

64
2es'



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



**Investigación de Reacciones
Cruzadas a *Brucella* en Sueros de
Pacientes con *Vibrio Cholerae***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

RUBEN RUIZ ROBLES

DIRECTORES:

DRA. AHIDE LOPEZ MERINO

Q.F.I. ANDREA BECERRIL OSNAYA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1993



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ABREVIATURAS

- ABS=absorber
- ADP=adenosil difosfato
- AMPc=adenosil monofosfato ciclico
- ATA=aglutinación en microplaca con *Brucella abortus*
- ATM=aglutinación en microplaca con *Brucella melitensis*
- ATP=adenosil trifosfato
- BAB=base de agar sangre
- BBL=agar de *Brucella*
- CDC=Control Disease Center
- CO₂=bióxido de carbono
- ELISA=ensayo inmunoenzimático
- FC=fijación de complemento
- GM1=gangliosido M1
- HCl=ácido clorhídrico
- Igs=inmunoglobulinas
- INDRE=Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
- KDa=kilodaltones
- KDO=2-ceto-3-desoxi-octonato
- LIA=descarboxilación y/o desaminación de la lisina
- mA=miliamperes
- MEA=aglutinación en microplaca con *Brucella abortus* usando 2 mercaptoetanol
- MEM=aglutinación en microplaca con *Brucella melitensis* usando 2 mercaptoetanol
- MIO=motilidad, indol, ornitina
- RB=rosa de bengala
- RB51=cepa rugosa de *Brucella abortus*
- RCM=proteínas de membrana externa de *Brucella abortus*
- RIA=radioinmunoensayo
- RMN=resonancia magnética nuclear
- STT=prueba en tubo estándar
- TBS=caldo soya tripticaseína

TCBC=tiosulfato citrato bilis sacarosa

TEMED=N'N'N'N'tetrametilendiamina

TSA=agar soya tripticaseina

TSI=triple hierro agar azucar

INDICE

	Página
1.0 INTRODUCCION.....	1
2.0 GENERALIDADES.....	3
2.1 COLERA.....	3
2.1.1 HISTORIA.....	3
2.1.2 AGENTE ETIOLOGICO.....	4
2.1.3 ENFERMEDAD.....	8
2.1.4 DIAGNOSTICO.....	11
2.2 BRUCELOSIS.....	17
2.2.1 HISTORIA.....	17
2.2.2 AGENTE ETIOLOGICO.....	18
2.2.3 ENFERMEDAD.....	20
2.2.4 DIAGNOSTICO.....	26
3.0 REACCIONES CRUZADAS.....	32
3.1 ESTRUCTURA DEL LPS.....	33
3.2 ANTECEDENTES.....	35
4.0 OBJETIVOS.....	45
5.0 METODOLOGIA.....	46
6.0 RESULTADOS.....	54
7.0 DISCUSION.....	68
8.0 CONCLUSIONES.....	72
9.0 REFERENCIAS.....	73

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Clasificación de <i>Vibrio cholerae</i> en base a su antígeno somático.....	5
Figura 2. Factores de patogenicidad de <i>Vibrio cholerae</i>	6
Figura 3. Mecanismo de acción de la toxina colérica.....	7
Figura 4. Representación morfológica de <i>Vibrio cholerae</i> mediante un modelo.....	13
Figura 5. Aislamiento bacteriológico de <i>Vibrio cholerae</i> a partir de hisopo rectal.....	14
Figura 6. Diagnóstico serológico de <i>Vibrio cholerae</i>	15
Figura 7. Casos de Brucelosis humana en México.....	21
Figura 8. Procesamiento utilizado en el INDRE para el aislamiento e identificación de <i>Brucella</i> a partir de muestras de sangre y de algunos órganos.....	27
Figura 9. Pared celular de bacterias Gram negativas.....	32
Figura 10. Estructura química general de una molécula de LPS.....	34
Figura 11. Representación estructural del core.....	35
Figura 12. Modelo estructural de <i>Brucella abortus</i> y <i>Brucella melitensis</i>	38

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Concentración de electrolitos en heces (mM/lit).....	10
Tabla 2. Especies del género <i>Brucella</i> y su hùsped.....	19
Tabla 3. Síntomas clínicos de la Brucelosis aguda en humanos.....	24
Tabla 4. Comparación de 3 pruebas serológicas en el diagnóstico de Brucelosis.....	29
Tabla 5. Comparación de la prueba STT y aglutinación con 2-mercaptoetanol para el diagnóstico de Brucelosis.....	31
Tabla 6. Componentes de una molécula de LPS.....	33
Tabla 7. Composición química del LPS de <i>Vibrio cholerae</i> serotipo Inaba 569B.....	36
Tabla 8. Composición química del lípido A de <i>Brucella abortus</i> 1119-3.....	39
Tabla 9. Reacciones cruzadas de <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Brucella</i>	42
Tabla 10. Título de anticuerpos séricos que demuestran reactividad cruzada de <i>Vibrio cholerae</i> hacia cepas lisas de <i>Brucella</i> después de llevar a cabo la absorción.....	43

RESUMEN

La relación antigénica que se presenta entre cepas lisas de *Brucella* y *Vibrio cholerae* se encuentra asociada a determinantes antigénicos comunes en la cadena O específica (grupos perosamina) de sus respectivos lipopolisacáridos.

772 sueros de casos, contactos y controles de Cólera fueron usados para investigar la reactividad cruzada que se presenta con el antígeno O de *Brucella*. Las pruebas ATA, ATM, MEA y MEM empleadas para el diagnóstico serológico de *Brucella* reconocieron anticuerpos en 56 (7.25%) de estos sueros con títulos de 1:20 hasta 1:640. Los estudios de absorción indican que existen determinantes antigénicos comunes en estos géneros bacterianos. Además para la evaluación del estudio se incluyeron 40 sueros de individuos aparentemente "sanos" los cuales resultaron negativos a los antígenos de *Brucella*; aunque 4 presentaron anticuerpos que fueron reconocidos por el serotipo Ogawa y 3 por el serotipo Inaba de *Vibrio cholerae*. El porcentaje de reactividad cruzada encontrado fué el siguiente: RB 1.91%, ATA 4.36%, ATM 5.18%, MEA 0.27% y MEM 0.54%. Por la técnica de inmuno-electrotransferencia se demostró que varios sueros de pacientes reaccionaban con algunos componentes presentes en un antígeno proteico de *Brucella*, pero no reconocían al sonificado de una cepa rugosa de *Brucella*. Con esto se determinó que los epitopos comunes que presentan *Vibrio cholerae* y *Brucella* se encuentran asociados a la molécula del LPS. Por medio de inmunodifusión se encontró que la reactividad cruzada serológica solo se presenta con anticuerpos de tipo aglutinante pero no precipitante. De los sueros estudiados solamente 3 pueden confundirse en el diagnóstico, ya que fueron positivos tanto a Cólera como a *Brucella*. Con ello se concluye que las reacciones cruzadas serológicas entre estos géneros son mínimas, por lo que se puede proporcionar un diagnóstico serológico confiable para ambas infecciones.

1.0 INTRODUCCION

La presencia del Cólera en México iniciada a mediados del mes de Junio de 1991, ha traído consigo toda una serie de investigaciones para el conocimiento de su agente causal; así mismo la presencia de anticuerpos en pacientes infectados por esta bacteria ha servido de base para la búsqueda de reacciones cruzadas que se presentan con otras bacterias, en nuestro estudio trataremos lo referente al género *Brucella*. Para ello es necesario diferenciar estos procesos infecciosos. A continuación se mencionan características muy generales de la enfermedad causada por cada una de estas bacterias.

El cólera es un padecimiento infeccioso gastrointestinal agudo, producido por un microorganismo Gram negativo: *Vibrio cholerae* O1. En el 75% de los casos se presenta de forma asintomática, cuando se manifiesta clínicamente se caracteriza por la aparición de diarrea acuosa y abundante, malestar abdominal, deshidratación, por lo general no hay fiebre ó es baja, vómito y en ocasiones es frecuente la presencia de calambres abdominales y musculares; colapso circulatorio y presión arterial no detectable (22).

Si persiste la deshidratación, sobreviene la acidosis metabólica, en este caso el paciente se encuentra en un estado obnubilado (22,34).

Como en todo proceso infeccioso el diagnóstico bacteriológico es primordial, por lo que se busca el agente etiológico *Vibrio cholerae* O1 a partir de heces fecales, sin embargo las pruebas serológicas pueden ser de gran ayuda: ya que se produce una elevación de anticuerpos antitoxina y anticuerpos vibriocidas (22).

Otro proceso infeccioso debido a una bacteria Gram negativa es la Brucelosis, que difiere de la anterior ya que esta es una zoonosis. En nuestro país esta enfermedad es la causa de grandes pérdidas económicas, afectando principalmente a las zonas norte y centro (35).

Las tres especies principales de *Brucella* que afectan al hombre son: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* y *Brucella suis*. Los países subdesarrollados y áreas mediterráneas se ven afectadas primordialmente por *Brucella melitensis* (26).

La brucelosis se presenta en el hombre en tres formas clínicas:

1) Aguda.- en donde hay fatiga, escalofríos, dolor de articulaciones, sudoraciones nocturnas y fiebres altas.

2) Subclínica.- por lo general no hay síntomas o son tan leves que pasan inadvertidos.

3) Crónica.- las manifestaciones clínicas duran cuando menos cuatro meses, se presentan manifestaciones de tipo visceral, osteoarticular y neurológico (36).

Debido a la dificultad para aislar a la bacteria en algunas formas clínicas y el predominio de la enfermedad en zonas rurales que carecen de infraestructura sanitaria adecuada, el diagnóstico de la brucelosis se basa en la mayoría de las ocasiones en pruebas serológicas: Rosa de Bengala y Aglutinación en microplaca (25,47).

La reactividad cruzada a *Brucella* encontrada en sueros de individuos inmunizados con vacuna de Cólera o que estuvieron en contacto directo con la bacteria fué descrita por primera vez por Eisle y col (1948) y McCullough y col. en el mismo año, quienes suponen que el antígeno flagelar de *Vibrio cholerae* estaba relacionado con el antígeno somático de tres especies de *Brucella*. Posteriormente en los años 50's Gallut J. describe que estas reacciones cruzadas se debían al antígeno somático de *Vibrio cholerae* y no al antígeno flagelar (19).

Estudios recientes realizados por Caroff M, Bundle D y col. (1984), Malcolm y Bundle (1990) determinaron que la reactividad cruzada de *Brucella* y *Vibrio cholerae* estaba relacionada a epitopos presentes en los residuos de derivados N-acetil, 4-amino-4,6-didesoxi-D-manopiranosil con uniones 1,2 que forman la cadena O polisacárida de sus lipopolisacáridos (8,41).

2.0 GENERALIDADES

2.1 COLERA

2.1.1 HISTORIA

El cólera es una infección gastrointestinal que posiblemente apareció por primera vez en Bangladesh y en la India, en aquel entonces fue denominada "Mari" (enfermedad mortal) (36).

Pero es hasta 1854 cuando Filippo Pacini descubre al agente etiológico del cólera biotipo el clásico, que es estudiado más detalladamente en 1833 por Roberth Koch en Calcuta (33,42).

Posteriormente en 1906 F. Gotschlich descubre al vibrión colérico biotipo el Tor en el cadáver de un individuo (42)

Existe gran discrepancia sobre las fechas y el número de pandemias que han afectado a la población, sin embargo, hasta la fecha se han reconocido siete pandemias:

Primera pandemia 1816-23

Segunda pandemia 1824-37

Tercera pandemia 1842-62

Cuarta pandemia 1865-75

Quinta pandemia 1879-1911

Sexta pandemia 1912-23

Séptima pandemia Iniciada en 1961

En la séptima pandemia el biotipo encontrado fué el Tor, siendo el responsable de brotes epidémicos. A partir de 1961 esta infección se extiende en la mayoría de los países de Asia, Europa, Africa y Oceanía. En 1970 el cólera invade a la Unión Soviética y para 1973 se ve afectada la península itálica. En 1977 aparece el cólera en Japón,

encontrándose como principal fuente de infección la contaminación por ingestión de agua, hacia el año de 1978 y 1981 se registran casos nuevos de cólera en Estados Unidos y casos muy esporádicos en 1986, 1987, y 1988, contrariamente a lo que sucede en 1989 donde se reportan 48403 casos, afectando a 35 países (33).

En México el cólera apareció en 1833 en la ciudad de Saltillo y se piensa que éste fue introducido por el Golfo de México, un siglo después se reportó un caso de cólera en una turista Estadounidense que vacacionaba en Cancún (10). A partir de 1991 se presenta el cólera nuevamente en nuestro país, la epidemia se inició en el Estado de México y para Diciembre de 1992 las entidades más afectadas eran: Campeche, Yucatán, Veracruz, Guerrero y Tamaulipas, se presentaron un total de 8162 casos, de los cuales 1783 se hospitalizaron, notificándose 99 defunciones (10).

2.1.2 AGENTE ETIOLOGICO

Según el manual de Bergey la familia Vibrionacea está constituida en su mayor parte por el género *Vibrio*; además existen otros géneros que presentan la característica de ser móviles y oxidasa positivos, entre ellos tenemos: *Photobacterium*, *Aeromonas*, y *Plesiomonas*. El *Vibrio* puede ser diferenciado fácilmente de estos tres géneros por medio de pruebas bioquímicas y por sus requerimientos de altas concentraciones de cloruro de sodio para poder crecer (2,22).

CARACTERISTICAS DEL GENERO

Observados microscópicamente son bacilos Gram negativos que presentan forma de coma, pero cuando el frotis se hace de cultivos viejos su morfología cambia presentando forma de esfera, bastoncillos, filamentos y espirales

Sensibles a desinfectantes, a ciertos antibióticos y a temperaturas superiores a 100°C (42).

Hasta el momento se han aislado 12 diferentes especies del género *Vibrio* de muestras clínicas humanas, debido a la gran cantidad de especies que se encuentran dentro de este género los *Vibrios* fueron clasificados como "aglutinantes" y "no aglutinantes"; actualmente se clasifican como:

- 1) *Vibrio cholerae* 01
- 2) *Vibrio cholerae* NO 01

La diferencia entre estos dos grupos es que los primeros tienen la capacidad de aglutinar con suero polivalente 01

Vibrio cholerae 01 es el agente causal del cólera, cuyo reservorio naturales el hombre, dentro de este se encuentran dos biotipos: el clásico y el Tor como se observa a continuación:

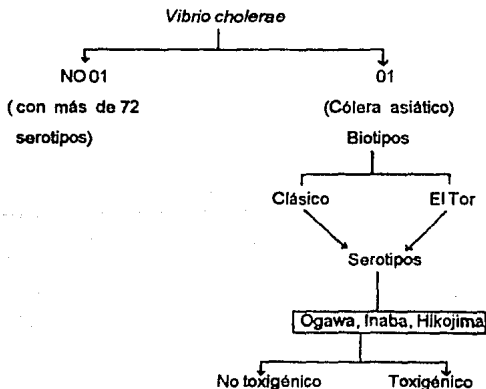


Figura 1. Clasificación de *Vibrio cholerae* en base a su antígeno somático. En caso de *Vibrio cholerae* 01 se incluyen biotipos y serotipos (22)

Las cepas productoras de toxina colérica son causantes de daños a nivel de intestino delgado, así como de la diarrea acuosa y abundante por el incremento en los niveles de AMPc (10,24).

FACTORES DE PATOGENICIDAD

En *V. cholerae* O1 se distinguen varios factores de patogenicidad entre los que encontramos:

- a) Toxina colérica
- b) LPS
- c) Flagelo
- d) Mucinasas
- e) Adhesinas ó hemaglutininas
- f) Fimbrias

Esquemáticamente se observan como sigue

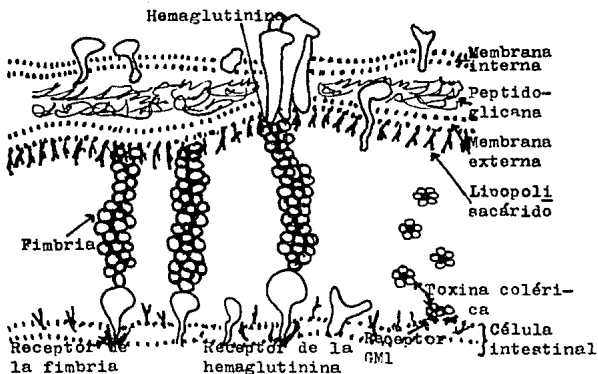


Figura 2. Factores de patogenicidad de *Vibrio cholerae*. Localización de los factores de patogenicidad en la bacteria y sus receptores en la célula intestinal (10).

Dentro de estos factores, el principal es la toxina colérica por lo que es necesario saber como esta conformada y su mecanismo de acción en el organismo humano. Se considera que es la más importante porque es la que causa mayores trastornos, ya que al penetrar por la capa mucosa y adherirse al epitelio del intestino delgado provoca la diarrea acuosa característica de la enfermedad (10). Existen evidencias que indican que la secreción activa de electrólitos por la estimulación epitelial de la toxina colérica se debe al incremento en los niveles de AMPc (10,22,24).

Varios estudios revelan que la toxina colérica es una proteína de aproximadamente 84 KDa, formada de dos subunidades:

- i) Cinco subunidades B
- ii) Una subunidad A (formada por dos fragmentos)

Las subunidades B son las que reconocen a los receptores específicos GM1 en la membrana celular del epitelio intestinal (22,24).

Mientras que la subunidad A1 que presenta una porción enzimática hace que se active el complejo adenilato ciclasa incrementando los niveles de AMPc, lo que provoca alteración de la secreción intestinal, con salida de agua, cloruros y carbonatos, dando como consecuencia diarrea acuosa y abundante (1,22,24)

Esquemáticamente se observa así:

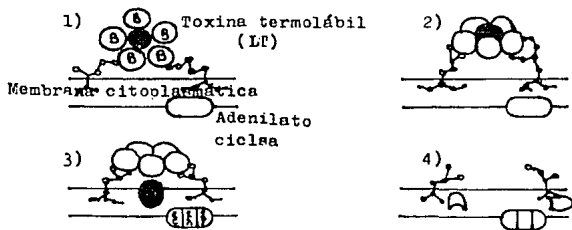


Figura 3 Mecanismo de acción de la toxina colérica. La célula intestinal contiene receptores específicos para que se una la subunidad B, que a su vez forma una especie de poro y deja que la subunidad A entre libremente al epitelio intestinal (10)

El incremento de AMPc por acción de la toxina colérica hace que también haya liberación de calcio por lo que se activa a la vez el complejo calcio-calmodulina que altera la permeabilidad celular de los cloruros (24).

Por otra parte, tenemos que el LPS es la parte más antigénica de la bacteria, por medio de él podemos diferenciar entre *V. cholerae* 01 y NO 01 (22), además el antígeno somático presenta reactividad cruzada con *Brucella*, *Yersinia enterocolitica* serotipo 09, etc, por lo que más adelante trataremos el tema con detalle (45).

En lo referente al flagelo podemos decir que se encuentra implicado en la patogénesis del cólera por dos causas:

- 1) Le da motilidad a la bacteria
- 2) Su posible papel en la adherencia a la superficie intestinal, por lo que la función del flagelo es poseer las adhesinas responsables del ataque al tejido intestinal (21).

2.1.3 ENFERMEDAD

Una vez que el vibrión colérico se ha introducido al organismo y pasado el período de incubación (2-5 días) pueden presentarse cuatro posibilidades:

- 1) Ausencia de síntomas, en un porcentaje del 59-75% de los casos
- 2) Molestias leves
- 3) Síntomas moderados
- 4) Cuadro clínico grave, aparece en un porcentaje muy bajo, ya que solamente lo presentan un 11% (24,33).

En el caso de los cuadros asintomáticos o diarreas leves sólo el cultivo de las heces permite la identificación del agente causal de la enfermedad (1). Los incisos dos y tres se presentan en un 15% de la población afectada (24).

Cuando el individuo presenta manifestaciones clínicas se dice que son debidas a la acción de la toxina colérica, causando la diarrea característica de la enfermedad, con pérdida de agua y electrolitos de los espacios intracelulares en el lumen intestinal (24).

Cuando se presenta el cuadro clínico grave se requiere de hospitalización ya que generalmente se presenta deshidratación, choque hipovolémico y muerte en el curso de unas cuantas horas si no se atiende inmediatamente al individuo (24,34).

Antes de que el paciente inicie la diarrea se presentan algunos síntomas como: anuria, anorexia y calambres musculares en el abdomen entre otros, posteriormente aparece bruscamente la diarrea acuosa y abundante que inicialmente es de color café pero rápidamente adquiere un color pálido como "agua de arroz" (líquido claro con trazas visibles de moco) con un olor parecido al del pescado, así como vómito (1,22,24,33).

Mientras el paciente presenta la diarrea, tiende a enronquecer e inclusive puede llegar a la afonía; poco a poco se va debilitando hasta caer en el colapso (33).

Generalmente las evacuaciones que tiene el enfermo por un lapso de 24 horas van de 20 hasta 50, dependiendo de la gravedad de la enfermedad (24).

Una vez desencadenada la enfermedad se observan las siguientes manifestaciones clínicas:

- a) Mejillas y ojos hundidos
- b) Piel seca y arrugada por lo que las manos dan apariencia de "mano de lavandera"
- c) No se percibe el pulso
- d) Tensión arterial baja

- e) Extremidades frías
- f) Abdomen blando con dolor tipo cólico
- g) Olor parecido al pescado causado por las heces
- h) Calambres en manos y pies
- i) No hay fiebre ó es baja. (1,33)

Por otro lado el químico al llevar a cabo exámenes de laboratorio encuentra las siguientes concentraciones de electrólitos en las heces:

Tabla 1. Concentración de electrólitos en heces (mM/lit) (24).

	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻
Adulto	135	15	100	45
Niño	105	25	90	30

Como se observa en la tabla 1 las heces presentan la característica de ser isotónicas, ricas en bicarbonato y potasio, causando con ello la pérdida de agua y posteriormente se produce la deshidratación (24).

Generalmente cuando los niños se ven afectados por una infección con *Vibrio cholerae* no se presentan las manifestaciones clínicas características del adulto, en ellos se observa que:

- 1.- La sensibilidad esta alterada
- 2.- Las convulsiones son más frecuentes
- 3.- La fiebre que es rara en los adultos, en los niños se presenta con bastante frecuencia (1,33).

Con la salida tan brusca de líquidos el paciente puede llegar a perder de un 10 al 15% de su peso corporal, lo que ocasiona un colapso circulatorio.

El paciente se puede encontrar conciente, pero inquieto y con bastante sed,

sin embargo, cuando no se puede controlar la deshidratación, hay acidosis metabólica (34).

Las formas graves del cólera que pueden llegar incluso a la muerte se observan en los individuos con edad avanzada, así como en aquellos individuos que están afectados por diferentes enfermedades somáticas que reducen la resistencia del organismo y disminuyen la barrera defensiva del estómago (42).

Un caso especial son las mujeres embarazadas que se ven afectadas por cólera, ya que se presenta aborto en un 50% de los casos, observándose también retención placentaria (1,33).

De todas las manifestaciones clínicas mencionadas anteriormente que suele causar el vibrión colérico se puede resumir que:

- Hay disminución en el volumen extracelular, por la pérdida de líquido a nivel intestinal

- Se presenta la acidosis como consecuencia de la pérdida del bicarbonato en las evacuaciones

- La eliminación excesiva de potasio en la materia fecal causa la hipotasemia (24).

2.1.4 DIAGNOSTICO

Para llevar a cabo el diagnóstico de *Vibrio cholerae* O1 existen tres posibilidades.

- 1) Cuadro clínico
- 2) Bacteriología
- 3) Serología

El cuadro clínico se facilita cuando existen gran cantidad de casos en una zona ó bien durante una epidemia, en cambio cuando los casos son aislados este tipo de diagnóstico se complica (24). En el diagnóstico clínico se aprecian síntomas característicos de la enfermedad como: anorexia, malestar abdominal y diarrea acuosa semejante al agua de arroz (33).

Una vez que se hace el diagnóstico clínico inmediatamente se puede iniciar el tratamiento del paciente, sin embargo; para confirmar cualquier caso sospechoso de cólera es necesario el aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* O1 a partir de materia fecal; la cual debe ser colectada de ser posible en las 24 horas después de iniciada la enfermedad y antes de la administración de antibióticos (24,33)

La muestra se colecta con hisopo rectal y una vez obtenida se debe procesar en el laboratorio correspondiente (22).

La presencia de un gran número de vibriones como 10^8 - 10^9 x ml en la materia fecal nos permite formular un diagnóstico con relativa facilidad (1,33).

Existen técnicas rápidas para el diagnóstico de *Vibrio cholerae* que aunque no se realizan de rutina pueden ser de gran utilidad, entre ellas tenemos el examinar las evacuaciones directamente al microscopio y tefirlas con Gram. Esta técnica en fresco nos sirve para observar la movilidad tan rápida de los vibriones, y comprobar la ausencia de leucocitos (24,42).

En el Gram se observan pequeños bacilos Gram negativos en forma de "coma", "s", "c", presentando un flagelo polar lo que le da la característica de ser móvil.

Mediante un modelo se podría representar como sigue:

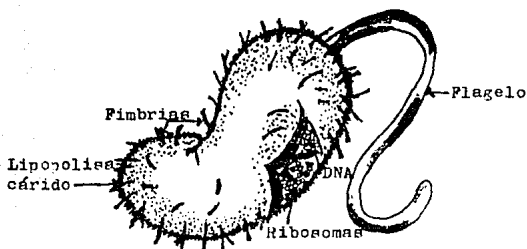


Figura 4. Representación morfológica de *Vibrio cholerae* mediante un modelo (10).

Con ayuda de la microscopia en campo oscuro se puede visualizar el tamaño, forma y movilidad (33,42).

La utilización del microscopio estereoscópico puede ser de gran ayuda para facilitar el diagnóstico bacteriológico; lo que se hace es sembrar las heces en estrías sobre placas de agar nutritivo, se incuban de 4-5 horas y transcurrido este tiempo se observan las colonias de los vibriones (1,33).

Otra de las técnicas rápidas que han sido utilizadas es la de anticuerpos fluorescentes, que ha mostrado resultados superiores al 90% de positividad con respecto al método de cultivo, sin embargo, no es aplicable para los casos de portadores o convalescientes, esto tal vez sea debido a que excretan menor cantidad (10^6 - 10^7) de vibriones que los casos de cólera (33). Para ello recientemente se ha utilizado la técnica de ELISA que llega a detectar pequeñas cantidades de enterotoxina de cólera del orden de 6 pg/ml (24).

Como ya se ha mencionado, el aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* O1 a partir de muestras de heces es esencial para confirmar el diagnóstico de la enfermedad. La metodología empleada para el aislamiento e identificación de *Vibrio chole-*

rae es la que se sigue en el CDC y en el INDRE:

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

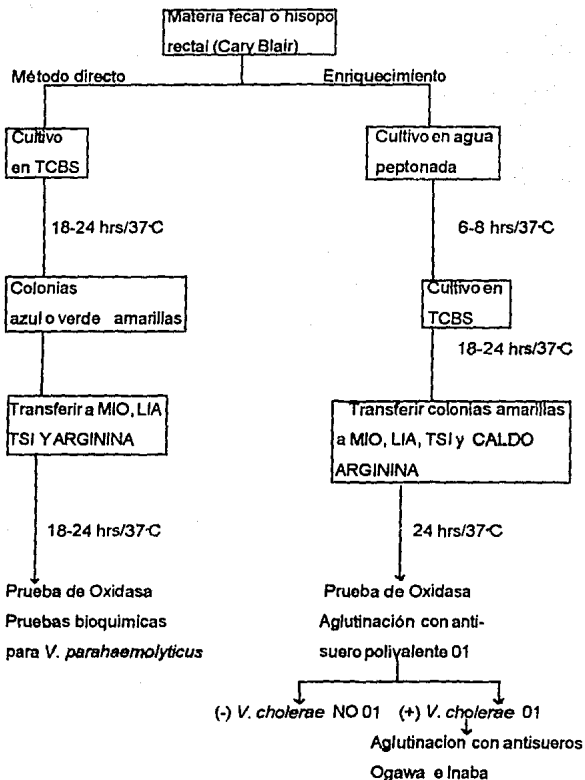


Figura 5. Aislamiento bacteriológico de *Vibrio cholerae* a partir de hisopo rectal (22)

Cuando el cultivo no se puede llevar a cabo por alguna causa se puede realizar un diagnóstico a nivel serológico

DIAGNOSTICO SEROLOGICO

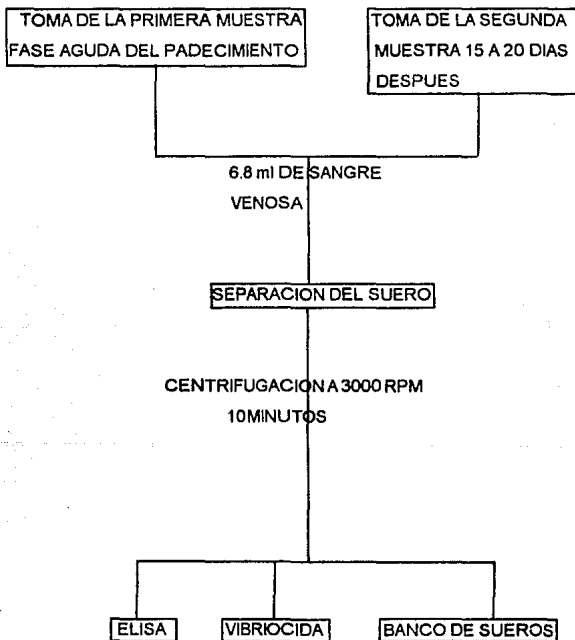


Figura 6. Diagnóstico serológico de *Vibrio cholerae*. Como lo muestra la figura se deben tomar muestras pareadas para determinar el nivel de anticuerpos vibrioncitas y antitoxina (23).

En este tipo de diagnóstico se determinan anticuerpos vibriocidas por la técnica de FC y anticuerpos antitoxina por el método de ELISA, tanto en la fase aguda como en la de convalecencia (22,23).

El cuadro anterior indica que se deben tomar muestras pareadas para que se pueda formular un diagnóstico presuntivo confiable, esperando una elevación de anticuerpos en la fase de convalecencia. Si solamente se llega a tomar una sola muestra, no se puede proporcionar ninguna información con valor diagnóstico (22).

Actualmente en el INDRE, se realiza la determinación de anticuerpos vibriocidas y antitoxina en: casos, contactos y controles de cólera.

El título de anticuerpos vibriocidas en la fase aguda de la enfermedad es bajo; sin embargo; al décimo día alcanzan su nivel máximo y disminuyen en la tercera o cuarta semana, permaneciendo con títulos elevados por más de seis meses, aunque se debe tomar en cuenta que la elevación de estos anticuerpos también puede ser debida a la infección por otras bacterias como: *Brucella*, *Citrobacter* y *Yersinia*, pero el tema de reacciones cruzadas que presenta *Vibrio cholerae* con otras bacterias lo trataremos adelante con más detalle (24).

En lo referente a los anticuerpos antitoxina, estos también alcanzan su nivel máximo al décimo día de la enfermedad, pero a diferencia de los anteriores, permanecen mucho más tiempo en torrente sanguíneo llegando incluso a detectarse después de dos años, sin embargo, también aquí hay que tomar en cuenta que *Escherichia coli* posee una enterotoxina que produce anticuerpos muy similares a éstos (10,24)

El diagnóstico serológico de un portador se observa cuando el título de anticuerpos persiste por doce semanas o más; así mismo para confirmarlo se debe determinar la presencia de vibriones en las heces y de ser posible en bilis (1).

2.2 BRUCELOSIS

2.2.1 HISTORIA

Por el año de 1861 J.A. Marston en la isla de Malta describió el primer informe sobre los síntomas de la brucelosis humana, en aquel entonces fue denominada fiebre remitente gástrica del Mediterráneo (18). Posteriormente en 1887 David Bruce, también realiza su trabajo en la isla de Malta, puesto que se presentaban 100 casos anuales de una enfermedad de origen desconocido. Al analizar bazos de soldados británicos fallecidos, encontró un microorganismo que por su pequeño tamaño lo llamó *Micrococcus melitensis*. Tiempo después Zammit descubrió que la fuente infectiva provenía de: sangre, leche y orina de las cabras (46).

En 1897 M.L. Hughes escribe un libro sobre la Brucelosis Humana, mencionando las manifestaciones clínicas y patología de esta enfermedad. Este mismo año un veterinario danés llamado Bang estudio la causa del aborto contagioso en el ganado bovino, encontrando como agente responsable a un pequeño bacilo Gram negativo, que más tarde recibió el nombre de *Brucella abortus*. (18,46).

En 1914 Traum aisló a una bacteria a partir del feto expulsado prematuramente por una cerda (6). Finalmente en 1920 Alice Evans observó la gran semejanza entre estas tres especies diferentes, por lo que estos gérmenes recibieron el nombre genérico *Brucella* y actualmente se conocen como: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* y *Brucella suis*, respectivamente, que son las especies que causan brucelosis en el hombre (17).

Recientemente se han reconocido otras tres especies más de *Brucella*: *B. canis*, en perros; *B. ovis* en ovejas y *B. neotomae* en la rata de madera del desierto (18).

En lo que se refiere a nuestro país, es hasta 1921 cuando en el Estado de Puebla, Pláceres logra el primer aislamiento de *Brucella*. Los primeros reportes de la incidencia de esta infección en los humanos fueron escritos en los años 30. Por estas mismas fechas

Ruiz Castañeda proporcionó información acerca del aislamiento, identificación y tratamiento de la Brucelosis en humanos (35).

2.2.2 AGENTE ETIOLOGICO

La Brucelosis es una infección zoonótica causada por pequeños cocobacilos Gram negativos que pertenecen al género *Brucella*, el cual se encuentra constituido por seis especies: *B. melitensis* con tres biovars; *B. abortus* con ocho biovars; *B. suis* con cuatro biovars; *B. canis*; *B. ovis* y *B. neotomae* que solamente presentan un biovar (35).

CARACTERISTICAS DEL GENERO

Las colonias son convexas, lisas, brillantes y translúcidas, no presentan pigmentación.

Las brucelas presentan pleomorfismo, esto es, que a veces en tinción de Gram pueden observarse como pequeños cocobacilos y otras como bastoncillos.

Se presentan en pares o pequeñas agrupaciones.

No poseen cápsula

No presentan esporas y flagelos

Son microorganismos aerobios estrictos.

Miden 0.5-0.7 μm de ancho por 0.6-1.5 μm de largo.

Oxidasa y catalasa positivas

Hidrolizan la urea.

La producción de H_2S varía entre especies y biovars.

Requieren de complejos nutricionales como: tiamina, niacina y biotina para poder crecer.

Reducen el nitrato a nitrito.

Son parásitos intracelulares.

Poseen metabolismo oxidativo (2,9,17).

Actualmente la Brucelosis es una enfermedad muy frecuente en el área Norte y Centro de la República Mexicana; por lo que representa un serio problema de Salud Pública (35).

Aunque cada *Brucella* presenta afinidad por una especie animal en particular, no significa que el hospedero no pueda ser infectado con una especie diferente (18).

Dentro del género *Brucella* encontramos las siguientes especies:

ESPECIE	HUESPED DEFINITIVO
<i>B. abortus</i>	Vacas
<i>B. melitensis</i>	Cabras
<i>B. suis</i>	Cerdos
<i>B. canis</i>	Perros
<i>B. ovis</i>	Ovejas
<i>B. neotomae</i>	Roedores de madera
<i>B. rangiferi tarandi</i> *	Renos y caribú

Tabla 2. Especies del género *Brucella* y su huésped. Cada especie puede infectar en mayor ó menor grado al ser humano (18).

* Todavía no es bien reconocida

De todas estas especies las que afectan al hombre en mayor o menor grado son: *B. melitensis*; *B. abortus* y *B. suis* (26).

2.2.3 ENFERMEDAD

Para poder definir los signos y los síntomas de la Brucelosis es necesario conocer cual es la forma de adquirir la enfermedad. Debido a que nosotros trabajamos con muestras de humanos, solamente trataremos lo referente a la Brucelosis humana.

La Brucelosis puede ser transmitida del animal infectado al humano por tres mecanismos diferentes:

1) **POR INGESTION.** Es quiza la causa más frecuente de infección, ya que incluso en nuestros días se consume leche cruda y productos lácteos no pasteurizados provenientes de ovejas cabras y vacas (26,36). En este caso la bacteria penetra a través de la mucosa intestinal y es atrapada por células polimorfonucleares que las transportan hasta los ganglios regionales, por lo que la bacteria se introduce a células mononucleares y se multiplica, algunas de estas células son destruidas y otras son transportadas a torrente sanguíneo, pudiendo llegar a bazo, médula ósea y riñón, donde ocasiona lesiones graves (17).

2) **CONTACTO DIRECTO.** Este tipo de mecanismo es debido al manejo de animales infectados o que han tenido abortos, ya que la bacteria se concentra en la zona fetal de la placenta, en el líquido amniótico y en el corión. En este caso la puerta de entrada de la bacteria es a través de vía cutánea (por pequeñas abrasiones en las manos) y conjuntival (26,36), por ende el personal que se ve afectado es el médico veterinario, pastores, caballerangos, carníceros, que son los que manipulan los tejidos de los animales, por lo que la frecuencia en este grupo es elevado; se considera una enfermedad de tipo profesional (6).

3) **POR INHALACION.** Se contrae cuando se inhalan materiales desecados de animales infectados, además de aerosoles, por lo que este tipo de transmisión esta vinculado al personal de laboratorio que maneja a las bacterias, también es considerada

una enfermedad de tipo profesional (36).

Por medio de varios experimentos se ha demostrado que la Brucelosis podía ser transmitida por mosquitos y moscas hematófagos. Parece ser que el agua esta excenta de ser un vehiculo de transmisión pues el único brote que se ha señalado por consumo de este liquido contaminado puede ser debido a un accidente de laboratorio (6).

Se ha reportado que solamente existen tres especies de *Brucella* que afectan al hombre, siendo estas: *B. melitensis*; *B. abortus* y *B. suis*. (35,46). *B. melitensis* es la especie que produce una enfermedad con mayor gravedad que las otras dos especies. Mientras que *B. suis* produce complicaciones supurativas con mayor frecuencia. En lo que respecta a *B. abortus* es considerada menos patógena que las dos anteriores (26,36).

El periodo de incubación de la bacteria es muy variable ya que puede ser de semanas y prolongarse hasta 3-4 meses (18,36).

Debido a que no se siguen en regla las normas para erradicar a la Brucelosis animal, todavía se siguen reportando casos de esta zoonosis en nuestro país, tal y como se muestra en la siguiente figura.

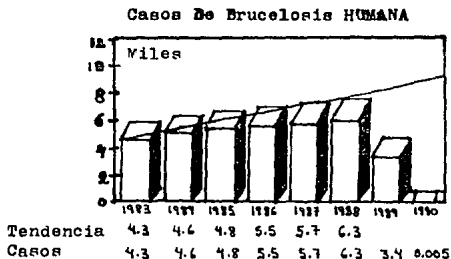


Figura 7. Casos de Brucelosis Humana en México. De 1983 al 1988 el número de casos de brucelosis en nuestro país aumentaba cada vez más, pero a partir de 1989 la enfermedad disminuye notablemente (35).

Una vez que las *Brucellas* se han introducido al organismo, deben adaptarse para su desarrollo y sobrevivencia, a este lapso se denomina período de incubación y se presenta de manera asintomática (35,36).

Los síntomas al inicio de la enfermedad son: astenia, malestar general, sensación de frío, dolores en músculos de huesos y articulaciones (9), posteriormente aparecen cuadros clínicos muy semejantes a los de otras enfermedades infecciosas como: fiebre tifoidea, tífus exantémico, paludismo, tuberculosis y reumatismo(42).

Al ir revolucionando la enfermedad puede ocurrir lo siguiente:

1.- Que la sintomatología dure menos de una semana y el individuo se recupere, en éste caso podemos descartar la infección por *Brucella*.

2.- Que la sintomatología sea moderada y algunas veces se presenten períodos alternados de mejoría y decaimiento.

3.- Que inicialmente no se presenten manifestaciones de importancia pero después aparecen cuadros clínicos severos. Este período puede clasificarse como de tipo agudo.

4.- Que se presente un cuadro febril violento y aparezcan manifestaciones más o menos severas de toxemia (9).

Debido a que en una infección por *Brucella* la intensidad, forma y duración de la temperatura es lo más importante, se ha clasificado la evolución de la Brucelosis como sigue:

A) De tipo intermitente, cuyas manifestaciones son: debilidad, sudoraciones nocturnas, reumatismo articular migratorio y temperaturas elevadas por la noche que

van de 38.5-40 C y descenso normal por las mañanas.

B) De tipo ambulatorio, presentandose sintomas muy semejantes al inciso anterior, pero más leves.

C) De tipo ondulante, caracterizada por aumentos progresivos de temperatura de un día a otro, hasta alcanzar un máximo y descender gradualmente. La temperatura puede ser continua, remitente, intermitente o muy irregular. En los periodos en los que no hay fiebre los sintomas pueden disminuir e incluso desaparecer.

D) De tipo maligno, generalmente se presenta en individuos que han padecido la enfermedad, en este caso la temperatura siempre es alta, hay hiperpirexia e incluso puede ocurrir la muerte

E) De tipo crónico, hay trastornos gastrointestinales y nerviosos, además de rigidez muscular (6,9).

Otro sintoma característico de la Brucelosis es la sudoración, la cual esta asociada a la temperatura del paciente, este tipo de sudoración es nocturna y conforme evoluciona la enfermedad va desapareciendo (35).

En lo que respecta a la debilidad física que tiene el paciente, podemos mencionar que se encuentra asociada a la pesadez en brazos y piernas, el enfermo muchas veces prefiere estar en cama reposando. Así mismo se presentan dolores musculares principalmente en articulaciones, siendo la rodilla la parte más afectada. Hay algias principalmente en la articulación coxofemoral (6,9,32).

En la fase de la bacteremia el enfermo tiende a perder peso corporal, presentando aspecto anémico (9).

Debido al estado febril se presentan manifestaciones clínicas como: anorexia, insomnio, nerviosismo y molestias respiratorias (9).

Con todo lo anterior podemos decir que los síntomas clínicos de la Brucelosis humana aguda no difieren a lo reportado por otros autores, tal y como lo muestra la siguiente tabla:

SINTOMAS CLINICOS EN BRUCELOSIS AGUDA				
SINTOMAS	Crosby E. et al.	Samra Y. et al.	Madkour M. et al.	Hosp. Infecto- logía CM La Raza
	(%)	(%)	(%)	(%)
Fiebre	95	100	93	100
Diaforesis	68	90	87	100
Cefalea	63	90	80	100
Artralgia	55	37	86	100
Pérdida de peso	21	-	65	26
Hepatomegalia	87	40	16	10
Esplenomegalia	61	60	15	10
Linfadenopatía	50	21	18	2

Tabla 3. Síntomas clínicos de la Brucelosis aguda en los humanos. El principal síntoma de todos estos estudios indica que la fiebre es la que se ha encontrado por encima del 90% de los casos (35).

Adicional a este cuadro suelen agregarse afecciones a otros órganos debidos a las complicaciones de la infección. Se presenta con frecuencia la orquitis y la espondilitis. En la fase de la bacteremia puede existir riesgo de aborto (9).

La infección por *B. abortus* produce un cuadro clínico semejante pero menos severo que el anterior, lo que contribuye a que se presente más del 80% de recuperación en individuos infectados por esta especie, mientras que la recuperación de los individuos infectados por *B. melitensis* cuando mucho llega a ser de un 30% (9).

BRUCELOSIS CRONICA

En lo que respecta a la Brucelosis cronica, se ha observado que los síntomas son poco definidos por lo que su diagnóstico se dificulta (17), pero se denomina así porque la enfermedad persiste por un período de 4-6 meses ó más (32,36), puede ser el resultado de un estado latente de la infección aguda.

En esta forma de infección el médico no puede proporcionar un diagnóstico clínico de la enfermedad, sino que es necesario apoyarse en estudios bacteriológicos e inmunológicos.

Las manifestaciones clínicas muchas de las veces son muy variadas, sin embargo; aún persiste la depresión física y mental (9,32), ligeras elevaciones de temperatura (9) así como trastornos gastrointestinales (6).

Algunos autores que han realizado estudios en pacientes con esta afección mencionan que la Brucelosis crónica se debe a una respuesta de hipersensibilidad que presenta el paciente hacia la enfermedad (35)

Debido a que algunos individuos presentan cuadros sintomáticos continuos e intermitentes, se consideran como pacientes con Brucelosis crónica a:

- 1.- Los casos de *Brucella* que persisten por más de un año según lo propone Spink
- 2.- Aquellos casos que después de una fase bacterémica por este germen, presenten cuadros clínicos continuos o intermitentes.
- 3.- Casos probables, especialmente en aquellos individuos que no presentan bacteremia y que los únicos datos que nos pueden ayudar son las pruebas de aglutinación y de alergia cutánea (9).

2.2.4 DIAGNOSTICO

En el caso de la Brucelosis el diagnóstico puede realizarse por tres formas:

- 1) Clínico
- 2) Bacteriológico
- 3) Serológico

Para el diagnóstico clínico ya se han mencionado todas las manifestaciones que presenta el paciente en cada etapa de la enfermedad, en este caso el que lleva a cabo el diagnóstico es el médico, sin embargo, debe tomar en cuenta que muchas veces la Brucelosis presenta cuadros clínicos muy semejantes a otras enfermedades infecciosas (42).

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

El diagnóstico bacteriológico es sin lugar a dudas la herramienta más útil que sirve para proporcionar un diagnóstico definitivo, este se lleva a cabo mediante el aislamiento y la identificación del agente etiológico (36).

Dentro de las muestras que pueden servir para el aislamiento del microorganismo encontramos:

Sangre.- se debe tomar este tejido biológico cuando el paciente se encuentra en estado febril ya que en esta etapa se ha observado que los cultivos son con frecuencia positivos. Un ejemplo de ello, es donde *B. melitensis* se aisló en un 68.2% cuando los pacientes presentaban cuadro febril agudo y solamente un 31.8% de cultivos fueron positivos cuando los pacientes no presentaban fiebre (47).

Médula ósea, hígado, nodulos linfáticos.- se recomienda este tipo de muestras en los casos subagudos y crónicos de la enfermedad (17,25,36).

Para determinar fuente de infección se trabaja con leche cruda y productos lácteos no pasteurizados. Una vez obtenida la muestra se procede a inocularla, aislar e identifi-

car al microorganismo causal de problema, para ello se sigue la metodología de rutina que se utiliza en el Laboratorio de Brucelosis del INDRE

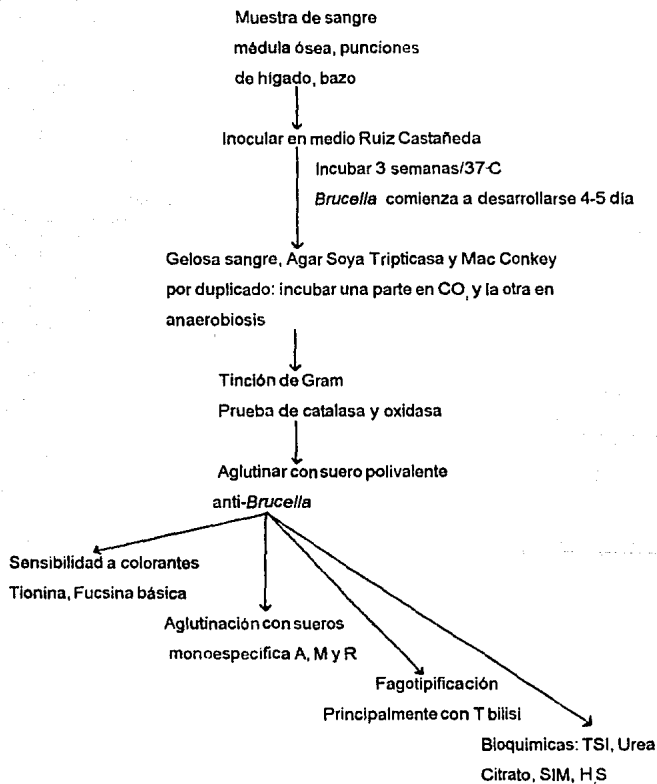


Figura 8. Procesamiento utilizado en el INDRE para el aislamiento e identificación de *Brucella* a partir de muestras de sangre y de algunos órganos (35,36).

DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Como se ha mencionado el aislamiento bacteriológico, es primordial para un diagnóstico de Brucelosis, sin embargo, el cultivo no siempre es positivo principalmente en algunas formas clínicas de la enfermedad, así mismo, los microorganismos pertenecientes al género *Brucella* son de lento crecimiento, es por ello que el diagnóstico de la Brucelosis se basa en la mayoría de las ocasiones en pruebas de tipo serológico (11).

Los anticuerpos reconocidos por cada prueba serológica son formados por la estimulación de antígenos de *Brucella*, por lo cual es necesario conocer cual o cuales de estos antígenos participan para que se monte la respuesta inmune:

- LPS.- solo se encuentra en cepas lisas

Contiene los antígenos A y M.

- Proteínas de membrana externa

- Proteínas citoplásmicas.- son fracciones solubles que se encuentran en cepas lisas y rugosas de *Brucella*.

Las pruebas serológicas han sido divididas en dos grandes grupos:

- 1) Aquellas donde las células completas en fase lisa son usadas como antígenos.
- 2) Aquellas que utilizan como antígeno extractos celulares.

En el primer grupo tenemos a:

Prueba	Inmunoglobulinas que detecta
Aglutinación en tubo	IgM, IgG e IgA
RB	IgM, IgG e IgA
FC	IgM e IgG
Prueba de Coombs	IgG e IgA no aglutinante
Inmunofluorescencia	

Todas estas pruebas detectan anticuerpos contra LPS.

En el segundo grupo encontramos las siguientes pruebas:

RIA

ELISA

Precipitación en gel (47).

En el laboratorio de Brucelosis del INDRE, las pruebas que se realizan de rutina son: RB, ATA, ATM, MEA, MEM (35,36).

Una vez que se obtiene el suero lo primero que se realiza es la prueba: **Rosa de Bengala**, la cual es una técnica cualitativa, rápida que solo dura 4 minutos; ha suplido a la prueba de Huddleson debido a que esta última presenta resultados falsos positivos (35). Utiliza como antígeno una suspensión de *B. abortus* 1119 S, que se tinte con el colorante Rosa de Bengala y se resuspende en un amortiguador de pH=3.65 (11,47).

Mucho se ha comentado al respecto de esta prueba sobre la especificidad, sin embargo, en un estudio realizado en 1989 por Colmenero D.J y col. encontraron los siguientes resultados en 122 pacientes (11).

Resultados de las pruebas estudiadas			
	Rosa de Bengala	Seroaglutinación	Inmunofluorescencia-IgS
	(suero puro)	($\geq 1:160$)	($\geq 1:100$)
Sensibilidad	95.79 %	65.28 %	68.80 %
Especificidad	98.43 %	100 %	100 %

Tabla 4. Comparación de tres pruebas serológicas en el diagnóstico de Brucelosis. Como se observa la prueba que presenta una mayor sensibilidad y especificidad con respecto a las otras dos es la de Rosa de Bengala (11)

Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Maravi-Poma, Buchanan y Oomen y col (11).

Cuando la prueba: RB resulte positiva, se procede a realizar pruebas complementarias para la formulación de un diagnóstico confiable, ya que por medio de esta prueba no podemos saber si la infección es reciente o pasada, así mismo al ser una técnica de tipo cualitativo, no estima el título de anticuerpos formados contra los antígenos de *Brucella*. (36)

Aglutinación en microplaca

Anteriormente esta era la prueba STT pero ha sido adaptada para economizar tiempo y cantidad de reactivos (47).

También esta prueba al igual que la anterior ha sido criticada por su baja especificidad, es por ello que se recomienda el uso de sueros controles con títulos conocidos, así como sueros de individuos "normales" cada vez que se utilice nuevo lote de reactivos (47).

Los fenómenos de prozona que se presentan en este tipo de titulación son muy raros, tal es el caso de un estudio en el que se analizaron 65 sueros de los cuales solamente uno de ellos presentó este fenómeno en una dilución $\leq 1:20$ (11,35).

Debido a que no está bien definido el título de anticuerpos que nos proporcione un diagnóstico definitivo es necesario la toma de muestras pareadas, una en la etapa temprana de la enfermedad y otra en la evolución de esta (36).

En el laboratorio de Brucelosis, por medio de varios estudios el título que es considerado como indicativo de enfermedad es $\geq 1:160$; claro está, tomando en cuenta el título de anticuerpos que se obtiene en la segunda muestra, esperando que este se vea incrementado con respecto a lo reportado en la primera muestra (35).

Aglutinación en microplaca con 2 mercaptoetanol

Es una prueba semejante a la anterior en lo único que varía, es en que ésta utiliza como diluyente un agente reductor (2 mercaptoetanol) el cual tiene la capacidad de inactivar IgM, por lo tanto, si al volver a evaluar un suero el título de anticuerpos es positivo, consideramos que se debe a inmunoglobulinas de tipo IgG e IgA (35).

La presencia del 2 mercaptoetanol a una concentración de 0.5 M hace que se rompan puentes disulfuro de macroglobulinas 19S e inhibe la aglutinación por anticuerpos IgM, y permite solamente la aglutinación 7S de anticuerpos IgG que son resistentes a 2 mercaptoetanol (3).

En estudios realizados por Buchanan y col. y Young y col. (47) se sugiere que la presencia del 2 mercaptoetanol también puede destruir parcialmente otras clases de inmunoglobulinas.

Esta prueba también nos sirve para evaluar la eficacia de la antibioterapia, así como a los pacientes con Brucelosis crónica, tal como observamos a continuación:

<u>No. de pacientes por título y por tiempo después del comienzo de la Brucelosis.</u>									
Título	STT				2 mercaptoetanol				
	6*	9*	12*	18*	6*	9*	12*	18*	
≥160	75	62	55	44	2	12	8	14	
80	15	21	21	22	24	17	12	5	
40	2	8	13	18	21	21	20	22	
20	0	1	3	8	25	42	52	61	
* expresado en meses.									

Tabla 5. Comparación de la prueba STT y Aglutinación con 2 mercaptoetanol para el diagnóstico de Brucelosis. Como se observa en los resultados anteriores la prueba de STT es más sensible que la prueba de 2 mercaptoetanol en pacientes con manifestaciones clínicas de Brucelosis aguda, sin embargo, en pacientes con un comienzo insidioso o síntomas durante tres o más semanas la prueba del 2 mercaptoetanol es más útil (3).

3.0 REACCIONES CRUZADAS

Cada género bacteriano puede ser diferenciado por sus requerimientos nutricionales así como por sus pruebas bioquímicas y serológicas, sin embargo, existen algunos géneros que presentan determinantes antigénicos comunes, los cuales pueden ser reconocidos por diferentes pruebas serológicas y confundirnos en el diagnóstico, esto es a lo que se denomina reacciones cruzadas serológicas.

En el presente estudio se analizan las reacciones cruzadas serológicas que existen en los géneros Gram negativos: *Vibrio cholerae* y *Brucella*.

En las investigaciones realizadas se reconoce que los determinantes antigénicos comunes pertenecientes a estos géneros se encuentran en la cadena "O" de la parte lipopolisacárida de cada bacteria (7,12,19,41,45).

Para ello necesitamos conocer cual es la composición general de un LPS y las funciones que realizan cada uno de sus constituyentes, así como las revisiones que se han hecho con respecto al tema.

Hay que recordar que la localización del LPS se encuentra exclusivamente en la superficie celular de las bacterias Gram negativas (28).

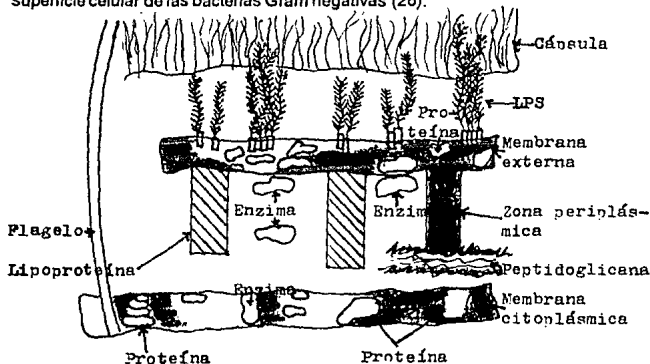


Figura 8. Pared celular de bacterias Gram negativas. Una de las diferencias existentes entre las bacterias Gram negativas y Gram positivas es que estas últimas carecen de LPS (28,31).

3.1 ESTRUCTURA DEL LPS

La molécula del lipopolisacárido está compuesta por tres partes:

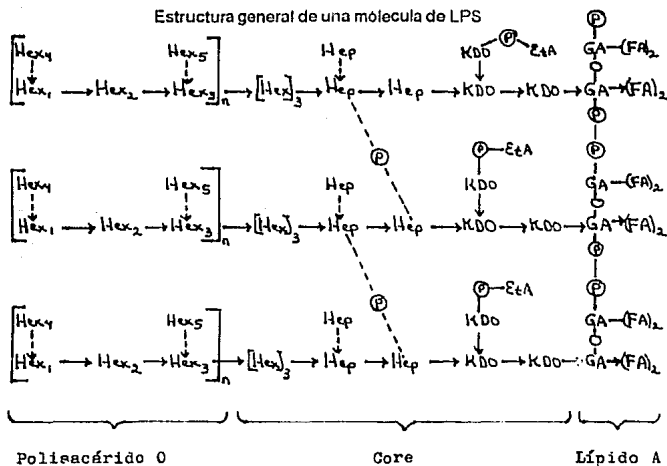
- 1) Parte lipídica, denominada lípido A
- 2) Core ó centro
- 3) El polisacárido "O" (31,40).

La función, composición química, y componentes de especificidad química de cada uno de estos tres componentes pueden observarse en la siguiente tabla:

Estructura básica	Polisacárido O	Core	Lípido A
<u>Función</u>	Especificidad Antigénica	Unión entre polisacárido y lípido A	Actividad biológica (toxicidad)
<u>Composición química</u>	1)Hexosas 2)Hexosaminas 3)Desoxihexosamina 4)6-Desoxihexosas 5)3,6-Didesoxihexosas	1)Hexosas 2)Hexosamina 3)Heptosa 4)Octosa (ácido) 5)Fosforiletanolamina 6)Fosfato	1)Ácidos grasos 2)Glucosamina 3)Etanolamina 4)Fosfato
<u>Componentes</u>	1)D-Galactosa D-Glucosa 2)D-Galactosamina 3)L y D Fucosamina D-viosamina 4)L-Fucosa L-Ramnosa	1)Glucosa Galactosa 2)N-acetilglucosamina 3)L-glicero-D-manoheptosa 4)KDO	1)Ácido 3-hidroximirístico Ácido mirístico Ácido laurico Ácido palmítico

Tabla 8. Componentes de una molécula de LPS. Función y composición química del lípido A, core y la cadena O específica (40).

Por otra parte el conocimiento de estos tres componentes, trajo una serie de investigaciones en cuanto a su estructura, la cual esta constituida como se observa a continuación:



Hex=hexosa Hep=heptosa
P=fosfato KDO=2-ceto-3-desoxioctonato
Eta=etanolamina GA=glucosamina
FA=ácido graso

Figura 10. Estructura química general de una molécula de LPS (40).

Analizando cada uno de los componentes del LPS observamos que a éste cuando se le realiza un tratamiento con hidrolisis alcalina se obtiene el lípido A, el cual está compuesto de ácidos grasos que van de 10 a 22 carbonos; este componente es el que

presenta la función biológica de toxicidad (31,40)

Core.-componente del LPS que es constante en todas las bacterias Gram negativas; sin embargo, cada especie puede diferenciarse debido a que presenta unidades repetitivas y uniones exclusivas. Estructuralmente el core puede ser representado así

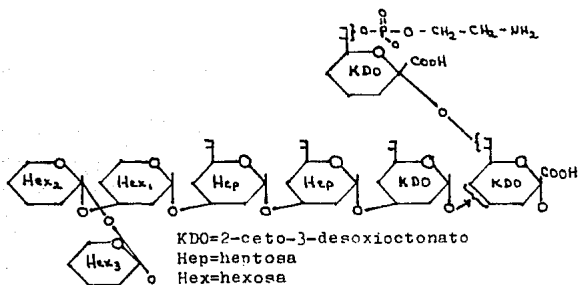


Figura 11 Representación estructural del core (40)

En lo que se refiere al antígeno "O" podemos mencionar que es un polisacárido que determina la especificidad de la bacteria. Generalmente es una cadena repetitiva en forma lineal, pero pueden observarse ramificaciones hacia los lados. Lo que determina la diferenciación en cada bacteria es el largo y la composición de las unidades repetitivas. Es un antígeno capaz de formar anticuerpos en cantidades de submicrogramos (40).

En modelos in "vivo" el LPS ha mostrado ser altamente tóxico y con actividad mitógena a la que responden solamente los linfocitos B (40).

Todo LPS es considerado un factor de patogenicidad que poseen solamente las bacterias Gram negativas cuando se encuentran en fase lisa, que se puede perder por pases de laboratorio, cambios de pH y tratamientos con agentes químicos.

3.2 ANTECEDENTES

Analizando el LPS de *Vibrio cholerae* serotipo Inaba y Ogawa observamos que

presentan determinantes antigénicos similares aunque cada uno de ellos contiene un determinante específico con el cual pueden ser diferenciados:

Cepa	Determinantes antigénicos
Ogawa	A y B
Inaba	A y C (22)

El LPS bacteriano puede obtenerse por diversos métodos, entre los que se encuentran: extracción con fenol/agua (el más utilizado), hidrólisis ácida, etc. Uno de estos métodos fue utilizado por Jackson y col. en 1971 para extraer el LPS de *Vibrio cholerae* O1 serotipo Inaba y al realizarle estudios inmunoquímicos observó dos aspectos que diferían de estudios previos:

- 1) Que el contenido de azúcar amino era más bajo
- 2) No estaba presente el ácido urónico

La composición química que presentó el LPS era la siguiente:

Manosa	1.40 %
Glucosa	6.69 %
Heptosa	6.87 %
Glucosamina	6.10 %
Galactosa	0 %
Glicerol	1.1 %
Etanolamina	3.0 %
Acidos grasos	18.5 %
Protelna	2.0 %
Lipido A	30.0 %
Fosfato total	2.2 %
Nitrogeno total	2.7 %
Acetil	2.6 %
Pérdidas	14.0 %

Tabla 7. Composición química del LPS de *Vibrio cholerae* serotipo Inaba 569B (30).

Posteriormente otro estudio realizado en 1979 por William Redmond sobre la estructura de la cadena "O" en el lipopolisacárido de *Vibrio cholerae* serotipo Inaba utilizando la misma cepa (569B) que la investigación anterior, se encontró que la cadena "O" específica estaba constituida de un polímero lineal de residuos 4-amino-4,6-dideoxi-D-manosa (D-PEROSAMINA) (44). Recientemente (1992) Rajeski y col. reportaron que el LPS de *Vibrio cholerae* estaba constituido de un lípido A, un core, compuesto de 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa, quinovosamina, D-glucosa, D-fructosa y Heptosa, KDO además de un antígeno "O" que contiene un sacárido compuesto con uniones 1,2 de D-PEROSAMINA, donde los grupos amino son acilados por ácido tetraico 3-desoxi-L-glicerol. Sin embargo la estructura de los tres dominios del LPS de *Vibrio cholerae* no está relacionada a la especificidad serológica de los serotipos Inaba y Ogawa (27)

Cuando el LPS de *Vibrio cholerae* es inoculado, se ha encontrado que ofrece protección tanto en humanos como en animales, por lo que se dice que la respuesta inmune es mediada por anticuerpos contra LPS (29).

La toxicidad e inmunogenicidad del LPS de *Vibrio cholerae* es muy similar a la de todas las bacterias Gram negativas cuando se encuentran en fase IIsa, adjudicando el papel tóxico al lípido A, determinando esta propiedad en especies animales como conejos y ratones. Además presenta la capacidad de inactivar al complemento (43).

Para analizar el LPS de *Brucella* hay que tomar en cuenta que las principales especies que afectan al hombre en nuestro país son *abortus* y *melitensis*; cuyos antígenos A y M, respectivamente, están estrechamente relacionados con la cadena O polisacárida en el LPS liso de *Brucella* (5).

El patrón electrofóretico que presenta *Brucella abortus* indica que la cadena O está compuesta de una sola unidad repetitiva de glucosa, mientras que la cadena O de *Brucella melitensis* es mucho más compleja ya que presenta unidades repetitivas pentasacáridas. Además por medio de estudios de RMN la cadena O de *Brucella abortus* muestra ser un homopolímero lineal formado de residuos 4,6-didesoxi-4-formamido- α -D-manopiranosil con uniones 1,2. Por otra parte la cadena O de *Brucella melitensis* es una cadena polimérica que también está compuesta de residuos 4,6-didesoxi-4-formamido- α -D-manopiranosil con uniones 1,3 por cada cuatro uniones 1,2 (5).

Por lo anterior podemos representar a la cadena O de *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* en la siguiente figura:

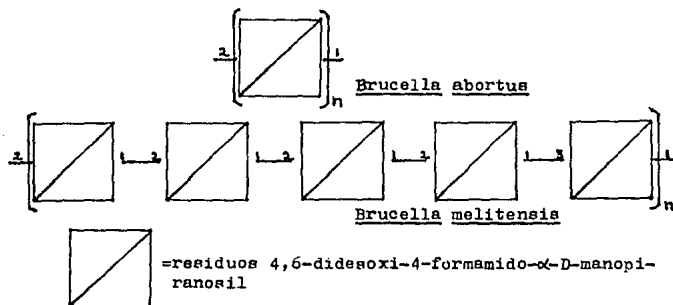


Figura 12. Modelo estructural de *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* (5).

Debido a que el LPS de *Brucella abortus* y especialmente la cadena O específica es mucho más simple que el de *Brucella melitensis*, la mayoría de los estudios se han realizado a esta especie. Un ejemplo de ello son las investigaciones hechas por Caroff y col. (1984) y Bundle y col. (1985) quienes al extraer el LPS de *B. abortus* cepa 1119-3 encontraron que efectivamente la cadena O específica esta compuesta de residuos 4,6-didesoxi-4-formamido-D-manopiranosil (PEROSAMINA) con uniones 1,2 y concluyeron que este LPS es idéntico al de *Yersinia enterocolitica* serotipo O9 de la fase fenólica, y que solamente difiere en las regiones terminales del core (4,8).

Composición del lípido A

2-amino-2-desoxi-d-glucosa	10.1%
Fosfato	5.9%
Acido n-tetradecanoico	12%
Acido n-hexadecanoico	33%
Acido octadecanoico	15%
Acido 3-hidroxitetradecanoico	27%
Acido 3-hidroxihexadecanoico	4%

Tabla 8 Composición química del Lípido A de *Brucella abortus* 1119-3 (8)

Además se le atribuye a este lípido A la mayoría de los efectos biológicos que produce, tal es el caso de la actividad mitógena en células de bazo y actividad anti-complementaria (máximo nivel alcanzado a una concentración de 50 µg) así como toxicidad en animales de laboratorio. Podemos decir que el lípido A tiene la capacidad de activar al complemento por vía clásica (39).

La existencia de reacciones cruzadas serológicas que presentan diversos géneros bacterianos a especies lisas de *Brucella* han sido estudiadas por muchos años. Entre estos géneros se incluyen: *Vibrio cholerae* (7,12,19,41,45); *Yersinia enterocolitica* serotipo O9 (7,14,15,37,45); *Escherichia coli* (14,15,41); *Pseudomonas maltophilia* (16);

especies de *Pasteurella*; *Proteus vulgaris* y OX19; Varios serotipos de *Salmonella*, incluyendo *Salmonella urbana* y *Salmonella pollorum*; *Francisella tularensis*; Serotipos de *Leptospiras*; *Bordetella bronchiseptica* y *Campylobacter fetus* (12).

Aunque en el tema se trata solo lo referente de la reactividad cruzada que presenta *Vibrio cholerae* a cepas lisas de *Brucella* se ha encontrado que todos los generos mencionados anteriormente presentan determinantes antigénicos comunes en cadena O de sus correspondientes LPS, por lo que se hablara de una manera muy general sobre algunas de estas investigaciones (7,14,15,16,37,41,45)

Las reacciones cruzadas serológicas que presenta *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9 a cepas lisas de *Brucella* ha sido estudiada mediante pruebas de hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación, inmunodifusión y fijación de complemento (37).

Por inmunodifusión se observó que existen bandas de reconocimiento con componentes de tipo carbohidrato, lo cual es corroborado posteriormente por Sandulache R. y Marx A. (37), encontrando que la molécula que se encuentra asociado a las reacciones cruzadas serológicas es un polisacárido presente en la fase fenólica. Estos mismos resultados fueron obtenidos en un experimento donde se utilizó como antígeno extracto fenólico de *Yersinia enterocolitica* y los antisueros problema fueron de *Brucella abortus*, *Vibrio cholerae* (este se incluyó debido a que se ha reportado que *Yersinia enterocolitica* estimula la producción de anticuerpos vibriocidas) y como control positivo el de *Yersinia enterocolitica*, encontrandose una línea continua entre el antígeno y los tres antisueros (45).

Con todo esto Caroff M. Budle D. y Perry M. concluyeron que las reacciones cruzadas serológicas que presentan los LPS de *Yersinia enterocolitica*, *Brucella* y *Vibrio cholerae* se deben a determinantes antigénicos comunes (residuos 4-amino-4,6-dideoxi- α -D-manopiranosil N-acilado con uniones 1,2) en la cadena O de sus LPS (7).

En el año de 1987 D. Fabio y col. analizaron el LPS de *Pseudomona maltophilia* encontrando que la cadena O presenta reactividad cruzada serológica con antisueros bovinos específicos para antígenos de *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*. La cadena

O era un polisacárido compuesto de unidades pentasacáridas repetitivas que contenían D-ramnosa, 3-acetamido-3,6-didesoxi-D-galactosa y 4-acetamido-4,6-didesoxi-D-manosa. Por ende se planteó que parece probable que las reacciones cruzadas serológicas entre el LPS de *Pseudomona maltophilia* y algunas especies de *Brucella* se deben a epitopos característicos comunes en la cadena O los cuales están relacionados a residuos 4-amino-4,6-didesoxi- α D-manopiranosil N-acilados (16).

En los últimos tres años se han presentado varios estudios con respecto de la reactividad cruzada que presenta *Escherichia coli* a *Brucella*.

En uno de estos estudios se muestra como principal responsable de la reactividad cruzada a la cadena O específica, ya que presentan el mismo determinante antigénico (grupos perosamina con uniones 1,2 y 1,3) que el LPS liso de *Brucella melitensis*, esto difiere un poco de los reportes anteriores donde se encuentra que la reactividad cruzada es más dominante con *Brucella abortus* (41).

Un segundo estudio consistió en analizar por inmunoelectrotransferencia la respuesta que presentaban 10 sueros de pacientes con Yersiniosis y 10 sueros de pacientes con síndrome uremico hemolítico (causado por *E. coli*) a sus respectivos LPS y a la combinación de ellos. Encontrándose lo siguiente:

1) Que el 80% de los sueros de pacientes con Yersiniosis reaccionaban tanto con el LPS de *Yersinia enterocolitica* como con el de *E. coli* O157.

2) Que los pacientes con Yersiniosis o Brucelosis presentan anticuerpos que reconocen al LPS de *E. coli* O157, además de su antígeno homólogo.

3) Que los pacientes con síndrome uremico hemolítico reaccionan con el antígeno O de *Brucella abortus* así como al antígeno de *E. coli* O157 (14).

Un tercer estudio consistió en analizar 10 sueros de pacientes con serología positiva de Brucelosis y fueron enfrentados al LPS de *Yersinia enterocolitica* y *E. coli*.

De estos 10 sueros se observó que solamente 5 de ellos contenían anticuerpos que eran reconocidos por el LPS de *Yersinia enterocolitica* y los 10 sueros reconocían al LPS de *E. coli* ., esta diferencia en la respuesta tal vez sea debida a que el LPS de *Yersinia enterocolitica* probablemente contiene dos sitios distintos de unión de anticuerpos y solamente uno de ellos se encuentra presente en el antígeno O específico de *E. coli* (15).

Wong y Chowen 1937 fueron los primeros investigadores en reportar la presencia de aglutininas contra *Brucella* en personas que había sido inmunizadas con vacuna de cólera (12). Sin embargo, no fue sino hasta finales de 1940 cuando dos grupos de investigadores, el primero de ellos dirigido por Eisle y el otro por McCullough quienes al realizar estudios sobre la reactividad cruzada serológica de estas bacterias concluyeron que estas eran debidas a la presencia del antígeno flagelar de *Vibrio cholerae* el cual estaba relacionado con el antígeno somático de *Brucella* (19). Los reportes sobre este tema fueron cada vez más frecuentes y es en el año de 1951 cuando se realiza un estudio para corroborar las reacciones cruzadas de estos microorganismos y por medio de la técnica de dilución seriada en tubo se encontraron los siguientes resultados:

Resultados de aglutinación en el suero

Antígeno	<i>B. suis</i>	<i>B. melitensis</i>	Inaba OH	Inaba O	Inaba H
<i>B. suis</i>	2560	5120	320	40	120
<i>B. melitensis</i>	2560	5120	320	40	120
Inaba OH	640	640	5120	5120	640
Inaba H	0	0	2560	2560	0

Tabla 9 Reacciones cruzadas de *Vibrio cholerae* y *Brucella*. Los títulos indican que los determinantes antigénicos son más comunes entre el serotipo Inaba de *Vibrio cholerae* y algunas especies de *Brucella* (19)

Título de aglutininas después de la absorción

Antígeno	<i>B. suis</i>	<i>B. melitensis</i>
Inaba OH	2560	2560
Inaba O	2560	2560
<i>B. suis</i> H	0	0
<i>B. melitensis</i>	0	0

Tabla 10. Título de anticuerpos séricos que demuestran reactividad cruzada de *Vibrio cholerae* hacia cepas lisas de *Brucella* después de llevar a cabo la absorción (19).

El análisis de estos resultados llevaron a Felsenfeld y col. a concluir lo mismo que Eisele y McCullough, que el antígeno H es el involucrado en la reactividad cruzada, aunque ya mencionan también como posible causa a una fracción A que se encuentra tanto en el serotipo Inaba como en el Ogawa de *Vibrio cholerae* (20).

Dos años después Gallut describe que las reacciones cruzadas serológicas se deben a epitopos comunes en el antígeno somático de ambas bacterias (45). A partir de entonces se han realizado estudios sobre la relación antigénica de *Brucella* y *Vibrio cholerae*, usando pruebas de aglutinación antes y después de llevar a cabo absorciones. Un ejemplo de ello es el trabajo hecho por Feeley John en 1969 quien encontró que:

- 1) A bajas diluciones el suero antibrucela aglutina con el antígeno O y HO de Inaba pero no con el de Ogawa.
- 2) Cuando se lleva a cabo la absorción del suero antibrucela con antígeno O de Ogawa e Inaba, decae el título de *Brucella*.
- 3) La absorción con antígeno Ogawa e Inaba elimina la aglutinación del serotipo Inaba.
- 4) La actividad dirigida contra antígenos de cólera es un pequeño componente que

participa en la aglutinación con los anticuerpos que tienen respuesta a *Brucella*.

Por lo tanto, existe un componente común en el antígeno de *Vibrio cholerae* que tiene respuesta contra los antisueros de *Brucella*, siendo más dominante en el serotipo Inaba (19).

Por medio de nuevos avances en cuanto a tecnología en los estudios físicos y químicos se ha demostrado que el componente antigénico común de *Brucella* y *Vibrio cholerae* responsable de la reactividad cruzada serológica es un homopolímero lineal de unidades 4-amino-4,6-desoxi- α D-manopiranosil (PEROSAMINA) con uniones 1,2 en la cadena O de sus respectivos lipopolisacáridos (7,12,41).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cólera iniciado el mes de Junio de 1991 en el Estado de México se ha propagado en gran parte de la población mexicana. El aislamiento e identificación del agente causal es esencial para el diagnóstico de la enfermedad. Actualmente las pruebas serológicas resultan ser una herramienta muy útil cuando no es posible realizar el procesamiento bacteriológico; sin embargo, la presencia de reacciones cruzadas serológicas que presenta *Vibrio cholerae* con cepas lisas de *Brucella* puede afectar la confiabilidad de los resultados, por lo que se hace necesario llevar a cabo este estudio.

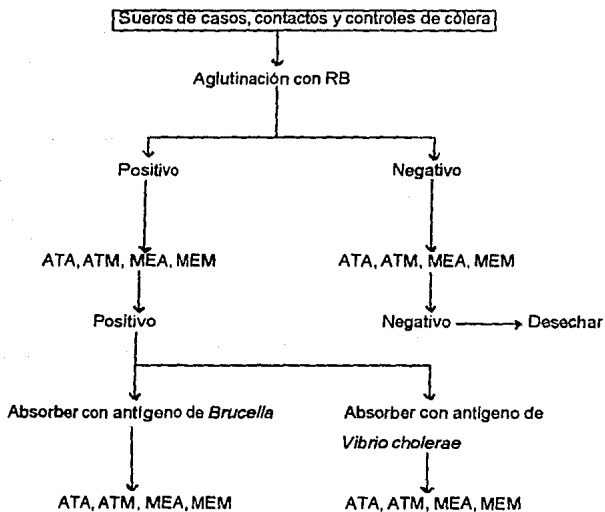
4.0 OBJETIVOS

- Determinar serológicamente la reactividad cruzada a *Brucella* en pacientes diagnosticados serológicamente con Cólera.
- Correlacionar los resultados obtenidos por las técnicas: Rosa de Bengala y Aglutinación en microplaca (empleadas para el diagnóstico de Brucelosis) con la de Fijación de complemento (utilizada en el diagnóstico de Cólera)
- Realizar la prueba de Western Blott a los sueros que hayan resultado positivos tanto a Brucelosis como a Cólera.

5.0 METODOLOGIA

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron sueros de casos, contactos y controles de cólera, a los cuales se les había determinado el nivel de anticuerpos vibriocidas. Para observar las reacciones cruzadas serológicas de *Vibrio* y *Brucella*, a estos mismos sueros se les determinó anticuerpos antibrucela.

DIAGRAMA GENERAL



MATERIAL BIOLÓGICO

Sueros: 772 de casos, contactos y controles de cólera.

Sueros: 40 de individuos aparentemente "sanos" que sirvieron como grupo control

Antígenos:

B. melitensis M16

B. abortus 544

Vibrio cholerae serotipo Ogawa

Vibrio cholerae serotipo Inaba

MATERIAL

Microplacas fondo en "U"

Micropipeta de 20, 100, 200 y 1000 μ l

Puntas para micropipeta

Aplicadores

Placas

Tubos de ensayo de 13 X 100 y 16 X 150

Pipetas graduadas de 1,2,5 y 10 ml

Viales eppendorf

Papel de nitrocelulosa

EQUIPO

Lámpara de luz blanca

Estufa con CO₂

Microcentrifuga

Cámara de electroforesis

Cámara de electrotransferencia

Potenciometro
Fuente de poder
Espejo para placas de hemaglutinación
Vortex

MEDIOS DE CULTIVO

TSA
BBL
BAB

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Solución salina fenolada 0.5%
Solución salina con 2 mercaptoetanol
Rojo Ponceau
Azul de Coomasie
TBS-Tween 20
Acril-bisacrilamida
Tris-HCl pH=6.8
Tris-HCl pH=8.8
SDS 10%
Persulfato de amonio 10%
TEMED(N'N'N'Tetrametilendiamina)
Conjugado polivalente antihumano en cabra unido a peroxidasa
HCl, NaOH
NaCl, Metanol
Glicina
Glicerol

Las pruebas serológicas de rutina que se utilizan en el laboratorio de Brucelosis del INDRE son: RB, ATA, ATM, MEA, MEM. En el presente trabajo se emplean estas mismas para determinar si existen reacciones cruzadas a *Brucella* en sueros de casos, contactos y controles de cólera, todas estas pruebas se fundamentan en reacciones de aglutinación.

La aglutinación puede ser definida como una reacción inmunológica que se lleva a cabo entre antígenos y anticuerpos; donde generalmente el antígeno es particulado, esta unión se hace visible con la formación de agregados macroscópicos. La aglutinación es una reacción que con el uso de diluciones puede estimar el título de anticuerpos.

PRUEBA DE ROSA DE BENGALA

- 1.- Colocar en una placa de vidrio 10, 20 y 40 µl del suero problema.
- 2.- Adicionar una gota (aproximadamente 30 µl) del reactivo de Rosa de bengala.
- 3.- Homogenizar las gotas con un aplicador empezando por la mezcla más diluida.
- 4.- Balancear la placa con movimiento rotatorio por cuatro minutos.
- 5.- Leer en lámpara de luz blanca.

CRITERIOS

Positivo: aglutinación (formación de grumos)

Negativo: no aglutinación en un tiempo de cuatro minutos (11,36,47).

AGLUTINACION EN MICROPLACA (ATA,ATM)

- 1.- Colocar en el primer pozo de la placa en fondo "U" 180 µl de solución salina fenolada al 0.5% (diluyente)
- 2.- Del pozo 2 al 9 colocar 100 µl de solución salina fenolada 0.5%
- 3.- Agregar al primer pozo 20 µl del suero problema, mezclar y transferir 100 µl al segundo pozo, mezclar y transferir 100 µl al tercer pozo y así sucesivamente, del último pozo

se desechan 100 µl para tener un volumen constante.

4.- Añadir 100 µl de antígeno (*B. abortus* ó *B. melitensis*, según sea el caso) a todos los pozos.

5.- Homogeneizar e incubar 37°C/24 hrs.

6.- Leer la placa en un espejo para hemaglutinación bajo lámpara de luz blanca.

CRITERIOS

Positivo: Formación de malla en el fondo del pozo.

Negativo: formación de botón en el fondo del pozo (36,47).

AGLUTINACION EN MICROPLACA CON 2 MERCAPTOETANOL (MEA, MEM)

Esta prueba se realiza de igual manera que la anterior excepto que como diluyente ahora se emplea el 2 mercaptoetanol.

1.- Colocar en el primer pozo 180 µl de solución salina con 2 mercaptoetanol.

2.- Del pozo dos al nueve se colocan 100 µl de solución salina con 2 mercaptoetanol.

3.- Agregar con una micropipeta 20 µl del suero problema al primer pozo, mezclar y transferir 100 µl al segundo pozo, mezclar y transferir 100 µl al tercer pozo y así sucesivamente, desechan 100 µl del último pozo para mantener un volumen constante.

4.- Añadir 100 µl de antígeno (*B. abortus* ó *B. melitensis*, según sea el caso) a todos los pozos.

5.- Homogeneizar e incubar 37°C/24 hrs.

6.- Leer la placa colocandola en el espejo de hemaglutinación y por encima colocar una lámpara de luz blanca.

CRITERIOS

Positivo: Formación de malla en el fondo del pozo.

Negativo: Formación de botón en el fondo del pozo (3,36,47).

El título en la prueba de microaglutinación, corresponde al último pozo donde se presente formación de malla.

ABSORCION CON *B.abortus* y *B. melitensis*

1.- *B. abortus* y *B. melitensis* fueron crecidas masivamente en tubos inclinados que contenian medio de BBL.

2.- Se incubaron de 24-48 hrs/37°C.

3.- Cosechar con solución salina fenolada 0.5%.

4.- Centrifugar y obtener paquete celular.

5.- Realizar tres lavados con solución salina fenolada 0.5%.

6.- El paquete se ajusta a una concentración de 1g bacteria/20 ml suero.

7.- Colocar en un tubo de ensaye cantidades iguales de las suspensiones de *B. abortus* y *B. melitensis*.

8.- Agregar el suero problema.

9.- Dejar en contacto durante 1hr la suspensión bacteriana y el suero, a temperatura ambiente, con agitación constante.

10.- Centrifugar.

11.- Tomar con pipeta Pasteur el suero absorbido y colocarlo en vial limpio.

Esta misma metodología se sigue cuando se lleva a cabo la absorción con *Vibrio cholerae* Ogawa e Inaba, a excepción de que el sembrado se hace en placas de BAB.

INMUNOELECTROTRASFERENCIA

Es una técnica que debido a su alto poder analítico permite identificar cuales antígenos pueden ser útiles en el diagnóstico de una enfermedad, teniendo como fundamento el poder resolutorio de la electroforesis y la reacción antígeno-anticuerpo en fase sólida.

Se realiza en tres pasos:

A) Electroforesis.- se lleva a cabo la separación de mosaicos antigénicos bajo la influencia de un campo eléctrico.

- 1.- Se preparó el gel separador y concentrador al 13.5%
- 2.- Se utilizó un peine de 10 carriles.
- 3.- Al primer y al décimo carril le colocamos 20 µl de Marcador de peso molecular suspendido en regulador de muestra.
- 4.- Del carril 2 al 9 colocamos 20 µl de antígeno RCM de *Brucella abortus* y por otro lado RB51 de *Brucella abortus*.
- 5.- Se corrió el gel a las siguientes condiciones: 400 volts; 50 mA; 30 watts, 1 hr 10 min.

B) Transferencia.- las partículas separadas por electroforesis son electro-transferidas a papel de nitrocelulosa, donde se unen covalentemente a los grupos reactivos del papel

- 1.- Colocar en un recipiente regulador de transferencia y dejar humedecer: papel de nitrocelulosa, esponjas y papel filtro.
- 2.- Colocar en el cassette las esponjas, el papel de nitrocelulosa y el gel.
- 3.- El cassette se transfiere a la cámara de transferencia y se aplica corriente a las siguientes condiciones: 50 volts; 300 mA; 60 watts, 2 hrs 30 min.
- 4.- Para saber si se llevó bien a cabo la transferencia cortamos una tira donde se colocó el marcador de peso molecular y otra tira que contenga el antígeno y ambos se tiñen con rojo ponceau.

C) Inmunodetección.- reacción antígeno-anticuerpo que se pone de manifiesto agregando un segundo anticuerpo unido a una enzima,

1.- El papel de nitrocelulosa se corta en tiras y se pone a bloquear con leche al 5% (3 ml por cada tira) 1 hr/37°C con agitación.

2.- Las tiras de nitrocelulosa ya bloqueadas se ponen en contacto con el suero problema (previamente diluido 1:25 con TBS-Twen20) y se incuban 1 hr/37°C con agitación.

3.- Lavar con TBS-Twen20 dos veces por 5 min y dos veces por 2 min.

4.- Agregar 2 ml del conjugado (polivalente antihumano en cabra unido a peroxidasa) a una dilución 1:3200 (diluido en TBS-Twen20) e incubar 1 hr/37°C con agitación.

5.- Repetir el paso 3.

6.- Por último agregar 2 ml de sustrato (preparado al momento de usarse) por tira reactiva y enjuagar hasta la aparición de color.

INMUNODIFUSION

1.- Desengrasar portaobjetos con alcohol.

2.- Colocar una película muy delgada de agarosa al 0.1%.

3.- Agregar agarosa al 1% (disuelta en Tris-HCl 0.1M pH=7.5) hasta formar una capa de 5 mm de espesor.

4.- Hacer las perforaciones.

5.- Colocar en un pozo el antígeno (RCM de *B. abortus* 99S) y en otro el suero problema.

6.- Incubar de 24-48 hrs/36°C.

7.- Leer a trasluz o en lámpara de luz blanca (38).

6.0 RESULTADOS

Se analizaron un total de 812 sueros:

- 772 de casos, contactos y controles de cólera
- 40 de individuos aparentemente "sanos"

Pruebas de aglutinación

De los 772 sueros de casos, contactos y controles de cólera, 95 contenían anticuerpos que fueron reconocidos con alguna(s) de las técnicas convencionales de aglutinación (RB,ATA, ATM, MEA, MEM) empleadas para el diagnóstico serológico de Brucelosis, obteniéndose un mayor reconocimiento con la prueba ATM y un menor con la prueba MEA donde solamente 2 sueros presentaron titulación (Tablas 1 y 2). Posteriormente se solicitó al laboratorio de Producción de sueros el título de anticuerpos vibriocidas (que había sido determinado con anterioridad utilizando la técnica FC) de estos sueros estudiados (Tabla3).

Debido a que el estudio era ciego, al comparar los resultados de anticuerpos antibrucela con los de anticuerpos vibriocidas se observó que de los 95 sueros, 39 sueros reconocían solo al antígeno de *Brucella*, principalmente con la prueba ATM a diluciones de 1:20 y 1:40 (Tabla 4), mientras que los 56 sueros restantes presentaban anticuerpos que reaccionaban tanto con el antígeno de *Vibrio cholerae* como con el de *Brucella* encontrándose que 32 fueron positivos a ATA, 38 a ATM, 2 a MEA y 5 a MEM si hacemos la suma de estos valores diríamos que es el resultado de 77 sueros, pero solamente es de los 56, debido a que varios sueros son positivos a dos o tres pruebas (Tabla 5), estos mismos resultados pueden observarse en la gráfica 1 expresados en porcentaje.

Los 40 sueros de individuos "sanos" resultaron negativos a las pruebas: RB, ATA, ATM, MEA, MEM. y solamente 4 presentaron título con el serotipo Ogawa y 3 con el serotipo Inaba de *Vibrio cholerae* (Tabla 6).

Pruebas de aglutinación después de llevar a cabo la absorción

A los 56 sueros mencionados anteriormente se les quería absorber con antígeno de *Brucella* y *Vibrio cholerae* para realizar un estudio completo, pero desafortunadamente la cantidad de varios de ellos ya no alcanzó para ninguna prueba, por lo que solamente:

1) 24 se absorbieron con antígeno de *Vibrio cholerae* (serotipo Ogawa e Inaba) y al ser probados nuevamente con las técnicas ATA, ATM, MEA y MEM se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 7, encontrándose títulos de 1:20 hasta 1:160, a estos mismos sueros se les determinó el nivel de anticuerpos vibriocidas y solamente 2 de ellos presentaron título de 1:20 con el serotipo Inaba (dato no mostrado).

2) 28 se absorbieron con antígeno de *Brucella* (*abortus* y *melitensis*) y al ser evaluados: 8 presentaron título de anticuerpos vibriocidas, 6 con el serotipo Ogawa y 2 con el serotipo Inaba, lo cual puede observarse en la Tabla 8. Mientras que cuando a estos sueros se les determinó el nivel de anticuerpos antibrucela solamente 1 de ellos presentó título de 1:20 con la prueba ATA (dato no mostrado).

Para ejemplificar como se encontraban los títulos de anticuerpos vibriocidas y anticuerpos antibrucela antes y después de llevar a cabo la absorción se tomaron un grupo de 8 sueros (2,4,8,10,17,23,24,34) cuyos resultados pueden observarse en las Tablas 9 y 10.

Inmunoelectrotransferencia

Los sueros (2,8,24) que resultaron positivos serológicamente tanto a *Vibrio cholerae* como a *Brucella* por las técnicas: fijación de complemento y aglutinación, respectivamente, también fueron positivos al ser probados con la técnica de inmunoelectrotransferencia, cuando se utilizó como antígeno proteínas de membrana externa de *Brucella abortus* 99S (Tabla 11), pero fueron negativos con esta técnica cuando se utilizó como antígeno una cepa rugosa de *Brucella* RB51.

Inmunodifusión

Se trabajaron por la técnica de inmunodifusión: 11 sueros no absorbidos, 6 absorbidos con *Brucella* (*abortus* y *melitensis*) y 6 absorbidos con *Vibrio cholerae*, en ninguno de ellos se presentaron bandas de precipitación (dato no mostrado).

TABLA 1. SUEROS DE CASOS, CONTACTOS Y CONTROLES DE COLERA QUE RECONOCEN ANTIGENO DE *Brucella*

TITULO PRUEBA	ATA	ATM	MEA	MEM
NEGATIVO	730	701	770	767
1:20	32	50	1	4
1:40	6	17	0	1
1:80	1	1	1	0
1:160	0	1	0	0
1:320	2	1	0	0
1:640	1	1	0	0

TABLA 2. SUEROS QUE SON POSITIVOS A RB Y PRESENTAN TITULO CON 4 PRUEBAS DE AGLUTINACION

No. SUEBO	RB	ATA	ATM	MEA	MEM
2	POSITIVO	1:640	1:640	NEGATIVO	NEGATIVO
8	POSITIVO	1:320	1:320	1:80	1:40
10	POSITIVO	1:80	1:80	NEGATIVO	NEGATIVO
14	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
16	POSITIVO	1:20	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
17	POSITIVO	1:20	1:20	NEGATIVO	NEGATIVO
18	POSITIVO	NEGATIVO	1:20	NEGATIVO	NEGATIVO
20	POSITIVO	1:20	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
23	POSITIVO	1:40	1:40	NEGATIVO	NEGATIVO
24	POSITIVO	1:320	1:160	NEGATIVO	NEGATIVO
28	POSITIVO	1:20	1:40	NEGATIVO	NEGATIVO
30	POSITIVO	1:20	1:20	NEGATIVO	NEGATIVO
35	POSITIVO	NEGATIVO	1:20	NEGATIVO	NEGATIVO
45	POSITIVO	1:20	NEGATIVO	1:20	NEGATIVO
56	POSITIVO	1:40	1:20	NEGATIVO	NEGATIVO

**TABLA 3. TITULO DE ANTICUERPOS VIBRIOCIDAS EN SUE-
ROS DE PACIENTES CON COLERA QUE RESULTA-
RON POSITIVOS A *Brucella***

TITULO/PRUEBA	OGAWA	INABA
NEGATIVO	53/95	53/95
1:20	6/95	5/95
1:40	6/95	6/95
1:80	6/95	5/95
1:160	4/95	3/95
1:320	6/95	1/95
1:640	1/95	6/95
1:1280	6/95	5/95
1:2560	4/95	1/95
1:5120	1/95	3/95
1:10240	2/95	2/95
1:20480	0/95	2/95
1:40960	0/95	3/95

**TABLA 4. SUEROS QUE RESULTARON NEGATIVOS
A *Vibrio cholerae* Y CON TITULO PARA
*Brucella***

TITULO/PRUEBA	ATA	ATM	MEA	MEM
NEGATIVO	29	6	39	39
1:20	9	26	0	0
1:40	1	7	0	0
1:80	0	0	0	0

TABLA 5. SUEROS DE PACIENTES CON COLERA QUE RESULTARON POSITIVOS AL ANALIZARSE CON 4 PRUEBAS PARA *Brucella*

TITULO/PRUEBA	ATA	ATM	MEA	MEM
NEGATIVO	701	695	731	728
1:20	23	24	1	4
1:40	5	10	0	1
1:80	1	1	1	0
1:160	0	1	0	0
1:320	2	1	0	0
1:640	1	1	0	0

**TABLA 6. RESULTADO OBTENIDO CON 40
SUEROS DE INDIVIDUOS 'SANOS'
ESTUDIADOS POR VARIOS METODOS**

TITULO/PRUEBA	ATA	ATM	MEA	MEM	OGAWA	INABA
NEGATIVO	40/40	40/40	40/40	40/40	36/40	38/40
1:10	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	1/40
1:20	0/40	0/40	0/40	0/40	1/40	0/40
1:40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40
1:80	0/40	0/40	0/40	0/40	2/40	1/40
1:160	0/40	0/40	0/40	0/40	1/40	1/40

**GRAFICA 1. PORCENTAJE DE REACTIVIDAD CRUZADA
PRESENTADA EN SUEROS DE PACIENTES
CON COLERA AL ESTUDIARLOS POR 5
METODOS PARA *Brucella***

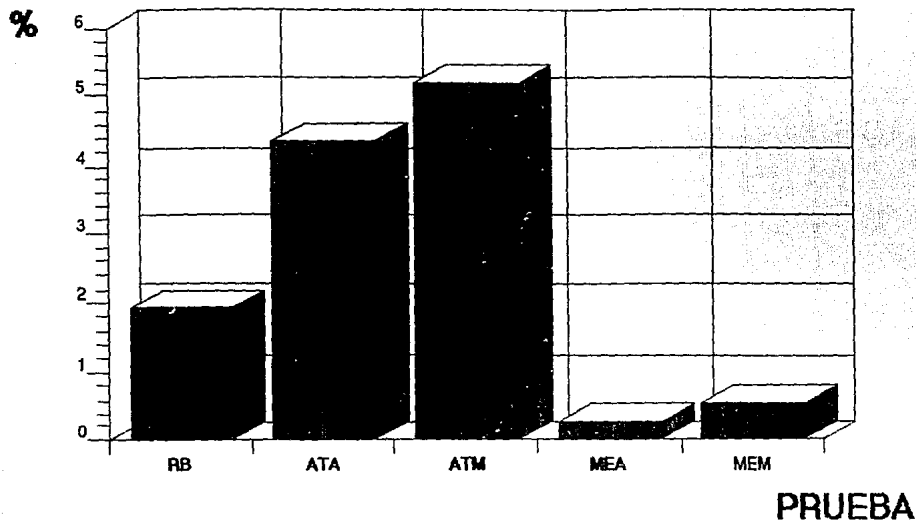


TABLA 7. RESULTADO DE 24 SUEROS ABSORBIDOS CON ANTIGENO DE *Vibrio cholerae* Y ANALIZADOS PARA *Brucella*

TITULO/PRUEBA	ATA	ATM	MEA	MEM
NEGATIVO	19/14	17/24	24/24	20/24
1:20	2/24	2/24	0/24	2/24
1:40	1/24	2/24	0/24	2/24
1:80	1/24	3/24	0/24	0/24
1:160	1/24	0/24	0/24	0/24

TABLA 8. RESULTADO DE 28 SUEROS ABSORBIDOS CON ANTIGENO DE *Brucella* Y ANALIZADOS PARA *V. cholerae*.

TITULO/PRUEBA	OGAWA	INABA
NEGATIVO	9/28	13/28
1:20	2/28	0/28
1:40	2/28	0/28
1:80	1/28	0/28
1:160	0/28	1/28
1:320	0/28	0/28
1:640	1/28	1/28

TABLA 9. TITULO DE ANTICUERPOS DE SUEROS REGISTRADO ANTES DE SER ABSORBIDOS

No. SUERO	RB	ATA	ATM	MEA	MEM	OGAWA	INABA
2	POSITIVO	1:640	1:640	NEGATIVO	NEGATIVO	1:5120	1:40960
4	NEGATIVO	NEGATIVO	1:20	NEGATIVO	NEGATIVO	1:2560	1:5120
8	POSITIVO	1:320	1:320	1:80	1:40	1:10240	1:40960
10	POSITIVO	1:80	1:80	NEGATIVO	NEGATIVO	1:2560	1:40960
17	POSITIVO	1:20	1:20	NEGATIVO	NEGATIVO	1:2560	1:1280
23	POSITIVO	1:40	1:40	NEGATIVO	NEGATIVO	1:20	1:2560
24	POSITIVO	1:320	1:160	NEGATIVO	NEGATIVO	1:1280	1:20480
34	NEGATIVO	1:20	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1:20	1:80

TABLA 11. SUEROS DE PACIENTES DE COLERA POSITIVOS A *Brucella* Y A *Vibrio cholerae*

No. SUERO	RB	ATA	ATM	MEA	MEM	OGAWA	INABA	WESTERN BLOT (Ag de <i>Brucella</i>)
2	POSITIVO	1:640	1:640	NEGATIVO	NEGATIVO	1:5120	1:40960	POSITIVO
8	POSITIVO	1:320	1:320	1:80	1:40	1:10240	1:40960	POSITIVO
24	POSITIVO	1:320	1:160	NEGATIVO	NEGATIVO	1:1280	1:20480	POSITIVO

7.0 DISCUSION

Las reacciones cruzadas serológicas que se presentan entre cepas lisas de *Brucella* y *Vibrio cholerae* son debidas a determinantes antigénicos comunes que se encuentran en sus respectivos lipopolisacáridos, específicamente en el antígeno O (grupos perosamina) (12,16,35).

Esta reactividad cruzada fue probada en 772 sueros de casos, contactos y controles de cólera, de los cuales 95 reconocían antígenos de *Brucella* encontrándose títulos de 1:20 hasta 1:640.

Al correlacionar los resultados que se obtuvieron con las técnicas: RB,ATA,ATM,MEA,MEM con los obtenidos en la determinación de anticuerpos vibriocidas se observa lo siguiente:

1) Que en los títulos de 1:20 y 1:40 los resultados no son muy concordantes ya que existen sueros que contienen anticuerpos hacia *Brucella* (principalmente con la especie *melitensis*) pero no hacia *Vibrio cholerae*, esto posiblemente pueda deberse a que los sueros que pertenecen a estos pacientes, alguna vez por el consumo de leche y subproductos lácteos sin pasteurizar adquirieron alguna *Brucella* pero no la dosis capaz para desarrollar la enfermedad. Por lo tanto solo es una prevalencia de anticuerpos antibrucela que no tienen significancia diagnóstica. También podemos suponer que no existe reacción cruzada en estos sueros debido a que tal vez pertenecían a los pacientes que se tomaron como controles de cólera.

2) De todos los sueros analizados existe uno que es positivo a la prueba RB y negativo con las técnicas de aglutinación en microplaca, por lo que consideramos que este valor es un resultado falso positivo de la técnica; aunque en varios estudios se ha demostrado que la prueba RB presenta una sensibilidad superior al 95% y una especificidad

por arriba del 97% con respecto a la aglutinación en microplaca (11).

3) Si consideramos que la prueba RB se emplea como tamiz (11,47). ya que solamente nos proporciona un resultado de tipo cualitativo y que la pauta para confirmar un diagnóstico serológico de Brucelosis se basa en la combinación de este resultado con el obtenido por la técnica de aglutinación en microplaca con títulos $\geq 1:160$ (determinado por estudios en el laboratorio de Brucelosis del INDRE), entonces existen solamente tres sueros (2, 8 y 24) que pueden confundirnos en el diagnóstico, esto es, decidir si es positivo a Cólera ó a *Brucella*, por lo que sería muy conveniente saber si bacteriológicamente se aisló *Vibrio cholerae*.

El título de anticuerpos antibrucela de 1:80 obtenido por las técnicas: ATA, ATM, MEA, MEM se presenta solamente en el suero 10, en este caso no podemos decir que el paciente sea positivo a Brucelosis por lo que sería recomendable que se obtuviera una segunda muestra para observar la tendencia del nivel de anticuerpos, sin embargo consideramos a este individuo sospechoso de Brucelosis.

Por otra parte el uso del 2 mercaptoetanol en la prueba de aglutinación en microplaca que solamente presenta título considerable en el suero 8 de un paciente, nos indica que pertenece a un individuo que posiblemente presenta Brucelosis de tipo crónico ya que unicamente lo que se esta detectando son anticuerpos IgG (3).

Si se observa el porcentaje de reactividad cruzada por prueba (ATA, ATM, MEA, MEM), encontramos que con la técnica de aglutinación en microplaca se presenta un mayor porcentaje, independientemente de la especie. Sin embargo, en estudios anteriores (4,8,37), se ha encontrado que el cruce antigénico es más dominante con *B. abortus* ya que presenta una estructura mucho menos compleja que la de *B. melitensis*.

Para evaluar el estudio se incluyeron sueros de individuos aparentemente "sanos",

para ello se analizaron 40 muestras de las cuales ninguna contenía anticuerpos que reconocieran los antígenos de *Brucella* (RB, ATA, ATM, MEA, MEM). Con esto queda comprobado que la reactividad cruzada serológica obtenida en los resultados es confiable y que estos no son debidos a reacciones inespecíficas por los tipos de antígenos utilizados en las técnicas (47).

A estas mismas muestras también se les determinó el nivel de anticuerpos vibriocidas, encontrándose que cuatro sueros reconocieron al antígeno de *Vibrio cholerae*, inclusive si tomamos en cuenta que el título de anticuerpos vibriocida de consideración diagnóstica es $\geq 1:40$ (determinado con estudios en el laboratorio de Producción de sueros del INDRE), entonces tres de estos sueros serían diagnosticados serológicamente como Cólera, siendo más dominante con el serotipo Ogawa, aunque podemos suponer que la gran mayoría de este grupo estudiado, por malos hábitos higiénicos y alimenticios estuvo o ha estado expuesto a una infección por *E. coli* que también puede presentar reactividad cruzada serológica con estos géneros ya que contiene epítomos comunes de PEROSAMINA (14,15,41); y por lo tanto hayan desarrollado anticuerpos contra esta bacteria que fueron reconocidos por antígeno de *Vibrio cholerae*. Así mismo podemos considerar que debido a que el cólera se ha diseminado a tal grado que afecta a gran parte del País no se descarta la posibilidad de que estas personas hayan sido infectadas por *Vibrio cholerae*, presentando cuadros clínicos leves e incluso asintomáticos y por ende se les detectaron niveles de anticuerpos vibriocidas que perduran por más de seis meses (12).

Con respecto a los sueros no absorbidos que presentan títulos altos para *Brucella* son también altos en el título de anticuerpos vibriocidas, estos resultados concuerdan con los de Feeley J. (19) ya que la reactividad cruzada serológica que presenta *Brucella* hacia *Vibrio cholerae* es mucho más dominante en el serotipo Inaba, debido a que cuando un RB es positivo y la aglutinación en microplaca es $\geq 1:160$, se presentan títulos de anticuerpos vibriocidas que van de 1:20480 hasta 1:40960 con el serotipo Inaba, mientras que con el

serotipo Ogawa se presentan títulos mas bajos que van de 1:1280 hasta 1:10240. Al llevar a cabo la absorción de estos sueros con antígeno de *Brucella* y al ser probados nuevamente con RB, ATA, ATM, ME y MEM resultan negativos, mientras que se presentan títulos con las pruebas de *Brucella* cuando la absorción se lleva a cabo con *Vibrio cholerae* es decir que este antígeno esta quitando los anticuerpos homologos a él pero deja libres algunos de reacción cruzada, pues los títulos decaen en proporción de 1 y 2 con respecto al título original.

La finalidad de realizar la técnica de inmunoelectrotransferencia en los sueros que resultaron positivos a *Brucella* y *Vibrio cholerae* es saber si al utilizar una técnica mucho más sensible y específica, y usando extractos celulares aún se siguen presentando las reacciones cruzadas serológicas que nosotros obtuvimos con las técnicas de aglutinación: RB, ATA, ATM, MEA, MEM donde se utiliza como antígeno a la bacteria completa.

Los resultados por inmunoelectrotransferencia nos muestran que los sueros 2, 8 y 24 que reconocieron antígenos completos de *Brucella*, también son reconocidos por extractos celulares bacterianos (RCM proteínas de membrana externa de *Brucella abortus* 99S) pero no a una cepa carente de LPS de *Brucella abortus* RB51 lo cual indica que la reactividad cruzada serológica obtenida se encuentra asociada al LPS.

Cabe mencionar que la mayoría de los reportes sobre reactividad cruzada serológica entre *Brucella* y *Vibrio cholerae* se presenta con anticuerpos de tipo aglutinante (12,19,20). lo cual nosotros comprobamos experimentalmente ya que al realizarles la prueba de inmunodifusión a los sueros absorbidos y no absorbidos, utilizando como antígeno proteínas de membrana externa de *B. abortus* 99S, no se presentó ninguna banda de precipitación. Pocos autores reconocen que también pueden existir reacciones cruzadas debidas a anticuerpos de tipo precipitante (38, 45), pero tal vez en este estudio no se encontraron porque estas solo se presentan cuando existe una Brucelosis activa y los títulos de aglutinación en microplaca son $\geq 1:320$ (38).

8.0 CONCLUSIONES

- Los sueros de casos, contactos y controles de cólera contienen anticuerpos que reconocen células completas y extractos celulares de *Brucella*, sin embargo, esta reactividad cruzada es mínima por lo que se puede proporcionar de manera confiable un diagnóstico serológico para ambas infecciones.

- Cuando se realizan estudios ciegos de reacciones cruzadas serológicas en *Brucella* y *Vibrio cholerae* se debe considerar si la enfermedad es ó no endémica en la zona donde se colectan las muestras, ya que muchas de las veces al correlacionar los resultados estos no son muy concordantes, debido a que el título de anticuerpos que se obtiene puede deberse a la infección causada por uno de los dos microorganismos y no a los epitopos comunes que presenten ambos.

- Mediante el uso de técnicas sensibles y específicas como el Western Blot se corroboran los resultados que se obtienen con otros métodos más rápidos y sencillos como lo es la aglutinación, determinando que la relación antigénica a *Brucella* en los sueros de pacientes con *Vibrio cholerae* se lleva a cabo en los epitopos comunes presentes en el LPS de ambas bacterias.

- Los anticuerpos de reacción cruzada detectados por las pruebas: RB, ATA, ATM, MEA y MEM en el presente estudio pertenecen a las clases: IgM, IgG e IgA; sin embargo, los títulos de significancia diagnóstica son solamente de tipo IgG e IgA ya que no se presenta título cuando la aglutinación se realiza en presencia del 2 mercaptoetanol.

9.0 REFERENCIAS

- 1.- Araoz J de; Barua D; Burrows W. y col. Principios y práctica de la lucha contra el cólera. Organización Mundial de la Salud. Ginebra 1970. Cuadernos de Salud pública #40. 47-52, 59-61.
- 2.- Balows A. et al. Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. American Society for Microbiology. Washington D.C. 1991. 384-395, 457-462.
- 3.- Buchanan T. Faber L. 2-mercaptoethanol *Brucella* agglutination test: Usefulness for predicting recovery from Brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1980; 11; 6: 691-693.
- 4.- Bundle D. and Perry M. Structure and serology of the *Brucella abortus* O-antigen. *Biochemical Society Transactions*. 1985; 3; 980-982.
- 5.- Bundle D; Cherwonogradzky J; Caroff M; Perry M. The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol. Second Forum in Microbiology*. 1987; 138; 92-98.
- 6.- Burrows. Tratado de microbiología. Editorial Interamericana. México D.F. 1980. Capítulo 22.
- 7.- Caroff M; Bundle D; Perry M. Structure of the O-chain of the phenol phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Eur. J. Biochem*. 1984; 139; 195-200.
- 8.- Caroff M; Bundle D; Perry M; Cherwonogradzky J. Duncan J. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infection and Immunity*. 1984; 46; 2; 384-388.
- 9.- Castañeda R. M. Brucelosis. Un problema universal. La Prensa Médica Mexicana. México D.F. Tercera edición. 1986. 18-21; 140-156.
- 10.- Colera/Diarreas infecciosas. Dirección General de Epidemiología/Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México D.F. Año 1 #1; Año 2 #4; Año 3 #1.

11.- Colmenero J y col. Empleo combinado del Rosa de Bengala e Inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de Brucelosis. *Enf. Infec y Microbiol. Clin.* 1989; 7; 6; 316-320.

12.- Corbel M. Recent Advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. *Veterinary Bulletin* 1985; 55; 927-942.

13.- Cruz R. Calderón E. Pared celular de bacterias Gram negativas. *Infectología.* 1982; 11; 675-682.

14.- Chart H. Cheasty T. Cope D. Gross Rand R. and Rowe B. The serological relationship between *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157 using sera from patients with yersiniosis and haemolytic uraemic syndrome. *Epidemiol. Infect.* 1991; 107; 349-356.

15.- Chart H. Okubadejo O and Rowe B. The serological relationship between *Escherichia coli* O157 and *Yersinia enterocolitica* O9 using sera from patients with Brucellosis. *Epidemiol. Infect.* 1992; 108; 77-85.

16.- Di Fabio J; Perry M; Bundle D. Analisis of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas maltophilia* 555. *Biochem. Cell. Biol.* 1987; 65; 968-977.

17.- Dulbecco Davis. Tratado de Microbiología. Salvat Editores. España. Segunda Edición. 838-843.

18.- Evans S and Feldman H. Bacterial infections of humans epidemiology and control. Plenum medical book company New York and London. 1982: 119-135.

19.- Feeley J. Somatic O antigen relationship of *Brucella* and *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology.* 196; 99; 645-649.

20.- Felsenfeld O et al. Serologic cross-reactivity of some enterobacteriaceae isolated in the United State with Cholera Vibrios. *P.S.E.B.M.* 1951; 77; 284-286.

21.- Fuerst J.a. Perry J.W. Demonstration of lipopolysaccharide on sheathed flagella of *Vibrio cholerae* O1 by protein A-gold immunoelectron microscopy. *Journal of Bacteriology.* 1988; 170; 4; 1488-1494.

22.- Giono Cerezo S. Gutierrez Cogco L. Hinojosa Ahumada A.M. Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae*. Instituto Nacional

de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México D.F. Publicación técnica #10. 1991.

23.- Gonzalez Bonilla C. (comunicación personal).

24.- Gonzalez N, Saltigeral P. Cólera. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill. México D.F. 1992. 29-54.

25.- Gotuzzo E; Carrillo E; Guerra J. An evaluation of diagnostic methods for Brucellosis. The value of bone marrow culture. The Journal of Infectious Diseases. 1986; 153; 1; 122-125.

26.- Gotuzzo E y col. Características Epidemiológicas y Clínicas de la Brucelosis en 39 grupos familiares. Enf. Infec. y Microbiol. Clin. 1988; 7; 4; 519-524.

27.- Gupta R; Szu S; Finkelstein R; Robbins J. Synthesis, characterization, and some immunological properties of conjugates composed of the detoxified lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 serotipo Inaba bound to cholera toxin. Infection and Immunity. 1992; 60; 8; 3201-3208.

28.- Hernández V. R. M. Proteínas de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Infectología 1983; 8; 371-378.

29.- Holmgren J. and Suennerholm A.M. Mechanism of disease and immunity in cholera: A review. The Journal of Infectious Diseases. 1977. 136. Supplement S105-S112.

30.- Jackson G. D.F. and Radmond J.W. Immunochemical studies of the O-antigens of *Vibrio cholerae*. The constitution of a lipopolysaccharide from *V. cholerae*. 569B (Inaba). FEBS LETTERS. 1971; 13; 2; 117-120

31.- Jawetz E; Melnick J; Adelberg E. Microbiología Médica. Editorial el Manual Moderno. México D.F. 1985. Undecima Edición.

32.- Joint. FAO/WHO. Expert Committee on Brucellosis. Six report, technical report serie:740. Geneva 1986; 25. 52-56. 108.

33.- Kouri Pedro. El control Sanitario Internacional y algunas enfermedades exóticas para Cuba. Instituto de Medicina Tropical. Segunda edición. Ciudad de la Habana Cuba. 1982. 45-60.

34.- Kumate J. Epidemiología: Manual para la vigilancia epidemiológica del cólera

en México 1. Secretaria de Salud. México D.F. 1991. 11-12, 33-34.

35.- López Merino A. Brucelosis: Avances y perspectivas. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Publicación técnica #6. México D.F. 1991.

36.- López Merino A. Manual de técnicas y procedimientos para el estudio de Brucelosis. Secretaria de Salud. Dirección General de Epidemiología. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México. D.F. 1989.

37.- Marx A; Sandulache R; Pop A; Cerbu A. Biochemical basis of the serological cross-reactions between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 1975; 126B: 435-445.

38.- Mc Mahon K; Renner E; Allmaras G and Anderson D. An agar-gel immunodiffusion test for detection of *Brucella* antibodies in human sera. Can. J. Microbiol. 1979; 26:850-854.

39.- Moreno E; Berman D; Boettcher L.; Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. Infection and Immunity. 1981; 31; 1;362-370.

40.- O'Leary W. Practical handbook of microbiology. CRC. Press Raton. Ann Ar-bor Boston. 1989. 405-410.

41.- Perry M and Bundle D. Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia coli* O157:H7, *Brucella melitensis* and *Brucella abortus*. Infection and Immunity. 1990; 58; 5; 1391-1395.

42.- Platkin K; Krivoshein Yu. Microbiologia. Editorial Mir. Moscú. 1986. 331-345.

43.- Raziuddin S. Toxic and immunological properties of the lipopolysaccharides (O-antigens) from *Vibrio* El-Tor. Immunochemistry. 1978; 15; 611-614.

44.- Redmond J. The structure of the O-antigenic side chain of the lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* 569B (Inaba). Biochimica et Biophysica Acta. 1979; 584; 346-352.

45.- Sandulache R and Marx A. Immunochemical studies on a *Yersinia enterocolitica* O:9 lipopolysaccharide cross-reacting with *Brucella abortus* and *Vibrio cholerae* extracts. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 1978. 129B; 425-435.

46.- Volk. Microbiologia General. Editorial Interamericana. México D.F. 1988.

Tercera Edición. 430-434.

47.- Young E. Corbel M. Brucellosis: Clinical and laboratory aspects. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1989. Chapter 6 and 8.

GLOSARIO

Aglutinación.- reacción antígeno-anticuerpo en la cual un antígeno sólido o en partículas forma un agregado con un antígeno soluble.

Anticuerpo.- proteína producida como resultado de la inducción de algún antígeno y que tiene la capacidad para combinarse con el antígeno que estimuló su producción.

Antígeno.- sustancia que es extraña al organismo y que al ser introducida puede o no desencadenar una respuesta inmune.

Caso.- individuo al cual se le aisla e identifica al microorganismo que le está causando un problema de salud.

Contacto.- individuo que convive directamente con el caso.

Controles.- individuos aparentemente "sanos" que se utilizan para evaluar técnicas de diagnóstico.

Epidemia.- enfermedad infecciosa que se presenta en una población afectando a un gran número de hospederos, es de duración corta.

Epitopo.- también llamado determinante antigénico, es la zona de un antígeno que determina la especificidad de una reacción antígeno-anticuerpo.

Estudio ciego.- realizar por separado dos ó más técnicas de diagnóstico a una muestra biológica, donde finalmente el resultado de cada una de ellas es comparado.

Fenómeno de prozona.- precipitación ó aglutinación subóptima que ocurre en la región del exceso de anticuerpos durante las reacciones inmunoserológicas,

Inmunoglobulinas.- glucoproteína compuesta de cadena H y L que funciona como anticuerpo.

Lipopolisacárido.- también llamado endotoxina, compuesto que se encuentra presente en bacterias Gram negativas, que tiene diversas funciones biológicas incluyendo actividad mitógena para los linfocitos B.

Pandemia.- enfermedad infecciosa que afecta a varios países e inclusive a varios continentes simultáneamente.

Precipitación.- reacción entre un antígeno soluble y un anticuerpo también soluble, en la cual se forma una red compleja de formas de conjuntos entrelazados.

Reacción cruzada.- la reacción de un anticuerpo con un antígeno diferente al que indujo su formación.

Serotipo.- tipificación de un microorganismo utilizando suero.

Zoonosis.- enfermedad que es transmitida del animal al hombre.