

201. 77

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN EL  
DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS HUMANA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**JOSE ANGEL MANZUR PEREZ**

México, D. F.

1987



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.

## Indice

	Pág.
I. Introducción	1
II. Generalidades	3
2.1 Características del Género Brucella	6
2.2 Composición y Estructura	6
2.3 Condiciones de crecimiento y Nutrición	7
2.4 Morfología Colonial	7
2.5 Metabolismo	8
2.6 Patogénesis	9
2.7 Aspectos Inmunológicos en la Brucelosis humana	12
2.8 Inmunofluorescencia	15
III. Materiales y Métodos	19
IV. Resultados	31
V. Discusión	51
VI. Conclusiones	59
VII. Apéndice	60
VIII. Bibliografía	63

## I. Introducción

El diagnóstico clínico de la brucelosis, es con frecuencia difícil de realizar por la vaguedad de signos y síntomas con que se presenta, por lo que se debe apoyar en pruebas de laboratorio como el hemocultivo y el serodiagnóstico. El primero puede presentar dificultades técnicas, en cuanto a su realización, además de que los resultados son tardados, pues las brucelas sólo crecen después de dos a tres semanas de incubación. Por otra parte, en la fase crónica de la enfermedad estos microorganismos, que son intracelulares, raramente están presentes en sangre periférica en suficiente número -- como para ser recuperados por hemocultivo (1).

El serodiagnóstico en cambio tiene una realización y una lectura mucho más rápida y es positiva precozmente; se -- utilizan en general las técnicas de aglutinación de Wright, -- de Antiglobulina humana o prueba de Coombs así como la aglutinación con 2-mercaptoetanol (2ME), que nos permite determinar que clase de globulinas están presentes en el individuo problema. La aglutinación determina anticuerpos aglutinantes y es el método más empleado; sin embargo, no se encuentran títu los positivos significativos en todos los pacientes y pueden presentarse resultados falsos positivos debido a reacciones -- cruzadas principalmente. La fijación de Complemento pone de manifiesto anticuerpos no aglutinantes, y tiene el inconve--

niente de su gran complejidad técnica, la prueba de Coombs de - detecta anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes, aunque no - se ha generalizado su empleo habitual, por su mayor laboriosi-- dad (2).

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) ha sido poco -- aplicada al diagnóstico de la brucelosis, ya que sólo en algunos países se usa, y creemos que no está debidamente estudiada con respecto a los otros métodos clásicos utilizados (3).

En el presente trabajo se tratará de comparar esta ú-- tima prueba, con las técnicas clásicas, y se pretende unificar - criterios para simplificar de algún modo el serodiagnóstico de la brucelosis humana.

Dentro de los objetivos de este trabajo estuvieron el estandarizar y optimizar un sistema de Inmunofluorescencia indi-- recta para determinar anticuerpos antibrucella en suero de pa-- cientes con brucelosis en diferentes fases clínicas, así como - individuos sin antecedentes de brucelosis. Además, se trató de establecer los límites en los niveles de anticuerpos que permi-- tieron diferenciar a ambos grupos de individuos, lo que a su vez permita el empleo de este sistema como diagnóstico serológico.

Por otro lado, se hizo una comparación de la respuesta inmune humoral con el diagnóstico clínico.

## II. Generalidades

La brucelosis es un problema sanitario mundial que, tanto por sus efectos sobre la salud humana y la de los animales, - como por sus repercusiones económicas, ocupa uno de los primeros lugares, de las infecciones transmitidas por los animales al hombre.

La mayor parte de las infecciones sufridas por las personas son resultado del contacto directo con los fetos, placenta y demás descargas que siguen al aborto o al parto de reses infectadas o cuando se sacrifican para el consumo. Además, muchas -- personas contraen la enfermedad al alimentarse con productos lácteos procedentes de vacas y cabras infectadas (4).

Las especies animales que son fuente de infección para el hombre, son bovinos, caprinos, ovinos, suinos, canidos, y algunas otras especies domésticas.

La importancia epidemiológica de estas especies animales está determinada por el tipo de Brucella que se encuentra infectándolos. En general, las ovejas y las cabras son el reservorio de Brucella melitensis, siendo la cepa más patógena para el hombre. Considerándose menos patógena a Brucella abortus, que infecta principalmente al ganado vacuno, Brucella ovis que tiene predilección por los ovinos, Brucella canis por perros y -- Brucella suis por cerdos. A pesar de que hay cierta predilección

de ciertas especies de Brucella por determinados huéspedes, no existe una exclusividad, y todos los animales y el hombre son sensibles a todas las especies de Brucella.

La transmisión en el hombre se lleva a cabo a través de tres vías: ingestión, contacto e inhalación.

#### Ingestión

Esta es la forma más frecuente de adquirir la enfermedad en México ya que el consumo de leche y sus derivados no pasteurizados es una práctica muy extendida particularmente en la población rural y se relaciona con la ocupación y bajo nivel socioeconómico. Además por la creencia de una adecuada vigilancia sanitaria de los productos de origen animal.

Por esta vía la bacteria penetra a través de la mucosa del tracto intestinal y si la acidez del jugo gástrico es --baja, también puede penetrar a través de la mucosa del estómago (5).

Brucella generalmente penetra al cuerpo humano a través de la piel de las manos o por conjuntivas; por lo que existe una alta probabilidad de infección por contacto en personas que se ocupan de los animales, que trabajan en los mataderos, -- que obtienen y procesan la lana, del personal de laboratorio -- que produce antígenos y vacunas debido a que hay una exposición masiva a las brucellas, a la vez que la piel de las manos puede

sufrierosiones durante la manipulación facilitando la entrada de la bacteria (6).

#### Infección por Inhalación

El hombre se infecta al respirar sustancia desecadas provenientes de animales infectados, polvo de lana, polvo de los camiones que sirven para transportar a los animales de los rastros y explotaciones agrícolas y por aerosoles en los laboratorios. Esta vía de infección ha sido comprobada por estudios experimentales y por observaciones epidemiológicas hechas en brotes acontecidos en mataderos (7).

Un factor importante que facilita que la transmisión se lleve a cabo es la gran capacidad que tienen las brucelas para sobrevivir en diversos productos, principalmente de origen animal. Pueden, permanecer vivas durante largo tiempo en carne refrigerada, cerca de 3 meses después del proceso de salado. Por lo tanto la carne y sus derivados provenientes de animales infectados constituyen una importante fuente de infección para las personas que la manejan y para los que la consumen cruda.

El impacto epidemiológico que tiene la enfermedad en los animales, es grande, ya que muchos son los huéspedes naturales para las diferentes especies de Brucella, que pueden transmitir la enfermedad al hombre. Entre ellos se encuentra a: zorros, venados, búfalos, camellos, vacas, cabras, borregos, perros, cerdos, etc. (8).

Para fines epidemiológicos se estima que los individuos pueden adquirir cierta inmunidad, como resultado del continuo contacto con animales infectados (en las zonas endémicas). Aunque también estos individuos pueden ser candidatos para una brucelosis crónica. El que suceda uno u otro caso dependerá -- por un lado de la cepa de Brucella y por otro del estado inmune general de los individuos.

## 2.1 Características del género Brucella

Este género pertenece al grupo de cocobacilos Gram negativos aeróbicos. Al microscopio se observan como cocobacilos pequeños que miden de 0.6 a 1.5 micras de largo, se presentan aislados y menos frecuentemente en pares, cadenas cortas o pequeños grupos. Inmóviles, no capsulados y no presentan coloración bipolar (9).

## 2.2 Composición y estructura

La ultraestructura de la célula es muy similar a la de otras bacterias Gram negativas, observándose una membrana externa, la peptidoglicana, el espacio periplásmico y una membrana citoplasmática.

La estructura química de la pared celular de las brucelas no ha sido totalmente determinada. El análisis global indica que ésta corresponde al 21% del peso seco de la bacteria -- en cepas lisas y al 14% en cepas rugosas.

Esta constituida de una membrana externa formada de protefnas y lipopolisacáridos, en donde se localizan los principales antígenos de superficie característicos de las células lisas y rugosas.

Las lisas contienen varios tipos de polisacáridos entre ellos el lipopolisacárido o endotoxina que es el sitio donde se localizan los antígenos A y M. La fase rugosa también -- contiene lipopolisacárido y un antígeno R característico de esta cepa el cuál puede ser empleado para diagnóstico serológico de infecciones causados por algunas de las cepas rugosas de -- Brucella. (B. ovis, B. canis), o para diferenciar animales vacunados con cepas rugosas de los infectados en forma natural -- (10).

### 2.3 Condiciones de Crecimiento y Nutrición

Brucella es un bacilo aeróbico estricto, crece lentamente en primo aislamiento y requiere de medios complejos. Entre los que se recomiendan son los siguientes: Agar infusión de hígado, suero dextrosa agar (SDA), agar soya tripticasa, agar Brucella y agar Albimi. En ellas crecen todas las especies del género.

### 2.4 Morfología Colonial

La morfología de Brucella varía dependiendo del caracter liso, rugoso o mucóide de las cepas y del medio empleado. -

Las cepas lisas (S) producen colonias circulares convexas con -- bordes regulares. A la luz transmitida son transparente y pre-- sentan un color amarillo pálido. A la luz reflejada son brillan-- tes, ligeramente opalescentes de color gris azulado. Las cepas rugosas presentan colonias semejantes en tamaño y forma pero va-- rían considerablemente en color, consistencia y textura. Estas colonias R, son menos transparentes que las S, con superficie más granular y color que va del blanco mate al amarillo o amarillo - café. Las colonias lisas son suaves, se emulsifican fácil y for-- man suspensiones estables en solución salina, mientras que las - rugosas son frecuentemente granulosas y difíciles de desprender del agar, no forman suspensiones homogéneas en solución salina y producen agregados granulares o filamentosos. Las colonias mu-- coides (M), son similares a las R en color y opacidad pero pre-- sentan textura mucoide (11).

## 2.5 Metabolismo

Los procesos productores de energía son esencialmente oxidativos y los cultivos de Brucella muestran poca capacidad -- para fermentar a los carbohidratos empleados en las pruebas con-- vencionales. Los requerimientos nutricionales de Brucella son en general complejos: múltiples aminoácidos, tiamina, biotina, nicotinamida y iones magnesio, son esenciales para su crecimien-- to. El hierro y el manganeso ejercen una acción reguladora; el crecimiento de algunas cepas es estimulado por pantotenato de -- calcio y meso-eritritol. Muy pocas cepas crecen con citrato co-

mo única fuente de carbono (12).

Los aminoácidos y proteínas conteniendo azufre, son degradadas y éste puede ser reducido a  $H^2S$ , variando su producción con la especie y el biotipo; no producen indol ni acetilmetil carbinol.

Tanto B. abortus como B. ovis requieren una atmósfera de 10% de  $CO_2$  para su crecimiento. El pH óptimo se localiza entre 6.6 y 7.4.

Cada una de las especies de Brucella (6) tienen un patrón característico y definido de metabolismo oxidativo.

B. melitensis, B. abortus, B. suis y B. canis generalmente producen oxidasa, sin embargo algunas cepas no la producen. La mayoría de las cepas reducen los nitratos exceptuando a B. ovis y B. canis. También la mayoría hidroliza la urea.

## 2.6 Patogénesis

Estos microorganismos son parásitos intracelulares facultativos capaces de invadir ciertos tejidos, originando procesos agudos con gran tendencia a la cronicidad, y aún infecciones inaparentes, tanto en animales como en el humano (13).

La especie más importante en la patología humana es B. melitensis, caracterizada por producir un estado tóxico que se ha comparado con la fiebre tifoidea; B. abortus produce un -

estado estado tóxico moderado; finalmente B. suis se caracteriza por producir lesiones supurativas o destructivas, dando focalizaciones en hígado, bazo, testículos, cuerpos vertebrales, -- etc. Existen otras especies cuya patogenicidad para el humano no esta comprobada, la posibilidad de contacto con animales portadores de las mismas es escasa, por lo que posiblemente no representa importancia verdadera desde el punto de vista epidemiológico.

La supervivencia de los parásitos intracelulares depende de su capacidad para inhibir o resistir los sistemas de destrucción bacteriana intracelular. Uno de los mecanismos esta mediado por la inhibición de la fusión entre lisosomas y fagosomas; cuando la fusión ocurre la destrucción puede llevarse a cabo por mecanismos oxígeno-dependientes o bien por proteínas catiónicas, proteasas, fosfolipasas.

En los individuos, la bacteria invade las células de la mucosa, pasa al torrente sanguíneo donde es fagocitada por polimorfonucleares; que los llevan al sistema reticuloendotelial y liberan las bacterias que luego invaden a los macrófagos, apareciendo grupos de células epiteliales o células gigantes formando granulomas y dando lugar a desaparición de las brucelas; los granulomas presentan degeneración hialina y disminución de tamaño y desaparecen en el lapso de meses.

La posibilidad de que resistan o impidan los mecanis--

mos intracelulares de destrucción esta mediado por componentes de la pared celular, lo que hace a una cepa lisa más virulenta comparada con una rugosa. Uno de los factores en el desarrollo del padecimiento esta dado por la capacidad de la bacteria para resistir los mecanismos de destrucción bacteriana por parte de la célula invadida. Por lo que la evolución de enfermedad estará dada por la resistencia del huésped, que en la mayoría de los casos dará lugar a curación en forma natural. Se considera enfermedad aguda cuando la duración es de tres meses, subaguda cuando persiste de 3-12 meses y crónica cuando la duración es mayor de 12 meses. Esta clasificación es discutible, algunos autores consideran que puede designarse como crónica - cuando el individuo enfermo ha recibido tratamiento con dosis completas y por tiempo adecuado, sin haber desaparición de los síntomas.

El periodo de incubación es de 2-3 semanas, aunque -- pueden observarse periodos más largos, hasta 3-4 meses. Las características clínicas más importantes son la fiebre elevada, de tipo vespertino haitualmente, intermitente; con cefalea intensa, generalmente constante; la diaforésis es un dato clínico constante en la mayor parte de los pacientes; finalmente -- las algias osteoarticulares, en ocasiones acompañadas de fenómenos inflamatorios locales, que pueden llegar al derrame articular.

mos intracelulares de destrucción esta mediado por componentes de la pared celular, lo que hace a una cepa lisa más virulenta comparada con una rugosa. Uno de los factores en el desarrollo del padecimiento esta dado por la capacidad de la bacteria para resistir los mecanismos de destrucción bacteriana por parte de la célula invadida. Por lo que la evolución de enfermedad estará dada por la resistencia del huésped, que en la mayoría de los casos dará lugar a curación en forma natural. Se considera enfermedad aguda cuando la duración es de tres meses, subaguda cuando persiste de 3-12 meses y crónica cuando la duración es mayor de 12 meses. Esta clasificación es discutible, algunos autores consideran que puede designarse como crónica cuando el individuo enfermo ha recibido tratamiento con dosis completas y por tiempo adecuado, sin haber desaparición de los síntomas.

El período de incubación es de 2-3 semanas, aunque -- pueden observarse períodos más largos, hasta 3-4 meses. Las características clínicas más importantes son la fiebre elevada, de tipo vespertino habitualmente, intermitente; con cefalea intensa, generalmente constante; la diaforésis es un dato clínico constante en la mayor parte de los pacientes; finalmente -- las algias osteoarticulares, en ocasiones acompañadas de fenómenos inflamatorios locales, que pueden llegar al derrame articular.

Existen otras manifestaciones que dependen del órgano o sistema involucrado. La afección en Sistema Nervioso Central puede cursar con estado depresivo, cambios de personalidad y aún psicosis; el líquido cefalorraquídeo mostrará proceso inflamatorio con celularidad a base de mononucleares principalmente. En el sistema Nervioso puede existir compromiso de nervios periféricos.

Entre las complicaciones más graves y de mayor letalidad debe considerarse la endocarditis por Brucella; aún con tratamiento específico y adecuado la mortalidad llega a ser de 70%. Otras formas de enfermedad se caracterizan por la focalización dando lugar a abscesos en vertebras, hígado, bazo, testículos o bien dando lugar a la formación de granulomas en diferentes sitios anatómicos (14, 15, 16, 17).

## 2.7 Aspectos Inmunológicos en la Brucelosis Humana

La existencia de factores de virulencia específica - así como la respuesta del huésped son importantes para determinar la importancia diagnóstica durante el desarrollo de una brucelosis humana.

La infección natural con Brucella o la inmunización con vacunas de bacterias vivas induce inmunidad humoral y celular.

Estudios en humanos ha demostrado que la inmunidad es adquirida después de una infección activa con Brucella produ-

ciéndose tanto mecanismos inmunes humorales como celulares --  
(13).

Las diferentes clases de inmunoglobulinas que se encuentran en fase aguda y crónica de la enfermedad y de variaciones en los títulos de varias pruebas serológicas reflejan la reactividad de las inmunoglobulinas en una prueba en particular. En la respuesta inicial o la fase aguda de la infección debida a Brucella se presenta un incremento de anticuerpos de tipo IgM. Cuando la enfermedad progresa, la IgM declina y la IgG se incrementa, aunque los niveles de IgM pueden persistir por algunos años.

Posteriormente, la IgG tiende a elevarse a niveles altos y disminuye luego del tratamiento hasta valores no detectables. Por ello se ha considerado a la IgG como un marcador de infección activa. La IgM y la IgG son anticuerpos aglutinantes, la IgM y algunas subclases de IgG también fijan complemento. Anticuerpos de tipo IgA pueden ser aglutinantes y no aglutinantes de la clase IgA o IgG pueden ser detectados por las pruebas de Coombs, ELISA, Radioinmunoensayo e Inmunofluorescencia indirecta (18, 19, 20).

El comportamiento de las pruebas serológicas es diferente en casos agudos comparados con crónicos. En la etapa temprana de la infección la aglutinación en tubo es positiva, mientras que la prueba de mercaptoetanol permanece negativa. Cuando la

infección progresa los títulos de mercaptoetanol aumentan simultáneamente con el de aglutinación en tubo.

La metodología diagnóstica empleada actualmente para la brucelosis humana se basa en técnicas de aglutinación, en placa como la reacción de Huddlesson y prueba de Rosa de Bengala, que detecta IgG, IgM o ambas. Con mercaptoetanol la actividad aglutinante de los anticuerpos IgM es destruida, y solo mide anticuerpos de tipo IgG.

También se han empleado métodos como fijación de complemento, contraímmunoelectroforesis y prueba de Coombs.

A pesar de la diversidad de métodos que existen para el diagnóstico de brucelosis, no ha habido un acuerdo en cuanto a su empleo y aplicación, ya que cada uno presenta ventajas y desventajas respecto a los demás. Es decir, no se ha encontrado un método serológico que por sí sólo establezca el diagnóstico definitivo por lo que siempre se recomienda el uso de 2 o más pruebas.

Parte de este problema nace de la especificidad del antígeno empleado. Se sabe que entre bacterias Gram negativas existe una alta frecuencia de reacciones cruzadas y esto se debe principalmente a la presencia de lipopolisacárido de la superficie de la bacteria. Brucella no es la excepción y existen varios reportes que nos muestran este problema con detalle

(21, 22, 23).

## 2.8 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es esencialmente una técnica -- histoquímica o citoquímica empleada para la detección y localización de antígenos.

Esta técnica se debe a A. H. Coons, quién publicó en - 1941, la conjugación de anticuerpos con colorantes fluorescentes para localizar al antígeno correspondiente (24).

### Fundamento

Las proteínas, incluyendo los anticuerpos presentes en el suero, pueden unirse químicamente con colorantes fluorescentes, sin afectarse las propiedades biológicas e inmunológicas - de las proteínas. Estos colorantes permiten que puedan ser visualizados en el microscopio de fluorescencia.

Si los anticuerpos fluorescentes reaccionan con su antígeno, el complejo inmunológico obtenido se vuelve fluorescente. Los colorantes conocidos como fluorocromos, son sustancias químicas que absorben luz de pequeña longitud de onda y emiten una luz de onda mayor. Los colorantes que se emplean para marcar anticuerpos absorben luz U. V. y azul corta y emiten luz visible.

Los fluorocromos empleados son el: Isotiocianato de - fluoresceína, Rodamina B de lisamina, y el ácido 1-dimetil-amino naftaleno-5-sulfónico (DANS). Estos colorantes producen -- fluorescencia intensa y color característico, que difiere del - color azul que produce la autofluorescencia de los tejidos. La fluoresceína y el Dans producen una luz amarillo verdosa y la - Rodamina luz roja anaranjada. Estas sustancias se unen a los - grupos aminos libres del anticuerpo, formándose enlaces tricarbá mido con fluoresceína y sulfonamido con el DANS y Rodamina.

#### Inmunofluorescencia Indirecta

Este método está basado en la prueba de Antiglobulina (Prueba de Coombs). Esta técnica que se lleva a cabo en 2 pasos se usa tanto para detectar antígenos como anticuerpos contra de terminado antígeno, en suero de pacientes.

Para detectar antígeno, en un primer paso se hacen reac cionar el antígeno a investigar y su anticuerpo específico no - marcado, obtenido generalmente en conejo. Se lava para elimi-- nar el anticuerpo que no reacciona y después la preparación se hace reaccionar con un anticuerpo marcado contra la gamaglobuli na de conejo, que a su vez esta unida al antígeno en caso de -- haberlo, obteniéndose así, indirectamente fluorescencia del an- tígeno.

En caso de no haber antígeno presente, no se va a ob-- servar fluorescencia pues el anticuerpo marcado no va a poder -

unirse al anticuerpo sin marcar, que al no haber antígeno se elimina con los lavados.

Para la detección de anticuerpos en el suero de pacientes; se hace reaccionar el antígeno contra el cual se va ver si hay anticuerpos y el suero sin marcar del paciente a estudiar. Se lava para quitar el exceso de anticuerpo del suero que no -- reaccionó, y después, esta preparación se hace reaccionar con -- un suero Antigamaglobulina humana marcada.

La relación fluorocromo/proteína se obtiene comparando las densidades ópticas del conjugado a 495 nm, (que corresponden al pico de absorbancia del fluorocromo conjugado a la proteína) y a 280 nm, que corresponden al pico de absorción de la tirosina (25, 26).

Conjugados adecuados son los que tienen una relación -- fluorocromo/proteína cercana a la unidad.

#### Microscopio de Fluorescencia

El microscopio de fluorescencia es más complicado que el microscopio óptico, y hay una gran variedad de ellos.

Generalmente, está compuesto de una fuente de luz que emite luz ultravioleta y azul corta. Estas fuentes de luz son lámparas de mercurio o de cuarzo-iodo-tungsteno.

Es necesario lograr una longitud de onda igual a la -- longitud de onda máxima de excitación del fluorocromo. Los an

anticuerpos marcados con fluoresceína absorben luz más eficientemente a 495 nm, y emiten su fluorescencia a 525 nm. observándose en el microscopio como verde amarillo. Los anticuerpos marcados con Rodamina absorben la luz a 550 nm. y emiten su fluorescencia a 580 nm.

Para seleccionar estas longitudes de onda de máxima -- excitación de los fluorocromos, se emplean filtros que sólo permiten el paso de la longitud de onda de luz ultravioleta requrida para excitación del fluorocromo, eliminando las radiaciones de otras longitudes de onda (27).

El microscopio de fluorescencia tiene también otros 2 filtros: uno térmico para absorber el calor producido por las fuentes de luz y un filtro secundario que elimina a toda la luz ultravioleta que puede pasar y ser perjudicial al ojo humano. - Un espejo revestimiento superficial manda la luz al condensador, que generalmente es de campo oscuro, ya que la intensidad de la imagen fluorescente es baja y es más fácil verla sobre un fondo negro. Al llegar la luz al anticuerpo fluorescente emite luz - visible.

Existe un sistema de epi-iluminación que emplea un iluminado vertical y un espejo dicróico. En este sistema la excitación es dirigida directamente a la muestra del tejido a través del objetivo. La luz fluorescente emitida de la muestra -- epiiluminada es transmitida al ojo a través del espejo dicróico.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### Material de vidrio y Equipo

Agitador magnético	Matraces Erlenmeyer
Agitador Vortex	Matraces volumétricos
Asa	Mechero
Bolsas de diálisis	Micropipeta manual 200
Botellas de Roux	Micropipeta manual 20
Cajas de Petri	Papel filtro
Celdas de cuarzo	Pipeta Pasteur
Centrifuga refrigerada	Placas de microtitulación
Cubreobjetos	Portaobjetos
Embudo Buchner	Sephadex G-25
Espectrofotómetro	Tubos de ensayo (diversos)
Estufa	Vasos de precipitados

#### Medios

Agar soya tripticasa  
Agar infusión de hígado

#### Reactivos

Agua destilada	Carbonato de sodio
Acetona	Dietilaminoetil celulosa
Acido Bórico	Formol
Alcohol etílico	Fosfato dipotásico
Adyuvante C. de Freund	Fosfato disódico dodeca-- hidratado
Adyuvante I. de Freund	

Bicarbonato de sodio	Glicerina
Borax	Hidróxido de sodio
Cloruro de potasio	Isotiocianato de Fluores-- ceína
Cloruro de sodio	Sulfato de amonio

### Soluciones

1. Solución amortiguadora de Carbonato-Bicarbonato 0.05 M. pH = 9.6
2. Solución amortiguada de Glicerina 0.5 M pH = 8.2
3. Solución amortiguada de Fosfatos 0.15 M pH = 7.2
4. Solución salina Fisiológica
5. Solución salina amortiguada de Boratos pH = 8.4 - 8.5

### 1. Grupos de individuos estudiados

Los individuos estudiados se clasificaron en cuatro - grupos diferentes:

- I. 40 individuos sanos, los cuales no tenían antecedentes clínicos de brucelosis
- II. 23 individuos con diagnóstico clínico de brucelosis y que fueron negativos a las pruebas -- convencionales.
- III. 69 individuos con título no significativos, entre 1:10 y 1:80 en las pruebas convencionales.
- IV. 68 individuos con títulos significativos, entre 1:160 y 1:1280.

## 2. Preparación del Antígeno (28)

El antígeno empleado en este experimento fue preparado a partir de una cepa de B. melitensis 16 M procedencia Centro - FAO/OMS de Brucelosis Weybridge, Inglaterra.

La preparación fue llevada a cabo en el laboratorio de Brucelosis, del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de la siguiente manera:

Se sembró la cepa en cajas con agar soya tripticasa y se dejó incubar en una estufa a 37°C durante 48 hrs. Después de haber verificado que las bacterias se encontraban en fase lisa, por medio de la prueba de la acriflavina, se sembraron en tubos que contenían el mismo medio, se incubaron a 37°C durante 48 hrs. Al crecimiento de estos tubos se les practicó aglutinación con sueros específicos, después se suspendieron en 1 ml. de solución salina fisiológica para la inoculación de botellas de Roux las cuáles se incubaron a 37°C durante 48 hrs.

Posteriormente, se cosecharon y lavaron las células - 1.250 x g mediante 1 hr. con solución salina fisiológica, haciendo tres lavados. Después de los tres lavados el sedimento de la última se resuspendió en solución salina formalinizada, de manera de obtener una concentración de 1 millón de gérmenes por ml.

La suspensión se conservó en refrigeración a 4°C.

### Densidad del antígeno

La densidad de la suspensión se determinó fotométricamente diluyendo la suspensión concentrada y ajustada finalmente al 1:50 en solución salina formalinizada en un frasco volumétrico y midiendo la densidad óptica a 420 nm. En un espectrofotómetro se comparó contra un lote normalizado de un antígeno diluido de igual manera. Si la densidad del nuevo lote no es la prevista, debe reajustarse añadiendo más solución salina formalinizada o más células.

### Titulación del antígeno

Para determinar la concentración del antígeno que se utilizaría en este sistema, se probaron diferentes concentraciones del antígeno:  $10^6$ ,  $10^9$ , y  $10^{12}$  células por ml., de estas se usaron 20 ul por pozo. Cada una de ellas se probaron con el suero de un individuo sano y de un paciente con diagnóstico clínico y serológico de brucelosis, estos sueros diluidos 1:50 y observados por Inmunofluorescencia indirecta.

### 3. Purificación de la Gamaglobulina con Sulfato de amonio

1. Se disolvieron 1000 g. de sulfato de amonio en 1000 ml. de agua destilada a 50°C se dejó que la solución reposará toda la noche a temperatura ambiente y se ajusto el pH = 7.2 con una solución amoniaca diluida.

2. Se diluyó el suero 1:2 con solución salina y se adicionó -- una solución de sulfato de amonio (preparado en 1) a tener una concentración final de 45% (V-V).
3. Agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos.
4. Se resuspende el precipitado y centrifuga a 1000 g por 15 - minutos a 4°C.
5. Se lavó el precipitado con 45% de sulfato de amonio satura- do y se centrifugo.
6. Se disolvió el precipitado en el mismo volumen de solución amortiguada de fosfatos, de la misma manera que el suero -- original.
7. Se centrifugó para remover algún material insoluble.
8. Se precipitó la gamaglobulina usando una concentración fi- nal de 40% de sulfato de amonio saturado.
9. Se resuspendió el precipitado y se lavó con 40% de sulfato de amonio saturado.
10. Después de la centrifugación se lavó el precipitado y se di- solvió en un volumen mínimo de solución amortiguada de fos- fatos.
11. Se dializó la gamaglobulina contra 5 cambios de solución -- amortiguada de fosfatos a 4°C.
12. Se preparó una dilución 1:20 de la gamaglobulina y se deter- minó la absorbancia a 280 nm. usando UV espectrofotómetro.
13. Finalmente, se liofilizó la gamaglobulina.

#### 4. Determinación de Proteínas (29).

##### Método de Lowry

Preparar una curva de calibración a partir de un estándar de albúmina de 600 ug/ml (albúmina bovina, Fraction V). El método es el siguiente:

---

0.4 ml. muestra	Adicionar
Blanco:	2 ml solución alcalina de cobre (R <sub>6</sub> )
0.4 ml. amortiguador Tris (R <sub>4</sub> )	

---

Mezclar y dejar reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente

---

	Adicionar 0.2 ml del -- Reactivo de Folin (R <sub>7</sub> )
--	--

---

Dejar reposar 30 a 45 minutos

---

Leer a 750 nm. en un espectrofotómetro

---

Una vez determinada la pureza de la fracción gamaglobulina y conocida su concentración (13.5 mg/ml) se procedió a preparar el inoculo para la inmunización, por lo cual se ajustó la concentración de proteína a 200 ug/ml. con solución amortiguada de boratos.

### Preparación de la antigamaglobulina humana

Los adyuvantes completo (ACF) e incompleto (AIF) de Freund se obtuvieron de los laboratorios Difco.

La antigamaglobulina humana de conejo fueron obtenidos por inmunización subcutánea en conejos Nueva Zelanda de acuerdo al siguiente protocolo:

<u>Día</u>	<u>Inoculación</u>	<u>Vehículo</u>	<u>Proteína</u>
0	Primera	0.5 ml de ACF 0.5 ml de PBS, 7.2	0.5 mg.
7	Descanso	----	----
14	Segunda	0.5 ml de AIF+ 0.5 ml de PBS, 7.2	1 mg.
21	Tercera	0.5 ml de AIF+ 0.5 ml de PBS, 7.2	1 mg.
28	Sangrado		

El suero fue separado por centrifugación a 2000 r.p.m. y almacenado en alícuotas a -20°C hasta su uso.

### Separación de la Antigamaglobulina por DEAE-celulosa.

Se dializaron 60 ml de suero inmune durante un período de 24 horas contra 8 litros de solución salina amortiguada con fosfatos. Se separó una muestra de 10 ml. del dializado para determinar la cantidad de anticuerpos presentes.

2. Se deja humedecer la DEAE-celulosa de la siguiente manera:
  - a) Se preparó una suspensión acuosa muy espesa con 45 g. - de DEAE-celulosa, que equivalen a 340-350 g. de celulosa.
  - b) Se aplicó succión para eliminar todo el agua que sea posible.
  - c) Se adicionó 500 ml. de la solución salina amortiguada.
3. Se pesó 340 g. de celulosa húmeda, pasándolos a un vaso de - precipitados donde se le adicionó 50 ml. de solución salina amortiguada mezclándolo perfectamente.
4. El vaso con la celulosa se colocó sobre el agitador magnético, y con la agitación constante se adicionó el suero dializado a la suspensión de la celulosa.
5. Se dejó reposar la mezcla durante 5 horas para que se equilibre el suero.
6. Se adicionó 100 ml. de solución salina amortiguada empleando agitación constante.
7. Se filtró la mezcla en un embudo Buchner por succión y se -- recoge el filtrado que se etiquetó como fracción I, esta solución contiene la antigamaglobulina bastante pura.
8. La fracción II se obtuvo lavando la celulosa contenida en un Buchner con 100 ml. de solución salina amortiguada.
9. Se mezcló la fracción I y II y se redujo el volumen por per vaporación a solo 35 ml.

10. Se dializó la antigamaglobulina así como la muestra de --  
suero dializado contra una solución salina amortiguada de  
boratos.

11. Se determinó el título de anticuerpos presentes en el sue-  
ro crudo dializado así como la antigamaglobulina purifica-  
da, para calcular el rendimiento.

#### 7. Inmunoelectroforesis

El procedimiento consiste en la migración electrofo-  
rética en medio de agarosa, de la preparación de gammaglobulina  
purificada y suero total proveniente de diferentes individuos  
sanos; después de la migración se coloca entre ambos pozos el  
anticuerpo a probar, y por difusión se formarán en la placa lí-  
neas o arcos visibles en las zonas donde se unen el antígeno y  
el anticuerpo, de tal forma que las fracciones se distinguen -  
por su posición característica. El método es el siguiente:

1. Se disolvió 1 g. de agarosa en 100 ml de solución amorti-  
guadora de Michaelis ( $R_9$ ), con ayuda de calor y se agregó  
0.2 g de azida de sodio.
2. Se sellaron los portaobjetos aplicando la solución con un  
pincel de tal manera que se forma una capa delgada. Se -  
dejo solidificar.
3. Se aplicaron 3 ml. de la misma solución procurando que la  
capa de gel quede lo más uniforme posible.

4. Se dejó solidificar y se guardó en cámara húmeda, en refrigeración media hora antes de usarse.
  5. Se perforaron las placas en la forma comercial.
  6. Se colocó el suero humano en el pozo superior y la fracción gammaglobulina en el inferior.
  7. Vertir en la cámara de electroforesis solución amortiguadora de Michaelis y se colocan las laminillas. Hacer la conexión con tiras de papel Whattman.
  8. Se efectuó el corrimiento electroforético a 200 volts, -- por 15 minutos.
  9. Al término del corrimiento, se colocó en el canal el anti cuerpo anti-gammaglobulina obtenido y se mantuvo la laminilla en cámara húmeda por espacio de 24 a 72 horas, tiempo en el cual se completa la difusión.
8. Método para preparar el conjugado FITC
1. Se dializó la fracción antigammaglobulina de el antisuero contra una solución amortiguada de Carbonato/Bicarbonato pH = 9, 0.25 M usando una columna de Sephadex G-25.
  2. Se determinó la concentración de proteínas de la solución y se ajustó a 20 mg/ml.
  3. Se adicionó 0.05 mg. de Isotiocianato de Fluoresceína por mg. de proteína total.

4. Se mezcló toda la noche a 4°C.
5. Se dejó separar el conjugado proteína-fluoresceína, el fluorocromo libre que no se conjugó pasando la mezcla por una columna de Sephadex G-25 equilibrada con una solución amortiguada de fosfatos.

#### Titulación del Conjugado

Se realizó la titulación del conjugado antigammaglobulina humana-fluoresceína realizando diluciones dobles de este reactivo desde 1:5 hasta 1:50, las cuales se probaron con un sistema ya establecido, y utilizando sueros positivos y negativos diluido 1:100.

#### 9. Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (28)

1. Se marcó cada portaobjetos con 10 círculos, y se depositó una gota de antígeno en cada uno de ellos excepto en el del suero testigo.
2. La gota de antígeno es fijada a la flama con alcohol etílico.
3. Después se hacen diluciones del suero a estudiar desde 1:10 hasta 1:5120 en placas de microtitulación incluyendo el suero testigo negativo y el suero testigo positivo.
4. Posteriormente, se coloca una gota de cada dilución del suero sobre cada círculo, incluyendo la del suero positivo y la del suero negativo, salvo la del testigo del antígeno.

5. Se dejaron en contacto 30 minutos a 37°C en una atmósfera húmeda para evitar la desecación.
6. En seguida se practicaron 2 lavados de 5 minutos con la -- solución amortiguada de fosfatos.
7. Posteriormente, se depositó una gota de antigammaglobulina humana conjugada a la fluoresceína diluida 1:10 en el centro de cada círculo.
8. Se deja nuevamente 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
9. En seguida las placas son lavadas con solución amortiguada de fosfatos 2 veces durante 5 minutos.
10. Finalmente, las laminillas son montadas utilizando una solución amortiguada de glicerina.

#### 10. Titulación del suero

Una vez establecida la concentración del antígeno y - la dilución del conjugado a emplear, se realizó la titulación del suero, utilizando para ello suero de un individuo sano y un paciente con diagnóstico clínico serológico de brucelosis de los cuales se realizaron diluciones dobles, desde 1:10 hasta 1:5120.

#### IV. Resultados

Puesto que uno de los objetivos de la tesis fue la estandarización del método de Inmunofluorescencia indirecta para ser usado en el diagnóstico de la brucelosis humana, el primer esfuerzo se encaminó a la preparación de los reactivos y al establecimiento de las condiciones óptimas del método. Se determinó que la concentración más adecuada de células, en la suspensión antigénica era de  $10^9$  bacterias/ml. El conjugado se trabajó diluido 1:10 que fue la dilución máxima a la que se obtendría fluorescencia homogénea y de buena intensidad.

Todos los sueros fueron sometidos a las pruebas serológicas de rutina, recomendadas por el Comité de expertos en brucelosis (30). Estas fueron aglutinación en tubo de Wright y -- aglutinación en presencia de mercaptoetanol, en las cuales se emplean suspensiones de B. abortus 99 s a 119-3) como antígeno.

Con la finalidad de facilitar el manejo de los pacientes y de sus sueros, se les clasificó en base a 2 parámetros; -- antecedentes clínicos y título de anticuerpos por el método de aglutinación de Wright, como se indico en Material y Métodos.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo y los grupos de individuos en estudio, se realizó la prueba de Inmunofluorescencia indirecta. En general los resultados muestran -- que en la mayoría de los sueros estudiados se obtuvieron títu--

los de anticuerpos más elevados con Inmunofluorescencia indirecta que con la de aglutinación, y la diferencia fue de 2 a 3 diluciones.

Por otro lado, se compararon a través de un estudio de correlación los resultados obtenidos por el método de Wright y los de Inmunofluorescencia indirecta. En la gráfica se muestra la distribución de títulos obtenidos en ambas pruebas, para las que se calculó el coeficiente de determinación ( $r = 0.45$ ) y la distribución "T" de student encontrándose un valor de  $p = 0.01$ . En base a estos cálculos se concluyó que no había ninguna correlación entre los títulos de ambos métodos.

Así mismo se compararon los resultados obtenidos para el conjugado IgG, con los obtenidos para la aglutinación con --mercaptoetanol. Obteniéndose un coeficiente de determinación ( $r = 0.47$ ) y una distribución de "T" student ( $p =$  menor de 0.01).

Por otro lado, se selecciono un grupo de pacientes, de los cuales se tenían como mínimo 2 muestras de sueros tomadas a intervalos de 2 a 6 meses con la finalidad de determinar la frecuencia de las diferentes clases de inmunoglobulinas en pacientes considerados sintomáticos (activos) o asintomáticos (no activos), con el fin de determinar si existía alguna correlación, entre la respuesta inmune humoral (clases de inmunoglobulinas) y su diagnóstico clínico.

Tabla I. El grupo control estuvo constituido de 40 muestras de suero, procedentes de individuos sanos. Se les efectuaron las pruebas diagnósticas de rutina a las cuales resultaron negativas. Cuando se les determinaron los anticuerpos específicos -- Anti-Brucella por IFI se encontró que 32 (80%) de las muestras fueron negativas, 5 (12.5%) dieron títulos de 1:10 y 3 (7.5%) - títulos de 1:20.

Total de	IFI			
	neg.	1:10	1:20	1:40
sueros				
40	32	5	3	0
Porcentaje	80%	12.5%	7.5%	

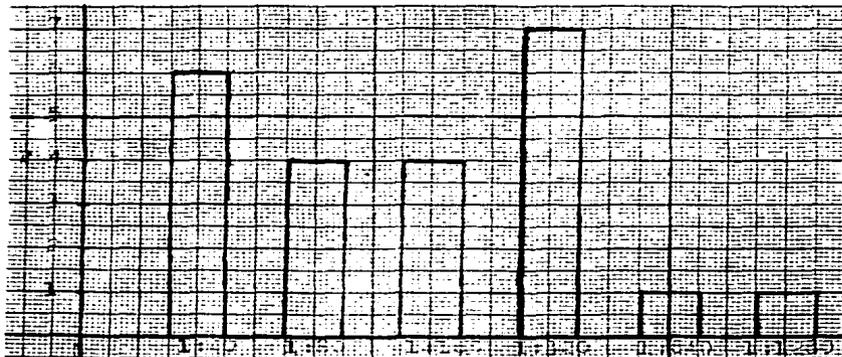
El grupo de pacientes constituido por 160 muestras de suero, fué dividido en tres grupos como ya se indicó en la sección de Material y Métodos.

El primer grupo estuvo formado de 23 pacientes que resultaron negativos a la prueba de AT. Encontrándose que 6 individuos dieron en IGI título de 1:40, 4(1:80), 4(1:160), -- 7(1:320), 1(640), 1(1280).

Los resultados desglosados se encuentran en la tabla -

II.

Gráfica 1



Distribución y frecuencia de títulos -- presentados en el grupo 1 de pacientes.

TABLA II. SUEROS DE PACIENTES CON AT NEGATIVA

	IF	IGM	IGG	IGA
1.	1:40	1:20	1:40	--
2.	1:40	--	1:40	--
3.	1:40	1:20	1:10	--
4.	1:40	--	1:20	--
5.	1:40	1:40	1:10	--
6.	1:40	1:10	1:20	--
7.	1:80	--	1:40	--
8.	1:80	--	1:80	--
9.	1:80	--	1:40	1:40
10.	1:80	--	1:40	1:20
11.	1:160	1:20	1:80	--
12.	1:160	--	1:160	--
13.	1:160	--	1:40	1:80
14.	1:160	--	1:80	1:20
15.	1:320	--	1:320	1:40
16.	1:320	--	1:160	1:40
17.	1:320	--	1:160	1:40
18.	1:320	--	1:160	1:20
19.	1:320	1:40	1:160	1:20
20.	1:320	1:10	1:80	1:20
21.	1:320	1:40	1:80	--
22.	1:640	--	1:320	1:40
23.	1:1280	--	1:320	1:40

El segundo grupo estuvo formado de 68 pacientes con antecedentes clínicos sugestivos de brucelosis que presentaron un título desde 1:10 hasta 1:80 por aglutinación en tubo. Encontrándose que 3 individuos dieron en Inmunofluorescencia indirecta título de 1:10, 4 sueros 1:20, 2(1:40), 9(1:80), 18(1:160), 24(1:320), 7(1:640), 1(1:1280).

En la Tabla III se presentan los resultados individuales obtenidos.

Gráfica II

Distribución y frecuencia de títulos -- presentados en el grupo 2 de pacientes.

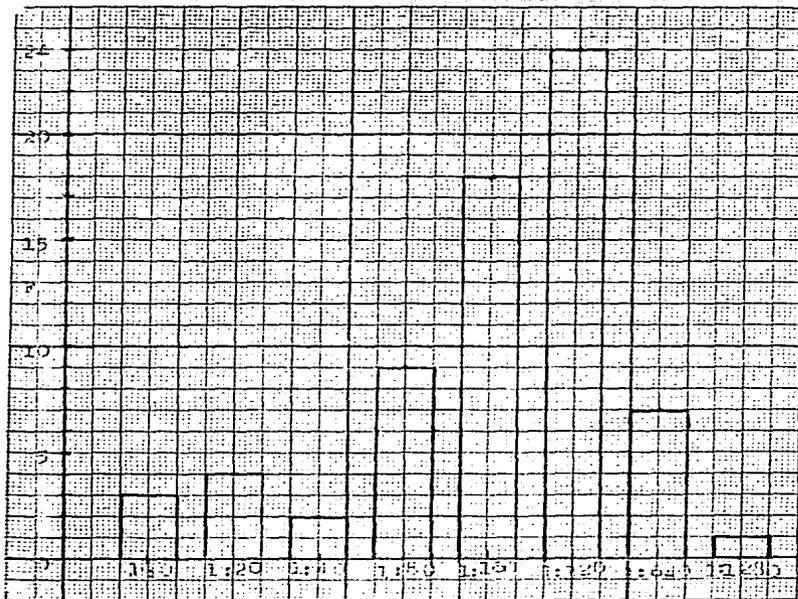


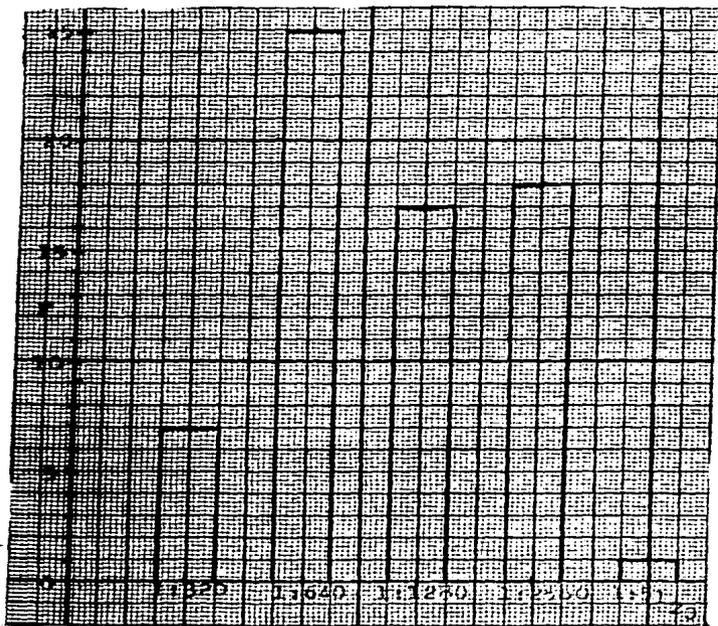
TABLA III. SUEROS DE PACIENTES CON AT < 1:80

	IFI	IGM	IGG	IGA		IFI	IGM	IGG	IGA
1.	1:10	---	1:10	---	36.	1:160	1:40	1:80	---
2.	1:10	---	1:10	---	37.	1:320	---	1:80	1:40
3.	1:10	---	1:10	---	38.	1:320	1:20	1:160	1:40
4.	1:20	1:20	---	---	39.	1:320	1:20	1:160	1:20
5.	1:20	1:40	---	---	40.	1:320	1:10	1:160	1:20
6.	1:20	---	1:20	---	41.	1:320	1:20	1:160	1:20
7.	1:20	---	1:20	---	42.	1:320	1:40	1:80	1:10
8.	1:40	1:20	1:10	---	43.	1:320	1:20	1:80	---
9.	1:40	1:40	1:10	---	44.	1:320	---	1:160	1:40
10.	1:80	1:20	1:40	---	45.	1:320	1:80	1:160	1:10
11.	1:80	1:40	1:20	---	46.	1:320	1:20	1:80	1:20
12.	1:80	---	1:40	1:10	47.	1:320	1:40	1:40	---
13.	1:80	1:80	---	---	48.	1:320	1:20	1:80	1:20
14.	1:80	1:20	1:80	---	49.	1:320	1:80	1:40	---
15.	1:80	1:80	1:20	---	50.	1:320	1:160	1:40	---
16.	1:80	1:80	1:10	---	51.	1:320	---	1:160	1:20
17.	1:80	---	1:160	---	52.	1:320	1:80	1:80	---
18.	1:80	1:20	1:40	---	53.	1:320	---	1:160	1:20
19.	1:160	1:40	1:40	---	54.	1:320	1:160	1:20	---
20.	1:160	1:10	1:80	1:10	55.	1:320	1:320	---	---
21.	1:160	1:20	1:80	---	56.	1:320	1:80	1:80	---
22.	1:160	1:160	---	---	57.	1:320	---	1:160	1:20
23.	1:160	1:40	1:20	1:40	58.	1:320	1:40	1:80	---
24.	1:160	1:80	1:40	1:40	59.	1:320	1:20	1:80	---
25.	1:160	1:20	1:80	---	60.	1:320	---	1:80	1:20
26.	1:160	1:20	1:80	1:10	61.	1:640	---	1:160	1:40
27.	1:160	1:80	1:40	---	62.	1:640	---	1:160	---
28.	1:160	---	1:80	1:20	63.	1:640	1:160	1:10	1:40
29.	1:160	1:80	1:20	---	64.	1:640	1:160	1:10	1:40
30.	1:160	1:80	1:20	---	65.	1:640	1:160	1:40	1:40
31.	1:160	1:80	1:40	---	66.	1:640	1:40	1:80	1:40
32.	1:160	1:40	1:80	---	67.	1:640	1:40	1:80	1:40
33.	1:160	1:80	1:20	---	68.	1:1280	1:40	1:320	1:40
34.	1:160	1:80	1:20	---	69.	---	---	---	---
35.	1:160	1:40	1:80	---					

El tercer grupo estuvo formado por 68 pacientes con diagnóstico clínico de brucelosis con sueros de un título mayor de 1:160 por aglutinación en tubo.

Para este grupo se encontró que 7 individuos dieron en Inmunofluorescencia indirecta título de 1:320, 25 dieron un título 1:640, 17(1:1280), 18(1:2560) y 1(1:5120).

Los resultados para este grupo se encuentran en la Tabla IV.



Gráfica III

Distribución y frecuencia de títulos presentados en el grupo 3 de pacientes.

TABLA IV. SUEROS DE PACIENTES CON AT  $\geq$  1:160

	IFI	IGM	IGG	IGA		IFI	IGM	IGG	IGA
1.	1:320	1:20	1:80	1:10	35.	1:1280	1:20	1:320	1:20
2.	1:320	1:20	1:80	1:20	36.	1:1280	1:160	1:80	1:40
3.	1:320	1:20	1:80	1:10	37.	1:1280	1:160	1:80	1:40
4.	1:320	1:160	1:40	---	38.	1:1280	---	1:320	1:80
5.	1:320	1:160	1:40	---	39.	1:1280	1:40	1:320	1:20
6.	1:320	1:20	1:160	1:10	40.	1:1280	1:10	1:640	1:40
7.	1:320	1:80	1:80	1:10	41.	1:1280	1:40	1:320	1:40
8.	1:640	---	1:160	1:20	42.	1:1280	---	1:640	1:40
9.	1:640	1:20	1:160	---	43.	1:1280	1:40	1:80	1:40
10.	1:640	---	1:320	1:40	44.	1:1280	1:20	1:80	1:40
11.	1:640	---	1:160	1:20	45.	1:1280	1:80	1:160	1:40
12.	1:640	---	1:160	1:80	46.	1:1280	---	1:640	1:40
13.	1:640	---	1:160	1:40	47.	1:1280	1:20	1:640	1:20
14.	1:640	---	1:80	1:40	48.	1:1280	1:20	1:320	1:40
15.	1:640	---	1:320	1:20	49.	1:1280	1:160	1:80	1:20
16.	1:640	---	1:160	1:20	50.	1:2560	1:20	1:1280	---
17.	1:640	1:40	1:80	1:40	51.	1:2560	---	1:160	1:80
18.	1:640	1:40	1:160	1:20	52.	1:2560	1:160	1:80	1:20
19.	1:640	1:40	1:160	1:40	53.	1:2560	1:80	1:320	1:20
20.	1:640	---	1:80	1:40	54.	1:2560	---	1:640	1:40
21.	1:640	---	1:320	1:20	55.	1:2560	---	1:160	1:40
22.	1:640	1:40	1:320	1:20	56.	1:2560	1:160	1:80	1:20
23.	1:640	1:20	1:160	1:40	57.	1:2560	1:640	1:40	---
24.	1:640	1:20	1:160	1:10	58.	1:2560	1:20	1:320	1:40
25.	1:640	1:80	1:40	1:40	59.	1:2560	1:320	1:80	1:20
26.	1:640	1:80	1:40	---	60.	1:2560	---	1:320	1:80
27.	1:640	1:80	1:80	---	61.	1:2560	1:320	1:80	---
28.	1:640	1:20	1:320	1:40	62.	1:2560	1:320	1:80	---
29.	1:640	---	1:320	1:40	63.	1:2560	1:640	1:40	---
30.	1:640	1:20	1:160	1:20	64.	1:2560	1:20	1:320	1:40
31.	1:640	1:40	1:320	1:20	65.	1:2560	1:640	1:40	---
32.	1:640	1:160	1:80	---	66.	1:2560	1:80	1:320	1:40
33.	1:1280	---	1:320	1:40	67.	1:2560	1:1280	1:80	---
34.	1:1280	1:20	1:320	1:80	68.	1:5120	1:20	1:1280	1:80

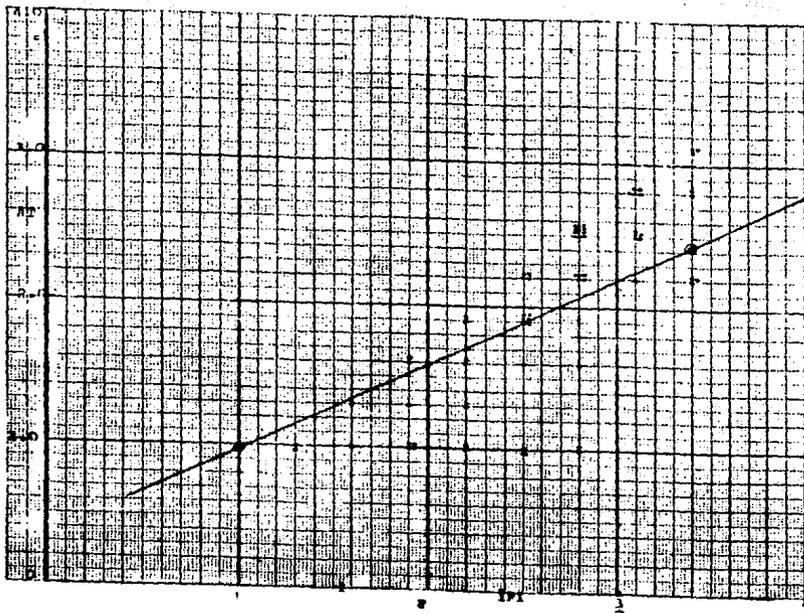
Tabla V. Para determinar la especificidad de la prueba se trabajó con 39 sueros que resultaron positivos a pruebas febriles para Salmonella con título mayor o igual a 1:80.

	No. de sueros	IFI			
		Neg.	1:10	1:20	1:40
Tifico "O"	13	7	2	3	1
Tifico "H"	13	8	1	3	1
Paratifi "A"	8	4	0	2	1
Paratifi "B"	5	3	1	1	0
Total	39	22	4	9	3

Tabla VI. También se realizó una prueba empleando *Yersinia enterocolitica* 0:9 y *Salmonella typhi* como antígenos y sueros positivos a *Brucella* con títulos mayores de 1:160 en aglutinación en tubo. Se trabajaron 10 sueros para cada género.

	Yersinia enterocolitica: 09		Salmonella typhi	B. melitensis
	IFI	IGG	IFI	IFI
1.	1:80	1:20	---	1:640
2.	1:20	---	---	1:160
3.	1:20	---	---	1:640
4.	1:20	---	---	1:1280
5.	1:20	---	---	1:640
6.	1:20	---	---	1:2560
7.	1:40	1:10	---	1:320
8.	1:40	---	---	1:640
9.	1:40	1:10	---	1:640
10.	1:20	---	---	1:1280

Gráfica. Estudio comparativo de las pruebas de Inmuno fluorescencia indirecta y aglutinación.



Gráfica 6. Estudio comparativo de la prueba de Inmuno fluorescencia indirecta (conjugado IgG) y aglutinación por 2-mercaptoetanol.

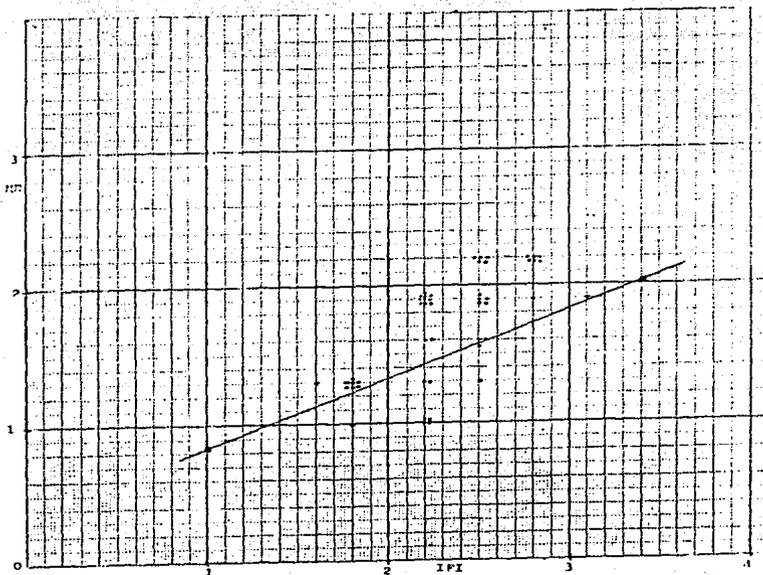


Tabla VII. Correlación entre IFI (conjugado estándar) y el diagnóstico clínico

Log	Título	Activos	N.A.
0	Negativo	0	0
1	1:10	0	0
1.3	1:20	0	0
1.6	1:40	0	1
1.9	1:80	1	1
2.2	1:160	3	3
2.5	1:320	6	3
2.8	1:640	8	4
3.1	1:1280	7	2
3.4	1:2560	2	0

Tabla VIII. Correlación entre IFI (conjugado IgG) y el diagnóstico clínico

Log	Titulos	Activos	N.A.
0	Negativo	0	0
1	1:10	0	0
1:3	1:20	1	1
1:6	1:40	2	2
1:9	1:80	8	6
2.2	1:160	10	2
2.5	1:320	4	2
2.8	1:640	1	1
3.1	1:1280	0	0
3.4	1:2560		

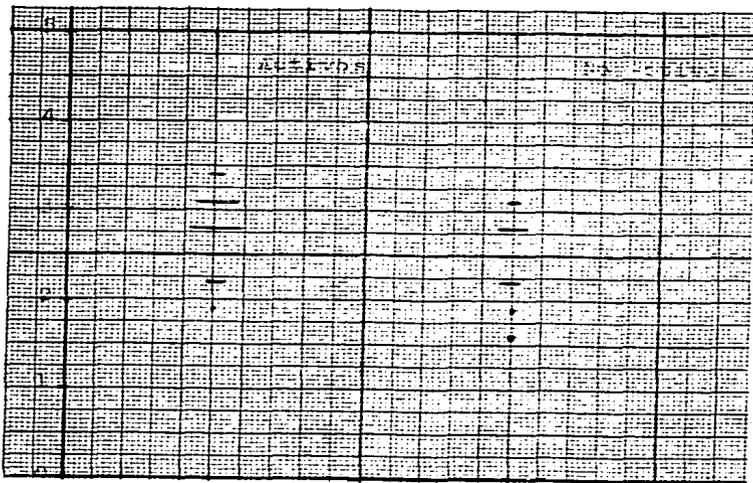
Tabla IX. Correlación entre IFI (conjugado IgM) y el diagnóstico clínico

Log	Títulos	Activos	N.A.
0	Negativo	7	9
1	1:10	2	4
1:3	1:20	9	5
1:6	1:40	6	4
1.9	1:80	3	0
2.2	1:160	1	0
2.5	1:320	0	0
2.8	1:640	0	0
3.1	1:1280	0	0

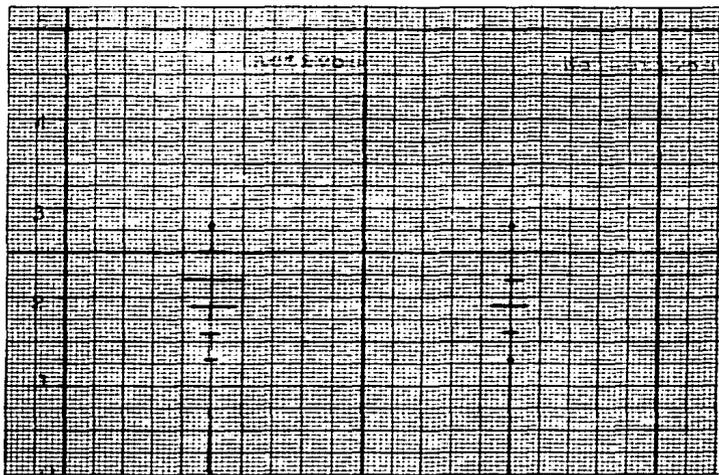
Tabla X. Correlación entre IFI (Conjugado IgA) y el diagnóstico clínico

Log	Títulos	Activos	N.A.
0	Negativo	3	3
1	1:10	3	4
1.3	1:20	11	5
1.6	1:40	9	2
1.9	1:80	2	0
2.2	1:160	0	0
2.5	1:320	0	0
2.8	1:640	0	0
3.1	1:1280	0	0

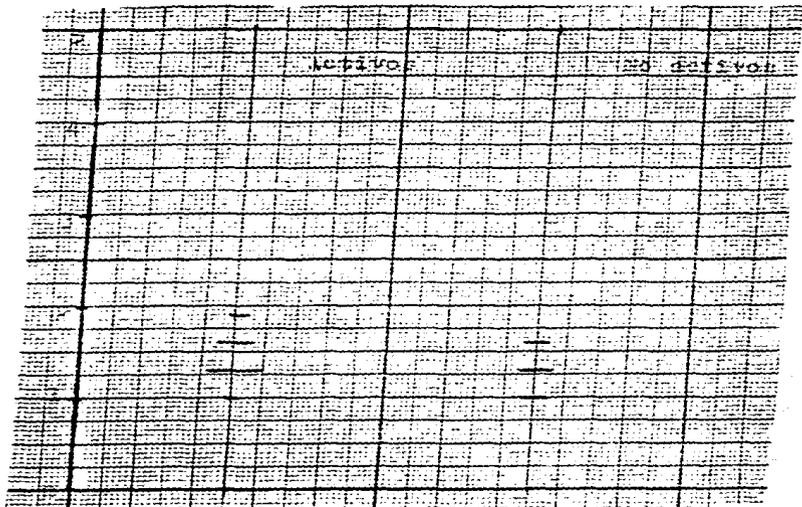
Gráfica 7. Correlación entre IFI (conjugado estándar) y el diagnóstico clínico.



Gráfica 8. Correlación entre IFI (conjugado IgG) y el diagnóstico clínico.



Gráfica 9. Correlación entre IFI (conjugado IgM) y el diagnóstico clínico.



Gráfica 10. Correlación entre IFI (conjugado IgA) y el diagnóstico clínico.

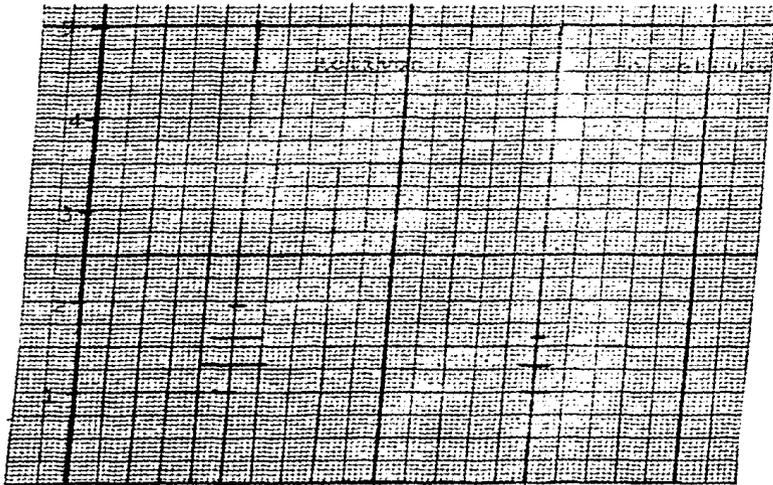


Figura 1. Fotografía por Inmunofluorescencia indirecta de un suero control positivo.

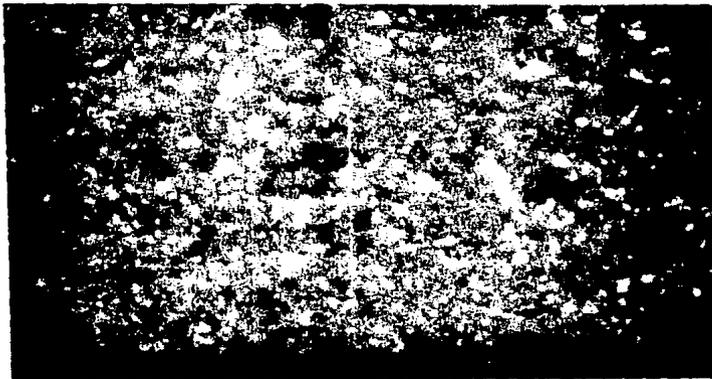


Figura II. Fotografía por Inmunofluorescencia indirecta de un suero control negativo.

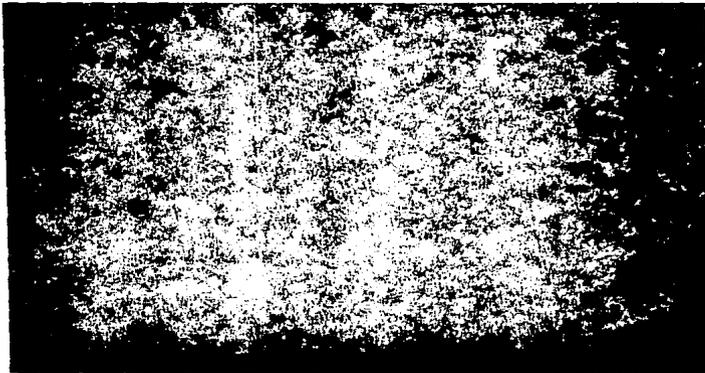
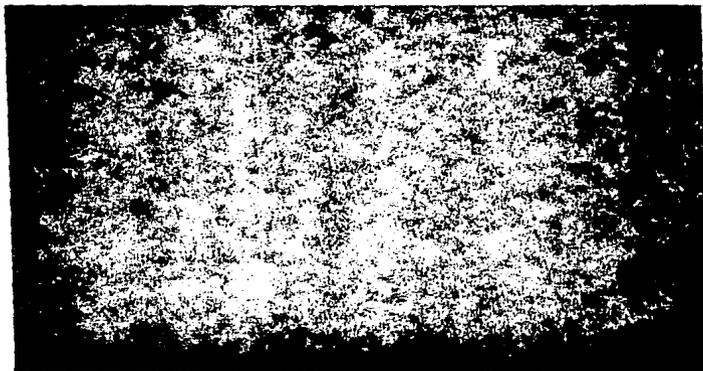


Figura 1. Fotografía por Inmunofluorescencia indirecta de un suero control positivo.



Figura II. Fotografía por Inmunofluorescencia indirecta de un suero control negativo.



## V. Discusión

La brucelosis es una enfermedad infecciosa transmitida de animales al hombre que mayor impacto económico ha cobrado y un mayor riesgo a la salud humana (31).

En el hombre, el aislamiento del agente etiológico es la prueba que garantiza el diagnóstico de brucelosis. Pero como no siempre resulta positiva, hay que recurrir a los métodos indirectos basados en la demostración de anticuerpos específicos frente a antígeno de Brucella (32).

Sin embargo, con el incremento del uso de antibióticos indiscriminadamente antes de obtener una muestra para cultivo, y al hecho de que la brucelosis tiende frecuentemente a la cronicidad, han colaborado a aumentar la prevalencia de la enfermedad (33).

Por otro lado, de acuerdo con los criterios expuestos por la OMS el diagnóstico de la brucelosis humana se basa en datos epidemiológicos, en la observación clínica y en los exámenes de laboratorio. Cuando el diagnóstico de laboratorio falla en apoyar la opinión clínica debido al gran polimorfismo que presente esta afección el diagnóstico definitivo se dificulta por la falta en la elaboración de un diagnóstico certero (23).

La existencia de un gran número de pruebas serológicas y variantes que han sido empleadas para el diagnóstico de bruce

losis y la falta de un acuerdo general respecto al método de elección da como resultado una difícil interpretación (22).

A pesar del amplio uso de estas pruebas persiste una confusión considerable en relación a confirmar una infección reciente (34).

La variación en los resultados obtenidos con diferentes pruebas puede ser atribuido a cualquiera de las diferentes clases de inmunoglobulinas presentes en el suero, o a los diferentes componentes que existen en la bacteria (35).

En el presente trabajo se realizó la búsqueda de anticuerpos específicos de la clase IgG, IgM, e IgA mediante el método de Inmunofluorescencia indirecta en diferentes grupos de individuos con cuadro clínico sugerente de brucelosis, empleando para ello una suspensión de Brucella melitensis (M-16).

Se seleccionó B. melitensis como antígeno en base a que los biotipos de Brucella que se encuentran con mayor prevalencia en la zona metropolitana (B. melitensis biotipo 1, B. abortus biotipo 4) tienen como antígeno dominante al aglutinógeno de tipo M (36). El empleo de las pruebas convencionales de aglutinación sirvió como una referencia y como un criterio para la clasificación de los pacientes.

De esta manera, se tuvo un grupo de pacientes sin niveles detectables de anticuerpos, sólo con antecedentes clíni-

cos; otro grupo con niveles no considerados como diagnóstico y un tercer grupo de pacientes con título de anticuerpos significativamente elevados.

Además se incluyó en el estudio, un grupo control, -- constituido por 20 individuos (tabla I) sanos de los cuales el 80% resultó negativo en todas las pruebas efectuadas, el 20% -- restante resultó positiva a la prueba de Inmunofluorescencia -- indirecta, con un título mayor de 1:20. Sin embargo, después de analizar los resultados obtenidos en este trabajo se determinó que se consideraría a partir de un título de 1:80 como suero positivo.

El primer grupo de individuos, con diagnóstico clínico sugestivo y serología negativa (tabla II) mostró resultados muy heterogéneos, ya que se obtuvieron títulos desde 1:40 hasta -- 1:1280 y todo tipo de combinaciones con respecto a las clases de inmunoglobulinas individuales. Es importante hacer notar en este punto que este grupo de pacientes solo contaban con el --- diagnóstico clínico, ya que ningún dato de las demás pruebas de laboratorio efectuadas fue útil para clasificarlos como pacientes brucelosos.

Es importante señalar que la positividad de los sueros encontrados en este grupo con títulos mayores o iguales a 1:80 no es debida a la presencia de reacciones cruzadas. Como se -- pudo demostrar por los resultados obtenidos con sueros positivos

para Salmonella (tabla V). Aquí se encontró que solo 16 sueros presentaron un título máximo de 1:40, por lo que se descarta la posibilidad de reacciones cruzadas debido a la presencia, tan frecuente de anticuerpos contra Salmonella.

También es importante hacer notar el hecho de que frecuentemente se han reportado reacciones cruzadas de anticuerpos anti-Brucella con cepas de bacterias de otros géneros como Yersinia enterocolitica 09 (37, 38). Se sabe que el cruce antigénico es causado por la presencia de lipopolisacárido, y se conoce ahora que la parte de la molécula que interviene en este fenómeno es un trisacárido llamado perosamina (39).

En nuestro medio se desconoce cuál es la prevalencia real de esta bacteria, por lo que no se descarta su probable importancia.

Al analizar este primer grupo de individuos (tabla II) se observa que 12/17 (70%) presentaron anticuerpos de tipo IgA y 17/17 (100%) presentaron anticuerpos de tipo IgG. Este hecho es de suma importancia ya que muchos autores (13) han reportado que los anticuerpos no aglutinantes o incompletos pertenecen a la clase IgG e IgA por lo cual sólo se podrán poner de manifiesto por la reacción de Coons o por algún otro método como la inmunofluorescencia indirecta. Por lo anterior se resalta la importancia de este método propuesto que ofrece la posibilidad de detectar a estos individuos que por la metodología habitual pa-

sarían inadvertidos.

Además de la dificultad en la interpretación de los resultados debido a la frecuente presencia del fenómeno de prozona que inhibe a la aglutinación. Zinneman, Glenchur y Hall (40) investigaron la secuencia en la producción de anticuerpos en brucelosis y los factores posibles que pueden causar el fenómeno de prozona; concluyeron que existían anticuerpos bloqueados o incompletos que estaban presentes en casos de brucelosis humana y que estos anticuerpos aparecían en una fase más tardía a la de los anticuerpos aglutinantes.

Por otro lado la mayoría de estos pacientes no presentan anticuerpos de tipo IgM, que es la responsable mayor de las reacciones de aglutinación. Algunos autores (41) han postulado que la presencia de anticuerpos de tipo IgM sugiere una brucelosis aguda en las fases tempranas de la enfermedad y que la presencia de anticuerpos de tipo IgG estaban asociadas a un estado crónico de la enfermedad. En base a nuestros resultados no fue posible hacer una correlación similar, ya que los pacientes estudiados en este trabajo, fueron muestreados una vez y es necesario un seguimiento para observar la evolución de la enfermedad para saber si este parámetro de inmunidad humoral in vitro tiene alguna relación con un estado agudo, subagudo o crónico de la enfermedad, basado en la proporción relativa de las inmunoglobulinas individuales (42).

Además es interesante saber si después de una terapia

adecuada y una cura aparente de una infección aguda, los anticuerpos de tipo IgG que son los responsables de una infección activa tienden a declinar o presentar resultados negativos (43).

Como se muestra en los resultados, de la tabla No. III individuos con antecedentes clínicos sugestivos de brucelosis y que presentaron un título desde 1:10 hasta 1:80 por aglutinación en tubo sugieren ser excluidos como diagnóstico de brucelosis por las pruebas convencionales, sin embargo, los hallazgos serológicos encontrados por el método de Inmunofluorescencia indirecta a partir del suero No. 10 confirman el diagnóstico clínico. Cuando el título de anticuerpos por las pruebas convencionales es 1:160 el diagnóstico de laboratorio puede ser una alternativa aceptable, pero cuando estos títulos fluctúan en un rango intermedio aumenta la dificultad de un diagnóstico acertado (44).

Por lo general, se observan títulos de anticuerpos de tipo IgM aumentados posiblemente por contactos recientes con alguna cepa de *B. melitensis* que por métodos convencionales no pueden ser detectados debido a que el antígeno que se emplea en estas pruebas es un antígeno de *B. abortus* biotipo 1 que presenta una proporción muy limitada del aglutinógeno M por lo tanto la sensibilidad que la metodología habitual ofrece no permitirá la posibilidad de detectarlos.

Además, existe otro grupo de individuos que presentan

preferentemente anticuerpos de la clase IgG e IgA, las cuales como ya se mencionó anteriormente no son anticuerpos aglutinantes y no podrán ser determinados por las pruebas convencionales. Estos anticuerpos llamados incompletos o bloqueadores se sabe de acuerdo a Wilkinson y Zinneman (45) que aparecen en una etapa -- tardía de la enfermedad.

Un hecho importante que se debe considerar para este -- grupo es que 6 individuos presentaron cultivo positivo y la cepa que se aisló en todas ellas fue *B. melitensis* biotipo 1, confirmando lo anteriormente señalado.

Para el tercer grupo (tabla IV) la existencia constante de reacciones de seroaglutinación positiva a títulos de 1:160 o superiores nos permite hacer el diagnóstico prácticamente en la totalidad de los enfermos.

Como se muestra en los resultados, se hizo un estudio comparativo de las pruebas diagnósticas de aglutinación de -- Wright e Inmunofluorescencia indirecta (conjugado estándar) encontrándose un coeficiente de correlación ( $r = 0.45$ ;  $p = 0.01$ ) y aglutinación con 2-mercaptoetanol con el conjugado IgG con un -- coeficiente de correlación ( $r = 0.47$ ;  $P = 0.01$ ) revelando en ambos casos que existe una pobre correlación al probar los sueros por aglutinación y por Inmunofluorescencia indirecta.

Los casos donde se observan los títulos más altos es -- la técnica de Inmunofluorescencia indirecta debido a la mayor --

sensibilidad que presenta este método esto debido a que se utiliza un antígeno diferente al usado en los métodos serológicos y a la aparición de anticuerpos que no son aglutinantes, a estos se les denomina anticuerpos bloqueadores o incompletos (46).

Por otro lado se realizó una comparación de IFI con pacientes que presentaron actividad y no actividad diagnósticos -- clínicamente encontrándose una frecuencia de correlación muy baja, esto debido principalmente a que la respuesta inmune humoral es muy variable para cada paciente. Tal vez el seguimiento de estos anticuerpos medidos en el suero a lo largo del tiempo en los pacientes y su relación con la evolución del cuadro clínico, pueda dar a estas evaluaciones inmunológicas un importante valor pronóstico.

## VI. CONCLUSIONES

1. La prueba de inmunofluorescencia indirecta fue útil para medir la respuesta inmune humoral en pacientes estudiados ante la infección por Brucella mediante la cuantificación de anticuerpos IgG, IgA, IgM, que por la metodología habitual (técnicas de aglutinación) pasarían inadvertidos.
2. Se observan altos títulos de anticuerpos específicos contra Brucella en pacientes que han padecido la infección. La mayoría de los huéspedes forman anticuerpos específicos contra Brucella y a menudo aparecen los títulos elevados en la etapa inicial de la enfermedad y declinan en pocos meses.
3. Es posible que exista una correlación entre la respuesta estudiada y el cuadro clínico, sin embargo, para verificarlo es necesario un seguimiento lineal de los pacientes en busca y la evolución del cuadro clínico.

VII. Apéndice

R<sub>1</sub> Solución Amortiguada de Fosfatos 0.15 M pH = 7.2

cloruro de sodio	8 g/l
cloruro de potasio	0.20 g/l
fosfato dibásico de sodio	1.15 g/l
fosfato monobásico de potasio	0.20 g/l
H <sub>2</sub> O c.b.p.	1000 ml.

R<sub>2</sub> Solución Saturada de Sulfato de Amonio

100g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> en 1 l. de agua, se calienta la solución con agitación a 50°C, hasta que la mayor parte de la sal se disuelva, posteriormente se mantiene a temperatura ambiente.

R<sub>3</sub> Solución Amortiguada de Boratos

amortiguador de boratos pH	8.4 - 8.5
ácido bórico	6.181 g.
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10 H <sub>2</sub> (bórax)	9.536 g.
H <sub>2</sub> O	1000 ml.

R<sub>4</sub> Amortiguador Tris HCL 0.04 M, pH 8.0

solución concentrada A. Disolver 24.2 g. de tris (hidroximetil amino metano) 0.2 M

solución concentrada B. Acido clorhídrico 0.2 M

mezclar 50 ml de la solución A con 26.8 ml de la solución B y se afora a 200 ml.

R<sub>5</sub> Solución Amortiguada de Carbonato - Bicarbonato 0.05 M  
pH = 9.6

preparar una solución de carbonato de sodio al 1 M y  
Bicarbonato de sodio 1 M

Mezclar perfectamente el carbonato y bicarbonato en una pro  
porción 1:9 (V/V) y llevarlo a un pH de 9.0

R<sub>6</sub> Solución Alcalina de Cobre

Reactivo A; solución al 2% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en NaOH 0.1 N

Reactivo B; solución al 0.5% de CuSO<sub>4</sub>.4 H<sub>2</sub>O en tartrato de  
sodio al 1.0%

Mezclar 50 ml. del reactivo A más 1 ml del reactivo B.

R<sub>7</sub> Reactivo de Folin

Folin Ciocalteu Phenolreagenz. Merck

En el método de Lowry se emplea 1 N y se encuentra 2 N. en  
la presentación comercial, por lo que se diluye volumen a  
volumen con agua destilada.

R<sub>8</sub> Solución Amortiguada de Glicerina pH 8.2, 0.5 M

Glicerina 14 g.

Hidróxido de sodio 0.7 g.

Cloruro de sodio 17 g.

Azida de sodio 1 g.

Disolver en 500 ml. de agua destilada y ajustar a pH = 8.2  
llevarlo a un volumen de 1000 ml.

R<sub>9</sub> Solución Amortiguada de Dietilbarbiturato-Acetato

pH - 8.2      Fuerza Iónica 0.05

Dietilbarbiturato de sodio      133.8 g.

Acetato de Sodio      88.3 g.

Agua destilada c.b.p.      1.5 l.

Ajustar el pH a 8.2 con HCl 0.1 N

Para su empleo en la inmunolectroforesis diluir con agua destilada 2:1

IX. Bibliografía

1. Navarro Rodríguez A., Pachon Díaz J. y A. Martín Martín (1984). "Utilidad de la prueba de Inmunofluorescencia indirecta y la prueba de Rosa de Bengala en el diagnóstico de brucelosis". Revista Clínica Española 175: 27-31.
2. Sánchez Calle M., J. Álvarez Betes, y B. Romero Blasco. (1977). "Valor diagnóstico de la Inmunofluorescencia indirecta en la brucelosis". Revista Clínica Española. 147: 153-157.
3. Daza R.M., D. Damaso y M. Moreno (1981). "Estudio comparativo de diversas pruebas en el diagnóstico serológico de la brucelosis". Med. Clínica (Barcelona) 76: 57-60.
4. Meyer, K.F., (1955) "Las tendencias seguidas en el control de la brucelosis". Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.
5. T.M. Buchanan, C.R. Sulzer, M.K. Frix, R. Feldman (1974) Brucellosis in the USA, 1960-1972. An abattoir-associated disease. II. Diagnostic Aspects. Medicine 53: 415-425.
6. A.F. Kaufman, M.D. Fox, J.M. Boyce, D.C. Anderson, M.E. Porter and C.M. Patton (1980). "Airbone Spread of brucellosis". Annals N.Y. Academy of Sciences. 353: 105-114.

7. Wise I. Robert (1980). "Brucellosis en the United States. Past, present and future. 244: 2318-2322.
8. Wesley W. Spink, (1953). "Observaciones sobre la brucelosis producida por *Brucella melitensis*". Bulletin of the World Health Organization. 9: 556-567.
9. Corbel, M.J., Bracewell, C.D. and Gill, K.P. (1979). "Techniques in the identification and classification of *Brucella* species. En Skinne, F.A. and Lovelock, D.W. eds. Identification Methods for Microbiologists, Society for Applied Bacteriology, Technical. Second edition. London. Academic Press.
10. Díaz, Ramón, Lois M. Jones, and J.V. Wilson (1968) "Surface antigens of Smooth *Brucella*". Journal of Bacteriology 96: 893-901.
11. Breed, R.S., Murray, E.D.G., and Smith, N.R. (eds). Bergey's Manual of Determinate Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore. (1984).
12. Ruiz Castañeda M. (1961). "Laboratory Diagnosis of Brucellosis in Man. Bulletin of the World Health Organization. 73-84.
13. Young, J.E. (1982). "Human Brucellosis". Rev. Infect. Dis. 5: 821-842.

14. Ruiz Castañeda M. (1976) "Estudios sobre la patogénesis de la brucelosis. Primera reunión interamericana de la brucelosis. También en: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 64: 298.
15. Douglas Thornes R. (1977) "The anergy of Chronic Human Brucellosis". Journal of the Irish Medical Association. 70: 29-33.
16. Williams K. Richard and Crossley Kent. (1982). "Acute and Chronic hepatic involvement of brucellosis". Gastroenterology. 83: 455-458.
17. Williams Eirian. (1973). "Brucellosis". British Medical Journal. 1: 791-793.
18. Kerr W.R., Payne, D.H., Robertson Z. and Coombs R.R.A. (1967). "Immunoglobulin class of Brucella antibodies in human sera. Immunology. 13: 223-225.
19. Coghlan J.D., Weir D.M., (1967) "Antibodies in human brucellosis". Brit. Med. J. 2: 269-271.
20. White R.G. (1978) "Immunoglobulin profiles of the chronic antibody response": discussion in relation to brucellosis infections. Postgraduate Medical Journal. 54: 595-602.
21. MacDonald A., Aberd M.D., Eimslie H. Wanda. (1967). "Serological Investigations in suspected brucellosis". Lancet 2: 380-382.

22. Diaz, R.E., Maravi-Poma y A. Rivero. (1976) "Comparison of Counter- Immunoelectrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis". Bull. World Health Organ. 53: 417-424.
23. Maravi- Poma, Murie M. Gamboa, Diaz R. y Rivero Puente A. (1982). Brucelosis: Estudio sobre 222 casos. Parte III; Brucelosis crónica. Estudio Clínico prospectivo de 36 casos. Revista Clínica Española. 166: 101-105.
24. Weir, D.M. (Editor): Handbook of Experimental Immunology Blackwell. (1973).
25. Beutner, H. Ernest, Russell J. Nisengard and Albin Beru. (1983). Defined Immunofluorescence and related cytochemical methods. Annals of the New York Academy of Sciences. 420.
26. Gardner, M.D., and McQuillin J. (1974). "Rapid Virus Diagnosis application of immunofluorescence" Butterworth. 35-45.
27. Holborow, E.J. (1970). "Standardization in immunofluorescence. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
28. Jean Jean M.F., Mandin J. et Roux J. (1973) "La réaction d'immunofluorescence dans le sérodiagnostic des brucelloses humaines". Medecine et Maladies infectieuses. 3: 53-62.

29. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951). "Protein measurement with the folin-phenol reagent" J. Biol. Chem. 193: 262-275.
30. Alton, G.G., L.M. Jones and D.E. Pietz. (1976). "Las técnicas de laboratorio en la brucelosis". O.M.S. 2a. ed. Ginebra, Suiza.
31. Abdussalam M. Fein D.A. "Brucellosis as a world problem" In: International Symposium on Brucellosis (II). Dev. Biol. Stand. 1976. 31: 9-33.
32. Magee, J.T. (1980). "An enzyme-labelled immunosorbent assay for brucella abortus antibodies". Journal Med. Microbiol. 13: 167-172.
33. Biegeleisen, J. Jr., Bradshaw, B.R., and Moody, M. O. (1962). "Demonstration of brucella antibodies in human serum. A comparison of the fluorescent antibody and agglutination techniques. J. Immunol. 80: 109-112.
34. Kerr, R.W., W.J. McCaughey, D.J. Coghlan and A.R. Payne. (1968). "Techniques and interpretations in the serological diagnosis of brucellosis in man". J. Med. Microbiol. 1: 181-193.

35. Raybould, T.J.G., J.E. Beesley, and S. Chantler. (1981) "Ultrastructural localization of characterized antigens of brucella abortus and distribution among different biotypes". Infect. Immun. 32: 318-322.
36. Raybould, T.J.G. (1982). "Antigens of diagnostic significance in brucella abortus". Can. J. Microbiol. 28: 557-564.
37. Mittal, K.R., Tizard, I. (1981). "Serological cross-reactions between Brucella abortus and Yersinia enterocolitica serotype 09". The Veterinary Bulletin. 51: 501-505.
38. Quinn Rosalind, Campbell Alisa M., and A.P. Phillips (1984). "A monoclonal antibody specific for the A antigen of Brucella sp". Journal of General Microbiology. 130: 2285-2289.
39. Caroff, M., D.R. Bundle and M.B. Perry (1984). "Estructure of the o-chain of the phenol- phase soluble cellular lipopolysaccharide of Yersinia enterocolitica serotype 09. Eur. J. Biochem. In Press.
40. Zinneman H. Horace, Seal Ulyses and Wendell H. Hall. (1964) Some molecular Characteristics of blocking antibodies in human brucellosis". J. Immunol. 93: 993-1000.
41. Farrel, I.D., Robertson and P.M. Hinchliffe (1974). "Serum antibody response in acute brucellosis. J. Hyg. Camb. 74: 23-28.

42. Hewit, W.G., Payne, D.J.H. (1984). "Estimation of IgG and IgM Brucella antibodies in infected and non-infected persons by a radioimmune technique". *J. Clin. Pathol.* 37: 692-696.
43. Parrat, D., Nielsen, K.H. and R.G. White. (1977). "Radioimmunoassay of IgM, IgG and IgA. Brucella antibodies" *The Lancet* *i*, 1075-1078.
44. Reddin, J.L., R.K. Anderson, D.V.M. and Wesley W. Spink (1965). Significance of 7S and macroglobulin Brucella agglutinins in human brucellosis. *The New England Journal of Medicine.* 272: 1263-1268.
45. Wilkinson P.C. (1965). Immunoglobulin patterns of antibodies against Brucella in man and animals". *The Journal of Immunology.* 96: 457-463.
46. Henderson, R.J., Hill, D.M. and Tillett, H. (1976). "Correlation between serological and immunofluorescence results in the investigation of brucellosis in veterinary surgeons. *J. Clin. Pathol.* 29: 35-38.