

1  
29



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

## DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE Haemophilus pleuropneumoniae ser. 1 EMPLEANDO Staphylococcus aureus cepa HG-14 POR UN ENSAYO DE COAGLUTINACION EN TARJETA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
EDGAR AGUILERA CERON

Director de Tesis:  
DR. J. ABEL CIPRIAN CARRASCO

Asesor de Tesis:  
JOSE CAMACHO MACHIN

FALLA DE ORIGEN

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México  
1 9 8 9





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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## R E S U M E N

El ensayo de coaglutinación en tarjetas se desarrollo a partir de una cepa de Haemophilus pleuropneumoniae serotipo 1 y Staphylococcus aureus cepa HG-14 hiperproductora de protefina A (comparada con la cepa Cowan 1). Ambos antígenos fueron teñidos por separado con rosa de bengala y suspendidos en amortiguador de lactato pH 3.6 a concentración final del 8%. Para la prueba se colocaron 30 mcl de suero de cerdo en el pozo de una placa de porcelana blanca excavada, los cuales se mezclaron con un volumen igual del reactivo de estafilococos, agitando por rotación lenta durante cuatro minutos. Si no se presentaba aglutinación se agregaban 30 mcl del reactivo de Haemophilus, agitando cuatro minutos más, se consideró positivo todo grado de aglutinación comparado con un control negativo en el que el suero se intercambi6 por amortiguador salino de fosfatos, y un control positivo en el que se utiliz6 un suero hiperinmune desarrollado en conejo contra el cuerpo bacteriano intacto de la cepa de Haemophilus utilizada en la preparación del reactivo. Este ensayo se compar6 contra la prueba de aglutinación lenta en tubo. En ocasiones se present6 aglutinación al agregar el reactivo de estafilococos a los sueros, estas reacciones inespecíficas se consideraron causadas por presencia de anticuerpos contra el estafilococo o por una concentración elevada de proteínas en los

sueros, por lo que éstos fueron adsorbidos con un volumen igual (30 mcl) de solución de proteína A (100 mg/ml) durante un minuto y se trataron según el método ya descrito duplicando el volumen de reactivos. Se probaron 102 sueros de cerdo por coagulación y aglutinación lenta en tubo, de los cuales se desecharon 22 por presentar hemólisis severa, ya que esta característica interfirió en la lectura de los resultados de ambas pruebas. Los resultados se compararon estadísticamente por la prueba de Chi cuadrada, no encontrando diferencia significativa entre los ensayos.

Considerando los resultados obtenidos la prueba puede ser utilizada para el diagnóstico de la pleuroneumonía contagiosa porcina.

# I N D I C E

I. INTRODUCCION	
Antecedentes .....	1
Pleuroneumonía contagiosa porcina .....	2
<u>Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae</u> .....	3
Transmisión, patología y cuadro clínico .....	4
La coaglutinación y su utilidad diagnóstica .....	8
<u>Staphylococcus aureus</u> y proteína A .....	11
Diagnóstico de la pleuroneumonía contagiosa porcina .....	19
II. OBJETIVO .....	22
III. MATERIALES Y METODOS	
Material biológico .....	23
Medios de cultivo y soluciones .....	25
Cultivo de los microorganismos .....	27
Fijación y estandarización de las cepas .....	28
Pruebas de aglutinación .....	31
Aislamiento y purificación de proteína A .....	36
Determinación de proteína A .....	37
Determinación de proteínas .....	38
Electroforésis en gel de poliacrilamida .....	38
IV. RESULTADOS	
Aislamiento y purificación de proteína A .....	39
Pruebas de aglutinación .....	44
V. DISCUSION .....	48
VI. CONCLUSIONES .....	53
VII. REFERENCIAS .....	54

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

### ANTECEDENTES.

En las granjas porcinas la producción animal esta regularmente afectada por las enfermedades infecciosas, siendo las afecciones entéricas y respiratorias las que provocan el mayor porcentaje de morbilidad y mortalidad del ganado porcino en América y Europa (Jericho, 1968; Pijoan y col., 1978; Muirhead, 1979). Son múltiples los agentes etiológicos en estas enfermedades y regularmente se asocian con tasas de crecimiento reducidas (Muirhead, 1979; Burch, 1982).

En los últimos años, la atención sobre problemas respiratorios en cerdos ha sido enfocada a las neumonías, que aunque de etiología variable se atribuyen principalmente a bacterias de los géneros Pasteurella, Bordetella y Haemophilus, sin que se reste importancia a micoplasmas, virus o interacciones entre estos (Leman, 1981; Taylor, 1981). En México, las neumonías representan grandes pérdidas económicas para la porcicultura. Estudios realizados en distintos estados de la República Mexicana revelaron que un 50% de los cerdos sacrificados en rastro presentaban lesión pulmonar (Maqueda, 1977), tan solo en el rastro de Ferrería en la ciudad de México, en 1978 el 10-12% de los animales sacrificados presentaban neumonía y para 1986 la cifra aumentó al 28.2% (Ochoa, 1978; Medina, 1986).

Un porcentaje importante de las neumonías lo representa la pleuroneumonía contagiosa porcina, esta enfermedad es de distribución mundial y tiene una gran importancia para la industria porcina moderna (Leman, 1981; Taylor, 1981). Los rangos de morbilidad y mortalidad pueden exceder al 50% durante los brotes agudos y pérdidas posteriores son ocasionadas debido a la pobre conversión alimenticia en los cerdos afectados crónicamente y el alto costo de su tratamiento, además la prevalencia y severidad de esta infección parecen relacionarse con el grado de intensidad de la producción porcina (Sanford y Josephson, 1981).

#### Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

La pleuroneumonía porcina está ampliamente distribuida, se ha encontrado en Inglaterra, Argentina, Estados Unidos, Suiza, Holanda, Dinamarca, India, Noruega, Canadá, Australia, Finlandia, Japón, Alemania, Taiwan, Suecia, Bélgica y Francia. El agente etiológico Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae, se clasifica según sus antígenos capsulares. En el presente, se reconocen diez serotipos designados con números arábigos del 1 al 10 (Gunnarson y col., 1977; Rosendal y Boyd, 1982; Nielsen y O'Connor, 1984; Nielsen, 1985), dos nuevos serotipos denominados 11 y 12 se han propuesto recientemente, pero el estatus del serotipo 11 no es claro en este momento (Nielsen, 1986). El serotipo 1 se

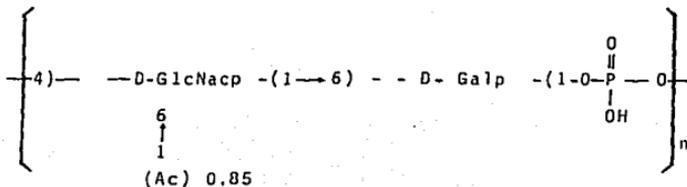
ha encontrado en Argentina, Holanda y Australia, el serotipo 2 en Suiza, Dinamarca, Suecia y Japón, el serotipo 3 en Suiza, Suecia e Inglaterra, el serotipo 4 en los Estados Unidos, Suecia, Suiza y Francia, y, el serotipo 5 en los Estados Unidos, Canadá, Taiwan, Finlandia, Holanda y Bélgica (Leman, 1981). En México, ha sido aislado el serotipo 1 (Medina, 1986).

Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae.

A. pleuropneumoniae es una bacteria pleomórfica que se observa generalmente como bacilo corto gram-negativo, encapsulado, de aproximadamente 0.5 a 1.5 micras de largo por 0.3 micras de diámetro, inmóvil, no esporulado, aerobio y anaerobio facultativo, crece bien en medios enriquecidos que contienen factor V (nicotinamida dinucleótido), sin requerimiento de factor X (hemina), de ahí que se pueden desarrollar en la proximidad de las colonias de Staphylococcus aureus, ya que éste libera el medio el factor V, dicho fenómeno se conoce como satelitismo (Cowan, 1974; Mc Faddin, 1980). Las colonias en agar suelen ser muy pequeñas (menores a un milímetro), blanquecinas, brillantes y mucoides, se reconocen dos variantes: la lisa y la rugosa.

La diferenciación en serotipos es importante en estu-

dios epizootiológicos de la pleuroneumonía contagiosa porcina. Los antígenos que permiten la diferenciación en serotipos son parte del material capsular de A. pleuroneumoniac y, presumiblemente una mezcla de polisacárido y lipopolisacárido, encontrándose en el lipopolisacárido determinantes antígenos comunes y específicos entre los diferentes serotipos, e inmunodeterminantes específicos de cepa dentro del polisacárido capsular (Fenwick y Osburn, 1986; Mittal y col., 1987). El polisacárido capsular de A. pleuroneumoniac serotipo 1 (ATCC 27088), es un polímero lineal tipo ácido teicoico compuesto por unidades repetitivas de disacárido 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y D-galactosa, de alto peso molecular que presenta la siguiente estructura:



(Altman y col., 1985).

#### Transmisión, patología y Cuadro Clínico.

La transmisión de la pleuroneumonía se lleva a cabo fundamentalmente por contacto directo de cerdo a cerdo a

través de aerosoles. El periodo de incubación en condiciones de campo varía entre 12 y 24 horas para infecciones naturales y experimentales (Taylor 1931). Entre los factores que predisponen a la enfermedad están los cambios bruscos de temperatura, malas condiciones de higiene, "stress" debido al manejo (Bjorlund, 1965; Landquist, 1974; Tielsen, 1973), y una alta densidad de población (Henry, 1982). La pleuroneumonía contagiosa porcina puede presentarse en forma crónica o aguda, característicamente en la forma crónica hay disminución de peso y crecimiento, y una baja conversión alimenticia, provocando mayor costo para el poricultor los animales que se mantienen vivos que los que mueren por la forma aguda (Henry, 1982). Los brotes se presentan súbitamente y se detectan por la muerte de algunos cerdos en la piara. La manifestación más aparente de esta enfermedad es la muerte repentina de los animales y la presencia de hemorragia nasal, debidas al proceso inflamatorio del parénquima pulmonar. En la forma aguda puede observarse anorexia, disnea con respiración diafragmática rápida, cianosis en orejas y extremidades, vómito ocasional y muerte con hemorragia nasal en uno a cuatro días o bien recuperación espontánea, en la forma sobreaguda se detecta hipertermia (41-42°C), cianosis en piel, abdomen y oreja, hemorragia y espuma nasal, cuillidos agudos, opistótonos y muer

te (Ramírez, 1970).

Las lesiones a nivel patológico ocasionadas por la pleuroneumonía contagiosa porcina pueden ser observadas tanto a nivel macroscópico como microscópico. Las lesiones macroscópicas comprenden pericarditis, hidropericardio, hidrotórax de líquido sanguinolento, hemorragias en miocardio, adherencias pleurales, infartos en lóbulos diaphragmáticos y friabilidad de la zona infartada. Las lesiones microscópicas indican zonas de infarto, edema vascular, infiltración peribronquial y perivascular de células mononucleares y hemorragias alveolares (Taylor, 1981).

Los datos disponibles sugieren que la enfermedad se produce cuando A. pleuropneumoniae llega a nivel alveolar y su virulencia esta asociada a uno o varios factores que parecen ser endotoxinas. El microorganismo resulta ser citotóxico para los macrófagos alveolares del cerdo y células mononucleares de sangre periférica. Esta actividad tóxica es aislada en sobrenadantes de cultivo, es termoestable y puede ser neutralizada con sueros de cerdo con infección crónica y puede producir trombosis vascular y exudación de flujo edematoso y hemorrágico (Bendixen y col., 1981) La infusión intrabronquial de lipopolisacárido obtenido a partir de cepas lisas y rugosas de A. pleuropneumoniae induce en cerdos lesiones típicas a las encontradas en cerdos

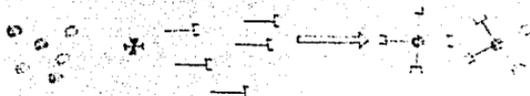
moriundos en estados agudos de pleuroneumonía, indicando la posible participación de endotoxinas en la patogénesis de la enfermedad (Fenwick y col., 1986).

## La Coaglutinación y su Utilidad Diagnóstica.

El método de coaglutinación consiste en el uso de la bacteria Staphylococcus aureus, cuya pared contiene proteina A, ésta tiene la capacidad de fijar anticuerpos de la clase IgG de algunas especies de mamíferos, por su porción cristalizable (Fc) y deja libres los sitios de combinación (Fab). Al utilizar diferentes antisueros para cubrir de anticuerpos al estafilococo se dispone de una técnica para reconocer diferentes antígenos en líquidos biológicos, los cuales se ponen de manifiesto por la aglutinación de los estafilococos sensibilizados, el método se muestra en la figura 1. La prueba ha demostrado tener una sensibilidad comparable a la aglutinación con látex y mayor que la contrainmuno-electroforesis, en la detección de antígenos solubles de Haemophilus influenzae tipo B, Streptococcus pneumoniae y Neisseria meningitidis, en fluidos corporales (Thirumoorthi y Dajani, 1979). La prueba también se utiliza para la identificación diferencial de estreptococos beta-hemolíticos de los grupos A, B y C (Edwards y Larson, 1974), en la detección de Salmonella typhi (García-Tamayo y Drago, 1982), en la diferenciación de serovariedades de Pseudomonas aeruginosa (Ansorg y col., 1984), en la detección de antígenos solubles o asociados a células de Legionella pneumophila ser 1 a 6, L. bozemanii, L. dumofii, L. gormanii y L. micdadei (Wilkinson y Fikes, 1981), para

## COAGULACION

## A. ESTABILIZACION



## B. REACCION DE AGLUTINACION

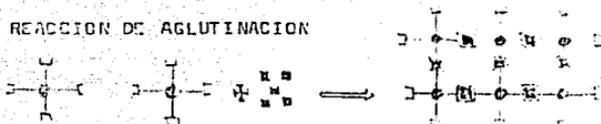


Figura 1. Representación grafica de la prueba de coagulación, en donde ● es S. aureus; — un anticuerpo específico y ■ el antigeno al que va dirigida el anticuerpo.

la identificación de Acanthamoeba, Naegleria y Entamoeba histolytica (Culbertson y Harper, 1980), en la detección de antígenos de Herpes simplex (Mogensen y Dishon, 1981), y en la detección y serotipificación de A. pleuropneumoniae aislado de pulmones neumónicos de cerdo (Mittal y col., 1983; Mittal y col., 1986). La ventaja de utilizar al estafilococo como soporte sólido es que su obtención en gran escala a bajo costo es factible en nuestro país. La sensibilidad de la prueba permite demostrar la presencia de antígenos que tienen una concentración de 1 mcg/ml o un poco menos (García Tamayo y Drago, 1982). Otras pruebas como el radioinmunoensayo o ELISA tienen una sensibilidad superior, pero no se puede rechazar la utilidad de la coaglutinación como una prueba de ayuda diagnóstica para muestras de campo que se encuentran en espera de exámenes o cultivos cuyos resultados demorarán horas o días.

Staphylococcus aureus y Proteína A

Staphylococcus aureus es un coco gram-positivo que se desarrolla en forma de racimos, es inmóvil y no forma esporas. Su diámetro puede variar entre 0.7-1.2 micras. Aerobio y anaerobio facultativo. Catalasa-positivo, oxidasa-negativo. Ataca a los azúcares por fermentación (Cowan, 1974). El conocimiento de las reacciones inmunológicas de este microorganismo común está todavía muy incompleto, probablemente no exista ningún otro patógeno humano que produzca tantos factores virulentos como S. aureus, entre las sustancias mejor caracterizadas están la toxina alfa (una de las cuatro hemolisinas conocidas), coagulasa, lipasa, leucocidina, enterotoxina, exfoliatina y proteína A (Fudenberg, 1980). La proteína A se distribuye uniformemente en la capa más externa de la pared celular del 75 al 90% de las cepas de S. aureus coagulasa-positivas (Forsgren, 1970). No existiendo una correlación clara y demostrable entre su presencia y la patogenicidad del microorganismo (Forsgren, 1972; Lind, 1972). La proteína está unida covalentemente al peptidoglicán de la pared celular, constituyendo de un 5 a 7% del peso de la misma y alrededor del 1.7% del peso total de la bacteria (Sjöquists y col., 1972), aunque un 8 a 30% es secretado durante la fase exponencial de crecimiento

(Frosgren, 1969; Movitz, 1976). El monto de producción de la proteína A por los estafilococos es muy variable y depende de la cepa de origen, una de las mejores productoras es la cepa Cowan I (ATCC 12598; NCTC 8530), en tanto que las cepas resistentes a metilicina usualmente carecen o solo la secretan (Lind, 1972, Winblad y Ericson, 1973). La cepa Cowan I se considera la cepa de referencia por su capacidad de producción de proteína A, sin embargo, se pueden aislar cepas silvestres hiperproductoras a partir de muestras clínicas con relativa facilidad probando el contenido de la proteína mediante microhemaglutinación (González-Aguilar y López-Revilla, 1980).

La proteína A reacciona con estructuras Fc de la cadena pesada de las gamma-globulinas. Basandose en la actividad de unión de fragmentos y subfragmentos moleculares y datos de cristalografía de rayos X se observó que el sitio de unión está localizado en la interfase  $C^H_2 - C^H_3$  en la IgG humana, en la de cerdo y probablemente también en la de otras especies (Kronvall y col., 1979a). Es preciso señalar que esta proteína no se fija a todas las gamma-globulinas animales, sino que se circunscribe a las de algunos mamíferos como el hombre, conejo, ratón, oveja, cabra, rata, echidna, cerdo y cuye, aunque no se excluye la posibilidad de otros. Aún más, solo es capaz de fijarse a algu-

nas de las subclases de dichas gamma-globulinas (Goding, 1976).

La protefna A posee un peso molecular de 42,000 d, contiene  $378 \pm 6$  residuos aminoácidos y menos del 0.2% de hexosaminas, presenta cuatro residuos de tirosina pero no contiene triptofano y su  $A_{275nm}^{1\%}$  es de 1.65 (Sjöquist y col., 1972). Su punto isoeléctrico es 5.1 (Lindmark y col., 1977). La molécula se conserva estable en un intervalo de pH de 0.99 a 11.8 y parcialmente intacta aún en clorhidrato de guanidina 6 molar o a 80°C, normalmente se encuentra cerca de un 50% de estructura alfa-hélice y 10-20% de estructuras beta (Sjoholm, 1975). La protefna consiste de cinco regiones, cuatro de las cuales (fragmentos D,A,B y C) pueden unirse a la región Fc de la IgG y muestran un alto grado de homología (Sjodahl, 1977), sin embargo, funcionalmente sólo dos sitios pueden combinarse con la IgG, posiblemente debido a interferencia estérica (Sjöquist y col., 1972). Aunque la unión con la IgG se da en la interfase de las regiones homólogas constantes 2 y 3 del framento Fc, se ha descrito una interacción alterna entre la gamma-globulina y la protefna A que comprende la existencia de sitios activos para la protefna A en el fragmento  $F(ab')_2$  de IgG, siendo el fragmento B de la protefna el que se combina con el sitio activo  $F(ab')_2$  (Ingånas y

col., 1980; Ingãnas y col., 1981). Las IgG que precipitan con protefna A contienen dos sitios activos que cooperan en la precipitaci3n, la ausencia de uno de estos sitios inhibe la reacci3n o vuelve no reactiva a la IgG. Si la inmunoglobulina es reactiva solo en la regi3n Fc $\delta$ , 3sta puede inhibir la precipitaci3n entre una inmunoglobulina precipitante y la protefna, y si 3sta es reactiva tambi3n en la regi3n Fab de la mol3cula, el fragmento F(ab') $_2$  puede participar en iniciar la formaci3n de co-precipitaci3n directa (Kronvall y Williams, 1971; Ingãnas y col., 1980). La constante de equilibrio para el complejo protefna A-IgG de humano es  $4 \times 10^{-7}$  l/mol, que es el mismo valor que el de una reacci3n de anticuerpos de baja afinidad (Kronvall y col., 1979b). Es necesario sobresaltar que la protefna A no se fija a cualquier clase de IgG. En humanos por ejemplo, s3lo se forma complejo con las subclases IgG $_1$ , IgG $_2$  e IgG $_4$  con la IgG $_3$  regularmente no se combina excepto cuando ha sido codificada por dos alelos especifcos  $\delta$ 3, presentando histidina en la posici3n 435, mientras que aquellas que no se combinan tienen arginina en dicha posici3n (Van Loghem y col., 1982). Algunas subclases de IgM de humano y conejo tambi3n pueden unirse a la protefna A (Goding, 1976), tambi3n puede existir interacci3n con IgE humana mediante la vfa de interacci3n alterna con F(ab') $_2$

(Ing anas y col., 1980), así mismo un 10% de la IgG porcina reacciona por esta vía (Milon y col., 1978). finalmente, la subclase 2 de la IgA humana y las IgD de superficie en linfocitos son capaces de ligar proteína A (Goding, 1976).

Cuando la proteína A se liga a IgG vía la pieza Fc blo<sub>q</sub> quea la fijación del primer componente del complemento, C<sub>1</sub> (Stalenheim y col., 1973), sin embargo, dicha unión si desencadena el sistema del complemento (Sj quist y Stalenheim, 1969; Stalenheim y col., 1973), solo que la activación se da cuando se liga la proteína a la porción Fab de IgG, los efectos biológicos de la proteína A como la fijación del complemento son mediados en parte por la reactividad asociada a Fab (Ing anas y col., 1980).

La proteína A puede ligarse a los receptores para gamma-globulinas en macrófagos y polimorfonucleares interfiriendo por lo tanto en los procesos de fagocitosis, también se ha observado puede ser un activador policlonal de células B (Ing anas y col., 1981; Barnet-Foster y col., 1982).

La proteína A ha sido aislada mediante cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel previa digestión de la bacteria con lisozima, pero los productos son en general heterogéneos y los rendimientos bajos, en contraste

cuando se trata la bacteria con lisostafina que produce proteína A más homogénea (Sjoquist y col., 1972 a,b). Se han obtenido rendimientos más altos y proteína de alta pureza utilizando columnas de inmunosorbencia con IgG ligada a sepharosa 4B a partir del sobrenadante de bacterias digeridas con lisostafina (Hjelm y col., 1972). El aislamiento en un paso se logra separando la proteína A del caldo de un cultivo de estafilococos por medio de una columna de inmunosorbencia (Kronvall, 1973). También se ha utilizado cultivo de diálisis con la cepa de S. aureus A676 con buenos resultados (Landwall, 1978).

La biomasa y el monto de proteínas producidas por un estafilococo se ven influenciadas por el tipo y concentración de nutrientes, así como el pH del medio en donde se desarrollan. Se considera que un desarrollo satisfactorio de S. aureus con alta producción de proteína se ve favorecido por medios que contengan extracto de levadura e hidrolizado de caseína, con un pH regulado entre 7.0-7.5, siendo recomendable la adición de vitaminas como la tiamina (Arvidson y Holme, 1971, Arvidson y col., 1971). En el caso particular de producción de proteína A, los medios más recomendables son el CCY (hidrolizado de caseína-extracto de levadura) y el caldo soya-tripticaseína, a un pH de 7.4 incubando a 37°C por 24 a 48 horas (Landwall, 1978; Ansorg y Zarifoglu, 1986).

El estafilococo vivo en suspensión o conservando a 4°C presenta un decremento en la actividad de proteína A de un 50% en tres días, aún a -20°C la actividad decrece rápidamente debido a la actividad de enzimas autolíticas (Kronvall y col., 1979a). Se ha propuesto diversos métodos para inactivar la bacteria, pero la mayoría de ellos resultan en una pérdida considerable de la actividad de proteína A (Ansorg y Zarifoglu, 1986). El método más utilizado de inactivación y estabilización del estafilococo para la coaglutinación consiste en separar la masa bacteriana por centrifugación y fijarla con formalina al 1.5% a una concentración final de bacterias al 10%, a temperatura ambiente durante 90 minutos, con agitación constante. La suspensión es introducida a un baño a 60°C durante 5 minutos seguido por un enfriamiento rápido en baño de hielo, este tratamiento térmico destruye a las bacterias que pudieron sobrevivir al tratamiento con formalina (Goding, 1976), sin embargo, dicho tratamiento disminuye a un 42% la capacidad de fijación de IgG por el estafilococo y se ha propuesto que el tiempo de tratamiento puede ser disminuido a 30 minutos si se usa formalina al 0.5% sobre una suspensión al 1% de estafilococos, omitiéndose el tratamiento térmico, de esta manera se obtiene un 74-76% de actividad de fijación de IgG por la bacteria. El tratamiento con n-propanol al 50% sobre una suspensión de bacterias al 1%

en amortiguador de fosfatos durante 10 minutos arroja resultados semejantes (Ansorg y Zarifoglu, 1936). La bacteria una vez fijada se lava varias veces con amortiguador salino de fosfatos y se ajusta al 10% almacenandose a - 20°C o liofilizando para no perder actividad (Goding, 1976). El contenido de proteína A por célula es cercano a 80,000 moléculas (Kronvall y col., 1976b) y 200 mg de bacteria liofilizada (aproximadamente un gramo de peso húmedo) pueden fijar 20 mg de IgG (Ansorg y Zarifoglu, 1936).

### Diagnóstico de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

El diagnóstico de la enfermedad se puede realizar a partir de los datos clínicos, patológicos o a través de los análisis de laboratorio. En vista que la rápida detección e identificación del agente etiológico en la infección puede ser de gran valor en el diagnóstico y tratamiento rápido y efectivo de la enfermedad, y que los portadores así como los enfermos crónicos son de importancia para la prevalencia de la pleuroneumonía porcina, el diagnóstico de laboratorio es el procedimiento más confiable para el control de esta afección.

En el laboratorio, A. pleuropneumoniae puede ser aislado a partir de exudados bronquiales o nasales y homogenizados de pulmón con lesión neumónica. La muestra es sembrada para primo aislamiento en agar sangre al 5%, inoculando por estriado continuo y colocando sobre éste una estriá de Staphylococcus aureus como cepa nodriza. El aislamiento de be mostrar colonias pequeñas cercanas a la estriá de estafilococo, las cuales presenten hemólisis beta, dando un diagnóstico presuntivo rápido, la identificación final se obtiene con pruebas bioquímicas. La bacteria puede ser detectada a partir de los exudados y homogenizados de pulmón antes citados por inmunofluorescencia directa e indirecta (Rosendal y col., 1981; Rapp y col., 1983), aglutinación

en placa (Mittal y col., 1982; Rapp y col., 1985), aglutinación lenta en tubo (Gunnarsson y col., 1977), precipitación en tubo capilar (Mittal y col., 1982) inmunodifusión (Rosendal y col., 1981), nemoaglutinación indirecta (Nielsen y O'Connor, 1984), y por coaglutinación (Mittal y col., 1983; Mittal y col., 1986).

Durante las infecciones naturales o experimentales la respuesta humoral y celular inmunes son estimuladas al parecer por la presencia del lipopolisacárido y el polisacárido capsular de A. pleuropneumoniae (Fenwick y Osburn, 1986), los anticuerpos circulantes pueden ser detectados alrededor de una semana después de la exposición al agente. Estos anticuerpos son demostrables por las pruebas de fijación de complemento (Lombin y col., 1982), aglutinación lenta en tubo y aglutinación con 2- mercaptoetanol (Mittal y col., 1984), y por la prueba de ELISA (Hicolet y col., 1981). Los niveles de anticuerpos son máximos en 3 a 4 semanas después de la infección y persisten por varios meses, pero desaparecen después de la total resolución de las lesiones. Las pruebas serológicas son utilizadas regularmente no solo con fines diagnósticos sino también para el control epizootológico de la enfermedad, las pruebas que se han utilizado con relativa eficiencia para éste fin son la fijación de

complemento y la aglutinación con 2-mercaptoetanol, que al menos han dado buen resultado en Estados Unidos y Canadá (Scultz y col., 1982; Mittal y col., 1984), sin embargo, estas pruebas no son tan sensibles y algunos portadores pueden pasar inadvertidos. En el caso de la fijación de complemento existe un problema adicional, la actividad pro complementaria del suero porcino ocasiona el requerimiento de suero fresco de ternera para la prueba y la actividad anticomplementaria presente también interfiere frecuentemente en la evaluación e interpretación de la prueba (Mittal y col., 1984).

Es claro que las pruebas disponibles hasta ahora no reúnen los requisitos necesarios para un control seroepizootiológico confiable y deben desarrollarse pruebas de sencilla realización y alta sensibilidad sin que se altere la especificidad, en el presente trabajo la prueba de coaglutinación ha sido modificada para detectar anticuerpos séricos como una alternativa a las pruebas de diagnóstico ya existentes.

## O B J E T I V O

ADAPTAR LA TECNICA DE COAGLUTINACION PARA EL  
DIAGNOSTICO DE LA PLEURONEUMONIA CONTAGIOSA  
PORCINA EN UN ENSAYO DE TARJETA.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M., y en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Laboratorio BC-52), I.P.N.

## MATERIALES Y METODOS

### Material biológico.

A. Microorganismos. Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae ser 1 (Hpp-1). Cepario del Laboratorio de Microbiología, Coordinación de Investigación y Posgrado, FES-C, UNAM.

Staphylococcus aureus cepa HG-14 (SpA-14). Proporcionado por el Dr. Rubén López Revilla, Depto. de Biología Celular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN.

Staphylococcus aureus. Cepario del Laboratorio de Microbiología, Coordinación de Investigación y Posgrado, FES-C, UNAM.

B. Antisueros. Suero anti-Hpp-1. Desarrollado en conejo contra el cuerpo bacteriano intacto, con título 1:250 por inmunodifusión radial, proporcionado por el Q.F.B. Andrés Romero Rojas, Coordinación de Investigación y Posgrado, FES-C, UNAM.

Suero anti-Estroma eritrocitario de carnero, desarrollado en conejo,

con título 1:2000, Whittaker M.A.  
Bioproducts (Walkersville, Maryland)

C. Levadura de pan (comercial).

D. Muestras. Sueros de cerdo obtenidos del rastro de  
Cuautilán, Edo. de México.

E. Eritrocitos de carnero al 50% en solución de Alsever.

Medios de cultivo y soluciones.

A. Caldo ATCC 117. Contiene 5.0 g de peptona (Bioxon), 3.0 ml de extracto fresco de levadura, 1.5 g de extracto de carne (Bioxon) y 1.0 g de glucosa por cada 100 ml. Se esterilizó en autoclave a 121°C (15 lb) durante 15 minutos (American Type Culture Collection, 1974).

B. Agar para infusión cerebro-corazón (BHI). Se utilizó el medio comercial Bioxon.

C. Caldo para infusión cerebro-corazón con extracto de levadura (BHI-L). 37.0 g del medio comercial BHI se resuspendieron en 950 ml de agua destilada esterilizando a 121°C (15 lb) durante 15 minutos, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionó con 50 ml de extracto fresco de levadura. El medio también se preparó utilizando agar BHI, para crecimiento en placa.

D. Extracto de levadura. 250 g de levadura de panadero se suspendieron en 1000 ml de PBS pH 7.4 calentando la mezcla a 60°C durante 60 minutos con agitación constante. La suspensión se centrifugó a 2500 X g durante 20 minutos para remover los cuerpos gruesos, el sobrenadante se prefiltró a través de membrana milipore de 1.25 micras y se esterilizó finalmente con milipore de 0.22 micras.

F. Amortiguador salino de fosfatos (PBS). Solución acuosa con 0.8 g de NaCl, 0.02 g de KCl, 0.0144 g de

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 0.02 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por cada 100 ml (pH 7.4).

G. PBS-azida. Solución de PBS adicionada de azida de sodio a concentración de 0.02 g por cada 100 ml.

H. PBS-VAT. Solución de PBS-azida adicionada con 0.05g de edetato de sodio y 0.5 ml de tritón X-100 por cada 100 ml.

I. Solución salina fenicada (SSP). Solución acuosa con 0.85 g de NaCl y 0.5 g de fenol por cada 100 ml. La solución se esterilizó a 121°C (15 lb) por 15 minutos.

J. Diluyente amortiguado, A 330 ml de NaOH al 6% en SSP se adicionaron 90 ml de ácido láctico concentrado completando el volumen a 1000 ml con SSP (pH 3.6).

K. Rosa de bengala. Solución acuosa estéril con 1.03 g de rosa de bengala por cada 100 ml.

Cultivo de los microorganismos.

A. Haemophilus pleuropneumoniae ser 1.

Cultivo en placa. La cepa de Hpp-1 fue sembrada por estriado continuo sobre placas de BHI con una estría perpendicular de S. aureus en el centro de las placas, incubando a 37°C por 24-48 h. El crecimiento en satelitismo se transfería a placas de BHI-L inoculando por estriado continuo, incubando a 37°C por 24h.

Cultivo en caldo. El crecimiento de una placa de BHI-L se lavó con 10 ml de PBS y la suspensión se ajustó a una concentración de  $3 \times 10^7$  bacterias/ml, inoculando 50 ml de caldo BHI-L con 7 ml de dicha suspensión incubando a 37°C por 4-5 h, posteriormente 25 ml de este crecimiento fueron transferidos a un litro de caldo BHI-L incubando la mezcla en agitador orbital (New Brunswick Scientific Co. Inc.), a 37°C y 100 rpm durante 24h.

B. Staphylococcus aureus cepa HG-14.

Cultivo en caldo. El crecimiento de toda la noche de una placa de BHI (sembrada por estriado continuo) se lavó con 10 ml de PBS y la suspensión se ajustó a  $1.5 \times 10^{10}$  bacterias/ml a partir de la extinción a 700 nm y 7 ml de ésta se adicionaron a 50 ml de caldo ATCC 117, incubando a 37°C por 7-8h. A un litro de caldo ATCC 117 se inocularon 25ml del crecimiento y se incubó en agitación orbital a 37°C y 100 rpm durante 15-18h.

### Fijación y estandarización de las cepas.

Fijación de *S. aureus* cepa HG-14. Se utilizó el método de Ansorg y Zarifoglu (1986). Las bacterias propagadas en el caldo fueron centrifugadas a 3000 X g por 15 minutos y el paquete se lavó por centrifugación con PBS en dos ocasiones. El paquete resuspendido en PBS a una concentración aproximada del 2% (V/V) y se mezcló con un volumen igual de 1-propanol y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos, agitando ocasionalmente. La inactivación se detuvo por centrifugación a 3000 X g por 15 minutos y las bacterias fijadas se lavaron por centrifugación con PBS en dos ocasiones.

Fijación de *Haemophilus pleuropneumoniae* ser 1. Las bacterias propagadas en caldo fueron centrifugadas 3000 x g por 15 minutos. El paquete se lavó por centrifugación con PBS en dos ocasiones y se resuspendió con formaldehído al 0.5% en PBS a una concentración aproximada del 1% (V/V). La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación ocasional. La inactivación se detuvo por centrifugación y el paquete se lavó dos veces más con PBS.

Estabilización de las cepas. Las cepas se estabilizaron por el método de Kessler, modificado por González-Aguilar y López-Revilla(1980). Las bacterias fijadas se resuspendieron con PBS-VAT a una concentración aproximada del 10% (V/V), se

incubaron 20 minutos a temperatura ambiente con agitación ocasional, se lavaron con PBS-azida en dos ocasiones y se resuspendieron finalmente en PBS-azida a una concentración aproximada de 10% (V/V). La suspensión se dividió en alícuotas y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Tinción y estandarización para el ensayo de coagulación. Las bacterias fijadas (SpA-14 y Hpp-1) se tiñeron de manera análoga a el antígeno brucelar amortiguado (Aiton, 1975). Después de dos lavados con PBS los paquetes bacterianos se pesaron y resuspendieron con suficiente SSP para obtener un volumen de 22.5 ml por gramo de células, ésta suspensión se adicionó con 1.0 ml de solución de rosa de bengala por cada 35 ml de la misma, agitandose con barra magnética durante dos horas. La suspensión se filtró a través de algodón estéril y las bacterias teñidas fueron lavadas por centrifugación con PBS en dos ocasiones. El paquete bacteriano se pesó nuevamente y se agregaron 2.0 ml de diluyente amortiguado por gramo de bacterias teñidas y se resuspendió con agitación orbital (50 rpm) durante dos horas. La suspensión se ajustó nuevamente a un volumen de 14 ml de diluyente amortiguado por gramo de células, se mezcló con barra magnética durante dos horas y se filtró por algodón estéril. Una alícuota fue tomada para determinar la densidad de la suspensión como el volumen porcentual de las células empacadas, esta determinación consistió en colocar la suspensión de bacterias en un tubo capilar, sellando por calor uno de los extremos y centrifugando a  $3500 \times g$  en una microcentrifuga. El paquete celular se midió directamente en un lector para microhematocrito clínico, siendo dicha medición la

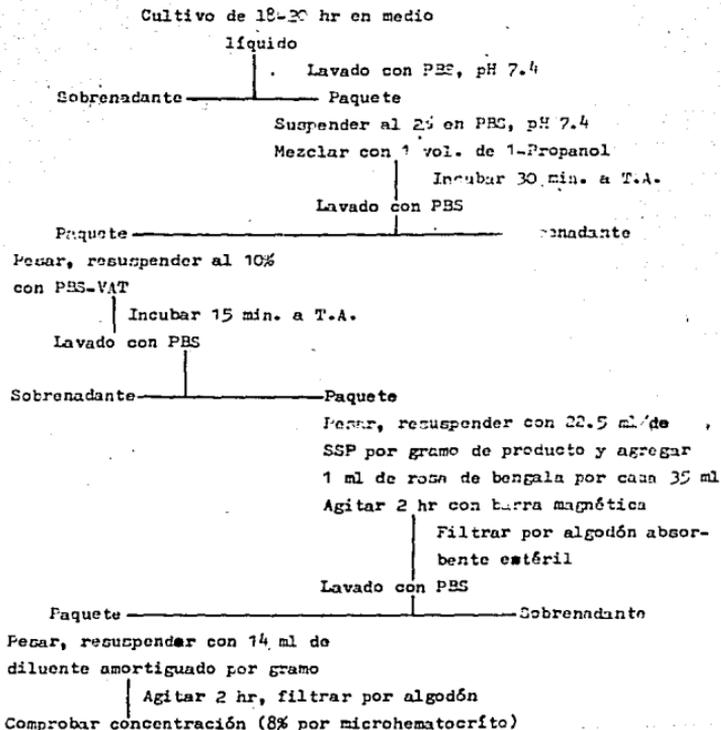
correspondiente al porcentaje de células en la suspensión. Cuando el volumen de células en la suspensión no era igual al 8%, se ajustaba la concentración por adición de diluyente amortiguado o bacterias teñidas según se encontrara más o menos concentrada (respectivamente) la suspensión, agitando dos horas más y determinando la densidad hasta obtener la concentración adecuada. El pH de la suspensión debía ser  $3.65 \pm 0.05$  y al mezclarse con un volumen igual de suero, éste debía mantenerse en  $3.8 \pm 0.05$ . Las suspensiones se dividieron en alícuotas de 5.0 ml y fueron almacenadas a 4°C hasta su uso. (Figura 2).

Estandarización de Hpp-1 para el ensayo de aglutinación lenta en tubo (SAT). Las bacterias propagadas en caldo se lavaron dos veces por centrifugación con PBS. El paquete se resuspendió en formaldehído al 0.5% en PBS a una concentración aproximada del 1% (v/v), la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos agitando ocasionalmente. Las bacterias se lavaron dos veces por centrifugación con PBS y el paquete bacteriano se resuspendió a una concentración del 4.5% y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Pruebas de aglutinación.

Agglutinación lenta en tubo (ensayo control). Se llevó a cabo por el método de dilución decimal según Morilla y

Fig. 2 PREPARACION DEL REACTIVO



Bautista (1986). La suspensión de Hpp-1 al 4.5% se diluyó a una concentración celular equivalente al 0.045% con SPP (1:100 v/v). La dilución se hizo al menos 12 horas antes de utilizarse y se conservó a 4°C hasta su uso. Antes de iniciar la prueba tanto los sueros problema como el antígeno diluido fueron expuestos a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos. Para el ensayo se procedió del siguiente modo:

1.- Por cada muestra se emplearon cinco tubos que correspondían a las diluciones 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400.

2.- Con una pipeta de Bang se depositaron en el fondo del primero al quinto tubo 80, 40, 20, 10 y 5 microlitros del suero de prueba.

3.- Con una pipeta serológica se depositaron 2.0 ml de antígeno diluido 1:100 en cada tubo, resultando las diluciones antes citadas.

4.- Los tubos se agitaron durante 30 segundos y se incubaron a 37°C durante 48 horas

5.- La lectura de la prueba se llevó a cabo utilizando una luz fluorescente indirecta con fondo negro. El grado de aglutinación se midió observando la transferencia sin agitar el tubo. Se considero el título del suero aquella dilución que causara aglutinación y sedimentación pro-

nunciadas con transparencia del 50%.

8.- Como controles de la prueba se utilizaron diluciones de un suero negativo y del antisuero control, así como agua destilada para comprobar la no existencia de autoaglutinación o la formación de sedimentos espontáneos del antígeno diluido.

Coaglutinación con SpA-14. Antes de realizar la prueba los sueros problema, los controles y los antígenos estandarizados se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos.

1.- Se depositaron con una micropipeta 30 microlitros de suero problema sobre una placa de porcelana excavada, seguidos por 30 microlitros de antígeno acidificado amortiguado de SpA-14 mezclando perfectamente con el extremo de un aplicador de madera.

2.- La mezcla se dejó reaccionar durante 3 minutos con un ligero movimiento de vaivén. Con los sueros que ocasionaron aglutinación en este punto ya no procedió el siguiente paso.

3.- Se agregaron a la mezcla 30 microlitros de antígeno acidificado amortiguado de Hpp-1 mezclando perfectamente con un aplicador de madera.

4.- La mezcla se dejó reaccionar durante 4 minutos con un ligero movimiento de vaivén. Pasado este tiempo la lec-

tura se efectuó de inmediato, considerando positivo el suero que provocara aglutinación visible con respecto a los controles.

5.- Se utilizaron como controles el suero de un animal libre de nemofílosis (control negativo), el antisuero control anti-Ilpp-1 (control positivo) y PBS para descartar autoaglutinación de los reactivos.

Adsorción de los sueros con proteína A soluble. Los sueros que ocasionaron aglutinación en el punto 2 del procedimiento anterior se adsorbieron con un volumen igual (30 microlitros) de solución de proteína A (100 mcg/ml) durante un minuto y se trataron según el método descrito en el párrafo anterior, duplicando el volumen de reactivos (60 microlitros).

### Aislamiento y purificación de proteína A.

El aislamiento de proteína A se llevó a cabo según el método de Sjoquist (Sjoquist y col., 1972b) ligeramente modificado. 12.0 g de SpA-14 (peso húmedo) fijadas por el método anteriormente descrito, fueron suspendidas al 5% en solución de sacarosa 0.25 M en Tris-HCl 0.05 M, pH 8.0. Se agregó a la mezcla lisozima a concentración final de 5 mg/ml y se incubó a 37°C por 18 h en agitación orbital (100 rpm). Después de centrifugar a 5000 X g durante 20 minutos a 4°C el sobrenadante se dializó contra agua destilada por 24 h. El precipitado formado durante esta etapa se descartó por centrifugación. El sobrenadante fue entonces adicionado con bicarbonato de sodio a concentración final de 0.1 M y aplicado a una columna de DEAE-celulosa (2 X 19 cm) con flujo aproximado de 20 ml/h. La columna se lavó con 200 ml de bicarbonato de sodio 0.1 M y la muestra se eluyó con un gradiente lineal de 150 ml 0.1 M y 150 ml 0.4 M de bicarbonato de sodio, pH 8.0, se midió la conductividad, absorbancia a 280 nm y la concentración de proteínas a las fracciones obtenidas (2.5 ml). Las fracciones adecuadas fueron probadas para contenido de proteína A y aquellas que presentaron títulos mayores a 1:1024 fueron combinadas y se concentraron por ultrafiltración (Micro Filtration Sistem Mo. UHP-76) con membrana de corte 10,000 de peso molecular (Ultra/por MWC0-10K). El concentrado fue aplicado a una co

lumna de Sephadex G 150-200 (2 X 60 cm) en Tris-HCl 0.05 M, 1.0 M NaCl, pH 8.0, con flujo aproximado de 30 ml/h, determinando a las fracciones obtenidas la absorbancia a 280 nm, el contenido de proteínas y la actividad de proteína A. Las fracciones con actividad de proteína A fueron combinadas y recromatografiadas en la misma columna.

#### Determinación de proteína A.

La determinación se realizó según el método de micro-nemaglutinación propuesto por Sjöquist y Stalenheim (1969). Los eritrocitos de carnero al 50% en Alsever fueron lavados por centrifugación con PBS en tres ocasiones, el paquete se resuspendió con un volumen suficiente de hemolisina diluida 1:8000 en PBS (un cuarto de la dosis mínima hemaglutinante) para obtener una concentración final del 2% incubados 60 min. a 37°C y lavados por centrifugación con PBS tres veces más y el paquete se resuspendió finalmente a concentración del 2% en PBS y se almacenó a 4°C hasta su uso. Para la determinación de proteína A se prepararon diluciones dobles sucesivas en PBS desde 1:2 hasta 1:2048 con 50 µcl de las muestras en placas de poliestireno para microhemaglutinación, a cada pozo le fueron agregados 50 µcl de la suspensión de eritrocitos sensibilizados, incubando la mezcla a temperatura ambiente por 12-24 horas. Las muestras con títulos menores a 1:1024 fueron descartadas.

#### Determinación de proteínas.

Fueron determinadas por el método de Kalb y Bernlohr (177). Se determinó la extinción de las fracciones a 230 y 260 nm contra blanco de agua destilada y la concentración se calculó a partir de la fórmula:

$183.E_{230} - 75.8.E_{260} = \text{mcg/ml}$ . Electroforésis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

Los geles de acrilamida/N,N'-metilbisacrilamida al 12% se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante así como los amortiguadores de muestra y de corrimiento. Dichos geles fueron teñidos con azul brillante R de Coomassie según las instrucciones del mismo fabricante (Sigma Tech. Bulletin No. MWS-877, Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo. U.S.A. Jan. 1986). La electroforésis se realizó a 150 voltios por espacio de tres horas, la movilidad relativa de las proteínas ( $R_f$ ) se calculó como el cociente de la distancia recorrida por las proteínas (en cm) entre la distancia recorrida por el colorante indicador de corrida, graficando los resultados en papel semi logarítmico para los marcadores de peso molecular e interpolando los valores de las fracciones de muestra en la curva de calibrado obtenida.

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

### Aislamiento y purificación de proteína A.

En la Figura 3 se muestra el perfil de la cromatografía en columna de DEAE-celulosa. El material activo de proteína A detectado por microhemaglutinación se confinó en tres picos, encontrándose el mayor contenido de proteína en el pico A. Las fracciones correspondientes a estos picos una vez concentradas por ultrafiltración presentaron un título mayor que 1:1,000,000. La Figura 4 A presenta la cromatografía de este concentrado en Sephadex G 150-200. Se obtuvieron dos picos separados con actividad de proteína A, siendo que en el segundo los títulos de proteína en las fracciones fueron iguales o menores a 1:1024 se consideró que la cantidad de proteína era muy pobre y sólo las fracciones señaladas por la línea bajo la curva fueron concentradas por ultrafiltración y recromatografiadas en la misma columna, el resultado se presenta en la Figura 4 B. El material de proteína A se confinó en un pico asimétrico el cual mostró solo una banda en SDS-PAGE (Fig. 5). El peso molecular aproximado de la proteína aislada, determinado por interpolación en la curva de marcadores de peso molecular (Fig. 6), fue de 59,000 d. La preparación que inició con 12 g de bacterias (peso húmedo) rindió 3 mg de proteína A que corresponde aproximadamente al 6% del monto total en la bacteria.

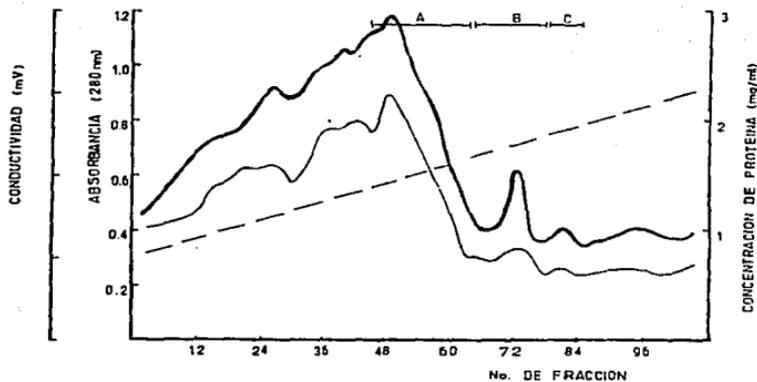


Fig. 3. Cromatografía en DEA Celulosa. El material obtenido por digestión de la bacteria con lisozima se aplicó a la columna con un gradiente lineal de 0.1 a 0.4 M de  $\text{NaHCO}_3$ . ---, Absorbancia a 280 nm; ---, concentración de proteína ---, conductividad en mV. A, B y C corresponden a las fracciones activas de proteína A determinadas por microhemaglutinación.

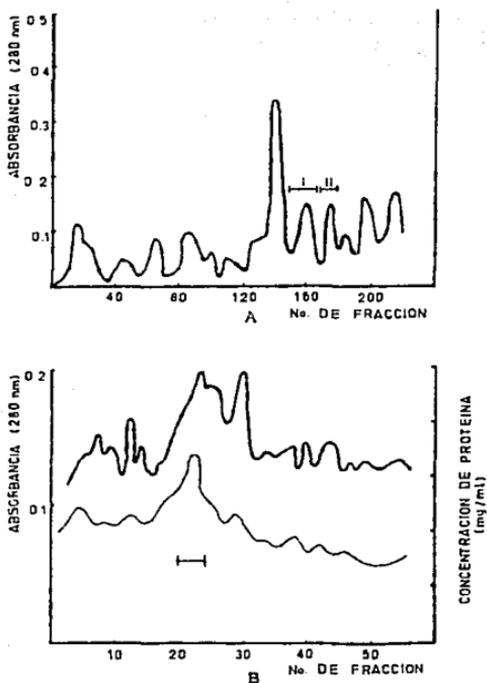


Fig. 4. (A) Cromatografía de las fracciones combinadas A, B y C de la Fig. 3 en Sephadex G 150-200, Tris-HCl 0.05 M, 1.0 M - NaCl pH 8.0. Las líneas en la parte superior de la gráfica con los números romanos I y II corresponden a las fracciones combinadas. El mayor contenido de proteína A se encontró en el pico I del perfil de elución. (B) Perfil de la recromatografía del pico I en la misma columna. ---, Absorbancia a 280 nm; —, concentración de proteína. El material activo de proteína A se confinó en un pico asimétrico indicado por la línea sólida en la parte inferior de la gráfica.



Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio al 12% (3 hr/150V), del extracto purificado de S. aureus en columna de sephadex G 150-200. PA, proteina A patron (Sigma, Che. Co.); A, proteina A del extracto de S. aureus cepa HU-14; MP, marcadores de peso molecular.

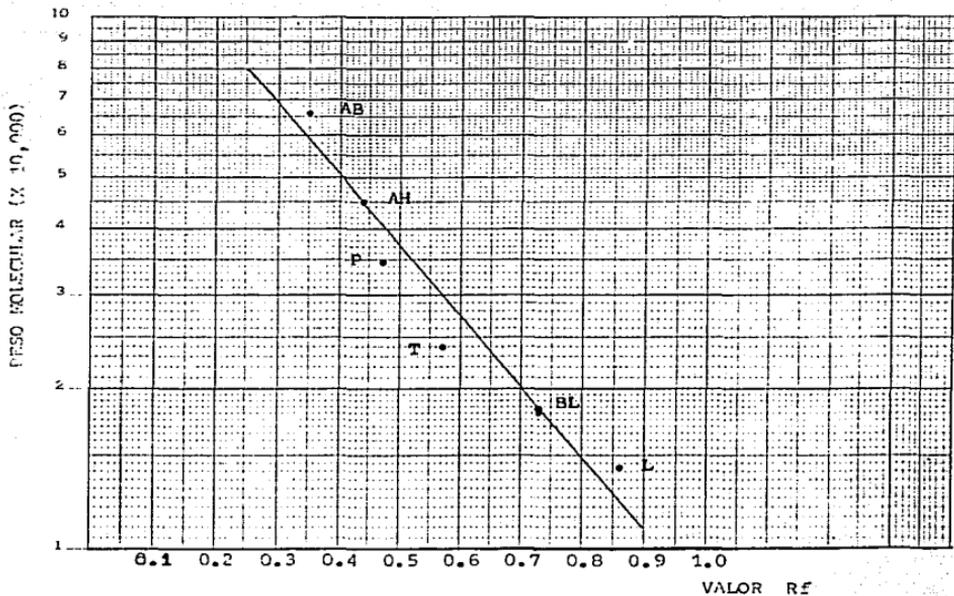


Fig. 6. Curva de marcadores de peso molecular para SDS-PAGE. AL, albúmina bovina (66,000 d, Rf 0.35), AH, albúmina de huevo (45,000 d, Rf 0.44), P, pepsina (34,700 d, Rf 0.47), T, tripsinógeno (24,000 d, Rf 0.57), BL,  $\beta$ -lactoglobulina (18,400 d, Rf 0.73), L, lisozima: - (14,700 d, Rf 0.86).

### Pruebas de aglutinación.

Se probaron en total 102 sueros de cerdo por coagulación y aglutinación lenta en tubo (SAT), 22 de los cuales presentaron hemólisis severa que interfirió en la lectura de ambas pruebas y tuvieron que descartarse del estudio. En el Cuadro 1 se presentan los resultados de las determinaciones. El ensayo de Chi cuadrada no demostró diferencia significativa entre los métodos; los sueros positivos por SAT mostraron títulos de 1:50 hasta 1:400, mientras que en la prueba de coagulación aún cuando no se ensayaron diluciones de suero fueron observados diversos grados de aglutinación, desde aglutinaciones pobres con baja clarificación hasta aglutinaciones francas con total clarificación del medio. Solamente se determinó título por coagulación al antisuero control y éste fue de 1:2048, a diferencia del título obtenido por SAT que fue de 1:200 el mismo que se obtuvo cuando se practicó aglutinación en tarjeta utilizando sólo el antígeno ácido amortiguado de Hpp-1. En el Cuadro 1 aparecen los resultados de 80 sueros probados por SAT y solamente 50 por coagulación, esto se debió a que en 21 sueros se presentó aglutinación al agregar el reactivo de SpA-14, estas reacciones inespecíficas se consideraron causadas por presencia de anticuerpos contra el estafilococo o por una concentración elevada de proteínas en los sue

ros por lo que éstos se adsorbieron previamente con proteína A. Los resultados se muestran en el Cuadro 2. En esta ocasión la diferencia entre los métodos fue aún menor según el ensayo de Chi cuadrada, sin embargo parece existir un mayor número de casos positivos detectados por coaglutinación que por SAT. Cabe señalar que la adsorción se practicó con el extracto parcialmente purificado en DEAE- celulosa, el extracto purificado con DEAE-celulosa/Sephadex G-150-200 y proteína A comercial estandarizados a 100 mcg de proteína por ml, a fin de probar su utilidad para la prueba no obteniendo diferencia entre los tres y encontrando un solo suero que no dió resultados satisfactorios con el tratamiento. En la Figura 7 se muestra el aspecto de la aglutinación provocada por el suero control y un suero negativo probados por coaglutinación.

Cuadro 1. Análisis de  $\chi^2$  para los sueros probados con aglutinación lenta en tubo (SAT) y coaglutinación, en la detección de pleureumonía contagiosa porcina.

PRUEBA	NEGATIVOS		POSITIVOS		TOTAL
S A T	39		41		80
Coaglutinación	21		38		59
	60		79		139
	E		O-E		O-E/E
S A T	34.53	45.77	4.47	-4.47	0.579 0.429
Coaglutinación	25.47	33.53	-4.47	4.47	0.784 0.216
Total	60.00	79.00	0.00	0.00	1.363 1.037

$$\chi^2 = 2.398, \text{ gl}=1 \text{ } 0.5 \text{ P } 0.1$$

Cuadro 2. Análisis de  $\chi^2$  para los sueros probados con aglutinación lenta en tubo (SAT) y coaglutinación, después de la adsorción con proteína A (100 mcg/ml).

PRUEBA	NEGATIVOS		POSITIVOS		TOTAL
S A T	39		41		80
Coaglutinación	25		44		69
	64		85		149
	E		O-E		O-E/E
S A T	37.23	42.77	1.77	-1.77	0.084 0.916
Coaglutinación	26.77	42.23	-1.77	1.77	0.985 0.015
Total	64.00	85.00	0.00	0.00	0.169 0.131

$$\chi^2 = 0.316, \text{ gl}=1 \text{ } 0.5 \text{ P}$$

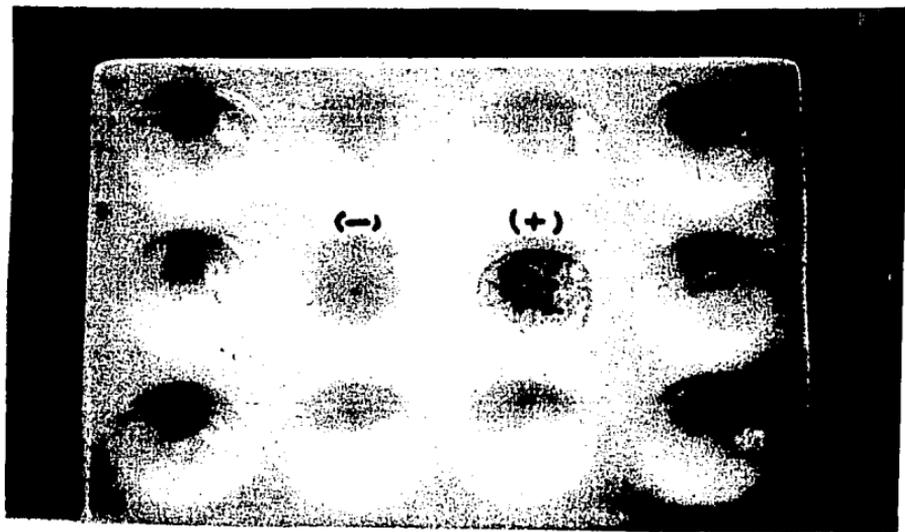


Figura 7. Aspecto de la aglutinación provocada por el suero control positivo (+) y un suero negativo (-) probados por coagulación.

## D I S C U S I O N

La técnica utilizada para la purificación de protefna A no permitió la obtención de altos rendimientos, solo un 12% del rendimiento reportado por Forsgren en 1969 y Sjoquist y col., en 1972, posiblemente debido a que alrededor de un 10% de la protefna ligada al petidoglicán no se libera por la digestión con lisozima (Forsgren, 1969). La lisozima cataliza la hidrólisis de las ligaduras beta-1,4 del Ac. N-acetilneuramfíico en el peptidoglicán siendo inespeccfíico el tamaño de las cadenas que se producen por la digestión, ya que la protefna esta unida covalentemente a la pared se obtiene un producto heterogéneo en dimensión y carga (Bjork, 1972), algunas de estas fracciones pudieron perderse durante la separación cromatográfica como fracciones con bajo título de aglutinación. La técnica original describibe el uso de bicarbonato de amonio durante la cromatografía en DEAE-celulosa el cual fue sustituido por bicarbonato de sodio con el consecuente cambio en la conductividad eléctrica de las soluciones y posiblemente en la interacción de la resina con las protefnas, esto también pudo ocasionar pérdida del producto. Aunque con rendimiento bajo, el producto final mostró solo una banda de protefna en SDS-PAGE, contra los resultados esperados por reportes anteriores en los que se describían hasta seis bandas con actividad de protefna A, además de otras sin actividad específica (Forsgren, 1969; Bjork, 1972). En la primera etapa del experi -

mento, las células se pre-trataron con EDTA y tritón X-100, esto permitió remover proteínas contaminantes que no estuvieran ligadas covalentemente al peptidoglicán (Sjöquist y col., 1972b). Por otra parte, se evitó la contaminación por las proteínas intracelulares y los ácidos nucleicos en los extractos debido a que la digestión con lisozima se realizó en condiciones hipertónicas con sacarosa, quedando retenidos estos componentes en los esferoplastos formados (Forsgren, 1969).

La detección de antígenos de A pleuropneumoniae por coaglutinación en pulmones de cerdos infectados ha demostrado ser sencilla, rápida, específica y altamente sensible en el diagnóstico de la pleuroneumonía porcina (Mittal y col., 1983; Mittal y col., 1986), en el desarrollo de nuestra prueba no se detectó antígeno específico como en la prueba clásica de coaglutinación sino que se realizó de manera "inversa", es decir, teniendo el antígeno estandarizado detectamos la presencia de anticuerpos específicos contra éste. El tratamiento previo de los antígenos de SpA-14 y Hpp-1 con EDTA-tritón X-100 presenta algunas ventajas teóricas con respecto a los reactivos ya existentes: Primero, la proteína A de superficie en el estafilococo queda en mayor disposición para fijar los anticuerpos presentes en los sueros permitiendo una mejor sensibilización y por ende un au-

mento en la sensibilidad, debido al efecto del edetato y el tritón en la solubilización de protefmas "contaminantes" de membrana (Schnaitman, 1971a), este efecto es patente por el aumento del título encontrado en el suero patrón cuando se utilizó la coaglutinación, sin embargo, no se excluye la sensibilización por las muestras de campo con anticuerpos inespecíficos ya sea en contra del estafilococo o de algún otro microorganismo que provoquen interferencia en el resultado de la prueba, este efecto fue minimizado por la introducción de protefna A soluble que eliminó de manera efectiva las reacciones inespecíficas, probablemente porque remueve los anticuerpos presentes en exceso así como algunas proteínas que interfieren en la prueba por alguna razón desconocida (Thirumoorti y Dajani, 1979). En este punto, el extracto parcialmente purificado de protefna A arrojó resultados satisfactorios y podría sustituir al extracto puro disminuyendo el costo de la prueba; y, segundo, el tratamiento de Hpp-1 con tritón X-100 solubiliza específicamente las protefmas de membrana interna sin alterar la morfología o composición del peptidoglicán y las fracciones polisacárido en la bacteria (Schnaitman, 1971a), en tanto que el EDTA por su capacidad quelante de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^{+}$  y  $Na^{+}$  los cuales están involucrados en el ensamblaje de los constituyentes de membrana externa de los gramnegativos, remueve los componen-

tes superficiales entre polisacáridos y proteínas, el sitio primario de acción del EDTA es el punto de inserción de el lipopolisacárido (Scnnaïtman, 1971b). Por otra parte, se ha demostrado que el cruce serológico entre los antígenos de A. pleuropneumoniae se dá vfa determinantes en el lipopolisacárido, teniendo mayor especificidad los determinantes del polisacárido capsular (Fenwick y Osburn, 1986, 1966; Mittal y col., 1937), adicionalmente la porción polisacárido de la pared celular de A. pleuropneumoniae juega un papel significativo en la respuesta humoral y celular porcina (Fenwick y Osburn, 1986). A partir de estos datos puede suponerse que solo los anticuerpos específicos en contra de Hpp-1 serán los involucrados en la reacción de coagulación al enfrentar el antígeno-Hpp-1 al Spa-14 previamente sensibilizado por el suero problema determinando una buena especificidad a la prueba, esto se refleja en que por sí solo el antígeno Hpp-1 provocó un buen título de aglutinación con el suero control. Hasta el momento no es posible afirmar que la prueba sea totalmente efectiva debido a que la cantidad de sueros fue muy pobre y los resultados podrían no representar a la población. Además, se presentan limitantes tales como la existencia de reacciones inespecíficas, que representan alrededor del 26% del total de los sueros probados en nuestra muestra, lo cual arrastra un cierto grado de error además del consecuente gasto de

reactivos y la introducción de proteína A soluble que elevan el costo promedio de la determinación. Otra limitante la constituye el poder obtener muestras libres de hemólisis. Debe señalarse también, que la presencia de anticuerpos específicos contra un microorganismo en el suero no es signo inequívoco de infección y podría solo representar la exposición anterior al agente infeccioso, aunque las pruebas de aglutinación presentan la característica de provocar falsos positivos la posibilidad de encontrar falsos negativos es muy pobre y un falso positivo se puede comprobar a partir de pruebas mas finas (García-Tamayo y Drago, 1982), por lo que la determinación podría servir como una prueba "tamiz" a nivel de campo.

## C O N C L U S I O N E S

La coagulación es una prueba que representa un arma potencial en el diagnóstico, prevención y control de la pleuroneumonía contagiosa porcina y que por lo tanto debe ser estudiada con más detalle a partir de un número mayor de muestras de suero paralelas al aislamiento en pulmones o la detección de antígenos en los mismos, además de utilizar sueros hiperinmunes contra otros serotipos de Mycobacterium (Actinobacillus) pleuropneumoniae para evidenciar la presencia de reacciones cruzadas entre serotipos. Hasta el momento, se encuentran ciertas fallas técnicas que reducen la aplicación de la prueba como el no poder utilizar sueros con hemólisis severa, aunque este problema puede solucionarse mejorando las técnicas de toma de muestra por el clínico de campo. Por otro lado, es necesaria la introducción de proteína A soluble a fin de disminuir las reacciones inespecíficas, tomando en cuenta que el costo adicional producido puede disminuirse utilizando el extracto proteico parcialmente purificando en DEAE-celulosa.

Considerando los resultados anteriores en este trabajo, la producción de un estuche de diagnóstico para pleuroneumonía contagiosa porcina por coagulación, es posible en México y debe ser promovida como una alternativa de control epidemiológico primario a las pruebas de diagnóstico ya existentes.

## REFERENCIAS

- Altman, E., Brisson, J.R. & Perry, M.B. (1986).  
Structural studies of the capsular polysaccharide  
from Haemophilus pleuropneumoniae serotype 1.  
Biochem. Cell Biol. 64: 707-716.
- Ansorg, R.A., Spies, M.E. & Kraus, C.J. (1984).  
Differentiation of the major flagellar antigens  
of Pseudomonas aeruginosa by the slide coaggluti  
nation technique. J. Clin. Microbiol. 20 (1):  
84-8.
- Ansorg, R.A. & Zarifoglu, F.I. (1986). Influence of  
the cultivation, devitalization and preservation  
of Staphylococcus aureus ATCC 12598 on the acti  
vity of cell- bound protein A. Med. Microbiol.  
Immunol. 174: 305-12.
- Arvidson, S. & Holme, T. (1971). Influence of pH on  
the formation of extracellular proteins by  
Staphylococcus aureus. Acta path.- microbiol.  
scand. Sect. B 79: 460-13.
- Arvidson, S., Holme, T & Wadstrom, T. (1971). influen  
ce of cultivation conditions on the production of  
extracelular proteins by Staphylococcus aureus.  
Acta path. microbiol. scand. Sect. B 79: 399-405.

- Barnett-Foster, D.E., Sjoquist, J. & Painter, P.H. (1982). The effect of fragment B of staphylococcal protein A on the binding of rabbit IgG to human granulocytes and monocytes. *Mol. Immunol.* 19 (3): 407-12.
- Bendixen, P.H., Shewen, P.E., & Rosendal, S. (1981). Toxicity of Haemophilus pleuropneumoniae for porcine lung macrophages, peripheral blood monocytes, and testicular cells. *Infect. Immun.* 33: 673-676.
- Bjorlund, W.E. & Bernvisco, B. (1965). Studies on pneumonia and atrophic rhinitis in pigs. On Variation caused by environment, breed and sex. *Nord. Vet. Med.* 17: 137-46.
- Burch, A. (1982). The incidence and distribution of lung lesions associated with enzootic pneumonia. *Proc. Int. Pig. Vet. Cong. (México)*.
- Cowan, S.T. & Steel, K.J. (1974). *Manual for identification of medical bacteria*, 2nd ed. Cambridge Univ. Press. pp 137-42.
- Culbertson, C.G. & Harper, K. (1980). Surface coagglutination with formalinized, stained protein A

Staphylococci in the immunologic study of three pathogenic amebae. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29 (5): 785-94.

- Edwards, E.A. & Larson, G.L. (1974). New method grouping beta-hemolytic streptococci directly on sheep blood agar plates by coagglutination of specifically sensitized protein A-containing staphylococci. Appl. Microbiol. 28 (6): 972-6.
- Fenwick, B.W. & Osburn, B.I. (1986). Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of Haemophilus pleuropneumoniae in convalescent and immunized pigs. Infect. Immun. 54 (2): 575-82.
- Fenwick, B.W., Osburn, B.I. & Olander, H.J. (1986). Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from Haemophilus pleuropneumoniae. Am. J. Vet. Res. 47 (7): 1433-41.
- Forsgren, A. (1969). Protein A from Staphylococcus aureus: VIII- Production of protein A by bacterial and L-forms of S. aureus. Acta path. microbiol. scand. 75: 481-90.

- Forsgren, A. (1970). Significance of protein A production by staphylococci. *Infect. Immun.* 2: 672-3.
  - Fundenberg. H.H., Stites, D.P., Caldwell, J.L. & Wells, J.V. (1980). *Inmunología Clínica*, 2a ed. Ed. Manual Moderno, México, pg. 561.
  - García-Tamayo, F. & Drago, E. (1982). Demostración de antígenos en productos biológicos por coagulación de estafilococos que contienen proteína A. *Bol. Med. Hosp. Infant. (Méx.)*. 39 (5): 321-6.
  - Goding, J.W. (1978). Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immunol. Methods* 20: 241-53.
  - González-Aguilar, H. & López-Revilla, R. (1980). Proteína A en *Staphylococcus aureus*: cuantificación por microhemaglutinación. *Arch. Invest. Med. (Méx)* 11 (4): 497-506.
  - Gunnarson, A., Biberstein, E.L. & Hurvell, B (1977). Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahemolyticus* (*pleuropneumoniae*): Agglutination reaction. *Am. j. Vet. Res.* 38: 1111
- 14

- Henry, S. (1982). Haemophilus pleuropneumoniae bacterins. Proceeding Minnesota. Pork Conference. pp. 106-10.
- Hjelm, H., Hjelm, K. & Sjoquist, J. (1972). Protein A from Staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. FEBS Letters, 28 (1): 73-6.
- Inganas, M., Johansson, S.G.C. & Bennich, H.H. (1980) Interaction of human polyclonal IgE and IgG from different species with protein A from Staphylococcus aureus: demonstration of protein A reactive sites located in the Fab'2 fragment of human IgG. Scand. J. Immunol. 12 (1): 23-31.
- Inganas, M., Johansson, S.G.O., & Sjoquist, J. (1981). Further characterization of the alternative protein-A interaction of immunoglobulins: demonstration of an Fc-binding fragment of protein A expressing the alternative reactivity. Scand. J. Immunol. 14:381-90.
- Jericho, K.W.F. (1968). Pathogenesis of pneumonia in pigs. Vet. Rec. 82: 362-71.

- Kalb, V.F. & Bernlohr, R.W. (1977). A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. Anal. Biochem. 82: 362-71.
- Kronvall, G., Quie, P.G. & Williams, R.C. (1970). Quantitation of staphylococcal protein A: Determination of equilibrium constant and number of protein A residues on bacteria. J. Immunol. 104: 273.
- Kronvall, G., Seal, U.S., & Finstad, J. (1970) Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of globulins using staphylococcal protein A. J. Immunol. 104: 140 7.
- Kronvall, G., & Williams, R.C. (1971). The staphylococcal protein A phenomenon, a three component immunoprecipitation involving protein A. immunochem. 8: 577.
- Kronvall, G. (1973). Purification of staphylococcal protein A using immunosorbents. Scand. J. Immunol. 2: 31-6.
- Landquist, J.O. (1974). Animal and environment in the production patternig pigs. Acta Vet. Scand. Suppl. 51: 26.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Landwall, P. (1978). Dialysis culture for the production of extracellular protein A from Staphylococcus aureus A 676. J. Appl. Bacteriol. 44: 151-8.
- Leman, A.D., Glock, R.D., Mengelin, W.L., Penny, R.H.C. Scholl, E & Straw, B. (1981). Diseases of swine, 5th. ed., The Iowa State University Press, Ames (Iowa), U.S.A.
- Lind, I. (1972). Correlation between the occurrence of protein A and some other properties in Staphylococcus aureus. Acta path. microbiol. Scand. Sect. B. 80: 702-8.
- Lindmak, R., Movitz, J. & Sjoquist, J. (1977). Extracellular protein A from a meticillin resistant strain of Staphylococcus aureus. Eur. J. Biochem. 74: 623-8.
- Lombin, L.H., Rosendal, S. & Mitchell, W.R. (1982). Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia of swine caused by Haemophilus pleuropneumoniae: Can. J. comp. Med. 46: 109-14.
- Mc Faddin, F.J. (1980). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Ed. Panamericana, Buenos Aires (Argentina).

- Maqueda, A.J. (1977). Incidencia de neumonía enzootica en varios estados productores de cerdos en la República Mexicana. AMVEC, UAM (1:1977, México).
- Medina, A.G. (1986). Serotipificación de Haemophilus pleuropneumoniae, aislados a partir de pulmones con pleuroneumonía contagiosa obtenidos en el rancho de Ferrería, D.F. Tesis profesional, Q.F.B., Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México.
- Milon, A., Houdayer, M. & Metzger, I J. (1978). Interactions of porcine IgG and porcine lymphocytes with protein A-Sephrose. Dev. Comp. Immunol. 2: 699.
- Mittal, K.R., Higgins, R & Lariviere, S. (1982) Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae. J. Clin. Microbiol. 15 (6): 1019-23.
- Mittal, K.R., Higgins, R & Lariviere, S. (1983). Detection of type-specific antigens in the lungs of Haemophilus pleuropneumoniae-infected pigs by coagglutination test. J. Clin. Microbiol. 18 (6): 1355-7.

- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S & Leblanc, D. (1984). A 2- mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of Haemophilus pleuropneumoniae infection in pigs. Am. J. Vet. Res. 45 (4): 715-9.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. & Martineau, G.P. (1986). Use of co-agglutination test for direct detection and serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae. Haemophilus pleuropneumoniae Compendium. 28-33.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. & Martineau, G.P. (1987). Effect of heat treatment on the surface antigens of Haemophilus pleuropneumoniae. Vet. Rec. 120: 62-5.
- Mogensen, S.C. & Dishon, T. (1981). The use of Staphylococcus aureus rich in protein A in the detection of Herpes simplex virus antigens. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 89: 427-32.
- Morilla, G.A. y Bautista, G.C.R. (1986). Manual de Inmunología, Ed, Diana, México.
- Movitz, J. (1976). Formation of extracellular protein A by Staphylococcus aureus. Eur. J. Biochem. 68: 291-9.

- Muirhead, M.R. (1979). Respiratory diseases of pig. Br. Vet. J. 135: 497.
- Nicolet, J., Paroz, P. & Krawinkler, M. (1981). An enzyme-linked immunosorbent assay, using an EDTA-extracted antigen for the serology of Haemophilus pleuropneumoniae. Am. J. Vet. Res. 42: 2139-42.
- Nielsen, R. (1985). Serological characterization of Haemophilus pleuropneumoniae (Actinobacillus pleuropneumoniae) strains and proposal of a new serotype: serotype 10. Acta. Vet. Scand. 2: 581-5.
- Nielsen, R. (1986). Serological characterization of Actinobacillus pleuropneumoniae strains and proposal of a new serotype: serotype 12. Acta. Vet. Scand. 27: 453-5.
- Nielsen, R. & O'Connor, P.J. (1984). Serological characterization of B Haemophilus pleuropneumoniae strains and proposal of a new serotype: serotype B. Acta. Scand. 25: 96-106.
- Ochoa, G. (1978). Aislamiento y caracterización de agentes bacterianos de pulmones neumónicos de cerdo. Tesis profesional, M.V Z. Facultad de Medicina

na Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México.

- Pijoan, C., Ochoa, G. y Mendez, D. (1978). Aislamiento de Haemophilus parahemolyticus en cerdos con neumonía. Tec. Pec. Méx. 34: 85-7.
- Ramírez, N.R. (1970). Neumonía hemorrágica en cerdos: Neumonía por Haemophilus parahemolyticus. U.A.M. México (7 pg).
- Rapp, V.J., Ross, R.F. & Zimmermann Erickson, B. (1985). Serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody test in swine. Am. J. Vet. Res. 46 (1): 185-92.
- Rosendal, S., Lombin, L. & DeMoor, J. (1981). Serotyping and detection of Haemophilus pleuropneumoniae by indirect fluorescent antibody technique. Can. J. Comp. Med. 45: 271-4.
- Rosendal, S. & Boyd, D.A. (1982). Haemophilus pleuropneumoniae serotyping. J. Clin. Microbiol. 16: 840-3.

- Sandford, S.E., & Josephson, G.K.A. (1961) Porcine Haemophilus pleuropneumonia epizootic in southwestern Ontario: Clinical, microbiological, pathological and some epidemiological findings. Can. J. Comp. Med. 46: 109-14.
- Schultz, R.A., Ross, R.F., & Young, T. (1982). Prevalence of antibodies to Haemophilus pleuropneumoniae in Iowa swine., Am. J. Vet. Res. 43: 1242-51.
- Schnaitman, C.A. (1971). Solubilization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli by Triton X-100. J. Bacteriol. 108 (1): 545-52.
- Schnaitman, C.A. (1971). Effect of ethylene diamine-tetraacetic acid, Triton X 100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of Escherichia coli. J. Bacteriol. 108 (1): 553-63.
- Sjöholm, I. (1975). Protein A from Staphylococcus aureus. Spectropolarimetric and spectrophotometric studies. Eur. J. Biochem. 51: 55-61.
- Sjö Dahl, J. (1977). Repetitive sequences in protein A from Staphylococcus aureus. Arrangement of fi-

- ve regions withing the protein four being highly homologous and Fc binding. Eur. J. Biochem. 73: 343.
- Sjoquist, J. & Stalenheim, G. (1960). Protein A from Staphylococcus aureus: IX. Complement-fixing activity of protein A-IgG complexes. J. Immunol. 102 (3): 467-73.
  - Sjoquist, J., Meloun, B & Hjelm, H. (1972). protein A isolated from Staphylococcus aureus after digestion with Lisostaphin. Eur. J. Biochem. 29 (3): 572-3.
  - Sjoquist, J., Movitz, J., Johansson, J.B. Hjelm, H. (1972b). Localization of protein A in the bacteria. Eur. J. biochem. 30 (1): 190-4.
  - Stalenheim, G., Gotze, O., Cooper, N.R., Sjoquist, J. & Muller Eberhard, H.J. (1973). Consumption of human complement components by complexes of IgG with protein A of Staphylococcus aureus. Immunochem. 10: 501.
  - Taylor, D.J., (1981). Pig Diseases, 2nd, The Burlington Press (Cambridge) LTD, Foxton, Cambridge, Great Britain.

- THE AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION: Catalogue of strains (1974) 11th ed., Hatt, H.D., Lessel, E.F., Clark, W.A. Davis, E.E , Jong, S.C., Zieg, R.G. & Alexander, H.T. (eds.), pg 274.
- Thirumorthi, M.C. & Dajani, A.S. (1979). Comparison of staphylococcal coagglutination, latex agglutination and counterimmunoelectrophoresis for bacterial antigen detection. J. Clin. Microbiol. 9 (1): 28-32.
- Tielens, M.J.M., (1978). Buildings, environmental conditions and diseases. Proc. A.U.E.A. & Prod. ng 747.
- Van Loghem, E., Frangione, B., Recht, B & Franklin, E.C. (1982). Staphylococcal protein A and human IgG subclasses and allotypes. Scan. J. Immunol. 15: 275-8.
- Wilkinson, H.W. & Fikes, B.J. (1981). Detection of cell-associated or soluble antigens of Legionella pneumophila 1 to 6, Legionella bozomanni, Legionella dumoffii, Legionella gormanii & Legionella micdadei by staphylococcal coagglutination test. J. Clin. Microbiol, 14 (3): 322-5.

- Winblad, S. & Ericson, C (1973). Sensitized sheep red cells as a reactant for Staphylococcus aureus protein A. Acta path. Microbiol. Scand. Sect. B 81: 150-6.