Se aislaron 81 cepas de *A. pleuropneumoniae* de pulmones neumónicos de cerdo. Todas las cepas fueron serotipificadas por coaglutinación (CoA) y hemoaglutinación indirecta (HI), 43 cepas (53%) fueron clasificadas en el mismo serotipo por las dos técnicas, 31 correspondieron al serotipo 1, nueve al serotipo 5 y una a los serotipos 3, 4 y 6. Catorce cepas poliaglutinaron al usar CoA, pero fueron clasificadas en el serotipo 1 por la HI. El 13% de las cepas fueron clasificadas en diferente serotipo por cada una de las pruebas usadas. Finalmente, 13 cepas fueron no tipificables por la HI y clasificadas en diferentes serotipos por la CoA. Se sugiere el uso de la CoA para la tipificación rutinaria, mientras que la HI se recomienda para la identificación final de los aislamientos. En relación con los serotipos identificados, los resultados de esta investigación coinciden con lo registrado por otros autores, ya que de 81 cepas, 45 correspondieron al serotipo 1, y nueve, al serotipo 5; lo que confirma que estos dos serotipos son los más frecuentemente aislados en México.

Introducción

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) es el agente causal de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP), este microorganismo puede ser clasificado en 12 serotipos o puede ser no tipificable.¹⁶

La distribución de los serotipos varía de país a país y aun entre las diferentes zonas de un país, por lo tanto,

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 controlar la PCP es el desarrollo de vacunas efectivas y seguras, las cuales deberán basarse en el patrón de serotipos de cada región.

Se han desarrollado una gran cantidad de pruebas serológicas para la tipificación de App: inmunofluorescencia, aglutinación en placa, aglutinación en tubo, aglutinación en látex, coaglutinación, inmunodifusión, hemoaglutinación indirecta, ELISA y contraelectroforesis.^{3,6,7,8,9,11,12,17}

El objetivo de este trabajo fue evaluar la coaglutinación y la hemoaglutinación indirecta para la serotipificación de cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, aisladas en México.

Material y métodos

Cepas. El aislamiento de las cepas se realizó a partir de pulmones de cerdo con lesiones neumónicas. La cara interna de un trozo de pulmón, obtenido estérilmente, fue inoculado en una placa de agar sangre, cruzando el cultivo con una estría de la cepa nodriza *S. aureus*. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h en condiciones de velobiosis; las colonias sospechosas fueron sembradas para purificarlas.

La identificación se llevó a cabo utilizando técnicas bacteriológicas estándar: tinción de Gram, ureasa, manitol, xilosa, trehalosa, indol, CAMP y satelitismo.^{1,2} Después de su identificación, se inoculó cada cepa en agar casoy adicionado de 10% de suero equino y 0.025% de NAD, el crecimiento fue cosechado en leche descremada estéril y se conservó a -70°C, hasta su tipificación posterior.

Coaglutinación (CoA). La preparación de los antisueros, reactivos, antígenos, así como el desarrollo de la prueba fueron realizados de acuerdo con el método de Mittal *et al.*,¹² sólo se incluyeron los antisueros correspondientes a los serotipos 1 al 9. En un portaobjetos, se mezcló una gota del reactivo de coaglutinación con un volumen igual de la suspensión bacteriana. La mezcla fue homogeneizada con un aplicador de madera. El

Recibido para su publicación el 10 de marzo de 1994.

* Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, D.F.

** Departamento de Producción Animal: Cerdos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, D.F.

portaobjetos fue examinado sobre una superficie oscura, como contraste, y se consideró negativo si la aglutinación no ocurría dentro de los primeros 4 min. Una reacción positiva se caracterizó por una aglutinación clásica ocurrida normalmente a los pocos segundos.

Hemoaglutinación indirecta (HI). De cada cepa se preparó una suspensión bacteriana que se calentó a 56°C durante 30 min y se centrifugó a 4500 gravedades por 20 min. El sobrenadante se usó como antígeno. Volúmenes iguales del antígeno diluido 1:10 en 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 antisueros de los serotipos 1 al 9 se inactivaron a 56°C por 30 min. Los anticuerpos heterófilos se absorbieron usando glóbulos rojos no sensibilizados al 4%. Se preparó una serie de diluciones dobles de los antisueros desde 1:10 hasta 1:10240 en microplacas con fondo en "U", usando un volumen de 100 µl. 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 h. El título se expresó como la máxima dilución del antisuero, el cual mostró un sedimento plano de comparación con el control negativo, que mostró el botón de glóbulos rojos sedimentados.

Resultados

Se aislaron 81 cepas de *A. pleuropneumoniae* de pulmones neumónicos de cerdo. Todas las cepas fueron serotipificadas por ambos métodos; 43 cepas (53%) fueron clasificadas en el mismo serotipo por las dos técnicas; 31 pertenecieron al serotipo 1, nueve al serotipo 5 y una a los serotipos 3, 4 y 6. Catorce cepas poliaglutinaron al usar CoA, pero fueron clasificadas en el serotipo 1 por la HI, aunque con títulos que oscilaron de 10 a 40. El 13% de las cepas fueron clasificadas en diferente serotipo por cada una de las pruebas usadas. Finalmente, 13 cepas fueron no tipificables por la HI y clasificadas en diferentes serotipos por la CoA (Cuadro 1).

Núm. de cepas	Prueba utilizada	Resultado
43	CoA	Mismo serotipo
	HI	
14	CoA	Poliaglutinación Serotipo 1
	HI	
13	CoA	Serotipos 1, 4, 7 No tipificables
	HI	
11	CoA	Diferente serotipo
	HI	
Total 81		

Discusión

Actinobacillus pleuropneumoniae ha sido clasificado en 12 serotipos. Los antígenos específicos de serotipo han sido descritos como estables y lábiles al calor y se ha propuesto que sean la cápsula, el lipopolisacárido (LPS) o ambos.^{5,7,10,15}

Inzana y Mathison⁷ en un estudio afirman que la cápsula es el antígeno que determina la especificidad de serotipo y sugiere que se deben utilizar antisueros preparados con el antígeno capsular purificado para la serotipificación.

Por su parte, Mittal *et al.*,¹³ sugieren que los antígenos específicos de serotipo son de origen capsular y que éstos se demuestran mejor, calentando los cultivos a 56°C, ya que es material que difunde libremente en las capas superficiales de la bacteria y es fácilmente removible con solución salina. También informaron que los antígenos particulados 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 antigénicamente 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 que podrían ser especie específicos, fueron principalmente estables al calor. La antigenicidad cruzada no se observó cuando se utilizaron antígenos solubles, por lo que se puede asumir que estos epitopes comunes entre serotipos pertenecen a 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 Fenwick y Osburn,⁴ quienes señalan que los lipopolisacáridos de App poseen antígenos que son especie específicos y serotipo específicos, mientras que los antígenos capsulares son serotipo y cepa específicos.

Las pruebas de aglutinación, basadas en el uso de células completas como antígeno, requieren cultivos capsulados en fase mucoide, el paso de mucoide a liso o rugoso reduce la posibilidad de tipificarlos.¹⁰

En el presente estudio el 70% de los aislamientos fue tipificado confiablemente; sin embargo, 14 cepas no mucoides mostraron tendencias autoaglutinantes, lo que imposibilitó su clasificación con CoA.

Los resultados de la CoA y de la HI no coincidieron en 24 ocasiones (29.6%). Resultados similares fueron informados por Mittal *et al.*,^{9,14} aunque el porcentaje de cepas que mostraron reacciones positivas con CoA y que no reaccionaron con HI fue de tan sólo 5%. Esta divergencia puede deberse a la detección de diferentes antígenos por cada una de las pruebas, ya que para la realización de la CoA, generalmente se utilizan suspensiones de células completas, por lo que los antígenos que se detectan son principalmente especie y serotipo específicos; en cambio los antígenos usados en la HI son de tipo capsular, o sea serotipo y cepa específicos o ambos.

La CoA no requirió de equipo sofisticado de laboratorio, fue rápida y sencilla de realizar; sin embargo, las cepas que poliaaglutinan 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 CoA, además de presentar cierto número de reacciones cruzadas.

Por otra parte, la HI requirió de más equipo y consumió más tiempo que la CoA, pero fue más fácil de interpretar, y los resultados se cuantifican al emitirse el título de la reacción, lo que da lugar a una mejor identificación de un serotipo, en el caso de reacciones cruzadas, las cuales por lo general, son menores que con CoA.

Con base en las características anteriores se sugiere el uso de la CoA para la tipificación rutinaria, mientras que la HI se recomienda para la identificación final de los aislamientos.

En relación con los serotipos identificados, los resultados de esta investigación coinciden con lo que otros autores han informado,^{1,2} ya que de 81 cepas, 45 pertenecieron al serotipo 1, y nueve al serotipo 5. Se confirma así que estos dos serotipos son los más frecuentemente aislados en México.

Abstract

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) is the causative agent of porcine pleuroneumonia, and it may be classified into 12 serotypes or may be non-typable. A total of 81 strains of App was isolated from pig pneumonic lungs. All strains were serotyped by the coagglutination test (CoA) and by the indirect hemagglutination assay (IHA) using specific antisera against 9 of the 12 serotypes so far known. Forty three strains (53%) were typed by both techniques. From these 43 strains, 31 belonged to serotype 1, nine to serotype 5 and one to serotypes 3, 4 and 6. Fourteen strains showed autoagglutination tendencies, when serotyping by CoA, however, they were classified as serotype 1 by IHA. Thirteen per cent of the isolations were placed in different serotypes by each of the tests. Finally, 13 strains were not typable by IHA and classified in distinct serotypes by CoA. Use of CoA is suggested for routine typing, whereas IHA is recommended only for final identification. Results of this research agree with the serotype pattern already described in Mexico: From 81 isolations, 45 belonged to serotype 1 and nine to serotype 5; confirming that these two serotypes are the most frequently isolated and found in our country.

Literatura citada

1. Ciprián, C.A., Medina, A.G., Fuentes, R.M., Pijoan, C.A., Torres, A.O., Colmenares, V.G., y Camacho, M.J.: Serotipificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en México. *Vet. Méx.*, 19: 205-209 (1988).
2. Díaz, C., González, M., Jiménez, E. y Stephano, A.: Identificación de diferentes serotipos de *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* aislados en México de cerdos con pleuropneumonía de 1985 a 1988. *Vet Méx.*, 20: 157-160 (1989).
3. Eaves, L. and Blackall, P.J.: Serological characterization of Australian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Austr. vet. J.*, 65: 379-381 (1988).
4. Fenwick, B.W. and Osburn, B.J.: Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infect. Immun.*, 54: 575-582 (1986).
5. Gunnarson, A.: Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae)*: Extraction of type specific antigens. *Am. J. vet. Res.*, 39: 469-472 (1979).
6. Hunter, D., Jones, M.A. and McKendry, T.: Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates using ring precipitation test. *Vet. Rec.*, 113: 158 (1983).
7. Inzana, T.J. and Mathison, B.: Serotype specificity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.*, 55: 1580-1587 (1987).
8. Kamp, E.M., Popma, J.K. and Leengoed van, L.A.M.G.: Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the Netherlands: With emphasis of heterogeneity within serotype 1 and (proposed) serotype 9. *Vet. Microbiol.*, 13: 249-257 (1987).
9. Mittal, K.R., Bourdon, S. and Berrouard, M.: Evaluation of counterimmunoelectrophoresis for serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates and detection of type-specific antigen in lungs of infected pigs. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 2339-2342 (1993).
10. Mittal, K.R., Higgins, R. and Lariviere, S.: Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 15: 1019-1023 (1982).
11. Mittal, K.R., Higgins, R. and Lariviere, S.: Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* by an indirect hemagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 17: 787-790 (1983).
12. Mittal, K.R., Higgins, R. and Lariviere, S.: Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 18: 1351-1354 (1983).
13. Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. and Martineau, G.P.: Effect of heat treatment on the surface antigens of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Rec.*, 120: 62-65 (1987).
14. Mittal, K.R., Higgins, R. and Lariviere, S.: Serological studies of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains of serotype 6 and their antigenic relationship with other serotypes. *Vet. Rec.*, 122: 199-203 (1988).
15. Nicolet, J.: Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. vet. J.*, 29: 578-580 (1988).
16. Nielsen, R.: Seroepidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. vet. J.*, 29: 580-582 (1988).
17. Sakpuaram, T., Fukuyasu, T. and Ashida, K.: Isolation of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* from pneumonic lungs of slaughtered pigs. *Jpn. J. vet. Sci.*, 51: 1279-1281 (1989).