

# LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION PARA EL DIAGNOSTICO DE LA PESTE

Dr. Milton Thiago de Mello<sup>1</sup>

*Se informa detalladamente sobre los procedimientos para la ejecución de la prueba de hemoaglutinación para el diagnóstico de la peste.*

Los brotes periódicos de peste en algunas áreas rurales del Continente Americano (10, 11) han sido objeto de interés, también periódico, por parte de algunos grupos de investigadores. Los brotes ocurridos en años recientes, particularmente los de 1964-1965, coincidieron con la mejora de los procedimientos para el diagnóstico de la infección en el hombre, así como en los roedores y otros animales pequeños. Sin embargo, la utilización de estos métodos parece no haber sido extensa.

Meyer (8) ha informado sobre los buenos resultados obtenidos en el diagnóstico retrospectivo de la peste humana mediante la prueba de hemoaglutinación (4) empleando la técnica de microtitulación (12); otros informes han destacado la importancia de la prueba para la evaluación de los niveles de anticuerpos contra *Pasteurella pestis* en roedores y otros animales silvestres (3, 5, 7, 9, 13).

Por los motivos antes señalados, creemos de utilidad, especialmente para los laboratorios que no dispongan de fuentes bibliográficas adecuadas, la publicación detallada de los procedimientos empleados en el Instituto de Microbiología de la Universidad Federal de Río de Janeiro (antigua Universidad del Brasil), en la ejecución de la prueba de hemoaglutinación para el diagnóstico serológico de la peste.

## Procedimiento para sueros sospechosos

Colectar la sangre en las condiciones más asépticas posibles; separar el suero; mantenerlo en una congeladora a una temperatura de  $-20$  a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Colocar los tubos con sueros problema, etiquetados con esparadrapo, en gradillas; dejar descongelar en reposo; centrifugar a 2,000 rpm durante 20 minutos, si los sueros estuvieren turbios; decantar el sobrenadante en otro tubo etiquetado.

Inactivar en baño de María a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.

Adicionar a cada suero hematíes de carnero lavados: 1 parte de hematíes empacados para 9 partes de suero; por ejemplo, 3 gotas de hematíes para 1 ml de suero (véase más adelante el procedimiento para hematíes de carnero).

Dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos, para remover los anticuerpos heterófilos.

Centrifugar a 1,500 rpm durante 5 minutos (de preferencia a  $5^{\circ}\text{C}$ ).

Decantar el sobrenadante para otro tubo etiquetado. Si el suero todavía estuviera muy turbio, centrifugar a 2,000 rpm durante 20 minutos.

Efectuar las reacciones con el sobrenadante: *suero inactivado y absorbido en hematíes de carnero.*

<sup>1</sup> Profesor de Bacteriología, Instituto de Microbiología, Universidad Federal de Río de Janeiro, Río de Janeiro, Gb., Brasil.

sospechosos en las pruebas, son tratados de la misma forma antes descrita.

#### Procedimiento para hematíes de carnero

Sangrar asepticamente un carnero, de preferencia en ayunas y con el pescuezo raspado, vertiendo la sangre de la vena yugular en un recipiente que contenga solución de Alsever modificada estéril (véase Anexo II): un volumen de sangre por un volumen de solución de Alsever (2); agitar suavemente para impedir la coagulación. Siempre que sea posible, hacer la sangría en circuito cerrado.

Mantener los hematíes a 5°C y usarlos, de preferencia, después de 5 días de la colecta y hasta 4 semanas más tarde. En el mismo día en que vayan a ser usados, filtrarlos en 4 capas de gasa; centrifugar una vez a 1,500 rpm durante 5 minutos, a 5°C, para remover la solución de Alsever y el plasma.

Lavar 3 veces con solución salina estéril (0.85% de cloruro de sodio en agua destilada), usando de preferencia 8 a 10 volúmenes de solución salina por un volumen de hematíes.

Remover el sobrenadante de la última centrifugación, dejando sólo los glóbulos empacados.

Usar esos glóbulos empacados para absorber los sueros que se van a examinar, así como para los sueros de conejos normales usados en la solución salina, la cual sirve tanto para suspender hematíes sensibilizados o no con antígeno, como para diluir los sueros sospechosos, en el momento de efectuar las pruebas.

#### Procedimiento para la adsorción de antígeno a los hematíes

Lavar 5 a 7 veces, con solución salina fría, los hematíes conservados en solución de Alsever, en centrífuga refrigerada (5°C), a 1,500 rpm durante 5 a 10 minutos, usando siempre cerca de 10 volúmenes de solución salina para cada volumen de hematíes (por ejemplo: para 100 ml de sangre corresponde usar 500 ml de solución salina).

El depósito final se suspende en 400 ml de

solución salina fría (para el caso de los hematíes de los 100 ml iniciales de sangre).

En un tubo de diálisis, de celofán, colocar 100 ml de formol (por ejemplo: "Formaldehyde solution, Fisher Certified Reagent"); colocar el tubo (que debe tener un espacio sin formol, de cerca de un tercio) en un vaso de precipitación ("beaker") de un litro; verter la suspensión de glóbulos sobre el tubo de diálisis.

Agitar mecánicamente durante 2 horas a temperatura ambiente.

Al cabo de este tiempo, perforar el saco de celofán y mezclar su contenido con la suspensión de hematíes.

Agitar durante la noche (16-18 horas) con agitador magnético, a temperatura ambiente.

Filtrar en 4 capas de gasa estéril.

Lavar 6 ó 7 veces con 10 volúmenes de solución salina, a 5°C y a 1,500 rpm, durante 5 minutos.

Suspender el depósito de la última centrifugación al 50% en solución salina.

Mantener en la refrigeradora a 5°C hasta el momento de usar. (Esta es la suspensión "stock") (6).

Suspender los hematíes al 2.5% en solución salina; mezclar un volumen de la suspensión al 2.5% con un volumen de ácido tánico al 1:20,000 en solución salina (peso/volumen). Hacer inicialmente una solución de ácido tánico al 1%; retirar de la misma el volumen necesario para obtener la cantidad deseada de solución al 1:20,000; incubar a 37°C, en baño de María, durante 10 minutos; desechar las soluciones remanentes de los trabajos del día; centrifugar a 1,500 rpm durante 5 minutos; lavar una vez el sedimento con solución salina, y resuspender el depósito al 2.5% en solución salina (1).

Mezclar un volumen de la suspensión de hematíes al 2.5%, formolados y tanados, con un volumen del antígeno diluido en solución salina. Se ha usado la siguiente preparación de antígeno: "*Pasteurella pestis* Fraction 1 antígeno, 2 mg/ml in saline. For complement fixation use 1:500 dilution. For hemagglu-

mination test use 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to sensitize 1 ml of 2.5% tanned cells. Lot 5691. Prepared by Dr. T. H. Chen"; proporcionada por la "George Williams Hooper Foundation, San Francisco, California, U.S.A." Por ejemplo: tomar 0.2 ml de la solución de antígeno original (que tiene 2 mg/ml en solución salina) + 9.8 ml de solución salina; quedarán 10 ml de solución salina al 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Mezclar esos 10 ml de la suspensión de hematíes al 2.5%; incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar a 1,500 rpm durante 5 minutos.

Lavar el depósito 2 veces con solución salina que contenga 1:250 de suero normal de conejo previamente inactivado y adsorbido con hematíes de carnero; cada lavado se realiza a 1,500 rpm durante 5 minutos. El depósito final es resuspendido al 0.5% en la solución salina con 1:250 de suero normal de conejo inactivado y adsorbido en hematíes de carnero. Esta es la suspensión que será usada en las pruebas.

Con manipulaciones idénticas, sólo que agregando solución salina a los glóbulos, en vez de solución de antígeno (fracción  $F_1$ ) se obtiene la suspensión al 0.5% de glóbulos no sensibilizados, que servirán de testigo, y que son indispensables para la realización de la prueba.

#### Procedimiento para la reacción

En la placa de plástico ("disposable tray U shaped, Linbro,<sup>3</sup> model S-MRC-96 clear" o "U-plates, disposable, Cooke,<sup>4</sup> mfg. No. 220-24"), usando lápiz dermatográfico, se marcan divisiones para separar las pruebas de los testigos, que incluyan una fila para un suero positivo conocido y otra sólo para la solución salina usada en la dilución de los sueros. Con una pipeta calibrada ("0.025 ml pipette dropper, Cooke, mfg. No. 220-5"), gotear en cada depresión de la placa el

volumen de 0.025 ml de solución salina que contenga 1% de suero normal de conejo inactivado y adsorbido en hematíes de carnero (véase el procedimiento para sueros sospechosos).

Diluir los sueros problema y el suero positivo testigo (inactivados y adsorbidos en hematíes de carnero) en serie y al doble, usando los microdiluidores de 0.025 ml ("0.025 ml microdiluter, Cooke, mfg. No. 220-33"). Hacer 6 diluciones (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) para trillaje; para titulación, en caso de ser el trillaje positivo hasta la última dilución, hacer diluciones hasta la 12<sup>a</sup> depresión, o sea, hasta 1:4092; en caso necesario, hacer más diluciones.

Agregar, con una pipeta calibrada, en cada depresión de la parte de la placa destinada a las pruebas, 1 gota (0.025 ml) de la suspensión de hematíes al 0.5% sensibilizados con la fracción  $F_1$  (véase el procedimiento para la adsorción de antígeno a los hematíes).

Adicionar, con otra pipeta calibrada, en cada depresión de la parte de la placa destinada a los testigos, 1 gota (0.025 ml) de la suspensión de hematíes no sensibilizados, o sea, sin fracción  $F_1$ .

La dilución inicial de los sueros problema será considerada como 1:4.

Cubrir las placas con la hoja de plástico engomada ("microtiter plate sealer, Cooke, mfg. No. 220-30"). Agitar suavemente en un agitador Vortex, o manualmente.

Hacer la primera lectura al cabo de 2 horas. Dejar de un día para otro, a temperatura ambiente, en superficie horizontal.

Hacer la lectura final, de un día para otro (generalmente 16 horas), usando el espejo de lectura del microtitulador ("test reading mirror, Cooke, mfg. No. 220-16"). Es indispensable comparar el aspecto de la aglutinación en las depresiones de prueba con el de las depresiones testigo.

#### Interpretación de los resultados

1:4 y 1:8—Sospechoso.

1:16 o más—Positivo.

<sup>3</sup> Linbro Chemical Co., Inc., 681 Dixwell Ave., New Haven, Conn. 06511, U.S.A.

<sup>4</sup> Cooke Engineering Co., Medical Research Division, 735 North Saint Asaph St., Alexandria, Va. 22314, U.S.A.

## Resumen

Se informa detalladamente sobre los procedimientos empleados en el Instituto de Microbiología de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil, para la ejecución de la prueba de hemoaglutinación para el diagnóstico de la peste.

Se describen los procedimientos empleados para sueros sospechosos, hematíes de carnero, adsorción de antígeno a los hematíes y se indican las bases para la interpretación de los resultados de la prueba.

Se incluyen dos anexos en los cuales se

describe la técnica para formolizar hematíes y se da la fórmula de la solución de Alsever modificada.

El autor cree que este trabajo resultará de utilidad, sobre todo a los laboratorios que no dispongan de fuentes bibliográficas adecuadas, porque, a pesar de que los brotes de peste ocurridos en años recientes despertaron el interés de algunos grupos de investigadores, y que los últimos (1964-1965) coincidieron con el mejoramiento de los métodos de diagnóstico, parece que dichos métodos aún no han sido extensamente utilizados. □

## Anexo I

### *Resumen de la técnica para formolizar hematíes (Czismas, L., 1960) (6)*

1. Recoger la sangre (por ejemplo, de carnero) en un sistema humedecido con solución de Alsever modificada y pasarla a un recipiente que contenga también esa solución.

2. Conservar a 4°C como máximo hasta 4 semanas antes de usar; el tratamiento de células recientes es mejor porque son menos frágiles.

3. En el día de la formolización, centrifugar a 1,500 rpm durante 10 minutos (por ejemplo, 100 de Alsever + 100 de sangre en frasco de centrifugación de 500 ml).

4. Lavar de 5 a 7 veces en 10 volúmenes (500 ml) de solución salina fría, al 0.85% y a 1,500 rpm durante 5 a 10 minutos. Durante el lavado y otras manipulaciones, evitar que se produzca espuma.

5. Resuspender las células depositadas (cerca de 50 ml), en no menos de 8 volúmenes (400 ml) de solución salina fría.

6. Colocar en un saco de diálisis (2.5 cm de ancho, cuando está aplanado) de celofán, una solución de formaldehído al 40%, USP, pH 5.5 a 6.0, en cantidad igual a la cuarta parte (100 ml) del volumen de suspensión de células. Hacer previamente un nudo en un extremo del saco de celofán; expulsar el aire por el otro

extremo, en aproximadamente un tercio del tubo, y hacer un nudo en la punta.

7. Colocar el saco de celofán con formol, en un vaso de precipitación.

8. Verter la suspensión de glóbulos sobre el saco de celofán.

9. Agitar el vaso de precipitación a temperatura ambiente en un agitador mecánico orbital, a la mayor velocidad posible que no produzca muchas burbujas.

10. Después de 2 horas, verter el contenido del saco de celofán en el vaso de precipitación (basta perforar el celofán).

11. Continuar la agitación por 12 a 18 horas más (con agitador mecánico o magnético), a temperatura ambiente.

12. Filtrar en gasa quirúrgica para remover los residuos de células, etc.

13. Agregar a la suspensión homogénea,  $\frac{1}{2}$  volumen (250 ml) de solución salina.

14. Lavar 6 veces en aproximadamente 750 ml de solución salina.

15. Suspender las células formolizadas (unos 60 ml) en igual volumen de solución salina con o sin 0.02% de timerosol (mertiolato). Guardar a 4°C, como suspensión "stock" al 50%, hasta un año.

## Anexo II

Solución de Alsever modificada (Bukantz *et al.*, 1946) (2)

Dextrosa . . . . .	2.05g
Citrato de sodio . . . . .	0.8g
Cloruro de sodio . . . . .	0.42g
Agua destilada . . . . .	100ml

Esterilizar al autoclave a 10 libras de presión (115°C) durante 15 minutos. No se debe sobrepasar esa temperatura para evitar la caramelización de la dextrosa.

Ajustar el pH a 6.1 con solución de ácido cítrico al 10% (generalmente basta adicionar 0.055g de ácido cítrico para 100 ml).

## REFERENCIAS

- (1) Boyden, S. V.: "The Adsorption of Proteins on Erythrocytes Treated with Tannic Acid and Subsequent Hemagglutination by Antiprotein Sera", *J Exp Med*, 93:107-120, 1951.
- (2) Bukantz, S.C., Rein, C. R., y Kent, J. F.: "Studies in Complement Fixation. II: Preservation of Sheep's Blood in Citrate Dextrose Mixtures (modified Alsever's solution) for Use in the Complement Fixation Reaction", *J Lab Clin Med*, 31: 394-399, 1946.
- (3) Cavanaugh, D. C., Thorpe, B. D., Bushman, J. B., Nicholes, P. S., y Rust, J. H., Jr.: "Detection of an Enzoitic Plague Focus by Serological Methods", *Bull Wild Hlth Org*, 32(2):197-203, 1965.
- (4) Chen, T. H., y Meyer, K. F.: "Studies on Immunization against Plague. VII: A Hemagglutination Test with the Protein Fraction of *Pasteurella pestis*: A Serologic Comparison of Virulent and Avirulent Strains with Observations on the Structure of the Bacterial Cells and its Relationship to Infection and Immunity", *J Immunol*, 72:282-298, 1954.
- (5) Chen, T. H., y Meyer, K. F.: "An Evaluation of *Pasteurella pestis* Fraction I—Specific Antibody for the Confirmation of Plague Infections", *Bull Wild Hlth Org*, 1966 (en prensa).
- (6) Csizmas, L.: "Preparation of Formalinized Erythrocytes", *Proc Soc Exper Biol Med*, 103:157-160, 1960.
- (7) Levi, M. I. *et al.*: "Results of Testing the Passive Hemagglutination Reaction and the Antibody Neutralization Test in the Practice of the Epizootiological Investigation of Wild Rodents for Plague", *Zh Mikrobiol* 40(12):113-119, 1963.
- (8) Meyer, K. F.: "Serological Tests for the Confirmation of Plague Infections: A Preliminary Communication", *Bull Wild Hlth Org*, 30:750-751, 1964.
- (9) Meyer, K. F., McNeill, D., y Wheeler, C. M.: "Results of a Preliminary Serological Survey of Small Mammal Populations for Plague on the Island of Hawaii", *Bull Wild Hlth Org*, 33:809-815, 1965.
- (10) Organización Panamericana de la Salud: *Casos notificados de enfermedades de declaración obligatoria en las Américas*, Washington, D.C. (Publicación Científica de la OPS 114), 1965.
- (11) Organización Panamericana de la Salud: *Plague in the Americas*, Washington, D.C. (Publicación Científica de la OPS 115), 1965.
- (12) Sever, J. L.: "Application of a Microtechnique to Viral Serological Investigations", *J Immunol*, 88(3):320-329, 1962.
- (13) Suchkov, I. G.: "Serological Examinations in Plague. XIV: Trial of Some Serological Reactions in Epizootiological Investigations in Natural Plague Foci", *Zh Mikrobiol*, 41(1):135-141, 1964.

### Hemagglutination Test for the Diagnosis of Plague (Summary)

This article contains a detailed account of the procedures used at the Institute of Microbiology of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, in the hemagglutination test for the diagnosis of plague.

Descriptions are given of the procedures used for suspect sera, sheep erythrocytes, ad-

sorption of antigens to erythrocytes, and the basis for the interpretation of the results of the test.

There are two annexes, one of which contains a description of the technique used for formalinizing erythrocytes, and the other contains the formula for modified Alsever solution.

The author is of the opinion that this article will be of use, especially to laboratories which do not have adequate bibliographical resources, because despite the fact that outbreaks of plague in recent years have aroused

the interest of some research workers, and that the last outbreaks (1964–1965) coincided with the improvement of diagnostic methods, it seems that those methods have still not been used extensively.

### **A Prova de Hemaglutinação para o Diagnóstico da Peste (*Resumo*)**

Descrição minuciosa dos procedimentos empregados no Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, para a execução da prova de hemaglutinação no diagnóstico da peste.

Descrição dos procedimentos empregados no exame de sêros suspeitos, hemácias de carneiro e adsorção de antígeno às hemácias, bem como a indicação dos critérios seguidos na interpretação dos resultados da prova.

O trabalho contém dois anexos nos quais está descrita a técnica do tratamento das he-

mácias com formol e indicada a fórmula da solução de Alsever modificada.

O autor considera o trabalho de utilidade, sobretudo para os laboratórios que não dispõem de fontes bibliográficas adequadas, porque, embora os surtos de peste ocorridos nos últimos anos despertassem o interesse de alguns grupos de investigadores e os últimos (1964–1965) coincidissem com o melhoramento dos métodos de diagnóstico, parece que tais métodos não foram ainda amplamente utilizados.

### **L'épreuve d'hémo-agglutination dans le diagnostic de la peste (*Résumé*)**

Le rapport décrit de façon détaillée les méthodes employées à l'Institut de microbiologie de l'Université fédérale de Rio de Janeiro (Brésil) pour effectuer l'épreuve d'hémo-agglutination dans le diagnostic de la peste.

L'auteur fournit des détails sur les méthodes employées en ce qui concerne les sérums suspects, les globules rouges du mouton, l'adsorption de l'antigène aux globules rouges, et indique les éléments principaux permettant l'interprétation des résultats de l'épreuve.

Deux annexes sont jointes au rapport; elles décrivent la méthode qui consiste à traiter les

hématies par le formol et indiquent la formule de la solution modifiée d'Alsever.

L'auteur estime que ce document sera utile, surtout pour les laboratoires qui ne disposent pas de sources bibliographiques suffisantes car, malgré le fait que les cas de peste qui se sont déclarés au cours des dernières années ont suscité l'intérêt de quelques groupes de chercheurs, et que les dernières épidémies (1964–1965) ont coïncidé avec le perfectionnement des méthodes de diagnostic, il y a lieu de croire que lesdites méthodes n'ont pas encore été largement utilisées.