

INVESTIGACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-*Listeria monocytogenes*. II. REACCIÓN DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO EN SUEROS DE BOVINOS

DRA. S. GIONO ^{1,2}
Q.B.P. L. GONZÁLEZ ²
Q.B.P. M.T. BECERRA ²

Resumen

Se estudiaron 172 sueros de bovinos, provenientes del Estado de Veracruz donde se habían presentado varios casos de aborto de etiología no determinada.

Se determinó la presencia de anticuerpos *anti-Listeria monocytogenes* por la técnica de fijación de complemento de Seeliger y Finger, tratando de buscar la posible relación entre el título de anticuerpos y los abortos.

Si se considera que un título de 1:5 tiene importancia diagnóstica, el resultado de la prueba revela la presencia de anticuerpos en valores de 1:5 hasta de 1:135 en 24 de los sueros (14%), de los cuales 1:45 se observó en 9 sueros (5.2%).

El examen de los resultados indica la probable presencia de infección listérica. No obstante los cuadros clínicos variados que es capaz de presentar *Listeria monocytogenes*, pudiera tener importancia en la etiología de los abortos que aunque en grado menor se observaron; lo cual sólo se puede determinar por medio de métodos microbiológicos y por la recuperación de *Listeria monocytogenes* de los productos del aborto.

Las reacciones serológicas estudiadas hasta ahora para *Listeria monocytogenes* (Seeliger y Finger, 1969), no presentan dificultades técnicas; el verdadero problema radica en la interpretación de los resultados, debido a la presencia de reacciones cruzadas con otros microorganismos (Neter *et al*, 1960).

Seeliger en 1961, buscando una reacción más específica para el diagnóstico de la infección listérica, diseña la prueba de fijación de complemento, también observó que era más específica y solía presentarse positiva en casos de infección clínica severa, así como en suero de animales inmunes; siendo negativa en los controles que con otras pruebas solían dar reacciones inespecíficas. Patocka la empleó para detectar casos incipientes de infección, durante el embarazo (Seeliger y Finger, 1969).

Se consideró importante estudiar acerca de la infección listérica en bovinos, por lo que se seleccionó un lote de sueros de animales que habían presentado abortos de etiología no determinada. En un primer trabajo (Giono y

Loaiza, 1974) se efectuó una encuesta de la presencia de anticuerpos somáticos aglutinantes, en él se observó que el 14.2% de los animales presentó títulos mayores de 1:160, dato que revela la presencia de la infección.

Aunque los títulos que se obtienen con la prueba de fijación de complemento, son bajos comparados con los de aglutinación, éstos suelen ser más específicos y pueden revelar los casos activos o recientes de infección listérica (Seeliger y Cherry, 1957).

Material y métodos

SELECCIÓN DE LA CEPA

Se utilizó *Listeria monocytogenes* tipo 4b, de la colección del Dr. M.L. Gray, en fase lisa y virulenta capaz de dar reacción de Anton positiva en 24-48 horas (Gray y Killinger, 1969), para preparar el antígeno.

PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO PARA PRUEBA DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO

1. El antígeno se preparó de acuerdo con las recomendaciones de Seeliger y Finger (1969) con la salvedad de que el cultivo original para obtener el paquete celular, fue preparado en un medio líquido, diseñado en nues-

¹ Jefe del Laboratorio de Bacteriología Médica y Veterinaria, Departamento de Microbiología. E. N.C.B. I.P.N. México 17, D.F.

² Lab. de Bacteriología Médica y Veterinaria, Departamento de Microbiología. E.N.C.B. I.P.N. México 17, D.F.

tro laboratorio, que da resultados comparables con el agar triptosa.

2. Se centrifugó un cultivo de 24 horas a 37°C en medio líquido a 3000 rpm durante 30 min. El sedimento se resuspendió en solución salina reguladora de fosfatos con pH igual a 7.2 y se volvió a centrifugar. Este lavado se repitió dos veces. El sedimento se resuspendió en un volumen igual de solución salina reguladora.

3. La suspensión bacteriana se esterilizó a 15 libras durante 15 min.

4. Se sometió la suspensión bacteriana esterilizada, a vibración sónica en un oscilador Sonifier (Bransons Sonic) modelo S 125, con una corriente de 7.5 amperes y una intensidad de 4. durante 5 minutos, en baño de hielo, para obtener un lisado de bacterias.

5. Se centrifugó a 6000 rpm durante 20 minutos.

6. En una prueba preliminar se intentó emplear como antígeno el sedimento, así como el sobrenadante, para montar la prueba de fijación de complemento, ambos se probaron a diferentes diluciones empleando dos sueros inactivados de conejo, uno proveniente de un

animal inmunizado y otro como control negativo.

Al sobrenadante, tratado por vibración sónica, se le agregó merthiolate a una concentración final de 1:10000. Los antígenos se conservaron en refrigeración.

REACCIÓN DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO PARA INVESTIGAR ANTICUERPOS ANTI-*Listeria monocytogenes*.

En la reacción se empleó:

Solución salina: preparada en la siguiente forma, 8.5% de NaCl; 0.1 g de MgSO₄; 40 mg de CaCl₂·2H₂O; 1 litro de agua destilada; pH de 7.2.

Complemento: Obtenido de cobayo por punción cardíaca, la sangre se conservó en baño de hielo y el suero se obtuvo al centrifugar en frío. Una vez preparado. se distribuyó en tubos de hemolisis en cantidades de 1 ml y se conservó en congelación.

Hemolisina: de carnero Difco (B217).

Glóbulos rojos de carnero: lavados, suspendidos en solución salina al 0.85%, a una concentración de 2%.

CUADRO 1

Investigación de anticuerpos anti-*Listeria monocytogenes* por la técnica de fijación de complemento

| Tubo ml | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Antígeno | Sist. Hemol | Gl. Rojos | * |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|----------|-------------|-----------|-----|
| Solución Salina | 0.8 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.8 | 0.4 |
| Suero inactivo | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | — | — | — | — |
| Pasar 0.2 al tubo | 2y5 | 3 | 4 | — | — | — | — | — | — |
| Desechar | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | — | — | — | — | — |
| Antígeno de LM dil 1:80 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | — | 0.2 | 0.2 | — | — |
| Temperatura ambiente durante 30 minutos. | | | | | | | | | |
| Complemento 2 unidades exactas | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | — | 0.2 |
| Agitar bien, incubar 18 horas a 4 — 8°C y 10 min. a temperatura ambiente. | | | | | | | | | |
| Hemolisina 2 unidades | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | — | 0.2 |
| Glóbulos rojos 2% | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |

Incubar en baño María a 37°C. 30 minutos y 10 min. a temperatura ambiente.

* Control de complemento.

Antígeno: *Listeria monocytogenes* rota por vibración sónica, se empleó el sobrenadante diluido 1:80.

Sueros: los sueros se inactivaron por calor a 56°C, durante media hora; cuando no se empleaban, al montar la prueba se volvía a calentar a 56°C durante 10 minutos.

La titulación de hemolisina y de complemento se hizo siguiendo la técnica de Kolmer, con antígeno de *Listeria monocytogenes*, ajustando las diluciones para obtener 2 unidades exactas de complemento y 2 unidades de hemolisina en volúmenes de 0.2 ml (Public Health Service, 1965).

El complemento y la hemolisina se titularon por lotes y cada vez que se efectuaron las diluciones adecuadas (Public Health Service, 1965). Se incluyeron testigos: de antígeno, de sistema hemolítico, de glóbulos rojos, de complemento y el tubo número 5, se empleó como testigo de anticomplementariedad de suero.

La técnica se diseñó, en volúmenes de 0.2 ml (Ibid. ídem.) en tubos de hemolisis, de acuerdo con el Cuadro 1.

Resultados y discusión

Respecto a la efectividad del antígeno que se preparó, no obstante que Seeliger y Finger (1969) dicen que se pueden emplear tanto el sedimento como el sobrenadante, se observó que el primero daba reacciones anticomplementarias, en cambio, el sobrenadante funcionaba bien hasta la dilución de 1:80, que fue como se empleó en la prueba.

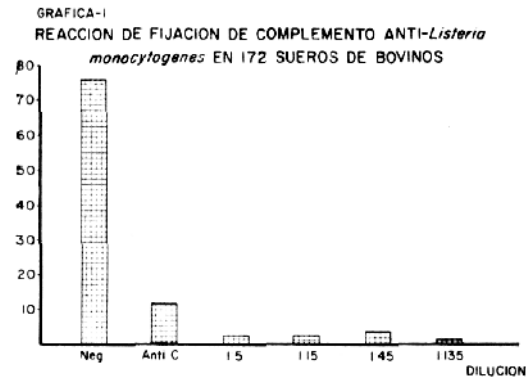
Los resultados se pueden observar en el Cuadro 2.

CUADRO 2

Resultado de la prueba de fijación de complemento anti-*Listeria monocytogenes* en 172 sueros de bovinos

| Sueros negativos | Sueros positivos Dilución | | | | Sueros anti-complementarios |
|------------------|---------------------------|------|------|-------|-----------------------------|
| | 1:5 | 1:15 | 1:45 | 1:135 | |
| 130 | 6 | 6 | 9 | 3 | 18 |
| 75.6% | 3.5% | 3.5% | 5.2% | 1.8% | 10.4% |

Total de sueros 172. Positivos 14%



La gráfica 1 muestra la distribución en porcentaje de los resultados.

De los 172 sueros de bovinos que se estudiaron, 10.4% resultaron anticomplementarios en la dilución 1:10; quizá debieron probarse otras diluciones, pero no se hizo. La elevada anticomplementariedad de los sueros se debió al manejo inadecuado de los mismos antes de su llegada al laboratorio, ya que no se les agregó ningún conservador y algunas muestras se contaminaron. Al llegar los sueros fueron centrifugados y se les agregó merthiolate a una concentración de 1:10000, conservándolos en congelación.

El 75.6%/c dieron resultado negativo y el 14% dio positivo en diferentes diluciones, principalmente en la dilución 1:45 (5.2%). Seeliger y Finger (1969) señalan que los títulos de fijación de complemento son inferiores a los títulos de aglutininas y además no existe una relación entre ellos, por lo que una reacción 1:5 requiere atención desde el punto de vista diagnóstico. Observando los resultados, sorprende que se obtengan 14% de positivos y que en la investigación de aglutininas se obtuvo 14.2%, de títulos significativos; lo que aumenta la importancia de los resultados. (Giono y Loaiza, 1972).

Pérez-Miravete y Romo (1968) hicieron un estudio experimental en conejos, ellos observaron que los títulos de fijación de complemento no excedían de 1:32, después de inoculación por vía endovenosa, en cambio los de aglutinación sí alcanzaban valores elevados.

Por consiguiente, vale la pena considerar que es posible que esos animales estuvieran infectados con *Listeria monocytogenes* y que haya sido la causa de algunos de los abortos

que se presentaron y que dieron lugar a esta investigación.

Gray en 1958 (Seeliger, 1961) señaló que es posible que en un establo se encuentren infectados el 8.10% de los animales. La mayoría aparentemente en estado de latencia, otros, en una proporción menor pueden presentar cuadros clínicos de listeriosis en forma típica o atípica.

En el ganado se puede observar desde conjuntivitis, bronconeumonía lobar, estados catarrales con abundante moco nasal y salivación, mastitis; lo que motivó este estudio fueron los casos de aborto. Esta enfermedad se presenta independientemente de la brucelosis, en forma de brotes epizooticos, también puede infectar a terneras en donde la mortalidad es muy grande.

Por todo lo anterior se puede concluir que es posible la infección listérica exista en los bovinos que fueron estudiados y que es necesario considerar su presencia como posible

agente etiológico en los casos de abortos que se observaron. Es indispensable que junto con los estudios serológicos se intente recuperar a *Listeria monocytogenes* por cultivo, ya sea del producto o de las secreciones del animal.

Summary

For these studies 172 samples of serum from cattle were used in complement fixation test. It was shown the 24 sera (14%) were positive giving titers of 1:5 to 1:135, from these 9 sera was positive in dilution 1:45 (5.2%).

Although the presence of antibodies suggests infection with *Listeria monocytogenes* of at least some of the animals. In addition with the abortion, could be other different clinical aspect of listeric infection.

An effort should be made to obtain *Listeria monocytogenes* from fetuses and discharge from animals.

Literatura citada

- GIONO, S. y R. LOAIZA, 1972, Investigación de Anticuerpos *Anti-Listeria monocytogenes*. I. Aglutinación con Antígeno Somático con Sueros de Bovinos, *Téc. Pec. Méx.*, N° 26-31.
- GRAY, M.L. and A.H. KILLINGER, 1969, *Listeria monocytogenes* and listeric Infections. *Bact. Rev.*, 30:309.
- NETER, E. *et al.*, 1960, Identification of an antigen common to *Listeria monocytogenes* and other bacteria, *Proc. Soc. Explo. Biol. Med.* 105:131.
- PÉREZ-MIRAVETE, A. Y E. ROMO. 1968, Respuesta Inmunológica a la infección natural y experimental con *Listeria monocytogenes*, *Rev. Lat-amer. Microbiol. Parasitol.*, 10:21.
- Public Health Service, 1965. Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and adaptation to micro test, 74. (1228) (1228) Washington, D.C.. E.U.A.
- SEELIGER, H.P.R. and W.B. CHERRY, 1957, Human Listeriosis its nature and diagnosis. *U.S. Dept. H. Educ. and Welfare*, C.D.C. Atlanta, Ga. E.U.A.
- SEELIGER, H.P.R.. 1961, Listeriosis, 2a. Ed., *Hafner Pub. Co.*, Inc. N.Y., E.U.A.
- SEELIGER, H.P.R. and H. FINGER, 1969, Analytical Serology of Listeria. En *Analytical Serology of Microorganisms*. Vol. 2. Ed. por Kwapinski J.B.G. *Interscience Pub.*, E.U.A. 549 pp.