

101  
207.



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**LA HEMAGLUTINACION INDIRECTA  
APLICADA AL 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  
A L M A N U Ñ E Z L E O N



MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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

	INTRODUCCION	1
	OBJETIVOS	4
CAPITULO 1	GENERALIDADES	
1.1	Antecedentes (Mundiales y Nacionales)	5
1.2	Breve descripción del género <i>Brucella</i> y de sus especies	8
1.2.1	Taxonomía	9
1.2.2	Morfología	10
1.2.3	Aislamiento e Identificación	12
1.2.4	Agentes Ambientales (Susceptibilidad o Resistencia)	18
1.2.5	Constitución Química y Antigénica	19
1.2.6	Patogenia y Patología	24
1.2.7	Diagnóstico	28
1.3	Hemaglutinación Indirecta o Pasiva	34
1.4	Tratamiento	37
1.5	Control y Prevención	38
1.6	Reacciones Cruzadas	39

<b>CAPITULO II</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	
2.1	Material	40
2.2	Metodología	42
2.3	Análisis Estadístico	51
<b>CAPITULO III</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>53</b>
<b>CAPITULO IV</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>56</b>
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
	<b>ANEXO</b>	<b>66</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>69</b>

**" LA HEMAGLUTINACION INDIRECTA APLICADA  
AL DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS  
HUMANA "**

## INTRODUCCION

La brucelosis es una antropozoonosis de distribución mundial que afecta principalmente a los países con ganado caprino y/o bovino. Es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Brucella*, dentro de éste, se consideran tres especies como patógenas para los animales y el hombre: *B. abortus* con 9 biotipos, *B. melitensis* con 3 biotipos y *B. suis* con cuatro; sin embargo, se conocen otras tres especies: *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis* (10,20,25,32).

En México, el 90% de los casos tienen su origen en los caprinos, siendo *B. melitensis* el agente causal más importante de la brucelosis humana en nuestro país. No obstante, se ha comunicado el aislamiento de cuatro de las especies de *Brucella*: *B. melitensis* que es la especie más patógena para el hombre y cuyos hospederos animales son cabras y borregos, *B. abortus*, menos patógena, infecta principalmente bovinos, *B. suis* comparable a *B. melitensis* en cuanto a su virulencia, se encuentra en cerdos, y *B. canis* en perros (10, 23,32,33,35).

Se transmite de los hospederos animales al hombre mediante ingestión de productos procedentes de dichos animales como leche y sus derivados no pasteurizados; por contacto con animales enfermos o sus tejidos tales como sangre, placenta, fetos abortados y orina. También se ha reportado transmisión mediante transfusión de sangre de individuos enfermos, por inoculación accidental en el laboratorio y por inhalación a través de las mucosas (6,20,25, 32).

El periodo de incubación es de dos a tres semanas, aunque pueden observarse periodos más largos, hasta de tres a cuatro meses (25,35). La

brucelosis presenta síntomas agudos como fatiga, escalofríos, dolor de cabeza y sudoraciones nocturnas, que se presentan durante un tiempo que dependerá de las condiciones del individuo, así como de la virulencia de la cepa. Estos casos de brucelosis que se podrían catalogar como típicos, son fáciles de identificar; sin embargo, la enfermedad puede presentarse en otras dos formas: la subclínica, en la cual los síntomas son inexistentes o muy leves y puede cursar en forma inaparente; en algunos pocos casos se resuelve en forma favorable sin ningún tratamiento, pero en la gran mayoría no sucede así y se desarrolla la otra forma que es persistente y que es la crónica. Esta última, también puede ser el resultado de una brucelosis aguda tratada en forma inadecuada.

En vista de que la brucelosis puede simular una gran variedad de enfermedades, el diagnóstico clínico sólo podrá confirmarse con pruebas de laboratorio, principalmente en aquellos casos en que se sospechen formas crónicas o subclínicas de la enfermedad (32,35).

Se realizan pruebas serológicas para determinar la presencia de anticuerpos específicos en el suero y para observar el incremento del título en la brucelosis aguda.

Se usan en general cuatro pruebas para cubrir las posibilidades de una enfermedad aguda o crónica, las cuales son: aglutinación en placa con antígeno teñido con rosa de bengala, aglutinación estándar en tubo, aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol y la prueba de Coombs; el comportamiento de éstas es diferente en los casos de brucelosis aguda o crónica, y los resultados no son siempre fáciles de interpretar, debido a que ninguna es específica y se requiere realizar por lo menos dos de ellas para establecer un diagnóstico (19,35).

Durante el curso de la infección se producen anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA. Las aglutininas contra *Bruceella* aparecen al final de la primera semana y alcanzan su máximo entre la segunda y la cuarta. Estas aglutininas corresponden a IgG e IgM. Los anticuerpos IgG prácticamente desaparecen después de los seis meses de evolución del padecimiento, persistiendo los IgM (7,22,23,32).

Lo anterior ha conducido al desarrollo de metodología que elimine los inconvenientes mencionados y para ello se han empleado otros métodos como: Inmunodifusión doble, inmunoelectroforesis (46), contraelectroforesis y recientemente otros métodos de mayor sensibilidad como el radioinmunoanálisis (27) y el análisis inmunoenzimático (5,7,22,29,39,47).

En el presente trabajo se realizará la estandarización de la técnica de hemaglutinación indirecta, la cual es sensible y fácil de realizar por lo que su empleo se ha difundido ampliamente para el diagnóstico de un gran número de enfermedades, ya que se utilizará comparándola con las técnicas de aglutinación en placa con antígeno teñido con rosa de bengala y microaglutinación en placa para la cuantificación de anticuerpos presentes, aún en cantidades muy pequeñas.

## **OBJETIVOS**

**Estandarizar la técnica de hemaglutinación indirecta como una prueba más en el diagnóstico de la brucelosis humana.**

**Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos, a través de tablas de contingencia.**

**Determinar la reproducibilidad de la técnica de hemaglutinación indirecta en el diagnóstico de la brucelosis humana.**

# CAPITULO I

## GENERALIDADES

### I.1 ANTECEDENTES

#### Mundiales

Durante la Guerra de Crimea (1854-1856) se observaron numerosos casos de fiebres prolongadas y ondulantes que no se podían comparar a las enfermedades conocidas hasta entonces, por lo que se sospechó que se trataba de una nueva enfermedad. Algunos autores consideran que la brucelosis era una enfermedad conocida desde Hipócrates (400 A.C.), pero sus primeras descripciones las realiza Cleghorn en 1751 (44).

En 1863, J.A. Marston presentó una descripción detallada de la enfermedad tal como ocurría en Malta, por la observación de diversos sujetos e incluso en él mismo, al realizar una expedición como cirujano del Ejército Británico a esta Isla; desde entonces se le considera como padecimiento endémico de los países del Mediterráneo, recibiendo los nombres de Fiebre de Malta, Fiebre del Mediterráneo o Fiebre Ondulante (10,20,44).

D. Bruce en 1887, descubrió al agente causal de la brucelosis en el bazo de personas muertas a causa de esta enfermedad, dándole el nombre de *Micrococcus melitensis* (10,20,23,44).

M.J. Huges, en 1897, realizó una monografía que se considera como una contribución importante sobre la materia (10).

E. Wright y D. Semple, en 1897, desarrollaron un método de diagnóstico basado en la propiedad aglutinante del suero de enfermos sobre cultivos de *M. melitensis* (20,44).

El Dr. D.T. Zammit, encontró aglutininas en el suero y en la leche de cabras. Determinó que éstas eran la fuente de infección, que se llevaba a cabo a través de los productos lácteos no pasteurizados.

El Dr. Horrocks continuó la investigación y descubrió la presencia de *M. melitensis* en leche y orina de cabras infectadas (20,44).

Los Drs. Bang y Striðholt en 1897 en Dinamarca, llevaron a cabo estudios sobre la etiología del aborto contagioso de bovinos, el agente causal de esta infección se llamó Bacilo de Bang, y así se le conoció durante más de 20 años (20,23,44).

Fué hasta 1918, que Alice Evans demostró la estrecha relación entre estos dos microorganismos (*M. melitensis* y Bacilo de Bang) al observar que su morfología bacteriana, sus cultivos y propiedades serológicas eran similares y en base a esto surgió la posibilidad de que la leche contaminada de cabras y vacas pudiera originar la enfermedad en el hombre, como efectivamente se pudo comprobar años después (20,44).

En 1920, Meyer y Shaw, en base a la similitud de los caracteres morfológicos y bioquímicos de los agentes etiológicos de la Fiebre de Malta y del aborto infeccioso en vacas, establecen el género *Brucella* en homenaje a David Bruce, denominándose a la especie presente en cabras como *Brucella melitensis* y *Brucella abortus* a la presente en vacas (44).

Un tercer miembro del género *Brucella*, fué aislado por Traum a partir de fetos de cerdos infectados, dándole el nombre de *Brucella suis* (20,23,44)

En 1953, Buddle y Boyer aislaron a *Brucella ovis* a partir de enfermedades genitales en borregos. Asimismo, en 1957 Lackman y Stoener aislaron a otro miembro del género *Brucella* a partir de ratas del desierto en Utah, dándole el nombre de *Brucella neotomae* (44).

El último miembro del género *Brucella* fué aislado por Carmichel y Bruner, de fetos de perros infectados, al que se le dió el nombre de *Brucella canis* (10).

#### Nacionales

En México se tenía noticia que desde el siglo pasado la enfermedad estaba diseminada por varios Estados, el primer aislamiento del agente causal lo logró Pláceres en 1921, en Puebla.

Los primeros reportes formales acerca de la incidencia de la infección humana aparecieron a finales de los años treinta, ya que se había incluido a la brucelosis en la lista de padecimientos transmisibles de aviso obligatorio. Con esto, se intensificó el estudio de la brucelosis en todo el territorio nacional.

El investigador mexicano Maximiliano Ruiz Castañeda, promovió reuniones nacionales e internacionales (en 1939, el Primer Congreso Nacional de Fiebre de Maltay en 1946 la Primera Reunión Interamericana de Brucelosis), para el análisis y estudio de esta enfermedad. Aportó elementos primordiales

para el aislamiento, diagnóstico y tratamiento de la brucelosis humana. Fundó el primer laboratorio de estudio e investigación de este padecimiento, considerado por la Organización Mundial de la Salud, por muchos años, como Laboratorio de Referencia (36).

## 1.2 BREVE DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *BRUCELLA* Y DE SUS ESPECIES

Los miembros del género *Brucella* son parásitos obligados, intracelulares y tienen la capacidad de invadir los tejidos animales. Causan aborto contagioso en cabras, vacas y cerdos; en el hombre pueden producir infección sistémica o localizada en huesos, tejidos y algunos órganos, y son un gran riesgo para veterinarios, trabajadores de laboratorio y rastros (23)

Este microorganismo se puede aislar de productos lácteos no pasteurizados, de muestras clínicas y de animales infectados.

Como se mencionó anteriormente, se conocen seis especies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis* (que infectan al hombre), *B. ovis* y *B. neotomae*.

Variaciones en su comportamiento permiten clasificarlas en cuarenta y tres variedades, de las cuales sólo se conocen 16 en la actualidad (20,32,33).

La identificación de las especies y biovariedades del género *Brucella*, se basa en la combinación de los resultados de producción de ácido sulfhídrico, ureasa, catalasa y oxidasa, requerimiento de bióxido de carbono, crecimiento en presencia de colorantes (ionina y fucsina), aglutinación con sueros monovalentes y lisis con diferentes fagos (33).

## 1.2.1. TAXONOMIA

Parte 7 de Bergey (45)

Bacilos y Cocos aerobios Gram (-)

Orden: *Eubacteriales*

Familia: *Parvobacteriaceae*

Tribu: *Brucellaceae*

Género: *Brucella*

Especies: *Brucella melitensis* (3 biotipos)

*Brucella abortus* (9 biotipos)

*Brucella suis* (4 biotipos)

*Brucella canis*

*Brucella ovis*

*Brucella neotomae*

## I.2.2. MORFOLOGIA

### Microscópica

Las brucelas son cocobacilos Gram negativos que miden de longitud 0.6 a 1.5 por 0.5 a 0.8 micras de ancho, se presentan aisladas, unidas en parejas u ocasionalmente en cadenas cortas, (de 4 a 6 miembros especialmente en medios líquidos) (2,23,32,33).

Son aerobios, inmóviles, no esporulados, no presentan pili, son parásitos intracelulares obligados. Aunque no poseen cápsula evidente, se han reportado estructuras semejantes a una cápsula en preparaciones tratadas con sueros antiespecie o en las variantes lisas y mucoides (20,23,30,32,33).

*In vivo* se observa la forma cocoide en pequeños racimos dentro del citoplasma de las células infectadas. *In vitro* las células teñidas por Gram se observan como bacilos pleomórficos, que escasamente captan el colorante de contraste, por lo que se aplica durante un tiempo mayor. No son ácido-alcohol resistentes, retienen cierta cantidad de fucsina básica en presencia de ácidos o álcalis diluidos (2,36).

### Colonial

El crecimiento sobre la superficie del agar aparece después de 2 días de incubación y las colonias llegan a medir de 2 a 3 mm a los 4 días (34).

Las cepas lisas (S) producen colonias circulares, convexas, con bordes regulares, transparentes y con coloración ámbar que a la luz reflejada son brillantes.

Las cepas rugosas (R) producen colonias semejantes en tamaño y forma pero varían considerablemente en color, consistencia y textura; son menos transparentes con superficie granular y color que va del blanco mate al amarillo o amarillo café.

Las colonias lisas son suaves, se emulsifican fácilmente y forman suspensiones estables en solución salina, mientras que las rugosas son frecuentemente viscosas, difíciles de desprender del agar, no forman suspensiones homogéneas en solución salina y producen agregados granulares o filamentosos. Las colonias mucoides (M) son similares a las R en color y opacidad pero presentan textura mucolde (2,35).

Las colonias no son hemolíticas ni pigmentadas. Para su crecimiento prefieren una presión parcial de oxígeno o ligeramente reducida con 10% de CO<sub>2</sub> (23,33).

En gelosa sangre se observa la misma morfología colonial que en agar soya triptícase (T.S.A.) y ausencia de hemólisis, las cepas que crecen en Mac-Conkey no fermentan la lactosa, además de observar la morfología colonial en T.S.A. es posible determinar en este medio la producción de catalasa y oxidasa. Las brucelas producen ambas (2)

#### Requerimientos Nutricionales

Las brucelas están adaptadas a un hábitat intracelular y sus requerimientos nutritivos son complejos. Algunas cepas se han cultivado en medios sintéticos compuestos de 18 aminoácidos, vitaminas, sales y glucosa (30).

Crece pobremente en los medios peptonados, lo hacen mejor en los que contienen triptosa o tripticasa soya, o tripticasa con suero (1 a 5%). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y su pH óptimo es de 6.6 a 7.4 (23,33).

Las brucelas utilizan diversos carbohidratos, pero no producen ácido ni gas en cantidades suficientes como para aprovechar esta prueba en su clasificación.

Muchas cepas producen ácido sulfhídrico, los nitratos los reducen a nitritos excepto *B. ovis*, hidrolizan la urea, no utilizan el citrato ni producen indol.

Requieren para su crecimiento tiamina, niacina y biotina y algunas cepas, además, necesitan suero en el medio para crecer (2,30,32,33).

### 1.2.3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

#### Aislamiento

El diagnóstico definitivo de la brucelosis requiere del aislamiento del microorganismo; aunque no siempre es posible, ya que la brucelosis humana tiene un período de incubación variable, el inicio de la enfermedad es insidioso y no hay signos que orienten hacia la sospecha de este padecimiento.

Por lo general, todos los casos de brucelosis confirmados se basan en pruebas de laboratorio. Aunque el diagnóstico por cultivo es el ideal, muchas veces puede dar negativo, por lo que el método más adecuado consiste en realizar pruebas serológicas (8,33).

En el período febril encontramos a la brucela en circulación, no es fácil de recuperar ya que sus requerimientos nutricionales son complejos y se encuentra en pequeño número, debido a su tendencia intracelular

Existen medios de cultivo enriquecidos que facilitan el aislamiento, por lo que se resuelve el problema de recuperar al microorganismo. El segundo problema se resuelve cultivando grandes cantidades de sangre, en proporción de 1:5 a 1:10 sangre:caldos, o realizar cultivos seriados por varios días. La sangre es la muestra más empleada para la búsqueda de brucelas, cuando se obtiene en la fase septisémica (fase aguda), pero irá perdiendo valor a medida que avanza la enfermedad, ya que interfieren los procesos naturales de defensa o el tratamiento con antibióticos, que provocan la disminución del contenido bacteriano en la sangre de estos pacientes (23).

Otros productos donde puede aislarse *Brucella* es el cultivo de médula ósea, ganglios linfáticos, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido pleural, líquido pericárdico, abscesos de tejidos blandos, otros tejidos como hueso y pulmón o tejidos que contengan lesiones granulomatosas como el hígado (20,23,32).

El medio de cultivo más recomendado es el bifásico de Ruiz Castañeda, el cual tiene polianetol sulfonato como anticoagulante y que además inactiva algunos antibióticos. También pueden emplearse medios líquidos que deben subcultivarse periódicamente en medios sólidos (2,20,33).

Cuando son hemocultivos de pacientes tratados con antimicrobianos, se recomienda emplear medios enriquecidos para el primoaislamiento, tales como Gelosa chocolate, Bordet Gengou, Gelosa sangre, etc.

Para la recuperación de formas L en brucelosis humana, se deben emplear medios con altas concentraciones de suero (20%), tioglicolato o un estabilizador osmótico.

Si las muestras a cultivar proceden de productos lácteos no pasteurizados y que se sospeche de gran contaminación, se recomienda el uso de medios selectivos como el diseñado por Farell (36).

#### Características de Cultivo

Las muestras para el primoaislamiento deben sembrarse en un medio bifásico (Ruiz Castañeda modificado) a partir del cual periódicamente se hacen resiembras por duplicado en medios enriquecidos.

El desarrollo positivo para *Brucella* ocurre entre la segunda y tercera semanas, aunque el cultivo debe mantenerse en incubación durante seis semanas antes de descartarlo como negativo.

Los medios enriquecidos que se emplean en las resiembras pueden ser: agar Eugón, agar chocolate, agar sangre, agar *Brucella*, también se resiembran en agar soya tripticasa más suero negativo (que no contenga anticuerpos anti-brucela) al 5% y agar Mac-Conkey.

Estas placas se siembran por duplicado y se incuban una serie en atmósfera parcial de CO<sub>2</sub> (5 al 10 %) y la otra en aerobiosis, durante un periodo de siete días mínimo, a 37°C. El desarrollo bacteriano se presenta entre el tercer y cuarto días. Una vez obtenidas las colonias características se procede a la observación microscópica

## Identificación

A partir del aislamiento que se obtuvo de los medios enriquecidos, se procede a la siembra por duplicado de tubos inclinados con medio de agar soya tripticasa con suero, incubando un tubo en atmósfera parcial de  $\text{CO}_2$  y el otro en aerobiosis a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas, se efectúa la prueba anterior inmediatamente después del primoaislamiento, antes de que se desarrollen mutantes independientes de  $\text{CO}_2$  y previo al desarrollo de otras pruebas bioquímicas para evitar resultados negativos falsos; esto se realiza para determinar si el microorganismo requiere de  $\text{CO}_2$  para su crecimiento.

A partir del crecimiento bacteriano obtenido se hace una suspensión en caldo soya tripticasa o caldo brucela, a una concentración de aproximadamente  $10^9$  bacterias por mililitro (tubo 4 de la curva nefelométrica de Mac Farland). De esta suspensión se hacen todas las pruebas de identificación que son (2,33,36).

### Medio de Kligler

Para ver la incapacidad de fermentación de azúcares (glucosa y lactosa) observando la ausencia de ácido y gas.

### Urea de Christensen

Se mide el tiempo que tarda en virar el medio, debido a la producción de ureasa.

### Medio de SIM

Se observa la inmovilidad de las brucelas, y la ausencia de producción de Indol.

#### Citrato de Simmons

Observar la no utilización del citrato como fuente de carbono (éste se debe sembrar primero ya que el arrastre de glucosa proveniente de otros tubos puede dar lugar a reacciones falsas positivas).

#### Producción de ácido sulfhídrico

Para observar la producción de ácido sulfhídrico, se coloca en un tubo con agar soya tripticosa papel filtro impregnado con acetato de plomo como indicador.

#### Crecimiento en presencia de colorantes

Las especies de *Brucella* muestran sensibilidad diferencial a colorantes como tionina, safranina, fucsina y azul de tionina a diferentes concentraciones, que se incorporan a un medio base. Cuando se prepara un lote de colorantes, éstos deberán probarse con las cepas de referencia para asegurar la confiabilidad de los resultados. Las concentraciones empleadas son Fucsina básica 1/50,000 Tionina 1/50,000, Safranina 1/50,000. Se siembra la cepa en estudio así como tres cepas de referencia. Se toma una asada de la suspensión y se hacen 5 estrías sobre el medio de cultivo con colorante, se incuba a 37°C con y sin CO<sub>2</sub>, durante 4-5 días, observar crecimiento o ausencia de él. Si el crecimiento aparece sólo en la primera estria, se debe a que ahí estaba más cargado el inóculo, y se considera negativa. Es positiva la prueba cuando el crecimiento aparece en 3 o más estrías (2,17,33,35).

#### Aglutinación con suero mono específico

Se emplean rutinariamente los sueros anti A y el anti M, el suero anti R se utiliza sólo cuando se sospecha de *B. canis* o de otra cepa rugosa natural.

Se prepara una suspensión de la cepa con crecimiento de 48 horas, se añade 1 ml de solución salina con fenol al 1 %, se colocan en un portaobjetos 2 gotas de la suspensión; a la primera de ellas agregar 1 gota de suero anti A y a la otra 1 gota de suero anti M, mezclar con un aplicador. La aglutinación se lee durante el primer minuto de agitación. Se coloca también un control negativo y 2 cepas de referencia, 1 que aglutine con A y otra con M (2,33,35,44).

### Susceptibilidad a Bacteriófagos

Existen diferentes bacteriófagos con capacidad de causar lisis en cepas de *Brucella* y que son de utilidad para distinguir *Brucella abortus* (biovariedades 4 a la 9) de *Brucella melitensis*, con los que suelen confundirse cuando sólo se realizan pruebas bioquímicas y crecimiento en colorantes.

El primer bacteriófago que se aisló fue el Tbilisi (Tb) en 1950 en la URSS y se considera como de referencia.

Hoy en día existen bacteriófagos clasificados cuya actividad no se restringe a cepas en fase lisa, sino que los hay también para cepas en fase rugosa.

Las diluciones ordinarias a las que se manejan los fagos se describen como RTD (ROUTINE TEST DILUTION) y es la más alta dilución del fago a la que se observa lisis total de la cepa en estudio. También en este caso se deben incluir cepas de referencia de las que se conoce su patrón de comportamiento a fagos.

La dilución rutinaria de prueba del bacteriófago Tb, lisa totalmente los cultivos lisos de *Brucella abortus*, pero los cultivos de *Brucella suis* y *Brucella melitensis* no se afectarán por esta dilución bacteriofágica. *Brucella suis* se lisa parcialmente con una dilución 10 000 veces la dilución común de prueba, pero casi todas las cepas de *Brucella melitensis* tampoco se lisan con esta dilución (2,33,35).

#### 1.2.4 AGENTES AMBIENTALES (SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA)

Las brucelas sobreviven en el medio ambiente cuando se encuentran en condiciones apropiadas y durante períodos que pueden ser prolongados, sobreviven igualmente al proceso de desecación si se encuentran en medios con alto contenido de proteínas, permanecen viables en el polvo o suelo hasta por 10 semanas. Cuando se encuentran en el agua sobreviven de 10 a 70 días en función de la disminución de la temperatura, si se encuentran en tejidos congelados persistirán durante años. En tejidos necróticos, fetos y placenta, esta bacteria es capaz de sobrevivir hasta 6 meses. *Brucella* se encuentra presente en derivados lácteos por lo cual éstos deben pasteurizarse ya que la sobrevivencia de la bacteria en estos productos es larga a bajas temperaturas.

Si están protegidas de la luz solar y, como se mencionó antes, en presencia de proteínas, las brucelas son infectivas por años. Son sensibles a temperaturas altas, ya que su exposición a 60°C durante 30 minutos las mata, también lo son a las radiaciones ionizantes, luz ultravioleta y a la mayoría de los desinfectantes comunes a las concentraciones normalmente recomendadas. Si se encuentran en presencia de materia orgánica o a bajas temperaturas, la susceptibilidad a los desinfectantes se reduce (23,36).

## 1.2.5 CONSTITUCION QUIMICA Y ANTIGENICA

La envoltura celular de las *Brucellas* presenta una estructura general característica de las bacterias Gram negativas, pero su composición química y propiedades físicas hacen que las brucelas sean diferentes. Están constituidas por la membrana plasmática interna, una capa intermedia de peptidoglucano y la membrana externa, éstas dos constituyen la pared celular. Dicha pared y la membrana citoplásmica están separadas por el espacio periplásmico (18,51).

La membrana externa es una barrera física y funcional entre la bacteria y su medio ambiente, es la primer estructura que entra en contacto con el sistema inmune del hospedero en el momento de la infección.

El citoplasma es homogéneo y contiene gránulos de 100 a 150 Amstromg que aparentemente corresponden a los ribosomas. El núcleo se ha observado como una estructura filamentososa (36).

### A) Membrana externa

Está compuesta fundamentalmente por fosfolípidos, proteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos (18).

#### A.1 Lipopolisacáridos

El lipopolisacárido liso (S-LPS) es la molécula más abundante (del 2.5 al 3 % del peso seco de la bacteria). Está compuesta de una cadena polisacárida o antígeno O específico, un polisacárido central y el lípido A. Esta molécula se encuentra expuesta hacia el exterior de la membrana externa, lo cual facilita

la inducción de anticuerpos dirigidos contra el antígeno O y el oligosacárido central, que son de gran valor en el diagnóstico de la brucelosis y en la identificación serológica de las especies de *Brucella* (36,51).

Los determinantes antigénicos A y M presentes en las cepas lisas y que han sido de gran valor para diferenciar los biotipos de las principales especies, son componentes del S-LPS (14,18,51). Actualmente se acepta que el antígeno O polisacárido de *Brucella abortus* 1119-3 está constituido de un homopolímero lineal de unidades D-manopiranosil, 4-6 dideoxi 4-formamido, ligadas por unión alfa 1-2 (14,18).

La estructura del polisacárido O de *Brucella melitensis* es también un homopolímero de D-manopiranosil, 4-6 dideoxi 4-formamido (o perosamina) en apariencia similar a la de *Brucella abortus*.

En base a la similitud estructural se explica la reacción cruzada que presentan estos microorganismos. Sin embargo, no aclara la especificidad antigénica de A, diferente de M, que se puede demostrar serológicamente

Se ha determinado que el antígeno M es un polímero lineal formado por una unidad repetitiva de pentasacárido integrada por una perosamina ligada por unión 1-3 y cuatro perosaminas por unión alfa 1-2. Estas similitudes y diferencias determinan la reactividad cruzada y la diferencia antigénica entre A y M.

La fracción lipídica del LPS de *Brucella* difiere de la del LPS de las enterobacterias, ya que se ha encontrado que el LPS de *E. coli* posee los ácidos láurico (C12), mirístico (C14), palmítico (C16) y beta-hidroxi mirístico, mientras que en *Brucella* los componentes principales son el ácido palmítico

(C16) y el ácido esteárico (C18) y, por lo menos, otros seis ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga (C18-C23); sin embargo, el ácido beta-hidroximiriístico considerado como un marcador de lípido A del LPS de las enterobacterias, no se ha identificado. Los azúcares que se han encontrado son: glucosa, manosa, quinorosaamina, glucosamina y el KDO (18,40).

El Lipopolisacárido Rugoso (R-LPS) se ha purificado y se ha encontrado que contiene menos de 1.5% de proteínas y relativamente grandes cantidades de ácidos nucleicos. Contiene un antígeno denominado antígeno R el cual comparten las cepas rugosas y se considera que es equivalente a las determinantes antigénicas A y M (18).

#### A.2 Polisacárido B

Llamado poli B o PB que es un carbohidrato de bajo peso molecular. Se obtiene de *Brucella abortus* y de *Brucella melitensis*, después de tratarlas con ácido tricloroacético. Los extractos obtenidos de esta manera a partir de la cepa rugosa *B. melitensis* B115 contenían un polisacárido no tóxico. Se propuso el término hapteno nativo (NH) para los polisacáridos haptenos presentes en preparaciones endotóxicas de células lisas de *Brucella* y el nombre de poli B para el polisacárido de fracción citoplásmica aislado de la cepa rugosa *B. melitensis* B115 (13,18,36,51).

El análisis estructural ha identificado a este polisacárido B como a un polímero cíclico que contiene entre 17 y 24 residuos de glucosa. Existen en todas las especies de *Brucella* y en forma pura no es antigénico. No tiene actividad endotóxica y no participa en las reacciones de aglutinación.

### A.3 Proteínas de Membrana Externa

Los estudios sobre la composición química, estructura y función de las proteínas de membrana externa del género *Brucella* son muy recientes y escasos (18).

Las mejor estudiadas son las del grupo 2 o porinas (35-40 kDa), del grupo 3 (25-30 kDa) y la lipoproteína que se une covalentemente al peptidoglicano con la membrana externa.

La proteína del grupo 2, constituida por proteínas de peso molecular de 35 a 40 000 aparentemente trómeros en su estado nativo, se propuso como las porinas de *Brucella* en base a su comportamiento electroforético y a su semejanza en la composición de aminoácidos con las porinas OmpF descritas en *E. coli* (18,36).

El grupo 3, con bandas de peso molecular de 25 a 30 000 se ha sugerido a pesar de no modificarse por el calor, como equivalente en su composición de aminoácidos a la proteína OmpA modificable por el calor, descrita en *E. coli*. La lipoproteína también comparte con *E. coli* varias características como punto isoeléctrico, composición de aminoácidos, peso molecular, distribución de ácidos grasos y algunos determinantes antigénicos. Aunque una diferencia en la localización de ésta con respecto a *E. coli*, es que la de *Brucella* se encuentra expuesta cuando está en forma libre en la superficie celular, mientras que la de *E. coli* se sitúa más internamente. Por este motivo, a la lipoproteína de *Brucella* puede reconocerla el sistema inmune.

Los dos grupos de proteínas forman complejos con el LPS. Se cree que algunas proteínas de membrana son de utilidad para el diagnóstico, ya que

evitarían los problemas que se presentan como consecuencia de las reacciones cruzadas (36).

#### A.4 Lípidos

Se encuentran los lípidos unidos (LPS y lipoproteína) y los lípidos libres, como parte importante de la membrana externa. Se han realizado numerosos reportes de los lípidos libres que describen su composición química y su uso con fines taxonómicos. Actualmente se desconoce el papel que juegan en la unión específica de la bacteria a células epiteliales e inmunes y a la localización y desarrollo intracelular de las brucelas. La adsorción de los lípidos libres a los linfocitos B y macrófagos podría relacionarse con el lipopolisacárido o con los lípidos que contienen ornitina, ambos se encuentran en la membrana externa. Por otro lado, se supone que los ésteres de tipo cera, los lípidos neutros raros y el poco común lípido A, así como el alto contenido de fosfatidilcolina presentes en forma característica en las brucelas, tendrían algunas implicaciones en la resistencia de la envoltura celular a la acción de enzimas lisosomales y en su adaptación al desarrollo intracelular (36).

Cabe señalar que existen otros componentes como ácidos nucleicos y exotoxinas de los que se conoce poco, ya que sólo hay algunos reportes sobre su uso como antígeno.

#### B) Peptidoglicano

El peptidoglicano de *Brucella* es una capa homogénea de grosor variable. Está compuesta de aminoazúcares y aminoácidos como glucosamina, ácido murámico, alanina, ácido glutámico, y ácido diaminopimélico, los cuales se han descrito en *E. coli* (18).

### C) Componentes Citoplásmicos

*Brucella* contiene un gran número de antígenos citoplásmicos solubles considerados específicos de género ya que son diferentes a los encontrados en otras bacterias Gram negativas. La mayoría de estos antígenos se han identificado en extractos obtenidos por numerosos métodos que van desde la simple extracción con agua, solución salina, o varios reguladores, sometiendo a ultrasonido y analizándolos mediante técnicas de inmunoelectroforesis (18,51)

Principalmente los extractos contienen ácidos nucleicos, proteínas citoplasmáticas, lípidos, ribosomas y cantidades variables de LPS. Empleando estos extractos y el suero polivalente, se han puesto de manifiesto cuando menos 30 componentes que precipitan.

### 1.2.6 PATOGENIA Y PATOLOGÍA

#### Transmisión

La brucelosis puede transmitirse al hombre a través de las siguientes vías (20,35,36):

a) Contacto directo: Por el contacto con material altamente contaminado (descargas del aborto, vísceras, sangre, excretas), penetra a través de la piel por escoriaciones o por conjuntiva. Es la forma de infección más común de veterinarios, ordeñadores, caballerangos, trabajadores de rastros y mataderos, etc.

b) Inhalación: Se lleva a cabo al respirar sustancias desecadas contaminadas

con brucelas provenientes de los animales infectados o de aerosoles. Las brucelas pueden penetrar por la mucosa del tracto respiratorio superior o por la del pulmón.

c) Ingestión: Es la más frecuente debido al consumo de leche y sus derivados no pasteurizados. Penetra la bacteria a través de la mucosa intestinal. Existe mayor riesgo de adquirir una brucelosis cuando la leche está contaminada con *B. melitensis* y *B. suis* que con *B. abortus*, ya que ésta se destruye con el jugo gástrico y es lábil al ácido láctico de la leche. También se ha sugerido que las aglutininas de la leche de vaca infectada ejercen efecto atenuante en el crecimiento de *Brucella* o en su infectividad.

d) Accidental: Se realiza otro mecanismo de transmisión de las brucelas al hombre durante la vacunación animal. En el laboratorio se puede adquirir brucelosis por salpicaduras que contaminan la piel y conjuntiva, por inyección o ingestión accidental de cultivos y a través de aerosoles.

e) Vía transplacentaria: Las brucelas pueden transmitirse de una mujer embarazada con brucelosis activa a su producto, a través de la placenta, provocando aborto o brucelosis en el recién nacido.

Cualquiera que sea la vía de entrada de la bacteria, la ingieren los leucocitos polimorfonucleares en los que se multiplica y es transportada por medio de los vasos linfáticos hasta los ganglios linfáticos regionales (7,17). Una vez llegado a éstos, una parte de las bacterias se destruye, liberando material antigénico que activa el mecanismo formador de anticuerpos, más tarde, como resultado de la migración bacteriana y de la diseminación del antígeno, se desarrollará hipersensibilidad generalizada, en esta etapa es cuando la infección se detiene, volviéndose incontinua. Las bacterias que no

se destruyen, se multiplican dentro de los macrófagos y una vez que lo han hecho, se hacen más resistentes a la acción bactericida del suero normal, son más fácilmente fagocitadas e incrementan su capacidad para sobrevivir y multiplicarse dentro de los fagocitos (23,32).

Una vez superada la barrera linfática, llegan a la circulación a través del conducto torácico y se localizan principalmente en las células del sistema reticuloendotelial del hígado, bazo, médula ósea, ganglios linfáticos y riñón. Las células invadidas tienden a agruparse formando nódulos en los que aparecen células epiteloides y se rodean de linfocitos, formando lesiones granulomatosas con focos de necrosis central (20,23,32,44).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad las determina, en gran parte, la liberación de una potente endotoxina y el grado de hipersensibilidad a los antígenos brucelares. La liberación de bacterias de las células necróticas puede sobrepasar la capacidad fagocítica, llegando a una fase de multiplicación extracelular, ocasionando el cortejo sintomático. Cuando los mecanismos inmunes, humoral y celular, ayudados por el desarrollo de tolerancia a la endotoxina y por desensibilización parcial de los tejidos debido al exceso de antígeno controlan la infección, ésta vuelve a ser predominantemente intracelular. Si las bacterias no se eliminan por completo, persisten pequeños focos de infección de localización intracelular inaccesibles para los antibióticos y para los mecanismos de defensa celulares y humorales; entonces, estos focos pueden liberar microorganismos y endotoxinas a la circulación en forma periódica, lo cual prolonga la sintomatología y la enfermedad adquiere un carácter crónico.

La evolución de la enfermedad dependerá de la respuesta inmunocelular del hospedero y de la capacidad del agente para evadir los mecanismos

intracelulares para su destrucción. La brucelosis humana presenta un período de incubación que varía, dependiendo de la virulencia del microorganismo, de su vía de entrada y de la dosis infectante. Se considera un período promedio de 1-3 semanas, aunque puede alcanzar algunos meses, la brucelosis adopta principalmente dos formas, según su evolución: brucelosis aguda y brucelosis crónica (23,32).

### Brucelosis aguda

El inicio de la enfermedad es insidioso, con sintomatología vaga y poco específica. Los principales síntomas son: fiebre elevada e intermitente, presentándose generalmente en la tarde y noche, escalofríos, cefalea, sudoración profusa, malestar general, dolor articular, diaforesis; los signos que ayudan a esclarecer el diagnóstico son la esplenomegalia, hepatomegalia discreta y linfadenopatía, principalmente cervical o axilar, sobre todo en los pacientes que presentan fiebre elevada de larga evolución. La fiebre continúa por dos o tres semanas y remite espontáneamente con o sin tratamiento; el enfermo permanece asintomático durante varios días después de lo cual reaparece la fiebre (fiebre ondulante o recurrente) algunos autores consideran a esta etapa como brucelosis subaguda. El padecimiento remite espontáneamente después de 6 a 12 meses en aproximadamente el 80% de los casos (20,23,32,44).

### Brucelosis crónica

La frecuencia de la brucelosis crónica es difícil de precisar, ya que se debe descartar inicialmente que la evolución sea debido a un tratamiento inadecuado. Se considera crónica a esta enfermedad cuando los síntomas

persisten por más de un año. Por lo general existe una historia recurrente en la que se presentan cuatro síntomas principales: decalcimiento, cefalea, mioartralgias y diaforesis. Las manifestaciones más comunes (10,23,32,44) que se conocen en brucelosis crónica son:

**Síndrome febril:** habitualmente de poca intensidad en la mayor parte de los casos.

**Osteoarticulares:** artritis, sacrolitis, granulomas óseos.

**Síquicas:** síndrome depresivo, nerviosismo e irritabilidad.

**Digestivas:** hepato-esplenomegalia, hepatitis.

**Neurológicas:** meningobrucelosis, polineuritis, mononeuritis, síndrome radicular y ciático.

**Respiratorias:** bronquitis, bronconeumonía, neumonía.

**Genitourinarias:** orquiepididimitis, cistitis, amenorrea.

**Hematológicas:** anemia hemolítica, anemia ferrocítica.

**Cutáneas:** dermatitis, urticaria, eritema nodoso, eccema.

**Oculares:** úlceras corneales, queratitis, retinitis.

**Cardíacas:** endocarditis.

### 1.2.7 DIAGNOSTICO

El cuadro clínico de la brucelosis, aunque en ocasiones poco específico, puede orientar hacia la posibilidad de la enfermedad, apoyándose en los antecedentes ocupacionales y en la ingestión previa de productos lácteos no pasteurizados. El diagnóstico de sospecha debe confirmarse mediante diversas pruebas de laboratorio, éstas se llevan a cabo en el momento en que el paciente se presente con un cuadro febril y síntomas sugestivos.

Los exámenes más empleados en el diagnóstico de la brucelosis se

basan principalmente en la detección y titulación de anticuerpos contra *Brucella* en el suero. La mayoría de los pacientes con brucelosis presentan esquemas hematológicos normales, en algunos casos la biometría hemática puede orientar en el diagnóstico, la leucopenia con leucocitosis relativa puede considerarse como sugestiva de brucelosis. La velocidad de eritrosedimentación se encuentra elevada en la brucelosis aguda y es normal en la crónica (10,23,36).

#### Diagnóstico bacteriológico

El método definitivo de diagnóstico de la brucelosis se establece de manera específica y con certeza cuando se cultiva, aísla e identifica al agente etiológico. La sangre, obtenida durante la fase septicémica de la enfermedad, es uno de los medios principales en que puede aislarse al agente etiológico; el método más usado es el hemocultivo, sin embargo, éste es positivo en un porcentaje bajo.

Hay que tener en cuenta que el éxito de los cultivos depende del tipo y frecuencia de las muestras, del momento en el que se obtienen, de la especie de *Brucella*, del tiempo de incubación, del medio y de las condiciones de cultivo. Se sugiere el cultivo de otras muestras, como médula ósea, para aumentar la probabilidad de aislamiento (32,36).

#### Diagnóstico Serológico

La fase septicémica de la brucelosis induce niveles importantes de anticuerpos en el suero de individuos infectados. Ya que es baja la proporción

de aislamientos de *Brucella*, el diagnóstico serológico de laboratorio se apoya en la demostración de anticuerpos específicos mediante diversos métodos. La mayoría de ellos emplean como antígeno a la bacteria completa e inactivada y determinan la presencia de anticuerpos aglutinantes, que son los primeros en aparecer. Son inducidos por el LPS e involucran la formación de aglutininas de las clases IgM e IgG. Se ha reportado la presencia de IgA específica que también participa en reacciones de aglutinación (3).

Las pruebas serológicas usadas ampliamente para el diagnóstico son aglutinación en placa con antígeno teñido con rosa de bengala, aglutinación estándar en tubo, aglutinación en tubo con 2 mercaptoetanol, fijación de complemento, prueba de Coombs (prueba de la antiglobulina) y fijación en superficie (23,35,36).

#### Prueba de aglutinación en placa con antígeno teñido con rosa de bengala (RB)

Es una prueba de aglutinación en placa, rápida y cualitativa, ha reemplazado a la prueba de Huddleson que da resultados inespecíficos.

Rose y Roepke (1957) emplearon para el diagnóstico de brucelosis bovina, un antígeno acidificado, con la finalidad de inhibir a bajo pH las aglutininas no específicas. Posteriormente, Pietz en 1966, introdujo dos modificaciones: suspendió las células en un amortiguador a pH 3.6 y las tiñó con rosa de bengala.

Esta prueba ha sido adoptada por muchos laboratorios ya que es baja la proporción de resultados falsos negativos. Detecta anticuerpos específicos de cualquiera de las clases IgM, IgG e IgA, dando positiva desde el inicio de la

enfermedad. Presenta una buena correlación al compararla con la aglutinación en tubo por lo que se ha empleado en estudios epidemiológicos.

Puede dar reacciones falsas positivas con sueros de individuos infectados con *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* 0:9, *F. tularensis*, *Salmonella*, o individuos vacunados contra cólera. Si la prueba fue positiva, deben de emplearse métodos cuantitativos complementarios, ya que no distingue una infección pasada de una activa en curso (15).

#### Prueba de aglutinación estándar en tubo (SAT)

Es la prueba más usada, determina anticuerpos aglutinantes de las clases IgM, IgG e IgA. Los resultados falsos negativos pueden deberse a fenómenos de prozona, que se presentan en un porcentaje bajo de sueros y en diluciones no mayores de 1:20 por lo que no es causa importante de estos; es positiva desde finales de la primera semana de la enfermedad.

Se deben tomar muestras seriadas, pero un título único de 1:160 o más, en presencia de sintomatología, es altamente sugestivo de enfermedad aguda o reciente. Asimismo, la elevación progresiva de estos títulos en muestras posteriores se considera diagnóstica. Aunque no es posible seleccionar un título, ya que éste varía conforme la población de estudio, sobre todo en zonas endémicas en donde se presentan niveles elevados de anticuerpos (> 1:160) que podrían considerarse como indicativos de enfermedad. También hay casos en los que los títulos de anticuerpos no son significativos (< 1:80) a pesar de haberse aislado *Brucella*.

Si no es posible contar con una segunda muestra que nos indique un

incremento en el nivel de anticuerpos, se toman en cuenta los aspectos clínicos y epidemiológicos para dar un diagnóstico definitivo (2,11,23,24,31,51).

#### Prueba de aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol (ME)

Se emplea un agente reductor para disociar la macroglobulina IgM, con lo que se inactiva su actividad aglutinante. Si se observa que aún después de utilizar el ME persiste el fenómeno, éste se debe a la presencia de anticuerpos aglutinantes IgG e IgA. Se considera útil para evaluar pacientes con brucelosis crónica y para contrastar la eficacia de la quimioterapia, ya que en forma paralela a la mejora clínica se deben alcanzar valores negativos de IgG para considerar que el tratamiento fué adecuado (2,12,23,36,51).

Los métodos de aglutinación en tubo se han adecuado para usar cantidades mínimas de reactivo. Se conocen como métodos de microaglutinación en placa (MAP) los cuales se realizan en poco tiempo y no requieren equipo ni reactivos costosos. Se han obtenido resultados semejantes al compararlos con los métodos en tubo (11,31,36).

#### Prueba de fijación de complemento

Esta prueba se basa en la presencia de anticuerpos fijadores de complemento de tipo IgG e IgM y se utiliza durante la etapa aguda y crónica del padecimiento.

### Prueba de Coombs (prueba de la antiglobulina)

Esta prueba va a detectar anticuerpos de las clases IgG e IgA (anticuerpos incompletos) desarrollados en la fase crónica de la enfermedad, que no son capaces de aglutinar a su antígeno específico, sino que solamente se fijan a él. Para poner de manifiesto los anticuerpos, se utiliza el suero de Coombs (anti-gamma globulina humana) para producir la aglutinación. Es decir, que se ponen en contacto los anticuerpos incompletos con el antígeno (*Brucella*), estos se fijan a los determinantes antigénicos de la pared celular y al añadir el suero de Coombs se produce aglutinación.

### Prueba de fijación de superficie

Es un método en el que se usa papel filtro con un antígeno teñido, que al ponerse en contacto con el suero problema se produce una reacción antígeno anticuerpo, la cual se hace visible a través de una coloración. El grado de corrimiento del suero es inversamente proporcional al contenido de anticuerpos presentes en éste, por lo que un desplazamiento de 0 % correspondería a un 100% de fijación, la reacción que manifiesta porcentajes superiores a 70 se considera de valor diagnóstico.

La inmunoprecipitación detecta anticuerpos contra otros constituyentes solubles de *Brucella* que no se demuestran por los métodos de aglutinación convencionales. Para tal efecto se han empleado mezclas complejas de antígenos citoplásmicos, así como polisacáridos semipurificados como el poli B. La principal ventaja es su gran sensibilidad. Como ejemplo de estos métodos tenemos el de contraímmunoelectroforesis y el de doble difusión en gel.

Los métodos inmunoenzimáticos y el radioinmunoanálisis (RIA) son muy sensibles y específicos, identifican anticuerpos en muchos casos en los que las pruebas convencionales fueron negativas; asimismo, se confirma la presencia de anticuerpos de la clase IgM en procesos agudos con pruebas positivas de aglutinación directa y de clase IgG e IgA en casos crónicos, con pruebas de fijación de complemento y de Coombs positivas.

Se han empleado diferentes tipos de antígenos en la prueba de ELISA como brucelas completas inactivadas o rotas por ultrasonido, extractos celulares, fracciones extracelulares, lipopolisacárido crudo o purificado, proteínas de membrana externa crudas o purificadas, etc. (3,4,29,39,47,51).

Se recomienda tener cuidado para la interpretación de los resultados, ya que en lugares donde la brucelosis es endémica hay individuos sin antecedentes clínicos, ni sintomatología que pueden dar resultados positivos que sólo reflejarían una enfermedad subclínica pasada y no una activa presente, por lo que se deben establecer los niveles normales para la comunidad de cada zona geográfica, ya que es de especial importancia para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba.

El diagnóstico de la brucelosis se necesita hacer tomando en cuenta la información epidemiológica, clínica y de laboratorio. En ausencia de resultados positivos en el cultivo, la presencia en cualquier paciente, de un cuadro febril y una prueba de aglutinación en tubo  $> 1:160$ , es suficiente para establecer un diagnóstico presuntivo (36,51).

### 1.3 HEMAGLUTINACION INDIRECTA O PASIVA

Algunos antígenos solubles pueden adsorberse sobre materiales inertes

como partículas de látex o bentonita y actuar como antígenos formes y dar una reacción de aglutinación, cuando se adsorben a los antígenos en partículas inertes, se le llama a este proceso aglutinación indirecta o pasiva. En la hemaglutinación indirecta o pasiva, los eritrocitos de carnero, o los humanos tipo O, se utilizan como soporte debido a que son fáciles de obtener y de conservar en el laboratorio bajo ciertas condiciones (37,41).

Las moléculas que más fácilmente se adsorben a los eritrocitos ya sea de manera espontánea o por acoplamiento químico a su superficie, son polisacáridos que se han conjugado con lípidos o proteínas, los lipopolisacáridos son ejemplo característico. Se necesitan cantidades mínimas de polisacáridos antigénicos, alrededor de 100 µg/10 células, lo cual equivale a unas 2,000 moléculas por eritrocito. El acoplamiento químico se lleva a cabo cuando los eritrocitos se tratan con sustancias tales como el ácido tánico, mediante unión por atracción electrostática o uniendo covalentemente el antígeno proteico usando por ejemplo glutaraldehído, bencidina, cloruro crómico, etc. (42)

Cuando se emplea ácido tánico es a una concentración final de 1:20,000 a 1:40,000 y actúa aumentando la aglutinabilidad de los eritrocitos y estabilizando su membrana.

Para llevar a cabo la sensibilización, el antígeno se incuba con los eritrocitos, y una vez cubiertos por éste, se lavan para eliminar su exceso. Para conocer la cantidad de anticuerpos presentes en un suero, se hacen reaccionar diluciones seriadas con cantidades constantes de la suspensión de eritrocitos sensibilizados con el antígeno específico; la dilución más alta del suero que determina una clara hemaglutinación, se considera como punto final de la reacción y representa el título de anticuerpos. La prueba puede realizarse

mediante una macrotécnica, (en tubo de ensayo, en volúmenes de 0.2 - 0.5 ml) o una microtécnica (en placa de microtitulación) con la cual hay una gran sensibilidad y se usan cantidades más pequeñas de reactivos; basta una cantidad mínima de anticuerpos del orden de 0.003  $\mu\text{g}$  (dado en  $\text{N}_2$  proteico) para un resultado positivo (9,49).

Las ventajas de emplear eritrocitos para recubrirlos con antígeno, son su disponibilidad inmediata, su sensibilidad como indicadores y su posibilidad de almacenamiento. Los eritrocitos pueden tratarse con formalina, glutaraldehído, aldehído pirúvico y almacenarse durante tiempo prolongado a 4°C. Aunque esto no se aplica a todos los antígenos, el tratamiento con estos preservadores puede efectuarse a menudo, ya sea antes o después del acoplamiento con el antígeno. En los sueros con títulos muy altos de aglutinación, puede ocurrir un fenómeno de prozona, dando reacciones falsas negativas (1,21,26).

Como algunos sueros humanos contienen anticuerpos heterófilos capaces de aglutinar eritrocitos de carnero, se debe incluir un control de eritrocitos de carnero sin sensibilizar (testigo negativo). Si existe aglutinación, la prueba se repite con el suero previamente absorbido con eritrocitos de carnero frescos (50).

En las pruebas de hemaglutinación pasiva intervienen tanto la IgG como la IgM. Esto se debe a la buena respuesta de la IgG frente a antígenos proteínicos y a la respuesta de IgM frente a antígenos de tipo polisacárido (10,48).

## 1.4 TRATAMIENTO

La antibioticoterapia específica, instituida en forma temprana, reducirá significativamente la morbilidad y las complicaciones. El tratamiento de la brucelosis humana implica un problema debido a la localización intracelular de la bacteria dentro del sistema reticuloendotelial del hospedador, sitio en donde las concentraciones del antibiótico pueden no ser óptimas.

Las tetraciclinas son los agentes terapéuticos más eficaces, las cepas de *Brucella* son sensibles a concentraciones mínimas inhibitorias. La clortetraciclina y la oxitetraciclina son las más efectivas considerándose que la dosis de 2g diarios de clortetraciclina es la cantidad óptima para obtener resultados efectivos. Los mejores resultados se obtienen con la doxiciclina que es una tetraciclina de tercera generación que se dosifica en concentraciones menores de 200 mg diarios.

Se recomienda el tratamiento asociado con algún aminoglucósido como la amikacina, la kanamicina o la estreptomycin, la dosis recomendada es de 1g diario. El uso de sulfas combinadas, como el trimetoprim-sulfametoxazol ha mostrado alta eficacia; la dosis recomendada es de 160 mg de trimetoprim y 800 mg de sulfametoxazol 2 veces al día durante 21 días, aunque los resultados han sido mejores cuanto más se prolonga al tratamiento.

La rifampicina se utiliza para tratar brucelosis, ya que tiene una gran capacidad para penetrar al interior de las células fagocíticas y alcanzar el sistema reticuloendotelial donde persisten las brucelas. Se ha reportado que es 85 % eficaz cuando se administra sólo durante 21 días; sin embargo, no se prescribe como único medicamento, ya que los mejores resultados se obtienen al asociarla con trimetoprim-sulfametoxazol o con la tetraciclina. No se

recomienda el uso de cloramfenicol, por su efecto sobre la médula ósea, las penicilinas son poco efectivas.

Se han utilizado otros métodos para el tratamiento de la brucelosis crónica, la desensibilización con extractos de la bacteria ha dado resultados variables, por lo que su utilidad no está plenamente reconocida. Existe controversia con respecto a la terapia con antígenos debido a las reacciones severas que pueden desencadenar.

Como regla general, se debe usar una combinación de antibióticos para el tratamiento de la brucelosis, si se quieren evitar las recaídas se debe incluir cuando menos uno que sea capaz de penetrar dentro de las células fagocíticas. La duración del tratamiento debe ser como mínimo de 21 días en forma ininterrumpida, aunque algunos autores recomiendan un período mínimo de 28 días.

Se aconseja hacer un seguimiento de los pacientes para valorar la eficacia del tratamiento. Se esperaría en general, que durante la primera semana hubiera una disminución de los síntomas y que los títulos de los anticuerpos descendieran al finalizarlo, sobre todo de las IgG, sin esperar que se hagan negativos a corto plazo. Se debe asegurar que ya no existen brucelas, a través del mielo o del hemocultivo. Se recomienda seguir controlando a los pacientes aún después de concluido el tratamiento, durante 6 a 12 meses, para asegurar la ausencia de recaídas (23,32,34,36).

## 1.5 CONTROL Y PREVENCIÓN

La prevención se logra mediante la erradicación de la brucelosis en los animales, eliminando a los infectados y vacunando a los sanos, evitando así

la enfermedad en humanos. Existen programas específicos para este fin; sin embargo, en México esto no ha sido posible debido a diversos factores sociales, económicos y por la imposibilidad de ejercer un control adecuado en el consumo de leche y productos derivados de este principal medio de difusión de la enfermedad.

Algunos autores han sugerido como medida preventiva la vacunación de individuos considerados en alto riesgo por su convivencia continua con los animales infectados. Este método profiláctico se ha utilizado sólo en algunos países con resultados favorables (10,23).

## 1.6 REACCIONES CRUZADAS

Todas las cepas lisas de *Brucella* muestran una gran reactividad cruzada que se pone de manifiesto cuando se realizan pruebas de aglutinación. La razón de este comportamiento se debe al lipopolisacárido (LPS) que es el principal antígeno de superficie, la presencia común de una o varias moléculas de perosamina en el LPS de cepas lisas de bacterias como *E. coli* O:157, O:116 y O:117; *Salmonella* del grupo N de Kauffman & White, *Pseudomonas maltophilia*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica* O:9, es la razón por la que se presentan reacciones cruzadas con *Brucella* (2,13,16)

## CAPITULO II

### PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1 Material

##### Material de uso normal

Aplicadores de madera

Guantes

Micropipetas de 50, 100, 200  $\mu$ l

Microplacas de fondo en U Costar Cat. No.3797

Microplacas de fondo en V Costar Cat No.3897

Placas para aglutinación

Pipetas de 1, 5, 10 ml

Pipetas Pasteur

Tubos para centrífuga

##### Equipo

Balanza analítica

Balanza granataria

Baño de agua a 37°C

Baño de agua a 56°C

Centrífuga

Incubadora de 37°C

Lámpara

Espejo

## Reactivos

Amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.2 (0.15M)

Amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 6.4 (0.15M)

Acido tánico (1:20,000 y 1:40,000)

Formaldehído al 40%

Solución salina fenolada al 0.5%

Solución de Alsever

## Reactivos biológicos

Antígenos proporcionados por el Lab. de Brucelosis del INDRE.

-Antígeno *B. abortus* (99S) teñido con rosa de bengala para la prueba de aglutinación en placa.

-Antígeno *B. melitensis* (M-16) para la técnica de Hemaglutinación indirecta.

-Antígeno *B. melitensis* diluido en solución salina fenolada para la prueba de microaglutinación en placa.

Eritrocitos de carnero

Eritrocitos humanos tipo "O"

Suero normal de conejo

## Muestras Analizadas

150 sueros de personas clínicamente sanas que acuden a consulta externa del Hospital Angeles del Pedregal, para la determinación del valor de corte para la prueba de hemaglutinación indirecta.

214 sueros de personas de varios estados del país que acuden al laboratorio

de Brucelosis del INDRE para la realización de su diagnóstico, seleccionándose para la validación de la prueba de hemaglutinación indirecta.

31 sueros de personas con diagnóstico de cólera que acudieron al laboratorio de producción de sueros del INDRE, para la determinación de reacciones cruzadas de la prueba de hemaglutinación indirecta.

20 sueros de personas con diagnóstico de salmonelosis (tifoidea) con cultivo positivo, del Banco de sangre del IMSS, para determinación de reacciones cruzadas de la prueba de hemaglutinación indirecta.

28 sueros de personas aparentemente sanas del estado de Puebla (zona considerada de alta prevalencia de brucelosis), para determinar la presencia de anticuerpos contra *Brucella* mediante la prueba de hemaglutinación indirecta.

## 2.2 Metodología

Las pruebas realizadas para todos los sueros (443) fueron las siguientes

- 1.- Aglutinación en placa con antígeno teñido con rosa de bengala
- 2.- Microaglutinación en placa
- 3.- Hemaglutinación indirecta

- 1.- Aglutinación en placa con antígeno teñido con rosa de bengala

En una placa de vidrio cuadrículada se colocan con una micropipeta 40µl del suero, se agrega una gota del antígeno con un gotero calibrado que equivale a 30µl, se homogeniza con un aplicador, se agita la placa con movimientos rotatorios durante 4 minutos y se observa frente a una lámpara la presencia o ausencia de aglutinación, colocando a la vez un suero testigo positivo y uno

negativo. Los resultados se interpretan, si hay aglutinación, como positivo y no aglutinación (a l cabo de 4 minutos) como negativo. La prueba tiene validez cualitativa y se invalida el resultado si se lee después de pasado los 4 minutos. Si la prueba es positiva se procede a titular el suero realizando diluciones de 1:80 a 1:320 para ver el título máximo del suero y poder comparar con las otras pruebas.

## 2.- Microaglutinación en placa

Se colocan 180 $\mu$ l de solución salina fenolada en la primera hilera de la microplaca con fondo en U y 100 $\mu$ l al resto de los pozos de la microplaca, se ponen 20 $\mu$ l de suero al primer pozo (1 suero / pozo), se toman 100 $\mu$ l del primer pozo y se hacen diluciones seriadas con micropipeta, desechando al final del último pozo 100 $\mu$ l. Se agregan 100 $\mu$ l de antígeno diluido en solución fenolada a todos los pozos, colocándose también un suero control positivo y un suero control negativo. Posteriormente se incuban las placas a 37°C durante 24 horas. Se colocan las placas en un espejo y se observan con ayuda de una lámpara.

Se mide el grado de aglutinación por la mayor o menor clarificación que se haya producido en comparación con el testigo negativo y el testigo positivo. El título corresponde al último pozo donde hubo clarificación.

## 3.- Hemaglutinación indirecta

### 3.1 Tizado de los eritrocitos

a)- Los eritrocitos de carnero suspendidos en solución de Alsever (Anexo) se

lavan 3 veces con PBS a pH 7.2. Se centrifugan a 2,000 rpm durante 5 minutos. Se ajusta a 2.5% la suspensión, con PBS a pH 7.2.

b)- Se adiciona un volumen igual de la solución de ácido tánico 1:20,000 (Anexo), mezclando bien e incubando la mezcla en baño de agua a 37°C durante 15 minutos.

c)- Se retiran las células tratadas con ácido tánico del baño de agua y se centrifugan a 2,000 rpm durante 5 minutos. Se decanta el sobrenadante y se lavan tres veces con PBS a pH 7.2, se resuspenden las células con PBS a pH 6.4, para tener nuevamente la concentración inicial de 2.5%.

### 3.2 Sensibilización de los eritrocitos con antígeno de *B. melitensis* M-16 (PCM-BM).

a)- Los eritrocitos tanados al 2.5% se sensibilizan añadiendo igual volumen de la dilución óptima de antígeno disuelto en PBS pH 6.4. Se incuba la mezcla en baño de agua a 37°C durante 15 minutos.

b)- Se retiran del baño de agua las células tratadas con antígeno y se centrifugan a 2,000 rpm durante 5 minutos. Se decanta el sobrenadante y se lavan las células 2 veces con PBS a pH 7.2 adicionado de suero normal de conejo (SNC) al 1% (Anexo).

c)- Se ajustan las células a una suspensión de 1.5% con el mismo diluyente.

### 3.3 Determinación de la concentración óptima de antígeno

a)- Se preparan diluciones de antígeno en PBS a pH 6.4 (1:20, 1:40, 1:80, 1:160)

b)- Se sensibilizan las células con cada dilución de antígeno, como se indicó anteriormente.

c)- Cada suspensión de eritrocitos sensibilizados se hace reaccionar con diluciones seriadas de un suero positivo y uno negativo conocidos, empleados como controles.

d)- La más baja concentración de antígeno que dé el más alto título con el suero inmune y no reaccione con el suero negativo, se considerará óptima.

### 3.4 Determinación de anticuerpos anti *Brucella* por la prueba de hemaglutinación indirecta

a)- Se inactivan los sueros problema a 56°C durante 30 minutos.

b)- A todos los pozos de la microplaca de fondo en U se les agregan con una micropipeta, 25µl de PBS a pH 7.2 adicionado de suero normal de conejo al 1%.

c)- Se colocan 25µl de suero problema en el primer pozo, se mezcla y se transfieren 25µl al siguiente pozo realizando diluciones seriadas y desechando al final 25µl (diluciones de 1:2 a 1:1024).

d)- A cada dilución de suero, se agregan 25µl de la suspensión sensibilizada de células al 1.5%.

e)- Se coloca la placa en el rotor de 1 a 3 minutos y posteriormente se deja reposar a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas cubriéndola; por último, se realiza la lectura observando sobre un fondo blanco o con la ayuda de un espejo.

#### Controles requeridos:

##### a) Control del diluyente

1.- Se depositan 25 µl de PBS a pH 7.2 adicionado de suero normal de conejo al 1% en una hilera de pozos y se agregan 25 µl de la suspensión de células sensibilizadas al 1.5%. Esta reacción deberá ser negativa.

##### b) Control de suero

1.- Se prueban las mismas diluciones del suero problema con eritrocitos sin sensibilizar.

2.- Se hacen las mismas diluciones del suero control positivo agregando 25µl de eritrocitos sensibilizados.

3.- Se realiza la misma operación con un suero negativo conocido.

#### Interpretación de resultados

Se leen los patrones de las células en el fondo de los pozos. Una reacción

positiva se indica por una aglutinación en forma homogénea en el fondo del pozo. Una prueba negativa es aquella en la cual las células forman un botón compacto o un anillo en el centro del pozo.

En los pozos correspondientes al testigo negativo con eritrocitos sensibilizados no debe haber reacción. En los pozos del testigo positivo de la prueba debe presentarse una hemaglutinación completa de los eritrocitos. En los pozos correspondientes a los que tienen el suero problema con eritrocitos no sensibilizados no debe haber reacción. En los pozos que corresponden a las diluciones del suero problema, el título de anticuerpo es igual a la mayor dilución en la que aún se presenta hemaglutinación.

Variabes analizadas en la prueba de hemaglutinación indirecta

#### Amortiguadores

Para la preparación del ácido tánico diluido y del suero normal de conejo al 1%, así como para el lavado de los eritrocitos y su tanado, se probaron los amortiguadores de fosfatos a pH 7.2 y 6.0 (0.15 M).

Para la sensibilización de los eritrocitos y la dilución del antígeno se probaron los amortiguadores de fosfatos a pH 6.4 y 8.0 (0.15M).

#### Eritrocitos

Se realizó la prueba de hemaglutinación utilizando eritrocitos de carnero y eritrocitos de humanos tipo "O", conservados en solución de Alsever.

### Solución de ácido tánico

Al mismo tiempo se prueban diferentes concentraciones del ácido tánico para el tanado de los eritrocitos, con las diluciones 1:20,000 y 1:10,000.

### Diluyente

Se emplean 2 diferentes diluyentes, suero normal de conejo al 1% en PBS a pH 7.2 y gelatina al 1% en PBS a pH 7.2. El suero normal de conejo se utiliza inactivado a 56°C durante 30 y 40 minutos y sin inactivar; también se prueba absorbiendo durante 1 hora con agitación suave con un volumen igual de paquete de eritrocitos de carnero.

### Tiempos de incubación

Se realizan pruebas en donde se emplen diferentes tiempos de incubación para el tanado y la sensibilización de los eritrocitos: 15 minutos a 37°C en baño de agua, 15 minutos a 37°C en la incubadora, 30 minutos a 37°C en baño de agua y 30 minutos a 37°C en incubadora.

### Sueros humanos

Ya mencionados en material.

## Placas para microtitulación

Se emplean dos diferentes tipos, placas de fondo en U clave 3797 y placas de fondo en V clave 3897, ambas de marca Costar.

## Antígeno

Se prueban los siguientes antígenos, extracto salino de la cepa 995 de *Brucella abortus* Ruiz Castañeda Modificado (RCM-BA) a una concentración de 5.4 mg/ml, extracto salino de la cepa M-16 de *Brucella melitensis* Ruiz Castañeda Modificado (RCM-BM) a una concentración de 10.7 mg/ml. Los antígenos se usan a diferentes concentraciones y diluciones:

*B. melitensis* M-16: 1:10 (1,070µg/ml), 1:20 (535µg/ml), 1:40 (267.5µg/ml), 1:80 (133.75µg/ml), 1:160 (66.87µg/ml).

*B. abortus* 995: 1:10 (540µg/ml), 1:20 (270µg/ml), 1:40 (135µg/ml), 1:80 (67.5µg/ml), 1:160 (33.75µg/ml).

## Lecturas

Las placas se dejan reposar diferentes tiempos, durante 2 horas a temperatura ambiente, 1 hora a 37°C y 14 horas en refrigeración, 2 horas a temperatura ambiente y 14 horas en refrigeración.

## Obtención del antígeno *B. melitensis* M-16

El antígeno utilizado es el RCM-BM, que es un extracto crudo de la cepa

M-16 de *B. melitensis* obtenido por el método de Ruiz Castañeda modificado (RCM). La cepa de *B. melitensis* M-16 se encuentra congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  en criotubos los cuales tienen 2 ml de la suspensión bacteriana en glutamato de sodio como soporte crioprotector.

El primer día se descongela el criotubo procediéndose a sembrar 7 tubos con medio inclinado (medio cuenta en placa 0.85% marca Difco, Dextrosa 1%, Glicerol 1%, Agar 2%), colocando una gota de la suspensión y girándolos para que se cubra toda la superficie, se siembran también dos placas de agar soya tripticasa (TSA) por estría con una gota de la suspensión bacteriana. Se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y se determina la pureza por morfología microscópica y colonial; verificar si el cultivo está puro y en fase lisa por aglutinación con acriflavina, se realiza aglutinación con suero polivalente para verificar que las bacterias son del género *Brucella*.

Se agregan 3 ml de caldo *Brucella* a los tubos inclinados para resuspender el crecimiento inoculándose 0.5 ml a 10 frascos con el mismo medio de cultivo mencionado anteriormente, se agitan de manera que la superficie del medio quede bañada por la suspensión, sembrándose también dos placas de TSA para pruebas de control, se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Después de la incubación se realizan las pruebas de pureza mencionadas anteriormente. Se revisa que la morfología del crecimiento en los frascos sea la característica.

Se agregan 6 ml de caldo *Brucella* a cada frasco para resuspender el crecimiento, se toman 2 ml de la suspensión y se inoculan las botellas de Roux con el mismo medio de cultivo que se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas.

Se examina el crecimiento de las botellas de Roux y se cosechan agregando 20 ml de solución salina fenolada al 0.5% (SSF) a cada una para inactivar las bacterias, se filtran a través de algodón y gasa estéril colectándolo en un matraz. A la suspensión así obtenida se le realizan las mismas pruebas de pureza.

Las células cosechadas se dejan en refrigeración durante tres días, después se centrifugan a 6,000 rpm durante 20 minutos descartando el sobrenadante, el paquete celular se resuspende con SSF y así se realizan dos lavados más con solución salina isotónica (SSI) para eliminar los restos de medio de cultivo, se colocan en un matraz conteniendo perlas de vidrio, dejándose en agitación durante 24 horas a 4°C, se centrifugan para separar el sobrenadante, al que se le cuantifican las proteínas por el método de Lowry, se distribuye en viales y se almacena a -20°C. De igual manera, el antígeno 99S RCM-BA se obtiene por el mismo procedimiento.

### 2.3 Análisis Estadístico

Para la valoración de los resultados obtenidos se utilizó la estadística descriptiva asociada a las tablas de contingencia o de doble entrada, mediante las cuales se determinan los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

**Sensibilidad.** En inmunoserología este término denota la capacidad de un procedimiento para detectar muy pequeñas concentraciones de una sustancia. El método de prueba idealmente sensible es aquél que encuentra un resultado positivo, cuando el verdadero estado de la muestra es positivo. Un resultado negativo falso ocurre cuando la prueba es negativa pero el verdadero estado de la muestra es positivo.

**Especificidad.** Tiene dos características, la primera es aquella que determina su capacidad para encontrar un resultado negativo de la prueba, cuando el verdadero estado de la muestra es negativo. La segunda característica del concepto es el relacionado con la presencia de las llamadas reacciones cruzadas.

Los valores predictivos describen el valor de las pruebas tomando en cuenta la prevalencia real de la infección en la población que se analiza. Por lo tanto, el valor de una prueba puede no depender de su sensibilidad y su especificidad, tanto como depende de la población analizada.

El valor predictivo positivo es la frecuencia de individuos infectados entre todas las personas con resultados positivos.

El valor predictivo negativo es la frecuencia de individuos no infectados entre todas las personas con resultados negativos.

**Reproducibilidad.** Representa la magnitud de las diferencias entre los resultados cuantitativos en repetidos ensayos en la misma muestra, sin tomar en cuenta el valor verdadero de la sustancia medida. Entre menores sean las diferencias entre los resultados obtenidos con los ensayos repetidos, más grande será la precisión del procedimiento.

TABLA DE CONTINGENCIA O DE DOBLE ENTRADA

		MAP	
		+	-
HAP	+	A PV	B NF
	-	C PF	D NV

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{A}{A + C} \times 100$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{D}{D + B} \times 100$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO POSITIVO} = \frac{A}{A + B} \times 100$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO NEGATIVO} = \frac{D}{D + C} \times 100$$

PV = POSITIVO VERDADERO = A

NF = NEGATIVO FALSO = B

PF = POSITIVO FALSO = C

NV = NEGATIVO VERDADERO = D

## CAPITULO III

### RESULTADOS

Como parte del desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, en el Laboratorio de Brucelosis del INDRE, se llevó a cabo la estandarización y evaluación de la técnica de Hemaglutinación Indirecta (HI) con la finalidad de contar con otra prueba de diagnóstico de rutina.

Los resultados se presentan en tablas de la 1 a la 15, y los contenidos de las mismas se describen a continuación:

Determinación del valor de corte para la prueba de hemaglutinación Indirecta. Dicho valor se obtuvo sometiendo a la prueba de hemaglutinación Indirecta los 150 sueros de personas clínicamente sanas, que acudieron a consulta externa del Hospital Angeles del Pedregal y que no cursaban con ninguna infección. El valor de corte correspondió a la dilución 1:32, es decir, los sueros que dieron un título mayor o igual a esta dilución se tomaron como positivos y los que dieron un título menor se consideraron como negativos. También se les realizó las pruebas de aglutinación en placa con antígeno teñido con rosa de bengala (RB) y microaglutinación en placa (MAP) obteniéndose resultados negativos, TABLA 1.

Se procedió a evaluar la prueba de hemaglutinación Indirecta, para ello se emplearon 214 sueros de personas que acudieron para el diagnóstico al Laboratorio de Brucelosis, los cuales se trabajaron simultáneamente con la prueba de microaglutinación en placa y aglutinación en placa con antígeno teñido con rosa de bengala. Se correlacionaron los resultados de la prueba de HI con los de la prueba de MAP para determinar la relación entre ambas obteniéndose los resultados que se muestran en la TABLA 2.

Se correlacionaron también los resultados de la prueba de HI con los resultados obtenidos en la prueba de RB, determinando la relación entre ambas pruebas, los resultados se muestran en la TABLA 3.

Se determinó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos para la prueba de HI tomando como prueba patrón el método de MAP a una dilución de 1:160, como valor de corte y de significado diagnóstico. Se utilizó la estadística descriptiva mediante las tablas de contingencia o de doble entrada, obteniéndose una sensibilidad del 97% y una especificidad del 92% así como un valor predictivo positivo del 95% y un valor predictivo negativo del 95%, los resultados se muestran en la TABLA 4.

Para la determinación de reacciones cruzadas con la prueba de HI, se sometieron a dicha prueba 31 sueros con diagnóstico de cólera trabajados simultáneamente también por las técnicas de RB y MAP, en donde 27 sueros fueron negativos por las tres pruebas y 4 fueron positivos para HI con títulos de 1:32 y 1:64, los resultados se muestran en la TABLA 5.

También se analizaron 20 sueros positivos para *Salmonella* por las tres pruebas (HI, RB, MAP) para la determinación de reacciones cruzadas obteniéndose resultados negativos para MAP y RB, por HI se obtuvieron títulos de 1:2, 1:4 y 1:8 los cuales se consideran negativos; los resultados se muestran en la TABLA 6. Los resultados de ambos grupos de sueros positivos a *Salmonella* y *V. cholerae*, por la prueba de HI se muestran en la TABLA 7.

Se estudiaron 28 sueros de personas clínicamente sanas de un área endémica del estado de Puebla para determinar la presencia de anticuerpos anti-*Brucella* obteniéndose títulos de 1:2 a 1:16, los resultados se muestran en la TABLA 8.

Se trabajaron 26 sueros de personas con cultivo positivo para *Brucella* por las tres pruebas (HI, RB, MAP), ya que como sabemos el aislamiento de la bacteria es la prueba que realmente confirma la infección por *Brucella*, los resultados se muestran en la TABLA 9.

Se calculó la reproducibilidad de la prueba de HI con 115 sueros positivos escogidos al azar de los demás sueros trabajados, se corrieron en dos distintos días, obteniéndose un 85% de reproducibilidad, los resultados se muestran en la TABLA 10.

Se determinó el número de muestras en que coincidieron los títulos de cada uno de los 5 grupos de sueros analizados, trabajados por las tres pruebas (HI, RB, MAP) los resultados se muestran en las TABLAS 11 a 15.

**TABLA 1**

**DETERMINACION DEL VALOR DE CORTE PARA LA PRUEBA DE  
HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HI) EN 150 SUEROS  
DE PERSONAS CLINICAMENTE SANAS.**

HI	NEG	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
SANOS	127	6	10	4	3		

**TABLA 2**

**CORRELACION DE VALORES OBTENIDOS POR LAS PRUEBAS DE  
HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HI) Y MICROAGLUTINACION  
EN PLACA (MAP) EN LA DETERMINACION DE  
ANTICUERPOS ANTI-Brucella.**

MAP \ HI	NEG (**)	1:4	1:8	1:16	1:32	1: 64	1: 128	1:256	1: 512	1: 1024
NEG (*)	21	7	5	7						
1:40	11	6	1	3	1	1				
1:80	3	5	7			1	1		2	
1:160			1	1	5	3	7	13	13	2
1:320	1					1	3	6	19	12
1:640	1							5	5	7
1:1280									1	14
1:2560								4		7
1:5120										1
TOTAL	37	18	14	11	6	6	11	28	40	43

(\*) INCLUYE DILUCION 1:10 y 1:20

(\*\*) INCLUYE DILUCION 1:2

**TABLA 3**

**CORRELACION DE VALORES OBTENIDOS POR LAS PRUEBAS DE  
HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HI) Y ROSA DE BENGALA  
(RB) EN LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS  
ANTI-Brucella.**

HI \ RB	NEG (**)	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
NEG (*)	17	11	2	1		1				
1:40	17	4	8	2		1	1	1	2	
1:80	2		4	5			5		8	1
1:160		1		3	1	2	3	7	4	2
1:320	1	2			5	2	2	20	26	40
<b>TOTAL</b>	<b>37</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>28</b>	<b>40</b>	<b>43</b>

(\*) INCLUYE DILUCION 1:10 Y 1:20

(\*\*) INCLUYE DILUCION 1:2

**TABLA 4**

**DETERMINACION DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS  
DE LA PRUEBA HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HI).**

		MAP		
		+	-	TOTAL
HI 1:32	+	128	6	134
	-	4	76	80
TOTAL		132	82	214

<b>SENSIBILIDAD</b>	<b>97%</b>
<b>ESPECIFICIDAD</b>	<b>92.60%</b>
<b>VALOR PREDICTIVO POSITIVO</b>	<b>95.00%</b>
<b>VALOR PREDICTIVO NEGATIVO</b>	<b>95%</b>

**TABLA 5**

**RESULTADOS DE 31 SUEROS CON DIAGNOSTICO DE COLERA  
AL ANALIZARLOS POR LAS 3 PRUEBAS (HI, MAP, RB).**

SUEROS	HI	MAP	RB
1	0	0	0
2	0	1:20	0
3	0	1:40	0
4	0	1:40	0
5	1:2	0	0
6	1:2	1:20	0
7	1:4	0	0
8	1:4	0	0
9	1:4	0	0
10	1:4	0	0
11	1:4	0	0
12	1:4	0	0
13	1:4	0	0
14	1:4	1:20	0
15	1:4	1:20	0
16	1:4	1:20	0
17	1:4	1:20	0
18	1:4	1:20	0
19	1:4	1:20	0
20	1:4	1:40	0
21	1:8	1:20	0
22	1:8	1:20	0
23	1:8	1:20	0
24	1:8	1:20	0
25	1:8	1:20	0
26	1:16	1:20	0
27	1:16	1:40	0
28	1:32	0	1:40
29	1:32	1:320	1:320
30	1:32	1:640	1:320
31	1:64	1:80	1:40

**TABLA 6**

**RESULTADOS DE 20 SUEROS POSITIVOS A Salmonella AL  
ANALIZARLOS POR LAS 3 PRUEBAS (HI, MAP, RB).**

SUERO	RB	MAP	HI	"O"	"H"
1	-	-	1:4	1:80	1:160
2	-	-	-	1:20	1:80
3	-	-	1:4	1:40	1:40
4	-	-	1:2	1:40	1:40
5	-	-	1:4	1:320	1:160
6	-	-	-	1:80	1:80
7	-	-	1:2	1:20	1:80
8	-	-	1:4	1:160	1:160
9	-	-	1:2	1:80	1:80
10	-	-	1:4	1:80	1:20
11	-	-	-	-	1:80
12	-	-	1:2	-	1:40
13	-	-	1:8	1:20	1:160
14	-	-	1:2	-	1:40
15	-	-	1:2	-	1:20
16	-	-	1:2	1:20	1:160
17	-	-	1:2	1:20	1:40
18	-	-	1:2	1:40	1:80
19	-	-	1:4	1:80	1:320
20	-	-	1:2	1:20	1:160

**TABLA 7**

**RESULTADOS DE SUEROS POSITIVOS A Salmonella Y A Vibrio cholerae  
OBTENIDOS POR LA TECNICA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HI).**

HI	NEG	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Salmonella	4	9	6	1				
V. cholerae	4	2	14	5	2	3	1	

**TABLA 8**

**VALORES OBTENIDOS POR LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION  
INDIRECTA (HI) EN 28 SUEROS DE PERSONAS SANAS  
DEL ESTADO DE PUEBLA.**

HI	NEG	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
SANOS	3	7	8	8	2		

**TABLA 9**

**RESULTADOS DE 26 SUEROS DE PACIENTES CON CULTIVO  
POSITIVO A Brucella AL ESTUDIARLOS POR LAS 3 PRUEBAS  
(HI, MAP Y RB).**

SUERO	RB	MAP	HI
1	1:320	1:320	1:64
2	1:80	1:80	1:1024
3	1:320	1:1280	1:1024
4	1:320	1:2560	1:1024
5	1:320	1:1280	1:1024
6	1:320	1:2560	1:2048
7	1:320	1:2560	1:2048
8	1:320	1:1280	1:2048
9	1:40	1:160	1:512
10	1:40	1:160	1:512
11	1:320	1:2560	1:1024
12	1:40	1:160	1:256
13	1:320	1:1280	1:2048
14	1:160	1:1280	1:2048
15	1:320	1:1280	1:2048
16	1:320	1:160	1:32
17	1:320	1:1280	1:1024
18	1:320	1:640	1:256
19	1:320	1:320	1:256
20	1:320	1:320	1:1024
21	1:320	1:320	1:1024
22	1:40	1:20	1:16
23	1:80	1:20	1:16
24	1:80	1:20	1:16
25	1:320	1:320	1:512
26	1:80	1:640	1:1024

**TABLA 10**

**DETERMINACION DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LA PRUEBA  
HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HI) OBTENIDA DE 115  
SUEROS DE INDIVIDUOS CON BRUCELOSIS.**

R 1 \ R 2	NEG	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
NEG	33	3									
1:4	3	7									
1:8		2	7								
1:16			2	3							
1:32					3						
1:64						6					
1:128							4				
1:256								5	2		
1:512								1	12		
1:1024										16	3
1:2048											3
TOTAL	36	12	9	3	3	6	4	6	14	16	6

**TABLA 11**  
**FRECUENCIA DE TITULOS OBTENIDOS POR LAS PRUEBAS**  
**(HI, MAP Y RB) EN 214 SUEROS DE PERSONAS**  
**CON DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS.**

HI	MAP	RB	FRECUENCIA
0	0	0	5
0	0	1:20	1
0	0	1:40	1
0	1:20	0	1
0	1:20	1:20	1
0	1:20	1:40	3
0	1:40	0	2
0	1:40	1:40	6
0	1:40	1:80	1
0	1:80	1:40	1
0	1:80	1:80	1
1:2	0	0	5
1:2	1:20	0	1
1:2	1:20	1:40	1
1:2	1:40	1:40	3
1:2	1:80	0	2
1:2	1:80	1:40	1
1:2	1:320	1:40	1
1:2	1:640	1:320	1
1:4	0	0	1
1:4	0	1:40	2
1:4	1:20	1:20	1
1:4	1:20	1:40	1
1:4	1:40	0	3
1:4	1:40	1:20	1
1:4	1:40	1:40	1
1:4	1:80	0	4
1:4	1:80	1:40	1
1:4	1:80	1:160	1
1:4	1:80	1:320	2
1:8	0	0	1
1:8	1:20	0	1
1:8	1:20	1:40	3
1:8	1:40	1:40	1
1:8	1:80	1:40	4
1:8	1:80	1:80	3
1:8	1:160	1:80	1
1:16	0	0	1
1:16	1:20	1:40	1
1:16	1:20	1:80	5
1:16	1:40	1:40	1
1:16	1:40	1:160	2
1:16	1:160	1:160	1

TABLA 11

## CONTINUACION

1:32	1:40	1:320	1
1:32	1:160	1:150	1
1:32	1:160	1:320	4
1:64	1:40	1:40	1
1:64	1:80	1:20	1
1:64	1:160	1:160	2
1:64	1:160	1:320	1
1:64	1:320	1:320	1
1:128	1:80	1:160	1
1:128	1:160	1:80	4
1:128	1:160	1:160	2
1:128	1:160	1:320	1
1:128	1:320	1:40	1
1:128	1:320	1:80	1
1:128	1:320	1:320	1
1:256	1:160	1:40	1
1:256	1:160	1:160	7
1:256	1:160	1:320	5
1:256	1:320	1:320	6
1:256	1:640	1:320	5
1:256	1:2560	1:320	4
1:512	1:160	1:40	2
1:512	1:80	1:80	2
1:512	1:160	1:80	4
1:512	1:160	1:320	7
1:512	1:320	1:80	2
1:512	1:320	1:160	2
1:512	1:320	1:320	15
1:512	1:640	1:160	2
1:512	1:640	1:320	3
1:512	1:1280	1:320	1
1:1024	1:160	1:160	1
1:1024	1:160	1:320	1
1:1024	1:320	1:160	1
1:1024	1:320	1:320	11
1:1024	1:640	1:80	1
1:1024	1:640	1:320	6
1:1024	1:1280	1:320	14
1:1024	1:2560	1:320	7
1:1024	1:5120	1:320	1

**TABLA 12**

**FRECUENCIA DE TITULOS OBTENIDOS EN 31 SUEROS DE  
PERSONAS CON DIAGNOSTICO DE COLERA POR LAS  
3 PRUEBAS (HI, MAP Y RB).**

HI	MAP	RB	FRECUENCIA
0	0	0	1
0	1:20	0	1
0	1:40	0	2
1:2	0	0	1
1:2	1:20	0	1
1:4	0	0	7
1:4	1:20	0	6
1:4	1:40	0	1
1:8	1:20	0	5
1:16	1:20	0	1
1:16	1:40	0	1
1:32	0	1:40	1
1:32	1:320	1:320	1
1:32	1:640	1:320	1
1:64	1:80	1:40	1

**TABLA 13**

**FRECUENCIA DE TITULOS OBTENIDOS EN 20 SUEROS DE  
PERSONAS CON DIAGNOSTICO DE SALMONELOSIS  
POR LAS 3 PRUEBAS (HI, MAP Y RB).**

HI	MAP	RB	FRECUENCIA
0	0	0	4
1:2	0	0	9
1:4	0	0	6
1:8	0	0	1

**TABLA 14**

**VALORES DE FRECUENCIAS OBTENIDAS POR LAS  
3 PRUEBAS (HI, MAP Y RB) CON 28 SUEROS DE  
PERSONAS SANAS DEL ESTADO DE PUEBLA.**

HI	MAP	RB	FRECUENCIA
0	0	0	2
0	1:20	0	1
1:2	0	0	6
1:2	1:80	0	1
1:4	0	0	7
1:4	1:80	0	1
1:8	0	0	8
1:16	0	0	2

**TABLA 15**

**FRECUENCIA DE VALORES OBTENIDOS POR LAS 3  
PRUEBAS (HI, MAP Y RB) EN 150 SUEROS  
DE PERSONAS SANAS.**

HI	MAP	RB	FRECUENCIA
0	0	0	112
0	1:20	0	13
0	1:40	0	2
1:2	0	0	6
1:4	0	0	10
1:8	0	0	3
1:8	1:20	0	1
1:16	0	0	2
1:16	1:20	0	1

## CAPITULO IV

### DISCUSION DE RESULTADOS

Durante la ejecución de la prueba el amortiguador de fosfatos que se seleccionó para el tanado de los eritrocitos fué el PBS a pH 7.2, ya que se probó el de pH 6.0 observándose que los eritrocitos son difíciles de resuspender, a pH 7.2 no se dificulta esto; igualmente es útil tanto para la preparación del ácido tánico como de la del suero normal de conejo al 1%.

Para la sensibilización de los eritrocitos se seleccionó el amortiguador de fosfatos a pH 6.4, ya que cuando se trabajó el de pH 8.0 se observó que había un cierto grado de hemólisis en los eritrocitos, asociado con la dificultad de resuspender las células en los lavados; incluso, se tenía que preparar y sensibilizar nuevamente, por lo que se decidió utilizar el pH de 6.4 al no observarse dificultad en la resuspensión ni en la hemólisis.

La preparación de los amortiguadores de fosfatos se hacía cada vez que se montaba la técnica, preparando sólo lo necesario para trabajar, aunque ocasionalmente se puede almacenar a 4°C, comprobando que al usarlos no estén contaminados por hongos y que el pH no haya variado.

Para este trabajo se emplearon eritrocitos de carnero y eritrocitos humanos tipo "O", los cuales se colectaron asépticamente en igual volumen de solución de Alsever y se refrigeraron a 4°C por lo menos de 3-4 días antes de usarse. Los resultados obtenidos con ambos fueron similares, aunque los eritrocitos humanos son más sensibles para el tanado.

Se decidió trabajar con los eritrocitos de carnero ya que fueron los más

fáciles de obtener en cantidad y los más satisfactoriamente probados por varios autores

Se recomienda trabajar con eritrocitos de la misma especie para evitar dificultades causadas por la presencia, en el suero, de aglutininas no homólogas contra los eritrocitos; se absorbieron los sueros trabajados con un paquete celular, y de esta manera, quitar las aglutininas no específicas que podrían lisar a los eritrocitos.

Se empleó ácido tánico en una concentración final de 1:20,000 a 1:40,000 para estabilizar la membrana de los eritrocitos. Se decidió utilizar la dilución 1:20,000 ya que con la segunda se observó aglutinación espontánea, además de que los eritrocitos se lisan.

Se recomienda tratar los eritrocitos tanados con formol para evitar su lisis, en el presente trabajo no se realizó, ya que se preparaban cada vez que se montaba la técnica, utilizando ácido tánico diluido fresco, ya que éste tiende a oxidarse y no funciona para tanar otro lote de células.

El ácido tánico se preparó con PBS a pH 7.2 puesto que a éste no se lisan los eritrocitos. El tanado se llevó a cabo a 37°C aunque también se observó que es efectivo a temperatura ambiente y durante un periodo de 15 minutos, lavando posteriormente para eliminar el exceso de ácido tánico.

El suero normal de conejo al 1% es el diluyente que se seleccionó para trabajar, éste actúa como protector de los eritrocitos durante los lavados que se hacen después de haberlos sensibilizado evitando que éstos se lisen. El suero normal de conejo se diluyó al 1% con PBS a pH 7.2 y se inactivó a 56°C durante 30 minutos, se absorbió con igual volumen de paquete de eritrocitos

de carnero lavados durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave, esto se realiza ya que hay proteínas presentes en el suero, que pueden adsorberse en los eritrocitos o reemplazar varias de las moléculas de antígenos sobre la superficie de éstos y aglutinarlos, dando reacciones inespecíficas.

También se trabajó con gelatina, la cual es una proteína que actúa igualmente que el suero normal de conejo, los resultados obtenidos fueron semejantes a los del suero normal de conejo, pero no se trabajó con ésta ya que se decidió seguir la técnica de Boyden.

Los sueros que se trabajaron se inactivaron a 56°C durante 30 minutos ya que el complemento lisa los eritrocitos sensibilizados ocasionando errores en la técnica inicialmente se probaron sueros sin desactivar y se observó aglutinación, por lo que se decidió inactivarlos, además de que es más seguro trabajarlos en esta forma ya que al mismo tiempo se inactivan los virus que pudieran estar presentes.

Los sueros se absorbieron con el paquete de eritrocitos de carnero lavados (volumen a volumen durante 10 minutos a temperatura ambiente), esto se realizó para eliminar los anticuerpos heterófilos que podrían aglutinar inespecíficamente a los eritrocitos.

Los sueros que se contaminaron se filtraron a través de una membrana de 0.45µm ya que si se hubieran trabajado contaminados los resultados obtenidos tendrían alterado el título dando falsos negativos.

Igualmente, se pudo observar que cuando los sueros se descongelaban para hacer una determinación y se volvían a congelar nuevamente, los títulos

bajaban, por lo que se tomaron alícuotas y se congelaron en forma individual, con lo cual, cuando se requería, se tomaba la alícuota de manera que las que no se trabajaran se mantuvieran congeladas.

El antígeno que se seleccionó fue el extracto salino de la cepa M-16 de *B. melitensis* Ruiz Castañeda Modificado (RCM-BM) a una concentración de 10.7 mg/ml. Para la determinación de la concentración óptima se realizaron diluciones (1:10, 1:20, 1:40, 1:80) sensibilizándose los eritrocitos con cada dilución del antígeno. La dilución óptima que dio mejor resultado fue la de 1:20 (0.535 mg/ml) ya que fue la más baja concentración de antígeno que dio el más alto título con el suero inmune y no reaccionó con el suero negativo.

La sensibilización de los eritrocitos tñados con el antígeno se llevó a cabo entre 10 y 30 minutos de incubación a 37°C, observándose resultados satisfactorios, aunque se decidió dejar 15 minutos para que se adsorbiera completamente, también se observó que la temperatura ambiente es efectiva para adsorber el antígeno.

Se realizaron tres lavados con SNC al 1% (PBS 7.2) después de la sensibilización para eliminar el antígeno libre, ya que de otra manera se podrían ocasionar aglutinaciones inespecíficas puesto que el antígeno estaría en exceso.

La prueba se llevó a cabo en microplacas de fondo en U y de fondo en V, seleccionando la primera ya que se aprecia mejor la aglutinación y el botón compacto, puesto que en las segundas se observa una diferencia en la forma del sedimento; la aglutinación se observa como puntos discretos, mientras que la no aglutinación se observa como una línea, no distinguiendo claramente estos sedimentos en la de fondo en V. Las lecturas de las microplacas se realizaron

después de dos horas a temperatura ambiente, no encontrando variación en los resultados obtenidos con respecto a las otras lecturas, los resultados cambiaron un título después de refrigerar las placas.

En los 150 sueros de individuos clínicamente sanos y que no presentan infección alguna o síntoma específico, no se excluyó la posibilidad de que presentaran anticuerpos contra alguna de las especies de *Brucella*, por lo que se les realizaron las pruebas serológicas de rutina que se emplean para el diagnóstico de brucelosis (RB y MAP), resultando negativas.

Estos sueros se corrieron por HI para determinar el valor de corte de la técnica, encontrando los títulos entre 1:2 y 1:16, como todavía tres fueron positivos a ésta última dilución, se decidió tomar la siguiente 1:32, como la de valor con significado diagnóstico o valor de corte para la técnica de HI, ya que a esta dilución ningún suero resultó positivo; considerando los títulos iguales o mayores a 1:32 como positivos y los sueros con títulos menores como negativos.

Una vez establecido el valor de corte se analizó el grupo de 214 sueros encontrándose que los resultados de HI muestran correlación con los obtenidos en MAP, a partir de los títulos de significado diagnóstico, es decir que a la dilución en que se consideran como positivos, correlacionan más. De los valores obtenidos, 128 resultaron positivos con ambos métodos, 76 negativos y 10 no coincidieron, observándose que el número de sueros falsos negativos es bajo

Por el contrario, no se observó la existencia de buena correlación entre las pruebas de HI y RB, ya que 132 resultaron positivos con ambas pruebas, 26 negativos y 56 no coincidieron, por lo que la dispersión de los datos es muy

grande, existiendo además un considerable porcentaje de falsos negativos, debido probablemente a que se utilizan diferentes antígenos

Se obtuvo para la técnica de HI una sensibilidad de 97%, una especificidad de 92%, un valor predictivo positivo de 95% y un valor predictivo negativo de 95%, usando como prueba patrón la MAP a una dilución de 1:160 como valor de significado diagnóstico, usándose la estadística descriptiva mediante las tablas de contingencia o de doble entrada. Los porcentajes obtenidos son aceptables ya que se encontró una relación porcentual estrecha entre sensibilidad y especificidad, lo que le confiere confiabilidad a la prueba.

En el trabajo realizado anteriormente por Renoux en 1980 con la técnica de HI, trabajando sueros de humanos y animales, encontró que la técnica es altamente sensible y específica para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus*, empleando como pruebas patrón a la de fijación de complemento y de aglutinación en tubo. Igualmente, Corbel y Day en 1973, determinaron que la HI es más sensible que las pruebas de fijación de complemento, de aglutinación en tubo y de aglutinación en placa con antígeno teñido con rosa de bengala, empleando antígenos diferentes (LPS y Intracelulares) de *Brucella abortus* con sueros de ganado.

No obstante lo mencionado, no se pueden comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los de otros autores, debido a que ellos reportan que la prueba es sensible y específica, pero no mencionan los porcentajes que obtuvieron, además de que se emplearon diferentes antígenos al utilizado en este trabajo y se usó como prueba patrón la MAP.

Como se sabe, el lipopolisacárido se considera, por su inmunodominancia, el antígeno de primera elección para usarse en pruebas serológicas, aunque se

ha demostrado que hay reacciones cruzadas del lipopolisacárido liso de brucela con los lipopolisacáridos de varias enterobacterias, las reacciones cruzadas resultan de la presencia común del N-acetil 4-amino-4,6-dideoxi-D-manosa (N-acetil D-perosamina) en unidades repetitivas en la cadena O del LPS o antígeno somático, tanto para brucela como para algunas enterobacterias.

Para descartar la posibilidad de que se presentaran reacciones cruzadas en la técnica de HI, se corrieron 31 sueros de individuos con diagnóstico de cólera, donde 27 sueros fueron negativos y 4 sueros resultaron positivos (1:32 y 1:64) para HI y de estos mismos, 2 resultaron positivos a RB y MAP, con títulos de 1:320 y 1:640 respectivamente, y los otros dos fueron negativos. Los títulos obtenidos en HI están cercanos al valor de corte, debiéndose probablemente a una reacción cruzada en un porcentaje bajo o a una mayor sensibilidad de HI. Por otro lado, los títulos que se obtuvieron en MAP y RB son significativos no descartando también la posibilidad de una reacción cruzada. Se debe tomar en cuenta el tipo de antígeno que se utiliza en cada prueba y su pureza, ya que entre más puro esté más específica será la prueba, disminuyendo las reacciones cruzadas.

Con respecto a los sueros de *Salmonella*, las pruebas serológicas MAP y RB dieron negativas, obteniendo también títulos bajos en HI, 1:2 a 1:8, que no se consideran como positivos, se descartan así la posibilidad de una reacción cruzada. Se eligieron los géneros *Salmonella* y *Vibrio* debido a que, como previamente se mencionó, presentan reacciones cruzadas con el género *Brucella*.

Se estudió un grupo de sueros de personas del Estado de Puebla aparentemente sanas, por ser un área endémica, en quienes no había antecedentes conocidos de contacto con *Brucella* pero que tenían probabilidades de haberlo

estado. Se les determinó la presencia de anticuerpos anti-brucela, obteniéndose títulos bajos de 1:2 a 1:16 que se consideran como normales, por lo cual se considera ausencia de anticuerpos anti-*Brucella*. Se podría pensar que hubiera una alta incidencia, relacionándose con la ganadería que se practica en dicha entidad y con la relativa deficiencia en el control sanitario de los productos cárnicos y lácteos que allí se manejan. Debido a que sólo se pudo obtener un pequeño grupo de sueros, estos resultados no son determinantes, siendo deseable realizar un estudio con más muestras, para tener valores más representativos y certeros.

Ya que la prueba definitiva para el diagnóstico de brucelosis, es el aislamiento del agente etiológico, se trabajaron 26 sueros con cultivo positivo para *Brucella*, realizándoles las pruebas serológicas, RB, MAP y HI, encontrando que la mayoría presentaba títulos altos por los tres métodos, con excepción de tres sueros que resultaron negativos, debido probablemente, a que cuando se realizaron las pruebas serológicas los títulos habían bajado

Se determinó la reproducibilidad de la técnica HI obteniéndose un 85%. Los 115 sueros positivos conocidos tomados al azar, se probaron en dos diferentes días, para observar si los títulos se mantenían igual o se modificaban, encontrando que 16 sueros cambiaron sólo un título por arriba o por abajo del obtenido en la primera determinación. Como estos representan un bajo porcentaje de los sueros trabajados, se considera aceptable la reproducibilidad de la técnica; sin embargo sería recomendable realizarla en los 7 días de obtenida la muestra para evitar, en lo posible, este problema.

Se analizaron los sueros de personas con diagnóstico de Brucelosis, TABLA II, que obtuvieron el mismo título en la prueba de HI, observándose que los valores de los títulos con las pruebas RB y MAP fueron diferentes,

además de que presentan poca similitud en las tres pruebas por lo que la frecuencia es muy variada, esto se puede deber principalmente, a que el antígeno utilizado así como la escala de dilución no son los mismos, también se toma en consideración que la sensibilidad y la especificidad de cada técnica son diferentes, por lo que es de desearse -y en algunos laboratorios así se realiza- se deben tomar en cuenta sólo los títulos que se consideran positivos para cada método y para dar un diagnóstico, tomar en cuenta el título que presenta el suero en dos técnicas. Se encontró además, que los títulos se van incrementando en MAP y RB a medida que también van aumentando los títulos en HI, es decir que hay un aumento en el número de sueros con título semejante que se consideran como positivos, así como en los títulos de los sueros considerados como negativos, disminuye el número con igual título

Analizando los resultados de la TABLA 12, se encontró que en la frecuencia presentada en los 31 sueros de cólera trabajados, no se observa similitud, por lo que ésta varía. También se encontró que 4 sueros presentan títulos con valor diagnóstico en HI, podría pensarse en la posibilidad de que se trate de una reacción cruzada; sin embargo, se aprecia que con las otras dos técnicas (MAP y RB) los títulos de estos mismos sueros son altos, por lo que queda mucho en duda la presencia de antígenos comunes.

## CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio realizado con las diferentes poblaciones de sueros, la técnica de Hemaglutinación Indirecta mostró ser confiable, sensible, específica, reproducible y con valores predictivos satisfactorios.
- La prueba de Hemaglutinación Indirecta es fácil de realizar y económica, pudiéndose implementar en cualquier laboratorio de diagnóstico ya que no requiere de equipo y reactivos costosos, siendo una opción más para el diagnóstico de la brucelosis humana.

## ANEXO

### Reactivos:

#### Eritrocitos de carnero

La sangre de un carnero se colecta en condiciones estériles en un volumen igual de solución de Alsever, se conserva en refrigeración a temperaturas entre 4 y 8°C.

#### Solución salina-amortiguador de fosfatos, pH 7.2 y pH 6.4

Se preparan 3 soluciones concentradas:

##### a) Solución A

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....21.30 g  
Agua destilada.....1000 ml

##### b) Solución B

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....20.40 g  
Agua destilada.....1000 ml

##### c) Solución C

$\text{NaCl}$ .....8.8 g  
Agua destilada.....1000 ml

PBS pH 6.4 (0.15M)

NaCl.....100 ml

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....32.3 ml

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....67.7 ml

PBS pH 7.2 (0.15 M)

NaCl.....100 ml

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....76 ml

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....24 ml

Solución de Alsever

Dextrosa .....20.50 g

Citrato de sodio (dihidratado)..... 8.00 g

Ácido cítrico (monohidratado).....0.55 g

Cloruro de sodio..... 4.20 g

Agua destilada..... 1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, se ajusta el pH a 6.1. Con esta solución se puede preservar las células (glóbulos rojos de carnero) hasta un mes después de su obtención, empleándose volumen a volumen.

Solución de ácido tánico 1:20,000

Se prepara una solución fresca de ácido tánico al disolver 10 mg de

ácido (grado reactivo) en 10 ml de PBS, pH 7.2. Esta solución 1:10,000 se diluye 1:20 para obtener la dilución 1:20,000 usada en la prueba ( 2.0 ml de 1:10,000 en 38 ml de PBS, pH 7.2). Si las células no muestran efecto de tanizado o si ocurre aglutinación espontánea, se deben probar otras concentraciones de ácido tánico para determinar la óptima dilución para tanizar un lote de células en particular.

#### Solución de suero normal de conejo al 1% (SNC)

Se inactiva el suero de conejo por calentamiento a 56°C durante 30 minutos y se absorbe durante una hora con agitación suave, con un volumen igual de paquete de eritrocitos de carnero lavados.

El suero inactivado se guarda en refrigeración y antes de usarse se vuelve a calentar a 56°C, 10 minutos. Se diluye 1:100 con PBS pH 7.2. Si el diluyente reacciona con los eritrocitos tanizados o los sensibilizados, descartarlos y reemplazarlos con suero de conejo no inactivado.

#### Suero humano

El suero por probar debe calentarse a 56°C durante 30 minutos y absorberse con un volumen igual de paquete de eritrocitos de carnero lavados, durante una hora a 37°C y con agitación suave.

#### Antígenos

Se realizan previamente pruebas con distintas concentraciones del antígeno y un suero conocido para determinar la concentración sensibilizante óptima.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ackroyd J.F.  
IMMUNOLOGICAL METHODS.  
1a. ed.  
Blackwell Sci. Pub.  
Oxford. (1964).
2. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. and Verger J.M.  
LAS TECNICAS DE LABORATORIO EN LA BRUCELOSIS  
2a. ed.  
Editorial Organización Mundial de la Salud.  
Ginebra. (1976).
3. Araj G.F. Profiles of *Brucella*-Specific Immunoglobulin G Subclasses  
in Sera of Patients with Acute and Chronic Brucellosis. *Sdiag Immun.  
Infect. Dis.* 1986; 2: 401-410.
4. Araj G.F., Brown G.M., Haj M.M. and Madhvan N.V. Assessment of  
Brucellosis Card Test in Screening Patients for Brucellosis. *Epidem.  
Inf.* 1988; 100: 389-398.
5. Araj G.F., Lulu A.R., Khateeb M.I., Saadah M.A. and Shakir R.A. ELISA Versus  
Routine Tests in the Diagnosis of Patients with Systemic and  
Neurobrucellosis. *APMIS.* 1988; 96: 171-176.
6. Ariza J. Brucellosis: Algunos Aspectos de su Epidemiología. *Enf. Infecc. y  
Microbiol. Clin.* 198; 7: 517-518.

7. Ariza J., Pellicer T., Pallares R., Foz A. and Gudiol F. Specific Antibody Profile in Human Brucellosis. *Clin. Inf. Dis.* 1992; 14: 131-140.
8. Arribas J.L., Navarro J.F., Hernández M.J., Muniesa M.P., Sarasa J., García J.R., Arazo P., Sarria J. y Aguirre J.M. La Brucelosis en un Hospital Terciario. Estudio Epidemiológico Retrospectivo de 166 casos. *Enf. Infecc. y Microbiol. Clin.* 1989; 7:126-130.
9. Barret J.T.  
INMUNOLOGIA. INTRODUCCION A LA INMUNOQUIMICA Y LA INMUNOBIOLOGIA.  
4a. ed.  
Editorial Interamericana.  
México D.F. (1985).
10. Braude A.I.  
ENFERMEDADES INFECCIOSAS.  
1a. ed.  
Editorial Médica Panamericana.  
Buenos Aires. (1988).
11. Brown L.S., Klein C.G., Mackinney T.F., and Jones L.W. Safranin O-Stained Antigen Microagglutination Test for Detection of *Brucella* Antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 1981; 13: 398-400.
12. Buchanan M.T. and Faber C.L. 2-Mercaptoethanol *Brucella* Agglutination Test: Usefulness for Predicting Recovery from Brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 1980; 11: 691-693.

- 13 Bundle D., Gidney M A , Duncan J.R. and Cherwonogrodzky J.W. Serological Confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 O-Antigens by Monoclonal Antibodies. Infect. Immun. 1984; 46: 389-393.
14. Bundle D.R., Cherwonogrodzky J., Caroff M. and Perry M. B. The Lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. 2nd Forum in Microbiol Ann. Inst. Pasteur. 1986; 92-98.
- 15 Colmenero J de D., Reguera J.M., Cabrera F. de P., Hernández S., Porras J., Manchado P. y Miranda M. T. Empleo Combinado del Rosa de Bengala e inmunofluorescencia indirecta en el Diagnóstico de la Brucelosis. Enf. Infec. y Microbiol. Clin. 1989; 7: 316-320.
16. Corbel M.J. Recent Advances in the Study of *Brucella* Antigens and Their Serological Cross-Reactions. Vet. Bull. 1985; 55: 927-942.
- 17 Corbel M.J 1991. Identification of Dye-Sensitive Strains of *Brucella melitensis*. J. Clin Microbiol. 1991; 29: 1066-1068.
- 18 TESIS  
Delgado G.D.  
Estructura y Propiedades Biológicas de Algunos Antígenos de *Brucella*  
E.N.C.B. I.P.N. Mexico, D.F. 1987.
- 19 Elbert S.S. A Guide to the Diagnosis Treatment and Prevention of Human Brucellosis. W.H.O. VPH. 1981; 31: 115-117.

20. Evans A.S. and Feldman H.A.  
INFECTIONS OF HUMANS. EPIDEMIOLOGY AND CONTROL.  
1a. ed.  
Plenum Medical Book Company.  
New York and London. (1982).
21. Fudenberg H.H., Stites D.P., Stobo J.D., Wells J.V.  
INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA.  
5a. ed.  
Editorial El Manual Moderno.  
México, D.F. (1985).
22. Gazapo E., González L.J., Subiza J.L., Baquero M., Gil J. and De la Concha E.G. Changes in IgM and IgG Antibody Concentrations in Brucellosis Over Time: Importance for Diagnosis and Follow-Up. J. Infect. Dis. 1989; 159: 219-225.
23. González S.N., Torales N.A. y Gómez B.D.  
INFECTOLOGIA CLINICA PEDIATRICA.  
4a. ed.  
Editorial Trillas.  
México, D.F. (1988).
24. Gotuzzo E., Carrillo C., Guerra J. and Liasa L. An Evaluation of Diagnostic Methods for Brucellosis. The Value of Bone Marrow Culture. J. Infect. Dis. 1986; 153: 122-125.
25. Gotuzzo E., Carrillo C., Sears C., Guerra J. y Magulña C. Características Epidemiológicas y Clínicas de la Brucelosis en 39 Grupos Familiares. Enf. Infecc. y Microbiol. Clín. 1989; 7: 519-524.

26. Herbert W.J. and Weir D.M.  
HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY.  
2a. ed  
Blackwell Scientific Publishers.  
Oxford. (1973)
27. Hewitt W.G. and Payne D.J. Estimation of IgG *Brucella* Antibodies  
in Infected and Non-Infected Persons by a Radioimmune Technique. J. Clin.  
Pathol. 1984; 37: 692-696.
28. Hoffmann E.M., Deyoe Billy L., Nicoletti P.L. and Tedder T.F. Conditions for  
Conducting the Indirect Hemolysis Test for Detection of Antibodies to  
*Brucella abortus*. J. Clin. Microbiol. 1980; 11: 402-408.
29. Hunter S.B., Bibb W.F., Shih Ch.N., Kaufmann A.F., Mitchell J.R. and  
Mckinney R.M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Major Outer  
Membrane Proteins of *Brucella melitensis* to Measure Immune Response  
to *Brucella* Species. J. Clin. Microbiol. 1986; 24: 566-572.
30. Jawetz E., Melnick J.L. and Adelberg E.A.  
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA.  
7a. ed.  
Editorial El Manual Moderno.  
México, D.F. (1977).
31. Klein G.C., Behan K.A., Brown S.L. and Couch E.E. Effect of Centrifugation  
and Microagglutination Techniques on *Brucella* Agglutinin Titers. J. Clin.  
Microbiol. 1982; 15: 531-532.

32. Kumate J. y Gutiérrez G  
MANUAL DE INFECTOLOGIA.  
11a Ed.  
Editorial Médica del Hospital Infantil de México.  
México, D.F. (1989).
33. Lennette H. E., Balows A, Hausler J.W. y Truant J.  
MICROBIOLOGIA CLINICA.  
4a. ed.  
Editorial Médica Panamericana.  
Buenos Aires. (1982).
34. López F.R. y García T.S. Valoración *in vitro* de la Actividad de  
Ciprofloxacina Sobre Diversas Cepas de *Brucella*. Comp. Inv. Clin. Lat. Mex.  
1991; 11: 38-40.
35. López M.A. Manual de Técnicas y Procedimientos para el Estudio  
Brucelosis. Secretaría de Salud. INDRE. 1989. México.
36. López M.A., López S. R., Antonio O.D., Hernández M.I. Brucelosis, Avances y  
Perspectivas. Publicación Técnica del INDRE #6. 1991. México.
37. Maes R.K., Hayes M.M. and Newmand J.P. Cryopreserved Erythrocytes  
in Clinical Laboratory Hemagglutination and Hemagglutination Inhibition  
Test. J. Clin. Microbiol. 1985; 22: 659-661.
38. Mittal K.R., Ricciardi I.D. and Tizard I.R. Indirect Hemagglutination  
Employing Enterobacterial Common Antigen and *Yersinia* Somatic

- Antigen: a Technique to Differentiate Brucellosis from Infections Involving Cross Reacting *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol. 1980; 11: 149-152.
- 39 Mongini C., Fernández T., Turovetzky A y Hajos E.S. Comparative Study of Cell-Immunoenzymatic Methods for the Estimation of IgG and IgM Anti-*Brucella* Antibodies in the Diagnosis of Human Brucellosis. J. Appl. Bacteriol. 1990; 69: 86-91.
40. Moriyón I., Gómez M., Alonso U., Riezu-Boj J. and R. Díaz. Serological Response to the Outer Membrane Lipoprotein in Animal Brucellosis. Infect. Immun. 1988; 56: 716-718.
- 41 Roesel C.E.  
IMMUNOLOGY: A SELF INSTRUCTIONAL APPROACH.  
1a. ed.  
Mac Graw Hill.  
U.S.A. (1978).
- 42 Raybould J.G. and Shireen Chantler. Serological Differentiation Between Infected and Vaccinated Cattle by Using Purified Soluble Antigens from *Brucella abortus* in a Hemagglutination System. Infect. Immun. 1980; 29: 435-441.
43. Renoux M. A. Passive Hemagglutination Test for the Detection of *Brucella* Infection. J. Immunol. Methods. 1980; 32: 349-355.

44. Ruiz C.M.  
BRUCELOSIS  
1a ed  
Editorial Prensa Médica Mexicana.  
México, D.F. (1954).
45. Smith LD and Holt J.G.  
BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMIC BACTERIOLOGY.  
9a. ed.  
Williams and Wilkins Co.  
U.S.A. (1984).
46. Stamshorn B. and Nielsen K. The Bovine Immune Response to *Brucella abortus* IV. Studies with a Double Immunodiffusion Test for Antibody Against Antigen A<sub>2</sub>. J. Comp. Med. 1981; 45: 147-153.
47. Tabatabai L.B. and Deyoe B.L. Specific Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay for Detection of Bovine Antibody to *Brucella abortus* J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 209-213.
48. Tedder T.F. and Hoffmann E.M. Immunoradiometric Assay for Examination and Quantitation of *Brucella abortus*-Specific Antibodies Reactive with the Antigens Used in the Indirect Hemolysis Test. J. Clin. Microbiol. 1981; 14: 415-426.
49. Villanueva D.G. y González B.D. Aplicación de la Prueba de Hemaglutinación Indirecta en la Cisticercosis Humana. Rev. Med. Hosp. Gral. 1980; 43: 253-256.

50. William E. and Paul M.D.  
FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY  
2a. ed.  
Raven Press.  
New York (1984).

51. Young E.J. and Corbel M.J.  
BRUCELLOSIS CLINICAL AND LABORATORY ASPECTS.  
2a. ed.  
CRC Press Inc. Boca Raton.  
Florida (1989).