



# Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

IZTACALA

“INMUNOENSAYO ENZIMATICO EN PAPEL  
DE NITROCELULOSA ( DOT - ELISA )  
COMO METODO DIAGNOSTICO EN  
LA BRUCELOSIS HUMANA”

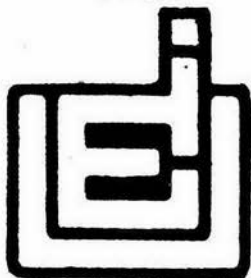
T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

**Juan Gabriel Valle Valdez**



Los Reyes Iztacala,

1992



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

**"INMUNOENSAYO ENZIMATICO EN PAPEL DE  
NITROCELULOSA (DOT-ELISA) COMO  
METODO DIAGNOSTICO EN LA  
BRUCELOSIS HUMANA"**

El presente trabajo, fué realizado  
en el laboratorio de brucelosis,  
del departamento de bacteriología,  
del Instituto Nacional de Diagnóstico  
y Referencia Epidemiológica, de la  
Secretaría de Salud.

**A mis padres:**

A. Armando Valle R.  
Ma. Guadalupe Valdés de V.

A ustedes por su confianza, apoyo  
y esfuerzo puesto en mí, que han  
hecho de mí lo que soy.

**A mis hermanos:**

**Gloria y Armando.**

**A mis sobrinos:**

**Gladys Vianney y Emmanuel.**

**A Dios:**

Por todo lo que me ha dado.

**A:**

**Dra. Ahidé López Merino**, por el apoyo y asesoramiento, puesto en la realización de esta trabajo.

**A:**

**Q.B.P. Roberto Migranas Ortiz**, por esa ayuda, sugerencias y tiempo, dado durante la realización de este trabajo.

**A mis sinodales:**

Por su disposición y aportaciones hechas a éste trabajo.

A todos aquellos, que de alguna manera contribuyeron con sus conocimientos y experiencias, durante la realización de de éste trabajo.

Gracias

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio.

## INDICE

INTRODUCCION .....	1
ANTECEDENTES .....	6
OBJETIVOS .....	8
METODOS.....	9
OBTENCION DE ANTIGENO .....	11
MATERIAL .....	14
METODO DOT-ELISA .....	16
PRUEBA ESTADISTICA .....	20
RESULTADOS .....	21
DISCUSION DE RESULTADOS .....	26
CONCLUSIONES .....	30
REFERENCIAS .....	31



## RESUMEN

" Inmunoensayo enzimático en papel de nitrocelulosa ( DOT-ELISA ) como método diagnóstico en la brucelosis humana "

La brucelosis es una zoonosis típica, que se transmite de un animal a otro, y en forma directa o indirecta al hombre, al consumirse derivados lácteos no pasteurizados, por contacto directo con la bacteria o por inhalación. Se han identificado seis especies que son: **B. abortus**, **B. melitensis**, **B. suis**, **B. canis** y **B. neotomae**, de donde **B. melitensis** es la más común en países en desarrollo incluyendo el nuestro.

La molécula de lipopolisacárido que es el antígeno dominante de las brucelas, está compuesta de una cadena polisacáridica ó antígeno "O" específico, un polisacárido central y un lípido "A". Se ha demostrado reactividad cruzada del lipopolisacárido liso de **Brucella** con el lipopolisacárido de algunos géneros de enterobacterias, y se debe a que presentan estructuras semejantes como el caso de **Yersinia enterocolitica** serotipo O:9 donde la cadena "O" específica de su lipopolisacárido, es idéntico al de **B. abortus**. Hasta hoy en día la célula intacta ha sido el antígeno más empleado, sin embargo se ha tratado de introducir el uso de fracciones celulares más o menos purificadas como el lipopolisacárido liso y fracciones proteicas, en sistemas inmunoenzimáticos.

Se obtuvo el lipopolisacárido de la cepa M-16 de **Brucella melitensis** que fué utilizado para las técnicas inmunoenzimáticas, en donde de los 152 sueros de pacientes, se encontraron 41 sueros negativos, 13 con título 1:40, 16 con 1:80, 18 con 1:160, 20 con 1:320 y 44 con 1:160. En base al valor de corte obtenido por la técnica de ELISA en placa, señaló que a la dilución 1:160 para la técnica DOT-ELISA se consideraría como de valor diagnóstico, ya que se obtuvo una sensibilidad de 96.25% y una especificidad de 84.78%.

De el ensayo que se realizó para ver si existía reacción cruzada con el género **Salmonella**, se encontró que de los 20 sueros probados, ninguno dió positivo en la prueba DOT-ELISA. Se obtuvo una reproducibilidad de 94% para la técnica DOT-ELISA.

En conclusión se encontró que la técnica es sensible, específica y reproducible, siendo confiable en el diagnóstico de la brucelosis humana.

## INTRODUCCION

La brucelosis es una antropozoonosis típica que se transmite de un animal a otro y en forma directa ó indirecta al hombre, la transmisión interhumana no ha sido prácticamente reportada.

Las brucelas fuéron aisladas por primera vez en 1887 por el médico David Bruce, de los bazos de soldados que morían a causa de la infección en la isla de Malta (17). El reservorio del germen fue descubierto hasta 1904, cuando se aisló e identificó a partir de la leche y orina de cabras aparentemente sanas; el segundo microorganismo del grupo fué aislado por Bang en Dinamarca en 1897, de ganado que padecía el aborto infeccioso, el tercero fué cultivado en Estados Unidos en 1914 del feto de una cerda prematuramente expulsado. En los años veinte, Evans reconoció que los tres microorganismos estaban estrechamente relacionados y fueron incluidos en un género aparte, **Brucella**. (9) En México Pláceres reportó el primer aislamiento de **B. melitensis** en 1921 en la ciudad de Puebla.(25)

Se han identificado seis especies que son : **B. abortus** que infecta preferentemente a bovinos, **B. melitensis** a caprinos, **B. suis** a porcinos, **B. ovis** a ovinos, **B. canis** a cánidos y **B. neotomae** a roedores. Aunque todas estas especies están distribuidas en el mundo, **B. abortus** es la de mayor prevalencia en Norte America y Europa, en tanto que **B. melitensis** es la más común en países en desarrollo incluyendo el nuestro.(1,25)

Respecto a la incidencia de esta enfermedad en humanos en México, la Secretaría de Salud, ha reportado en los últimos seis años un total de 25284 casos, lo cual da un promedio de 4214 casos por año. Existe una mayor incidencia de esta enfermedad en los estados del Centro y Norte del país, lo cual podría estar relacionado con la intensa ganadería que se practica en dichas entidades, y a la relativa deficiencia en el control sanitario de los productos cárnicos y lácteos que allí se manejan y se consumen. En general existe una notable subnotificación entre otras cosas porque se carece de un diagnóstico adecuado, ya que la mayoría de las veces, este se efectúa sólo en forma clínica sin recurrir al laboratorio para confirmarlo.(12,35)

A pesar de que existe una preferencia de las diferentes especies de **Brucella** por determinados hospederos, todos los animales son de hecho susceptibles a todas las especies en menor o mayor grado. En éstas, las brucelas muestran una sorprendente predilección a localizarse en el útero grávido (causando frecuentemente el aborto) y en las glándulas mamarias, al parecer animales aparentemente sanos pueden expulsar brucelas en la leche durante años. A diferencia de lo que ocurre en los animales, en el hombre tiende a localizarse generalmente en los órganos del sistema fagocítico mononuclear en donde desarrolla granulomas. (10,38)

La brucelosis es una zoonosis que persiste en regiones del mundo donde no ha sido controlada en las diversas especies animales, y por lo tanto la transmisión de la infección a humanos ocurre frecuentemente a través de las siguientes vías:

a) INGESTION: Es la más frecuente, debido a que el consumo de leche y sus derivados no pasteurizados es una práctica extendida en muchos lugares. En este caso la bacteria penetra a través de la mucosa intestinal.(38)

b) CONTACTO DIRECTO: La brucela penetra a través de heridas en la piel ó por conjuntiva, siendo ésta la vía más frecuente de infección de veterinarios, tablajeros, agricultores, caballerangos, etc. En dichos casos la condición determinante es el manejo de material altamente contaminado sin ninguna medida de protección.(38)

c) INHALACION: La infección se lleva a cabo al respirar sustancias desecadas, provenientes de los animales infectados, así como polvo de corrales, polvo de lana, y también aerosoles formados dentro del laboratorio, etc.(38)

Se debe de sospechar de brucelosis humana en aquellos individuos que:

- \* Sean originarios de zonas endémicas.
- \* Hayan permanecido por algún tiempo en ellas.
- \* Hayan ingerido productos lácteos de origen dudoso.
- \* Hayan tenido contacto estrecho con animales de dichas zonas.
- \* Presenten los siguientes síntomas: fiebre, escalofrío sudoraciones nocturnas, malestar general, dolor de cabeza y articulaciones y presenten debilidad.

La brucelosis humana tiene un periodo de incubación de 2 a 3 semanas que puede prolongarse por 3 a 4 meses, la principal vía de entrada de las brucelas, la constituye el aparato digestivo al consumirse productos lácteos contaminados, los microorganismos pasan del sitio de entrada por vía linfática a los ganglios regionales, en donde parte de las bacterias son destruidas y parte de ellas alcanzan sangre periférica, ahí son fagocitadas por los leucocitos polimorfonucleares que en muchos casos son incapaces de matarlas por lo que las transportan y facilitan su localización posterior en los órganos ricos en células del sistema fagocítico mononuclear (hígado, bazo, médula ósea y riñón ). Los bacilos quedan en vacuolas fagocíticas en los leucocitos y ahí se multiplican; los leucocitos se rompen liberando material antigénico, lo cual activa los mecanismos formadores de anticuerpos, y por otro lado, las células fagocíticas del sistema reticuloendotelial ingieren las bacterias, que persisten dentro de ellas durante semanas ó meses. (16)

Las brucelas son coccobacilos o bacilos cortos Gram negativos, de extremos redondeados con un diámetro de 0.5 micras y una longitud máxima de 1.5 micras, son inmóviles, no esporuladas, no presentan cápsula, ni pili, su envoltura celular es similar a la descrita para la mayoría de las bacterias Gram negativas. Está formada por la membrana externa y una capa intermedia de péptidoglicana, ambas constituyen la pared celular y separada por un espacio periplásmico se encuentra la membrana interna ó la membrana citoplasmática. (7,10)

La membrana externa se observa al microscopio electrónico como una capa triple ondulada, compuesta fundamentalmente de fosfolípidos, proteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos, éste último en las células lisas, es uno de los componentes antigénicos que participa de manera relevante en las pruebas serológicas usadas generalmente en el diagnóstico; los determinantes antigénicos A y M son componentes del lipopolisacárido, y están presentes en todas las cepas lisas.(11)

Se ha demostrado que el lipopolisacárido liso ( S-LPS) de **Brucella** con actividad endotóxica se separa principalmente de la fase fenólica cuando las células lisas se tratan con fenol-agua, de acuerdo al método descrito por Westphal, a diferencia del S-LPS de la mayoría de las bacterias Gram negativas que se recupera en la fase acuosa. Esta fracción ha sido estudiada y se ha encontrado que contiene cantidades pequeñas de lípidos y concentraciones variables de KDO en donde no se ha demostrado que exista actividad endotóxica significativa.(11)

El diagnóstico clínico de la brucelosis, es frecuentemente difícil de establecer, particularmente en la forma subclínica y crónica, en donde los síntomas pueden ser relativamente inespecíficos, la única prueba definitiva para establecer el diagnóstico de brucelosis es el aislamiento del agente etiológico. Lo cual no siempre se realiza ya que el microorganismo requiere de varios días para su desarrollo, en medios de cultivo adecuados, situación que sólo en algunos casos se cumple por lo que los cultivos de **Brucella spp.** frecuentemente son negativos, por éste y otros motivos se recurre preferentemente a la utilización de métodos serológicos como pruebas indirectas de diagnóstico. (13,14)

Los métodos serológicos empleados convencionalmente para el diagnóstico de la brucelosis emplean como antígeno suspensiones en fase lisa (1, 14), los más recomendados son:

a) AGLUTINACION LENTA EN TUBO: Ha sido el principal método serológico empleado hasta ahora, se ha observado que en algunas infecciones localizadas y en procesos en fase crónica los títulos son bajos y pueden llegar a ser negativos, en cambio en un proceso agudo tienden a ser elevados en general, ésta prueba determina aglutininas de la clase IgA, IgM e IgG.

b) AGLUTINACION LENTA EN TUBO EN PRESENCIA DE 2-MERCAPTOETANOL: Esta solo determina anticuerpos de la clase IgG e IgA, ya que la actividad aglutinante de inmunoglobulinas IgM es destruida por la acción del mercaptoetanol, por lo que se considera ésta prueba la mas indicada para determinar una infección activa.

c) AGLUTINACION EN PLACA: Es la prueba rápida que utiliza el reactivo de Huddleson, y aunque su especificidad y sensibilidad es baja comparada con las otras, en el país sigue siendo la prueba de diagnóstico más ampliamente empleada.

d) AGLUTINACION EN PLACA CON ROSA DE BENGALA: Emplea el antígeno Rosa de Bengala, éste reactivo se ajusta a un pH de 3.6 , con la finalidad de disminuir las reacciones de aglutinación inespecíficas. Ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad en sueros que contienen anticuerpos de las clases IgA, IgG e IgM. (1,15)

Todos los métodos antes descritos en general, ponen de manifiesto los anticuerpos producidos contra lipopolisacárido (LPS) los que también pueden ponerse en evidencia por una variedad de métodos como, RIA, precipitación en gel y ELISA, utilizando al lipopolisacárido crudo ó purificado. (6,21)

La molécula de LPS que es el antígeno dominante de las brucelas, está compuesta de una cadena polisacáridica ó antígeno "O" específico, un polisacárido central y un lípido A. Esta molécula contiene los determinantes antigénicos "A" y "M" que han sido de gran valor para diferenciar las principales especies de cepas lisas de *Brucella*. La cadena "O" ha sido caracterizada como un homopolímero lineal de unidades de perosamina ( alfa D-manopiranosil, 4-6 didesoxi, alfa 4 formamido ). La diferencia estructural hasta ahora determinada entre el antígeno "A" y "M", es que en el primero las unidades de perosamina están ligadas por unión alfa 1-2, mientras que en el "M" el antígeno está representado por una unidad repetitiva formada por una perosamina ligada por unión alfa 1-3 y 4 perosaminas por unión alfa 1-2. (11,9)

Se ha demostrado reactividad cruzada del lipopolisacárido liso de *Brucella*, con el LPS de *Vibrio cholerae*, *Salmonella urbana* del grupo N, y *Escherichia coli* serotipo O:157, y la más estudiada ha sido la que se presenta con *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9 y se debe a que la estructura de la cadena "O" específica de su LPS, es idéntica a la del LPS de *Brucella abortus*. (3,8,13,24)

La prueba de ELISA ha sido estudiada por diversos autores, empleando como antígeno: suspensiones bacterianas lisas, extractos ricos en lipopolisacárido, lipopolisacárido purificado, polisacárido, extractos proteicos y sonicados. Dadas las cualidades de la prueba algunos autores han concluido que el método de ELISA posee mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de casos agudos y crónicos de brucelosis. (14,16,18,20,30) Podría ser el indicado para sustituir las técnicas comunes hasta ahora empleadas, ya que la efectividad de el método de ELISA va a depender del tipo de antígeno que se utilice. (26,36)

En los sistemas de inmuno ensayo enzimático, se fija uno de los participantes de la reacción antígeno-anticuerpo a una fase sólida, los anticuerpos ó antígenos se van

a fijar por adsorción ó por uniones covalentes dependiendo de la naturaleza de la fase sólida. Todos los reactivos que no interactuen con los reactantes de la fase sólida son eliminados por procesos de lavado. (29)

Los espacios en donde no se haya fijado el antígeno, se bloquean con sustancias que no participan en la reacción, tales como aminoácidos ó algunas proteínas, posteriormente se pone a interactuar la muestra de la cual se desea conocer el contenido de anticuerpos contra el antígeno fijado a la fase sólida. Unicamente estos anticuerpos, si están presentes, quedarán unidos. Después de un proceso de lavado, se agrega la enzima conjugada al segundo anticuerpo anti inmunoglobulina para que reaccione con el complejo antígeno-anticuerpo que está fijo a la fase sólida; de nuevo después de un proceso de lavado todo el conjugado que no haya reaccionado es eliminado. Finalmente se agrega el sustrato apropiado para la enzima, la actividad enzimática sobre el sustrato dará como resultado una coloración que se observará sobre la fase sólida. En donde la cantidad de coloración desarrollada es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra. (29)

Las enzimas son catalizadores biológicos, que incrementan el índice de reacción química sin verse alteradas por dicha reacción. En los métodos directos de inmuno ensayo enzimático el anticuerpo específico contra el antígeno es el que lleva unida la enzima, en cambio en los métodos indirectos, el conjugado enzima-anticuerpo está dirigido contra un primer anticuerpo el cual ya reaccionó con el antígeno, el método de inmuno ensayo enzimático indirecto ha tenido mucha aplicación en la búsqueda de anticuerpos contra agentes infecciosos como el caso de **Brucella**. (29)

## ANTECEDENTES

Se sabe que el lipopolisacárido es el principal componente reactivo que participa en las pruebas convencionales de diagnóstico, por lo que se considera que es el antígeno de elección primaria por su naturaleza inmunodominante.

Hasta nuestros días la célula intacta sigue siendo el antígeno más empleado. Sin embargo en años recientes se ha tratado de introducir el uso de fracciones celulares mas o menos purificadas como el S-LPS y fracciones proteicas, en sistemas de Inmunoensayo enzimatico. De entre ellos vale la pena analizar algunos de los sistemas empleados:

Rupparner y col. (1980) utilizaron como antígeno un sonicado de *B. abortus* y realizaron una comparación entre la prueba de ELISA y otras pruebas serológicas. Ellos encontraron una correlación del 100% con la de aglutinación en tubo y del 95% con la de fijación de complemento.

En su método de ELISA, Hunter y col. en 1989, emplearon como antígeno proteínas de la membrana externa de una cepa lisa de *B. melitensis*. Encontraron que éstas proteínas eran capaces de identificar las infecciones causadas en humanos, por *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. canis*.

Algunos autores han empleado como fase sólida en el sistema, papel de nitrocelulosa (DOT-ELISA), sobre todo al estudiar sueros de animales, y se tiene la siguiente experiencia:

Uribe (1988) estudio 323 sueros de ovinos, utilizando la técnica DOT-ELISA, con antígeno celular y fraccionado de *B. ovis*. Los resultados obtenidos en la prueba de DOT fueron comparadas con las pruebas convencionales, tomando como prueba patrón la de fijación de complemento, los resultados fueron similares en ambas pruebas y encontraron resultados significativos en la dilución de suero de 1:100 con antígeno celular y 1:50 con antígeno fraccionado, por lo que concluyeron que la técnica DOT era recomendable para el diagnóstico de brucelosis ovina ya que era rápida, fácil de ejecutar e interpretar.



En experimentos con sueros de bovinos tendientes a poner de manifiesto anticuerpos de *Brucella* por el método de DOT-ELISA, Batra y col. en 1989 emplearon como antígeno un extracto soluble de *B. abortus* 99 S, éste fué depositado sobre discos de papel de nitrocelulosa, utilizando leche descremada como bloqueador y trabajando con diluciones de los sueros 1:800 y 1:600, se usó peroxidasa como conjugado y diamino benzidina como sustrato. El resultado fué un desarrollo de color café en el disco de papel de nitrocelulosa en aquellos sueros positivos, y ausencia de color en aquellos sueros negativos.

Alonso y col. (1990) analizaron 200 muestras de suero de cerdos, por el sistema DOT-ELISA, utilizaron un antígeno proporcionado por CEPANZO, usaron diluciones del suero 1:50 y 1:100, con conjugado anti IgG porcino marcado con peroxidasa, y como sustrato el 4 cloro 1 naftol. Para el desarrollo de la técnica, ellos utilizaron un aparato ( BIO-DOT ) que les permitió el análisis simultáneo de varias muestras, consideraron como reacción positiva una coloración violeta en los círculos de papel, y una reacción negativa en aquellos que no había desarrollo de color. Los resultados se compararon con la prueba de fijación de complemento (utilizada como prueba patrón) y encontraron significancia diagnóstica a la dilución 1:200 en la prueba de DOT-ELISA, éste método fué el que alcanzó mayor correlación entre sensibilidad y especificidad, ( 50% y 97% respectivamente).

Por otro lado Rojas y col.(1990) Utilizaron en el sistema DOT antígeno de *Brucella abortus* III9-3 tanto celular, como fraccionado (LPS-S), empleando para el desarrollo de la técnica el aparato BIO DOT como en el trabajo anterior, para la realización simultánea de numerosas muestras. Encontraron resultados significativos en la dilución 1:200 de los sueros al utilizar células completas como antígeno y a la dilución 1:100 de los sueros cuando utilizaron antígeno lipopolisacárido liso. Al final vieron que la técnica DOT-ELISA demostró una sensibilidad y especificidad, más cercana a fijación del complemento, en razón a ello y a la facilidad de ejecución de la prueba, se estima posible su inclusión como método de diagnóstico de brucelosis animal.

Por otra parte Mongini y col. (1990) realizaron un estudio comparativo de dos métodos inmunoenzimáticos para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-brucela, en los dos métodos emplearon como antígeno células enteras, ellos obtuvieron para la prueba de Dot-ELISA una correlación de 100% para IgG y un 97% para IgM, al compararla con la prueba de fijación de complemento y aglutinación, y cuando usaron la prueba de ELISA, encontraron que el 11% de sueros positivos no fueron detectados por ésta técnica, la comparación de éstas dos técnicas enzimáticas con las pruebas serológicas convencionales, indicaron que ambas DOT-ELISA y ELISA, son sensibles, reproducibles y específicas para la cuantificación de anticuerpos IgG e IgM, y que son recomendables para el diagnóstico de brucelosis humana.



## OBJETIVOS

A) Desarrollar la técnica de DOT-ELISA, para determinar anticuerpos contra **Brucella**.

- Obtener y purificar lipopolisacárido a partir de la cepa lisa M-16 de **Brucella melitensis**, para ser utilizado como antígeno para identificar anticuerpos contra el género **Brucella**.

- Estandarizar el método de DOT-ELISA.

B) Evaluar su uso en el diagnóstico de la brucelosis humana.

- Realizar el estudio de sueros de individuos sospechosos de la enfermedad, un grupo de individuos clínicamente sanos y un grupo de individuos con salmonelosis, para la valoración de la técnica.

## MATERIAL Y METODO

Se obtuvieron 152 muestras de sangre de individuos provenientes de diversas zonas del país que acudieron al laboratorio de brucelosis del INDRE para que se les efectuara el diagnóstico, así como 92 sueros de personas clínicamente sanas del laboratorio de análisis clínicos de la ENEPI y 20 sueros del Banco de sangre del IMSS que fueron negativos a *Brucella* pero positivos a *Salmonella*. La muestra de sangre obtenida de los pacientes fue de aproximadamente 10 ml, de los cuales 5 ml fueron puestos en un frasco con medio bifásico para cultivo, y el resto se utilizó para diagnóstico serológico, se colocó la sangre en un tubo y se dejó a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos, cada suero se colocó en viales y se guardó en refrigeración para su uso posterior.

### EXAMENES SEROLOGICOS

Las pruebas realizadas para cada muestra de suero fueron las siguientes:

- \*Agglutinación en placa con antígeno Rosa de Bengala
- \*Microagglutinación en placa con antígeno de *Brucella melitensis*.
- \*Prueba de ELISA
- \*Prueba de DOT-ELISA

**AGLUTINACION EN PLACA:** Con antígeno acidificado ( Rosa de Bengala ), elaborado por el laboratorio de brucelosis del INDRE a partir de la cepa 99s de *Brucella abortus*. Se efectuó en una placa de vidrio donde se pusieron en contacto 40 microlitros del suero y con un gotero calibrado una gota de aproximadamente 30ul del reactivo ( Ag ) se homogenizaron y se observó la presencia o ausencia de aglutinación en un lapso no mayor de 4 minutos.

#### MICROAGLUTINACION EN PLACA

Utilizando antígeno de *Brucella melitensis*, normalizado para la prueba en tubo.

- 1.-Se colocaron en el primer pozo 180 ul de solución salina fenolada y 100 ul a los 9 pozos restantes.
- 2.-Se añadieron 20 ul de suero al primer pozo obteniendo así un volumen final de 200ul.
- 3.-Se tomaron 100ul del primer pozo y se pasaron al segundo, de aquí se tomaron 100 ul y se pasaron al tercero y así sucesivamente con los restantes, al final se desecha los 100ul del último pozo.
- 4.-Se agregó a todos los pozos 100 ul de antígeno diluido con solución salina fenolada.
- 5.-Se incubó a 37 grados centígrados durante 24 horas.
- 6.-Se examinó la aglutinación, por medio de una fuente luminosa colocada por arriba de la placa y un espejo colocado por abajo, observando el grado de clarificación que presenta cada pozo se determina el título.

## PRUEBA DE ELISA

- El antígeno LPS de *B. melitensis* M-16 se diluyó en amortiguador de fosfatos pH 7.4 a una concentración de 1 µg/ml, se colocaron 100 µl del antígeno por duplicado en pozos de placas marca Corning ( poliestireno ) para cada una de las muestras y 100 µl del amortiguador en un pozo que funcionaba como testigo de suero, se mantuvo la placa a temperatura ambiente durante 18 horas.
- Se eliminó el contenido de las placas por decantación y se agregó el bloqueador que fué leche descremada al 12% en amortiguador de fosfatos pH 7.4, se colocaron 100 µl en cada pozo y se incubó a 37 grados centígrados por una hora.
- Se realizaron 5 lavados con regulador de fosfatos + Tween 20 al 0.05% (PBS-T).
- Las diluciones de los sueros se realizaron con PBS-T, colocando 100 µl a 2 pozos porque la prueba se realizó por duplicado, y un tercero como testigo de suero, incubándose la placa durante una hora a 37 grados centígrados.
- Se realizaron cinco lavados con regulador PBS-T.
- La dilución del conjugado, se realizó con regulador PBS-T y se colocaron 100 µl a cada pozo, incubándose a 37 grados centígrados por una hora.
- Se realizaron 5 lavados con regulador PBS-T.
- A cada pozo se añadió 100 µl del sustrato, que se preparó de la siguiente manera: A 10 mg de orto-fenilendiamina en 25 ml de regulador de citratos 0.025 M pH 5.0, se agregaron 10 µl de peróxido de hidrógeno. Se colocó la placa en obscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos, al término del tiempo se paró la reacción con ácido sulfúrico 8 N, colocándose 50 µl a cada pozo.
- Las placas se leyeron en un lector de ELISA (Dynatech) con filtro de 490 nm.

## PRUEBA DE INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO EN PAPEL DE NITROCELULOSA ( DOT- ELISA )

### Soluciones y Reactivos:

- Regulador fosfato salino (PBS) 0.01 M pH 7.4  
Utilizado para sensibilizar las membranas, diluir el antígeno y el bloqueador, además de usarse como solución de lavado.
- Regulador fosfato salino + 0.05% de tween 20 (SIGMA) 0.01 M pH 7.4 ( PBS-T) usado para la dilución de los sueros, conjugado y como solución de lavado.

## ANTIGENO

El antígeno empleado fué el lipopolisacárido liso (LPS-S) de *Brucella melitensis* cepa M-16, que se obtuvo y purificó de acuerdo a la metodología propuesta por Cherwonogrodsky y col. (9) que consistió en lo siguiente:

1. La cepa de *Brucella melitensis* M-16, se encontraba en criotubos congelada a -70 grados centígrados, se descongeló y se procedió a sembrar en frascos semilla colocando 0.2ml de la suspensión, a la vez se sembró en una placa con gelosa TSA y se incubaron ambos 24 horas, la siembra en placa fué para determinar pureza por morfología colonial y microscópica, disociación tanto por aglutinación con acriflavina cómo por tinción de colonias con cristal violeta. Al transcurrir el tiempo de incubación se agregó al tubo 3ml de caldo brucela para resuspender el crecimiento y se inoculó éste en los frascos semilla colocándoles 1ml de la suspensión y se pusieron a incubar por 24 hrs. a 37 grados centígrados, realizando también en éste paso siembra en placa para las pruebas de control.

2. La producción de la masa celular se llevó a cabo en medio sólido ( 17.5g Medio para Antibióticos No.3, 2.5g casaminoácidos, 9.0g Dextrosa, 1.5g NaCl, Agar 2.5% y 1000ml de agua destilada ), se inactivaron las bacterias agregando fenol hasta alcanzar una concentración final de 0.5% y se dejaron 72 horas en refrigeración, posteriormente se cosecharon por centrifugación y se realizaron tres lavados con solución salina fenolada al 0.5% estéril.

3. Se resuspendió en tris salino ( 1% NaCl, 0.02%  $\text{NaN}_3$ , 0.12% tris, 2% fenol, pH 7,0 ) se elevó la temperatura a 70 grados centígrados, al mismo tiempo de elevar la temperatura de un volumen equivalente de 95% de fenol a 70 grados centígrados, se adicionan las dos y se agitó por 30 minutos a la misma temperatura.

4. Se colocó esta mezcla en tubos de centrifuga y se almacenó a 4 grados centígrados por un día, se centrifugó a 20 000 X g por 40 minutos, con una pipeta Pasteur se removió la capa de fenol y se guardó el restante, para realizarr una segunda extracción.

5. A la fase fenólica se adicionaron 5 volúmenes de metanol + 1% de acetato de sodio, se enfrió una noche a 4 grados centígrados para que precipitara el lipopolisacárido, se centrifugó a 20 000 X g por 20 minutos y se separó el paquete, posteriormente se disolvió en un pequeño volumen de regulador tris salino sin fenól, y se dializó contra regulador tris salino durante 24 horas.

6. Una vez que estuvo completa la diálisis, se adicionaron 25 ug/ml de lisozima, ribonucleasa y desoxirribonucleasa; se incubó por 6 horas a temperatura ambiente con agitación, y se adicionaron 50 ug/ml de proteinasa K, se incubó por 48 horas a temperatura ambiente con agitación, y se dializó contra solución salina a 4 grados centígrados.

7. Se realizó una centrifugación baja (10 000 X g a 4 grados centígrados por 15 minutos ) para remover los restos, y se efectuó una centrifugación a 100,000 X g por 18 horas a 4 grados centígrados, el sedimento con aspecto seroso éra el lipopolisacárido liso, se eliminó el sobrenadante y se redisolvió en piridina 0.5 molar y ác. acético ( 1 ml de cada uno en 250 ml de agua destilada, pH final 4.7 ).

8. Se pasó esta muestra a través de la columna de Sephadex G 50 usando para la elución el regulador piridin-ác.acético, se concentraron y envasaron aquellas fracciones que dieron un índice de refracción diferente a la del blanco ( medido con un refractómetro de Abbe ).

Para la estandarización de la Técnica DOT-ELISA, se probó lo siguiente:

- 1.- Diferentes tipos de reguladores (tris salino, boratos, fosfatos, acetatos, citratos, carbonatos ).
- 2.- Tipos demembrana de nitrocelulosa de diferente porosidad (0.8,0.22 y 0.45 micrometros ).
- 3.- Concentración de suero.
- 4.- Concentración de antígeno.
- 5.- Tipos de bloqueador.
- 6.- Diferentes diluciones del conjugado anti-gamma globulina humana-peroxidasa (1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000 y 1:5000).
- 7.- Diferentes sustratos.

La técnica de DOT-ELISA en papel de nitrocelulosa es una modificación al procedimiento clásico, y consiste en:

- a) Sensibilizar las membranas con el regulador por un lapso de tiempo, transcurrido éste se colocarán en papel secante hasta que estén completamente secas.
- b) Ya secas las membranas se procede a fijar a ellas el antígeno previamente diluido en regulador y dejarlo un lapso de tiempo.
- c) A continuación se procede a bloquear las partes donde no se pegó el antígeno.
- d) Una vez bloqueada, se procede a colocar la muestra diluida de suero e incubarla, a continuación realizar lavados.
- e) Seguido de ésto, se procede a colocar el conjugado incubándose determinado tiempo y seguido de lavados.
- f) Finalmente se coloca el sustrato, dejando que actúe en la oscuridad, y la reacción se detiene con agua destilada posteriormente a la aparición del color.

En donde hay aparición del color se considera como reaccionante ó positiva comparando éste color, con el desarrollado con los sueros controles. También se pondrán controles de antígeno y de regulador.

Por medio de las técnicas de microaglutinación en tubo y con mercaptoetanol, Rosa de Bengala, se seleccionaron los sueros, para ser utilizados en la técnicas de DOT-ELISA.

Durante el desarrollo de la técnica se tomó una temperatura estándar (37 grados centígrados) y se realizó en agitación. Para las incubaciones y lavados, se variaron los tiempos para ver cual período se tomaría, siendo éstos ( 3 de 10 y de 5 minutos, 4 de 3 minutos y 5 de 1 minuto) para los lavados, y para las incubaciones de (5,10,15,30 y 60 minutos).

## MATERIAL

### MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO CELULAR;

NaCl 1.5g, Baker  
Casaminoácidos 2.5g, Difco  
Medio para Antibioticos No.3 Difco 17,5g  
Dextrosa 9.0g, Baker

Regulador TRIS salino  
Fenol  
Metanol  
Centrífuga refrigerada  
Refractómetro  
Centrífuga clínica  
Frascos semilla (80 ml)  
Botellas Roux  
Membrana de diálisis  
Piridina  
Ac. acético  
Columna de Sephadex G 25-50  
Tubos

### ENZIMAS:

Lizosima Sigma  
Ribonucleasa Sigma  
Desoxirribonucleasa Sigma  
Proteinasa K Sigma

## DOT-ELISA

### Reguladores:

	NaCl 10 g
	NaN <sub>3</sub> 0.2 g
TRIS SALINO	TRIS 1.2 g
	Agua destilada 1000ml.
	pH 7.5

BORATOS            Ac. bórico 0.618 g  
Tetraborato de sodio 0.953 g  
NaCl 0.438 g  
Agua destilada 100ml  
pH 8.4

FOSFATOS            NaCl 8 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g  
KCl 0.2 g  
Agua destilada 1000ml  
pH 7.4

ACETATOS            A) Ac. acético 1.14ml en 100ml de H<sub>2</sub>O  
B) Acetato de sodio 5.44g en 200ml de H<sub>2</sub>O  
Medir de la A) 74ml y de la B) 176ml y aforar a 500ml con  
agua destilada  
pH 5.0

CITRATOS            Ac. cítrico 0.51 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.73 g  
Agua destilada 100ml  
pH 5.0

CARBONATO            Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.15 g  
NaHCO<sub>3</sub> 0.293 g  
Agua destilada 100ml  
pH 8.6

Membrana:

De diferente porosidad 0.22 um., 0.8 um. y 0.45 um (Millipore) y 0.45um MSI.

Bloqueadores:

albúmina sérica humana 2%  
leche descremada 12%  
glicina 2%



Conjugados:

Marca Sigma  
Marca Cappel

Sustratos:

Peróxido de Hidrógeno con 4 cloro alfa Naftol  
Peróxido de Hidrógeno con 3 amino 9 etil carbazol

Lavados con:

Tween 20

MATERIAL:

Agitador  
Probetas  
Potenciómetro  
Pipetas  
Balanza Analítica  
Matraces  
Balanza Granataria  
Pipetas automáticas

## **ESTANDARIZACION DEL METODO DE DOT-ELISA**

### **REGULADORES:**

1.-Se probó primero el regulador de carbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ;  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.6) en todo el sistema, colocándose una concentración de antígeno de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , en los cuatro tipos de membranas, usando como bloqueador glicina (2%), usando como conjugado el de Sigma y como sustrato el 4 cloro alfa naftol, utilizando los cuatro tipos de membranas y trabajando con suero control positivo y negativo.

2.-Se realizaron varios experimentos como el anterior en donde la variante a probar en cada uno, solo fue el regulador, ( carbonatos, boratos, fosfatos, tris. )

## SUSTRATOS

A continuación se realizó todo el experimento anterior, tomando solamente como variable al sustrato, utilizando el 3 amino 9 etil carbazol.

## CONJUGADOS

El sistema se desarrolló, variando los conjugados, pero sólo con 2 tipos de reguladores y un solo tipo de sustrato que fueron los que mejor resultado dieron en los experimentos anteriores, trabajándose de la siguiente manera:

Regulador	Membranas	Ag	Conjugado	Sustrato
a) TBS	los 4 tipos	1ug/ml	Sigma(1:3000)	Carbazol
b) PBS	los 4 tipos	"	Sigma "	Carbazol
c) TBS	los 4 tipos	"	Cappel(1:20000)	Carbazol
d) PBS	los 4 tipos	"	Cappel "	Carbazol

## BLOQUEADORES

Siguiendo la misma metodología del sistema, se procedió a probar los bloqueadores que se tenían, utilizando las variantes siguientes.

Regulador	Membranas	Ag	Bloqueador	Conjugado	Sustrato
a) PBS	los 4 tipos	1ug/ml	Glicina 2%	Sigma	carbazol
b) TBS	los 4 tipos	1ug/ml	Glicina 2%	Sigma	carbazol
c) PBS	los 4 tipos	1ug/ml	Albumina2%	Sigma	carbazol
d) TBS	los 4 tipos	1ug/ml	Albumina2%	Sigma	carbazol
e) PBS	los 4 tipos	1ug/ml	Leche Desc.12%	Sigma	carbazol
f) TBS	los 4 tipos	1ug/ml	Leche Desc.12%	Sigma	carbazol

## MEMBRANAS

La evaluación de los diferentes tipos de membranas, se llevó acábó utilizando las variantes antes seleccionadas.

MEMBRANAS	0.8 micrometros (um) ( millipore )
	0.22 micrometros (um) ( millipore )
	0.45 micrometros (um) ( millipore )
	0.45 micrometros (um) ( nucleopore )

La membrana se seleccionó a través del siguiente ensayo:

Regulador	Membranas	Ag	Bloqueador	Conjugado	Sustrato
a) TBS	los 4 tipos	1ug/ml	leche desc.	Sigma	carbazol
b) PBS	los 4 tipos	1ug/ml	leche desc.	Sigma	carbazol

### TITULACION DEL ANTIGENO

Durante la estandarización de la técnica, cuando se probaron las diferentes variables, se trabajó con una concentración de antígeno de 1ug/ml. Por lo cual se procedió a realizar una titulación del mismo para ver cual era la concentración que mejor resultado daba en el sistema, para lo cual se realizaron diluciones del antígeno para obtener las siguientes concentraciones:

500, 200, 150, 100, 50, 20, 10, 5 y 1 ( ug/ml ).

Efectuadas las diluciones se procedió a probarlas en el sistema, se colocaron 5ul de la dilución del antígeno en cada membrana, realizando esto con dos tipos de reguladores, quedó el experimento de la siguiente manera:

Regulador	Membrana	Suero	Bloqueador	Conjugado	Sustrato
a) PBS	.22um	controles	leche d.	Sigma	carbazol
b) TBS	.22um	controles	leche d.	Sigma	carbazol

### SUEROS

Una vez que se tenían delimitadas las condiciones, se procedió a realizar la técnica haciendo diluciones de los sueros controles ( 1:25, 1:50 y 1:100 ). Se colocaron 5 ul de la dilución hecha de cada suero en su respectiva membrana, utilizando como regulador el PBS y con las mismas variables seleccionadas.

Con los resultados obtenidos en la prueba anterior se procedió a realizar lo siguiente:

50 ul de cada suero control se descomplementó, por calentamiento a 56 grados centígrados, por 20 minutos, se realizaron diluciones y se probaron.

En el siguiente experimento se procedió a descomplementar y centrifugar el suero a 8000 rpm por un tiempo de 6 minutos, después de esto se realizaron las diluciones correspondientes y se corrieron en el sistema.

Posteriormente se procedió a variar los tiempos de incubación del suero con la membrana, para lo cual sólo se centrifugaron los sueros (sin descomplementarse por considerarse innecesario), se les realizaron las diluciones y se les colocaron 6ul de cada dilución en el respectivo cuadro de la membrana, variando los siguientes tiempos 5, 10, 15, 20, 30 y 60 (minutos).

### **TITULACION DEL CONJUGADO**

Se realizó una titulación del conjugado para ver a que dilución del conjugado daba un mejor desarrollo de color que contrastara en las membranas, para lo cual se trabajaron en el sistema las siguientes diluciones. 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000 y 1:6000.

### **REDUCCION DE TIEMPOS**

Una vez seleccionada la dilución del conjugado a la cual había contrastado mejor en la membrana, se procedió a variar los tiempos de incubación del conjugado con las membranas, para ver la variación de coloración respecto al tiempo, se seleccionaron los siguientes periodos 5, 10, 15, 30 y 60 (minutos).

Posteriormente se realizaron variaciones de tiempo en cuanto a los periodos de lavado después de haber colocado la muestra del suero, siendo los siguientes:

3 lavados de 10 minutos cada uno

3 lavados de 5 minutos cada uno

4 lavados de 3 minutos cada uno

5 lavados de 1 minuto cada uno

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar los resultados que se obtuvieron en este trabajo, se utilizó la estadística descriptiva.

Para la determinación del título de significancia diagnóstica para la prueba de DOT-ELISA, se utilizaron las tablas de doble entrada, se seleccionó como prueba patrón la de ELISA (en placa); así también para obtener la sensibilidad y especificidad de los diferentes métodos, se utilizaron las mismas tablas, tomando de igual manera a ELISA, como prueba patrón.

Esquemáticamente consiste en lo siguiente:

	+	-	TOTAL
PRUEBA ESTUDIADA	A	B	
	C	D	
TOTAL			

A: Positivo a ambas pruebas.

B: Positivo a la prueba estudiada y negativo a ELISA.

C: Negativo a la prueba estudiada y positivo a ELISA.

D: Negativo a ambas pruebas.

$A+B+C+D$ = Número total de sueros

$$\text{Sensibilidad relativa: } \frac{A}{A+C} \times 100$$

$$\text{Especificidad relativa: } \frac{D}{B+D} \times 100$$

# RESULTADOS

## EJECUCION DE LA PRUEBA

### ( TECNICA ESTANDARIZADA )

Se cuadrículó (1x1 cm) la membrana de papel de nitrocelulosa ( Millipore 0.22um ) y se cortáron tiras de ( 2.2 X 8 cm ).

### SENSIBILIZACION

Se sumergieron esas tiras en regulador de PBS y se pusieron en agitación por 20 minutos, transcurrido ése tiempo se sacaron las tiras y se colocaron sobre papel secante y se dejaron hasta que se secaran.

### ANTIGENO

Se colocaron las tiras en cajas de Petri. Se diluyó el antígeno a una concentración de 20 ug/ml, se marcaron las tiras y se procedió a colocar 8 ul del antígeno en cada cuadro de la membrana, se taparon las cajas y se dejaron a temperatura ambiente por un tiempo de 18 a 24 horas, con el fin de que se adsorbiera el antígeno al papel.

### BLOQUEADOR

Se bloquearon las membranas, colocándolas en cajas de Petri con suficiente volumen de leche descremada al 12 %, de tal manera que se cubrieran bien las membranas, se mantuvieron en agitación a una temperatura de 37 grados centígrados, por un tiempo de 2 horas, transcurrido ese periodo se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-T en agitación a 37 grados centígrados. A continuación se colocaron las membranas sobre papel secante y se dejaron secar.

### SUERO

Se colocaron las membranas en cámara húmeda y se realizaron las diluciones del suero con PBS-T ( 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 y 1:640 ); antes de colocar la muestra del suero en la membrana, se colocaron 3 ul de PBS-T en cada cuadro, en seguida se colocaron 8 ul de la dilución del suero, se dejaron en contacto sólo 5 minutos y se procedió a realizar 4 lavados de 3 minutos con PBS-T en agitación a 37 grados centígrados.

## CONJUGADO

Se colocaron las membranas en cajas de Petri y se les agregó el conjugado anti gama globulina humana (SIGMA) acoplada a peroxidasa diluido 1:4000 (preparado al instante) con PBS-T. Se incubaron en agitación a 37 grados centígrados, posterior a esto se realizaron 2 lavados de 10 minutos c/u con regulador PBS-T y 2 lavados de 10 minutos con regulador PBS (sin tween), ambos en agitación a 37 grados centígrados.

## SUSTRATO

Se colocaron las membranas en otra caja de Petri en contacto con el sustrato que se preparó al instante (6mg de 3 amino 9 etil carbazol disueltos en 1.25 de N-N dimetil formamida, se agregan 25 ml de regulador de acetatos, se agregan 25 ul de peróxido de hidrógeno al 30% y se homogeniza) se agregó a las membranas en volúmen suficiente para que quedaran bien empapadas dejándose de 5 a 10 minutos, en oscuridad y a 37 grados centígrados, procurando que no se empalmaran las membranas, transcurrido ese tiempo se colocaron las membranas en una caja de Petri con agua destilada para parar la reacción (desarrollo de coloración), posterior a esto se colocaron en papel secante procurando que no se expusieran mucho a la luz.

Por último se procedió a leer el título que presentaba el suero por la coloración desarrollada en la membrana, se anotó, las membranas ya secas se guardaron en la oscuridad.

## RESULTADOS OBTENIDOS EN LA ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DOT-ELISA.

Los resultados que se obtuvieron, señalaron que tanto con el regulador de carbonatos, como con el de boratos, no existió desarrollo de color o mancha alguna, contrario a lo que se observó con el regulador de Tris y con el de fosfatos, en donde se observó una coloración de color azul tenue sobre las membranas, cuando se utilizó en el ensayo como sustrato el 4 cloro alfa naftol, lo mismo se realizó de igual manera, cambiando el sustrato, por el 3 amino 9 etil carbazol, y se obtuvo lo siguiente.

Carbonatos	4 cloro naftol	— No coloración
Boratos	4 cloro naftol	— No coloración
Tris	4 cloro naftol	— azul tenue (decoloran a las 24horas)
Fosfatos	4 cloro naftol	— azul tenue
Carbonatos	Carbazol	— No coloración
Boratos	Carbazol	— No coloración
Tris	Carbazol	— color rojo
Fosfatos	Carbazol	— color rojo

Con respecto a los conjugados se realizaron cuatro experimentos para seleccionar el mejor:

Regulador	Membranas	Ag	Conjugado	Sustrato	Resultado (color)
a) TBS	.8um millipore	20ug/ml	SIGMA	Carbazol	no color
	.22 millipore	20ug/ml	SIGMA	Carbazol	tenué
	.45 MSI	20ug/ml	SIGMA	Carbazol	tenué
	.45 nucleopore	20ug/ml	SIGMA	Carbazol	tenué

b) La variante fué el conjugado, se trabajó el CAPPEL.

c) Se utilizó como regulador el PBS y como conjugado el SIGMA.

d) Se usó como regulador el PBS y el conjugado CAPPEL.

En el experimento a) se observó un desarrollo de color rojo tenue, con excepción de la membrana de .8um en donde no existió desarrollo de color.

Respecto al axperimento b) no hubo desarrollo de color en ninguna de las membranas.

En el experimento c) se presentó un desarrollo de coloración tenue en la membrana Nucleopore y una coloración fuerte en las otras tres membranas.

En el d) se presentó un desarrollo de coloración muy tenue en los 4 tipos de membranas.

De este ensayo se puede concluir que el conjugado SIGMA fue el que mejor se unió al anticuerpo fijado en la membrana por lo que se desarrolló mejor color, en especial cuando se realizó el ensayo con el regulador PBS, la coloración presentada en las membranas con el conjugado marca CAPPEL, desaparece al cabo de 24 horas.

De los bloqueadores probados, se descartó la albúmina y la glicina, ya que se observó en las membranas una coloración inespecífica donde no había reacción antígeno-anticuerpo, en cambio con la leche descremada no se observó la coloración inespecífica.

Respecto al soporte se descartó la membrana Nucleopore ya que no existió un buen desarrollo de coloración, de igual manera se descartó la membrana .45 MSI, ya que aunque en ésta se desarrollaba una buena coloración, este tipo de soporte era de importación de ahí que se descartara. La membrana de .8um, aunque funcionaba bien, el tamaño era reducido además de que era muy delgada lo que dificultaba cortarla, por todo lo anterior se eligió para trabajar, la membrana de millipore de .22um, ya que aparte de que funcionaba muy bien, era mas gruesa y se contaba con hojas de tamaño grande.



El ensayo de titulación de antígeno, permitió seleccionar la mínima concentración del antígeno, que al reaccionar con los anticuerpos de los pacientes produjeran una coloración visible y distinguible de la obtenida con sueros normales, se llevó acábo con dos reguladores, el PBS y el TBS, se encontró que la concentración óptima del antígeno fué de 20ug/ml ya que con las concentraciones menores se obtenía una coloración tenue y con mayor concentración hubo un desarrollo de color fuerte. De los dos reguladores probados se apreció mejor la coloración en las membranas con el PBS, por lo que se eligió para trabajar en el sistema.

Se observó que al variar los tiempos de lavados después de que se colocaba el suero, no existió diferencia alguna en el desarrollo del color sobre la membrana, aunque la coloración se apreció mejor con 4 lavados de 3 minutos, siendo ésta la elegida, eliminandose mucho mejor la coloración inespecífica.

Los 92 sueros que se obtuviéron de personas clínicamente sanas y que no cursaban alguna infección, fuéron estudiados por las cuatro pruebas ( rosa de bengala, microaglutinación en placa, ELISA y DOT-ELISA ), y los resultados en todas ellas resultaron negativos.

Posteriormente ya que se tenía estandarizada la técnica de DOT, se procedió a estudiar 152 sueros de personas que llegaron para diagnóstico al laboratorio de Brucelosis del INDRE, obteniendose los siguientes resultados.

No. de sueros	Negativos	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
152	41	13	16	18	20	44

Para la evaluación de la técnica de DOT, se procedió a analizar todos los sueros por el método de ELISA en placa, se realizó una dilución por abajo del título obtenido en la prueba de DOT y dos diluciones por encima de ese título, de la siguiente manera:

Título en DOT	Diluciones empleadas para ELISA				
Negativos	1:40	1:80	1:160		
1:40	1:40	1:80	1:160		
1:80	1:40	1:80	1:160	1:320	
1:160	1:80	1:160	1:320	1:640	
1:320	1:160	1:320	1:640	1:1280	
1:640	1:320	1:640	1:1280	1:2560	

La determinación del valor de corte para la prueba de ELISA, se efectuó con los 92 sueros de las personas sanas, a los que se le realizaron las siguientes diluciones: 1:40, 1:80 y 1:160; de ahí se tomó la dilución 1:80, se calculó la media con los valores obtenidos de todos los sueros y se le agregó 2 desviaciones estándar, resultando un valor de corte de 0.26 de densidad óptica, lo que significó que todas las diluciones de los sueros que tuvieran un valor superior se considerarían positivos en la prueba de ELISA.

Con el valor de corte obtenido para la prueba de ELISA, se procedió a comparar los títulos de los sueros trabajados en DOT-ELISA, y se obtuvieron los siguientes resultados ( TABLA 1 ).

La comparación se realizó también para los sueros de individuos sanos y los sueros positivos a **Salmonella**, los títulos obtenidos en la prueba de ELISA se muestran en la ( TABLA 2 ).

Se determinó la sensibilidad y especificidad para la técnica de DOT, rosa de bengala y microaglutinación en placa, (TABLAS A,B,C) para lo cual se tomó como prueba patrón la de ELISA; a una dilución de 1:160, los resultados se muestran en la ( TABLA 3 ).

Se calculó también la reproducibilidad de la técnica, para lo cual se tomaron 50 sueros al azar de toda la población que se tenía, y se corrieron en dos distintos días con la prueba de DOT, para ver si los títulos se modificaban, donde solo 3 sueros cambiaron de título, observándose que el cambio fue de un solo título, por lo que se obtuvo un 96% de reproducibilidad de la técnica, como se observa en la ( tabla 4 ).

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos en 20 sueros positivos a **Salmonella** que no presentaron reacción cruzada, ya que resultaron negativos a las cuatro pruebas para **Brucella**.

Como se mencionó al principio, la única prueba definitiva para el diagnóstico de brucelosis es el aislamiento del agente etiológico, por tal motivo se trabajaron 13 sueros de individuos con cultivo positivo a **Brucella**, se les realizaron las distintas pruebas y se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 6 .

## DISCUSION DE RESULTADOS

El antígeno utilizado en ésta técnica, fue obtenido a partir de la cepa M-16 de *Brucella melitensis* por medio del método descrito por Cherwonogrodsky, este fue purificado y utilizado, ya que se sabe que el lipopolisacárido de las cepas lisas es uno de los componentes antigénicos que participa de manera relevante en las pruebas serológicas usadas generalmente en el diagnóstico de brucelosis. Algunos autores (5,19,26,28,32,33,37) han utilizado diferentes tipos de antígenos en el sistema inmunoenzimático como lo son: la célula completa, sonicados, proteínas y lipopolisacáridos; sin embargo los resultados obtenidos en los diferentes sistemas no son comparables.

Durante la estandarización de la técnica, al probarse los diferentes tipos de membranas que se tenían, se observó que no en todas se desarrollaba una buena coloración, además de que al transcurrir el tiempo se desvanecía el color; la membrana que se eligió para el desarrollo de la técnica fué la de 0.22um Millipore, ya que con ésta se obtuvieron resultados favorables, aunque algunos autores (2,28,32) no mencionan si durante la realización de sus trabajos probaron algún otro tipo de soporte (membrana), ellos solo mencionan la utilización de las membranas de 0.45um (marca Millipore y la de Schleicher Schuell) con resultados adecuados para ellos, ya que el color desarrollado depende de que se pegue adecuadamente el antígeno a la membrana seleccionada.

La técnica de ELISA ha sido considerada muy eficiente al compararla con los métodos tradicionales (18,27,34,36). Sin embargo las placas de poliestireno son costosas y su utilización resulta muy engorrosa por el tiempo que requiere el lavado, además que en muchos casos se observa un fondo muy elevado que interfiere con lecturas posteriores, por otro lado se requiere de un lector especial para tener un valor cuantitativo de la reacción desarrollada. Afortunadamente existen otros tipos de materiales que pueden servir de soporte para llevar acabo la reacción, entre ellos el papel de nitrocelulosa. Ahí la reacción final (positiva) se manifiesta en forma de una mancha colorida sobre el papel, que puede ser vista a ojo desnudo (31), además de ser una técnica sensible y específica, superior a las técnicas convencionales.(4)

Al estandarizar la técnica de DOT-ELISA, se pudo observar que cuando los sueros tenían varios días de haberse obtenido y se habían descongelado varias veces, al trabajarlos en la técnica de DOT-ELISA, se observó la membrana que servía de testigo de suero (membrana sin antígeno) y la membrana donde se colocaba la muestra de suero presentaba una mancha debida a una coloración inespecífica; ésto se corroboró al probar varios sueros recientes que no habían sido descongelados; estos se congelaron y descongelaron durante cinco días y a diario se efectuaba la técnica de DOT-ELISA, se observó que conforme aumentaba el número de descongeladas, aumentaba la coloración inespecífica en las membranas. Además se pudo constatar que los sueros después de que se descongelaban por primera vez, si se centrifugaban a 8000 rpm durante seis minutos, la coloración inespecífica desaparecía en las membranas, y que si se utilizaban sueros recién obtenidos y sin congelación se podían utilizar sin necesidad de centrifugarlos.

Los sueros de personas clínicamente sanas, se utilizaron como controles negativos en las pruebas de ELISA y DOT-ELISA, aunque estas personas no presentaban ningún síntoma clínico, no se descartó la posibilidad de que tuvieran anticuerpos contra algún componente de las brucelas, por lo que previo a su uso en las técnicas inmunoenzimáticas, se les realizaron las distintas pruebas serológicas que se usan de rutina para el diagnóstico de brucelosis, como lo fue rosa de bengala y microaglutinación en placa, donde dos sueros de la población supuestamente sana, aglutinaron con rosa de bengala, pero resultaron negativos a la otra prueba. Sin embargo fueron descartados esos dos sueros, quedando solo 92. Cuando se estudiaron con la técnica de DOT-ELISA, todos salieron negativos ya que se observó una ausencia de color sobre las membranas.

Se sabe que el azúcar perosamina que forma la cadena "O" del lipopolisacárido de las brucelas, existe también en los lipopolisacáridos de algunas enterobacterias, por lo que no sería difícil que se presentaran anticuerpos contra ese azúcar en individuos infectados con estos géneros (3, 11, 13, 24,25). Para descartar la posibilidad de que se presentaran reacciones cruzadas en la técnica de DOT-ELISA se obtuvieron 20 sueros con la característica de ser serológicamente positivos a *Salmonella* pero negativos a *Brucella*; se eligió el género *Salmonella*, debido a que en nuestro país es muy frecuente la infección por este microorganismo, para tal efecto los sueros fueron estudiados con las distintas pruebas serológicas para brucela. Como se describió en resultados, todos los sueros salieron negativos en dichas pruebas, mientras que en las pruebas de aglutinación con antígeno somático "O" y flagelar "H", se pudo observar una gran variación de títulos que presentaron estos sueros, por lo que independientemente del título que presentaron, estos no dieron ningún grado de positividad en ninguna de las pruebas específicas para *Brucella*, así como ningún tipo de reacción cruzada en el sistema DOT-ELISA.

Para determinar el título que tuviera significancia diagnóstica en la prueba de DOT-ELISA, se utilizó como prueba patrón la de ELISA en placa, ya que algunos autores mencionan que es muy eficiente al compararla con otros métodos y ha sido ampliamente estudiada y evaluada (4,23,28,36). Como ya se mencionó en la metodología se realizaron tres diluciones por arriba del título obtenido en la prueba de DOT, y una dilución por abajo de ese título, la coloración desarrollada en la técnica de ELISA, fue leída en un lector a 490nm de longitud de onda. Para la obtención del valor de significancia diagnóstica para la prueba de DOT-ELISA, se corrieron en la técnica de ELISA en placa los 92 sueros de individuos clínicamente sanos. Para determinar el valor de corte se tomó la dilución 1:80, se obtuvo la media de los valores y se le agregó dos desviaciones estándar, obteniéndose un valor de 0.26 de densidad óptica, siendo éste el valor de corte, ya que el suero que tuviera una densidad óptica de 0.26 ó mayor a este valor, sería positivo, y por abajo de ese valor sería negativo; se tomó la dilución de 1:80, ya que a diluciones más bajas hubo mayor desarrollo de coloración inespecífica y a diluciones mayores la coloración inespecífica se fué disminuyendo, pero a la vez también se pondrían de manifiesto poca cantidad de anticuerpos, además de que algunos autores que trabajan con la técnica de ELISA, toman para la obtención de su valor de corte la dilución 1:100, siendo esta dilución mayor a la utilizada en este trabajo.

En base al valor de corte obtenido, se encontró que cuatro sueros de la población sana resultaron positivos a la dilución 1:80 en la prueba de ELISA, por lo que se decidió tomar la dilución 1:160 como la dilución de valor de significancia diagnóstica para la prueba de DOT-ELISA, ya que el título de 1:80, aún para técnicas como microaglutinación en placa no se considera positivo sino sospechoso, siendo ELISA una técnica tan sensible deberían seleccionarse títulos mayores, sin embargo la positividad nos indica que existen anticuerpos en esos individuos que resultaron probablemente de infecciones subclínicas, ya que la persona pudo estar infectada sin presentar sintoma alguno, ó por la presencia de anticuerpos debidos a una respuesta inmune humoral de memoria ( que la persona estuvo infectada alguna vez ); y puesto que a la dilución 1:160 de población sana no se detectó la presencia de anticuerpos, se tomó esta como la dilución de significancia diagnóstica para la prueba de DOT-ELISA, los 88 sueros restantes de esta población resultaron negativos.

Tomando como prueba patrón a ELISA en placa, se observó que la sensibilidad y especificidad obtenida para los métodos de rutina fueron diferentes. La confiabilidad de la técnica, va a depender de la estrecha relación que existe entre sensibilidad y especificidad. En este trabajo se obtuvo una sensibilidad similar entre las pruebas de DOT-ELISA y rosa de bengala con un 96.25% y 96.34% respectivamente. La sensibilidad más baja se obtuvo para la prueba de microaglutinación en placa con un 60.75%. Respecto a la especificidad obtenida, la más alta fue para la prueba de microaglutinación en placa con un 86.02%, siguiendole la de DOT-ELISA con un 84.78% y la especificidad más baja se obtuvo con la de rosa de bengala con un 67.77%. En cuanto a la sensibilidad y especificidad encontrada para DOT-ELISA, cabe hacer mención que estos valores se obtuvieron al tomar la dilución de 1:160, sin embargo conforme se tomaba una dilución mayor para efectuar el cálculo los valores tanto de sensibilidad como de especificidad iban aumentando; en trabajos realizados con anterioridad con la técnica DOT-ELISA, se han probado sueros de animales, por ejemplo Alonso y col. en 1990 trabajando con sueros de cerdos, encontraron en sus trabajos la mayor correlación entre sensibilidad y especificidad para DOT-ELISA, con un 50% y 97% respectivamente, por otra parte en el mismo año Rojas y col. trabajando con sueros de ovinos obtuvieron una sensibilidad de 80.3% y una especificidad de 86.4% para DOT-ELISA, por su parte Mongini en ese mismo año, trabajando con sueros humanos, en la detección de anticuerpos de *Brucella abortus*, menciona en su trabajo que la técnica DOT-ELISA es sensible y específica, sin hacer mención de los valores obtenidos; por lo que no se puede comparar la sensibilidad y especificidad obtenida por los otros autores con los de este trabajo puesto que la prueba patrón que ellos emplearon fué la de fijación de complemento y aquí se empleo ELISA en placa. En este trabajo la relación porcentual más estrecha entre los dos parámetros se obtuvo con la prueba DOT-ELISA ya que se obtuvo una sensibilidad de 96.25% y una especificidad de 84.78%, lo que le confiere confiabilidad a la prueba.

Los resultados obtenidos al comparar las otras técnicas con la de ELISA, muestran valores bajos. Definitivamente a pesar de que exista una correlación entre los valores obtenidos, no hay que olvidar que se trata de sistemas donde se utilizan antígenos diferentes. En ELISA y DOT-ELISA se van a poner de manifiesto todos los anticuerpos dirigidos contra el lipopolisacárido, mientras que en las reacciones de aglutinación el antígeno lo constituye la bacteria completa, por lo que se pondrán de manifiesto



anticuerpos dirigidos contra el lipopolisacárido y otros antígenos proteicos superficiales que sean capaces de aglutinar. Lo que explicaría los valores obtenidos al comparar los métodos enzimáticos con las técnicas de rutina. Además de que las pruebas de rosa de bengala y microaglutinación en placa son métodos de diagnóstico rutinario que minimamente deberían realizarse en todo el país y cuyo uso se encuentra restringido a solo algunos laboratorios.

La reproducibilidad obtenida para la prueba DOT-ELISA fue de un 94%. Los 50 sueros escogidos al azar de entre los que se habían probado solo en tres casos (6%) cambiaron de título al probarse en dos distintos días (2 días de diferencia), siendo de un título por arriba del obtenido en la primera vez. Por otro lado estos sueros que cambiaron de título se consideraron negativos para la prueba de DOT-ELISA por tener un título menor de 1:160. No se observó ningún cambio de título en los sueros que presentaban títulos mayores ó igual a 1:160; por lo anterior se consideró aceptable la reproducibilidad de la técnica. En otros trabajos realizados, los autores no hacen mención de la reproducibilidad del método en días consecutivos.

Al analizar el porcentaje de positividad de los sueros de pacientes trabajados con las cuatro pruebas diferentes (rosa de bengala, microaglutinación en placa, DOT-ELISA y ELISA) como se muestra en la tabla 7 se observó que 112 sueros resultaron positivos a una o más pruebas, de los cuales el 41.96% (47 sueros) resultaron positivos a las cuatro pruebas, tomando en cuenta que los sueros se consideraron positivos si presentaban títulos mayores ó igual a 1:160 en las pruebas de microaglutinación en placa, DOT-ELISA y ELISA, en tanto que para la prueba de rosa de bengala se consideraron positivos si presentaban aglutinación; este porcentaje se debe a que las pruebas poseen diferente sensibilidad y especificidad.

Cabe señalar que para la prueba de rosa de bengala se encontraron 13.39% (15 sueros) positivos exclusivamente a esta prueba pero con las demás técnicas dieron títulos inferiores a 1:160 considerado como valor de positividad; probablemente esto se debió a que los pacientes estaban en diferentes fases de la enfermedad al momento de tomar la muestra, estos títulos bajos nos indican bajas cantidades de anticuerpos aglutinantes que es característico de periodos de recuperación o de estados crónicos de la enfermedad. En cuanto al porcentaje de positividad obtenida en cada prueba (TABLA 8) el mayor fue para la prueba de rosa de bengala con un 96.4%, seguido de DOT-ELISA con 78.61%, microaglutinación en placa con 75.0% y ELISA con 70.5%. El mayor porcentaje obtenido en la prueba de rosa de bengala es debido a sus características en base a las que se ha considerado una prueba tamiz cualitativa que detecta la presencia o ausencia de anticuerpos en los pacientes en cualquier fase de la enfermedad. Por otro lado las pruebas enzimáticas como lo son ELISA y DOT-ELISA detectan en algunos casos mayor cantidad de sueros positivos o de anticuerpos, y esto debido en gran parte a que poseen mayor sensibilidad, ya que determinan anticuerpos bloqueadores o incompletos, además de otros.

## CONCLUSIONES

1) Se obtuvo 9.3g de lipopolisacárido extraído de la cepa M-16 de *Brucella melitensis*, el cual fue semipurificado y liofilizado.

2) La técnica DOT-ELISA, se estandarizó utilizándose como antígeno, el lipopolisacárido extraído.

3) En base a el estudio realizado en los tres diferentes grupos de sueros ( individuos sanos, individuos con sintomatología compatible a brucelosis y individuos con salmonelosis ), la técnica DOT-ELISA presentó una sensibilidad de 96.25%, una especificidad de 84.78% y una reproducibilidad de 94%.

4) En base a los resultados obtenidos, la técnica DOT-ELISA, puede ser empleada como una opción más en el diagnóstico de la brucelosis humana, además de que resulta ser rápida y confiable.

## REFERENCIAS

- 1.- Acha P.N. (1977) Zoonosis y enfermedades transmisibles, comunes al hombre y a los animales. Publicación Científica No.354 OPS/OMS p.p. 7-23.
- 2.- Alonso y col. (1990) Diagnóstico de brucelosis porcina por la técnica de enzimo inmunoensayo en papel de nitrocelulosa. Arch. Med. Vet. Chile, XXII 2:129-133.
- 3.- Alton y col. (1988) Techniques for the Brucellosis Laboratory I.N.R.A. París.
- 4.- Araj y col. (1986) Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. J. Hyg. Camb.97:457-469.
- 5.- Batra H. y col. (1989) Dot-enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies in bovine brucellosis. Res. Vet. Sci. India, 46:143-146, India.
- 6.- Berman y col. (1980) Caracterización de *Brucella abortus* soluble antigen employed in immunoassay. J. Clin. Microbiol. 11:355-362.
- 7.- Corbel M. y col. (1984) Bergeys Manual of sistematic bacteriology. Vol.I Williams and Wilkins Co. Baltimore p.p.377-388.
- 8.- Corbel M,J. (1985) Recent advances in the estudy of *Brucella* antigens an their serological cross-reactions. Vet. Bull. 55:927-942.
- 9.- Cherwonogrodsky J. y col. (comunicación personal).
- 10.- Davis B.D. (1984) Tratado de Microbiología. Ed. Salvat. en: *Brucella*, España. Cap. 33:561-566.



- 11.- Delgado G.D. (1987) Estructura y propiedades biológicas de algunos antígenos de *Brucella*. Examen Predoctoral. E.N.C.B. I.P.N. México.
- 12.- Del Rio V.J. (1988) Importancia de la brucelosis en México. II foro Nacional sobre Brucelosis. S.A.R.H. C.A.N.I.P.A.R.M.A. U.N.A.M. México.
- 13.- Díaz R. y Moriyón I. (1990) Laboratory Techniques in the diagnosis of human brucellosis, in: *Brucellosis, Clinical and Laboratory Aspects*. CRC Press Inc. Boca Raton Fla Cap.6, p.p.73-84.
- 14.- Elbert S.S. (1981) A guide for the diagnosis treatment and prevention of human Brucellosis, W.H.O. V.P.H./81.31, Rev.1.
- 15.- Gilbert G. (1981) The antibody response to ***Brucella***: immunoglobulin response measured by enzyme-linked immunosorbent assay and conventional test. Aust. N.Z.J. Med. 11:40-45.
- 16.- González S. y col. (1988) Infectología clínica pediátrica. en: ***Brucella***, 4a. ed. Trillas, México, Cap. 36:615-629.
- 17.- Hall W. (1990) History of ***Brucella*** as a human pathogen. en: *Brucellosis. Clinical and Laboratory Aspects*, C.R.C Press Inc. Boca Raton Fla. Cap.1:19.
- 18.- Heizmann K. y col. (1985) Brucellosis: serological methods compared. *Journal of hygiene*, Cambridge 95:639-653.
- 19.- Hunter S. y col. (1986) Enzyme linked immunosorbent assay with major outer membrane proteins of ***Brucella melitensis*** to measure immune response to ***Brucella*** species. *J. Clin. Microbiol.* 24:566-572.

- 20.- Klerk E.; Anderson R. (1985) Comparative evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the laboratory diagnosis of **Brucella**.  
J. Clin. Microbiol. 21:381-386.
- 21.- Lamb V. y col. (1979) Enzyme-linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to **Brucella abortus** lipopolisaccharides.  
Infect. Immun. 26:240-247.
- 22.- Lara S.J. (1985) Estudio de la respuesta inmune celular en pacientes con brucelosis. Tesis licenciatura. E.N.C.B. I.P.N. Méx.
- 23.- Lee y col. (1985) Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of brucellosis ovis infection in rams. Aust. Vet. J. 62:91-93.
- 24.- Lindberg A. y col. (1982) Enzyme immunoassay of the antibody response to **Brucella** and **Yersinia enterocolitica** 0:9 infections in humans. J.Hyg. Camb. 88:295-307.
- 25.- López M. y col. (1991) La trascendencia de las zoonosis; La brucelosis en México.en: La seroepidemiología en México. I.N.D.R.E. S.S.A Cap.8, p.p.51-58, México.
- 26.- Magge J.T. (1980) An enzyme-labeled immunosorbent assay for **Brucella abortus** antibodies. J. Med. Microbiol. 13:167-172.
- 27.- Ming-Chen L. (1984) Application of an enzyme linked immunosorbent assay for detection of **Brucella** antigens in vaginal discharge of cows. Am. J. Vet. Res. 45:32-34.

- 28.- Mongini C. y col. (1990) Comparative study of cell-immunoenzymatic methods for the estimation of IgG and IgM antibrucella antibodies in the diagnosis of human brucellosis. J. Appl. Bacteriol. 69:86-91.
- 29.- Nielsen K. y col.(1984) Enzyme immunoassay and its application to the detection of bovin antibody to **Brucella abortus**. Agriculture Canada, Animal Diseases Research Institute. Nepean, Ontario Canada.
- 30.- Pellicer T. y col. (1988) Specific antibodies during relapse of human brucellosis. J. Infec. Dis. 157:918-924.
- 31.- Quiñones A. (1986) Montaje de un test de enzimo inmuno ensayo en papel de nitrocelulosa para el diagnóstico de brucelosis. Seminario de titulación. Facultad de ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- 32.- Rojas X. y col. (1990) Diagnóstico de brucelosis ovina por la técnica de enzimo inmunoensayo en papel de nitrocelulosa. Arch. Med. Vet. Chile. XXII, No. 2, p.p. 135-142.
- 33.- Ruppanner R. y col. (1980) Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay with others test for brucellosis, using sera form experimentally infected heifers. J. Vet. Res. 41:1329-1332.
- 34.- Saz J. y col.(1987) Enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis. Eur. J. Clin. Microbiol. 6:71-74.
- 35.- Subdirección de información epidemiológica (1991) D.G.E. S.S.A.

- 36.- Tabatabai y col. (1984) Specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovin antibody to ***Brucella abortus***. J. Clin. Microbiol. 20: 209-213.
- 37.- Uribe O. (1988) Ensayo de un test Inmunoenzimatico en papel de nitrocelulosa para la detección de anticuerpos antibrucella en suero sanguineo ovino. Tesis licenciatura, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- 38.- Young E. (1983) Human brucellosis. Rev. Infect. Dis. 5:821-842.

TABLA 1. CORRELACION DE VALORES OBTENIDOS POR  
 LA TECNICA DE ELISA Y DOT-ELISA, EN  
 LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS  
 ANTI-*B*<sub>rucella</sub>.

DOT ELISA	NEGATIVO	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
ELISA						
NEGATIVO	41	12	11	3	1	5
1:40			1			
1:80				1		
1:160		1	2	1	4	
1:320			2	4	5	3
1:640				9	5	8
1:1280					5	21
1:2560						7

TABLA 2. RESULTADOS DE SUEROS DE POBLACION  
SANA Y DE POSITIVOS A Salmonella  
OBTENIDOS POR LAS TECNICAS ELISA  
Y DOT.

DOT ELISA	NEGATIVO	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
SALMONELLA	20					
SANOS	87		5			

TABLA A. DETERMINACION DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD  
DEL METODO DE DOT-ELISA.

		ELISA 1:160		
		+	-	TOTAL
DOT ELISA 1:160	+	77	14	91
	-	3	78	81
TOTAL		80	92	172

TABLA A. SENSIBILIDAD 96.25%  
ESPECIFICIDAD 84.78%

TABLA B. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD  
Y ESPECIFICIDAD PARA EL METODO  
ROSA DE BENGALA.

ELISA 1:160

		+	-	TOTAL
ROSA DE BENGALA	+	79	29	108
	-	3	61	64
TOTAL		82	90	172

SENSIBILIDAD 60.75%

ESPECIFICIDAD 86.02%



TABLA C. DETERMINACION DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD  
 PARA EL METODO DE MICROAGLUTINACION EN PLACA.

ELISA 1:160

		+	-	TOTAL
MICROAGLUTINACION EN PLACA 1:160	+	48	13	61
	-	31	80	111
TOTAL		79	93	172

TABLA C. SENSIBILIDAD 60.75%  
 ESPECIFICIDAD 86.02%

TABLA 3. PORCENTAJES DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD  
 OBTENIDOS EN LAS DISTINTAS PRUEBAS  
 CON RESPECTO A ELISA.

PRUEBA SEROLOGICA	SENSIBILIDAD RELATIVA	ESPECIFICIDAD RELATIVA
ROSA DE BENGALA	96.34%	67.77%
MICROAGLUTINACION		
EN PLACA	60.75%	86.02%
DOT ELISA	96.25%	84.78%

TABLA 4. REPRODUCIBILIDAD DE LA PRUEBA DOT-ELISA  
 OBTENIDA DE 50 SUEROS DE INDIVIDUOS CON  
 SINTOMATOLOGIA COMPATIBLE CON  
 BRUCELOSIS.

R1 R2	NEGATIVO	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
NEGATIVO	14					
1:40	2	12				
1:80			6			
1:160			1	7		
1:320					7	
1:640						4

TABLA 5. RESULTADOS DE 20 SUEROS POSITIVOS A Salmonella  
AL ANALIZARLOS POR CUATRO METODOS.

No. DE SUERO	ROSA DE BENGALA	MICRO AGLUTINACION EN PLACA	ELISA	DOT	"O"	"H"
1	-	-	-	-	1:80	1:160
2	-	-	-	-	1:20	1:80
3	-	-	-	-	1:40	1:40
4	-	-	-	-	1:40	1:40
5	-	-	-	-	1:320	1:160
6	-	-	-	-	1:80	1:80
7	-	-	-	-	1:20	1:80
8	-	-	-	-	1:160	1:160
9	-	-	-	-	1:80	1:80
10	-	-	-	-	1:80	1:20
11	-	-	-	-	-	1:80
12	-	-	-	-	-	1:40
13	-	-	-	-	1:20	1:160
14	-	-	-	-	-	1:40
15	-	-	-	-	-	1:20
16	-	-	-	-	1:20	1:160
17	-	-	-	-	1:20	1:40
18	-	-	-	-	1:40	1:80
19	-	-	-	-	1:80	1:320
20	-	-	-	-	1:20	1:160

**TABLA 6. RESULTADOS DE LOS SUEROS DE PACIENTES  
CON CULTIVO POSITIVO A *B. brucella*  
AL ESTUDIARLOS CON 4 PRUEBAS.**

NUMERO DE SUERO	ROSA DE BENGALA	MICRO AGLUTINACION EN PLACA	ELISA DOT	ELISA
1	1:160	1:160	>/1:640	1:1280
2	1:320	1:2560	>/1:640	1:2560
3	1:320	1:2560	>/1:640	1:1280
4	1:320	1:640	>/1:640	1:1280
5	1:320	1:160	1:320	1:640
6	1:320	1:1280	>/1:640	1:2560
7	1:320	1:1280	>/1:640	1:640
8	1:320	1:320	>/1:640	1:1280
9	1:320	1:1280	>/1:640	1:1280
10	1:320	1:320	1:320	1:1280
11	1:320	1:2560	>/1:640	1:2560
12	1:320	1:320	1:160	1:640
13	1:320	1:320	1:160	1:640

TABLA 7. PORCENTAJE DE POSITIVIDAD OBTENIDA  
 AL ANALIZAR 112 SUEROS.

SUEROS	ROSA DE BENGALA	MICRO AGLUTINACION PLACA	DOT ELISA	ELISA	TOTAL	
					No.	%
POSITIVOS	+				15	13.4
A		+			0	0
1 PRUEBA			+		0	0
				+	2	1.8
POSITIVOS	+	+			3	2.7
A	+		+		5	4.5
	+			+	4	3.6
		+	+		0	0
2 PRUEBAS		+		+	0	0
			+	+	2	1.8
POSITIVOS	+	+	+		10	9
A		+	+	+	0	0
	+	+		+	0	0
3 PRUEBAS	+		+	+	24	21.4
POSITIVOS A 4 PRUEBAS	+	+	+	+	47	42
TOTAL					112	100

TABLA 8. PORCENTAJE DE SUEROS QUE RESULTARON  
POSITIVOS EN LAS CUATRO PRUEBAS  
ESTUDIADAS.

SUEROS	ROSA DE BENGALA		M.A.P.		DOT ELISA		ELISA	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
POSITIVOS	108	96.41	84	75	88	78.61	79	70.5
NEGATIVOS	4	3.6	28	25	24	21.4	33	29.5
TOTAL	112	100	112	100	112	100	112	100