

205



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

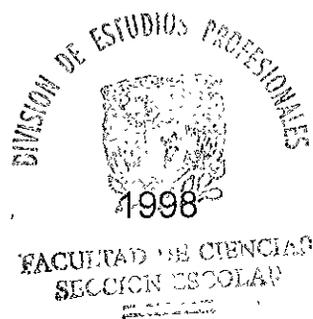
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN SUERO DE PACIENTES CON BRUCELOSIS POR LA TÉCNICA DE ELISA

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
FERNANDO RENATO CÁZARES SOSA

ASESOR DE TESIS:
QBP IRMA HERNÁNDEZ MONROY



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



261979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"DETECCION DE ANTICUERPOS EN SUERO DE PACIENTES CON BRUCELOSIS POR LA TECNICA
DE ELISA"

realizado por FERNANDO RENATO CAZARES SOSA

con número de cuenta 8231738-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

QBP. IRMA HERNANDEZ MONROY

Irma Hernandez Monroy

Propietario

BIOL. PABLO MACIAS MUÑOZ

Pablo Macias Muñoz

Propietario

MenC. JOSE ARMANDO MUÑOZ MOYA

Jose Armand Muñoz Moya

Suplente

DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ

Dr. Rene de Jesus Cardenas Vazquez

Suplente

DR. GUILLERMO SALGADO MALDONADO

Dr. Guillermo Salgado Maldonado

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
M. en C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS :

Gracias a todos los que directa o indirectamente colaboraron a la realización de la tesis que sin su valiosa ayuda y consejos no se hubiese realizado :

Sinceramente : **FER.**

A mis Padres :

Victor y Mary.

Por su dedicación y especial cariño que desde siempre he recibido y que han influido en mi formación.

A mis Hermanos :

José y Felipe.

Por su paciencia e incondicional apoyo.

A mi familia :

A ustedes que forman parte de mi vida.

Lety e Ilse

A mi asesora de Tesis :

Irma Hernández Monroy.

Gracias por tu paciencia .

Con un especial agradecimiento a :

Sergio Pasten Sánchez
Ahide López Merino
Alejandro Escobar Gutiérrez

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias :

Gabriel
Silvia
Herón
Margarita
Horacio
Martín
Julieta
Rafael
Arturo
Gabriela

Yaqueline
Waldemar
Gillermo
Ana Laura
Delfina
Paty
Laura
Crecencio
Hector

Al Grupo "EGO"

Paty
Olga
Doña Hilda

Constantino
Cristina

Al grupo del Laboratorio de Brucelosis

Don Cesar
Blanca
Margarita
Araceli

Gema
Juan
Elsa

A mis compañeros del Departamento de Investigaciones Inmunológicas :

Silvia
Lupita
Edith
Raquel
Flor
Blanca
Claudia
Nancy

Hugo
Arturo
Francisco
Don Neftali
Sigifredo

A los Sinodales de la Facultad :

Armando Muñoz Moya
Pablo Muñoz
Guillermo Salgado Maldonado
Rene Cárdenas

INDICE GENERAL.	Página
I - RESUMEN.	6
II - INTRODUCCION	8
II.1 .- Historia de la brucelosis.	
II.2 .-¿Que es la brucelosis?	
II.3 .- Distribución geografica de la brucelosis.	
III - CLASIFICACION BACTERIOLOGICA DE <i>Brucella</i> .	13
III.1 - El genero <i>Brucella</i> .	
III.2 - Estructura de la pared de <i>Brucella</i> .	
III.3 - Composición antigénica de <i>Brucella</i>	
IV -PATOGENIA.	19
IV.1 - Tipos de brucelosis.	
IV.2 - Cuadro clínico y transmisión de <i>Brucella</i> .	
IV.3 - Métodos de diagnóstico.	
V -INMUNOLOGIA DE <i>Brucella</i>.	25
V.1 - Respuesta celular.	
V.2 - Respuesta humoral.	
VI - JUSTIFICACION.	27
VII - ANTECEDENTES.	28
VIII - OBJETIVOS.	30
IX - MATERIAL Y METODOS.	31
X - RESULTADOS.	45
XI - DISCUSION.	75
XII - CONCLUSIONES.	76
XIII - ANEXO.	77
XIV - BIBLIOGRAFIA.	84

FIGURAS Y TABLAS.

FIGURAS:

Figura 1: Pared celular de *Brucella*.

Figura 2: Infección por *Brucella* en el hombre.

Figura 3: Respuesta de anticuerpos en la brucelosis humana.

Figura 4: Diseño para la titulación de Ag de *B. Abortus* 99s.

Figura 5: Diseño para la titulación de IgA e IgM.

Figura 6: Diseño para la titulación de IgG e Ig tot..

Figura 7: Análisis Inmunoenzimático indirecto en fase sólida.

Figura 8: Anticuerpos anti gamaglobulinas totales (Ig tot) anta *Brucella* de los tres grupos de suero en referencia al punto de corte.

Figura 9: Anticuerpos de la clase IgM anta *Brucella* de los tres grupos de suero en referencia al punto de corte.

Figura 10: Anticuerpos de la clase IgG anti *Brucella* de los tres grupos de suero en referencia al punto de corte.

Figura 11: Anticuerpos de la clase IgA anti *Brucella* de los tres grupos de suero en referencia al punto de corte.

Figura 12: Distribución de los grupos de trabajo, forma y valor medio (mediana) y valores extremos para Ig totales e isotipos de anticuerpos.

Figura 13: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 1.

Figura 14: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 2.

Figura 15: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 3.

Figura 16: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 4.

Figura 17: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 5.

Figura 18: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 6.

Figura 19: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 7.

Figura 20: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 8.

Figura 21: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 9.

Figura 22: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 10.

Figura 23: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 11.

Figura 24: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 12.

Figura 25: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 13.

Figura 26: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 14.

TABLAS:

Tabla 1: Especie de *Brucella* y reservorio animal.

Tabla 2: Distribución de la brucelosis en México.

Tabla 3: ELISA para anticuerpos anti-*Brucella* individuos aparentemente sanos.

Tabla 3: Continuación, ELISA para anticuerpos anti-*Brucella* individuos aparentemente sanos.

Tabla 3: Continuación, ELISA para anticuerpos anti-*Brucella* individuos aparentemente sanos.

Tabla 4: Casos de personas con brucelosis.

Tabla 4: Continuación, Casos de personas con brucelosis.

Tabla 4: Continuación, Casos de personas con brucelosis.

Tabla 4: Continuación, Casos de personas con brucelosis.

Tabla 5: Casos de personas con cólera.

Tabla 6: Medidas de tendencia central de los grupos de trabajo.

Tabla 7: Valor medio y Desviación estándar de los grupos de trabajo con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 8: Diseño de la tabla de 2 X 2 para determinar las características operativas para el diagnóstico de brucelosis por la técnica de ELISA.

Tabla 9: Características operativas de ELISA para *Bruselas*.

Tabla 10: Concordancia entre las pruebas estándar y ELISA.

GLOSARIO DE TERMINOS

Agar soya tripticaseína	TSA
Aglutinación estándar	AMPA
Aglutinación en presencia de 2- mercaptoetanol	2-ME
Amortiguador de fosfatos	PBS
Amortiguador de fosfatos - tween	PBS-T
Anticuerpo	Ac
Antígeno	Ag
B	<i>Brucella</i>
Densidad óptica	D.O
Gramo	g
Hora	h
Lipopolisacarido	LPS
Inmunoensayo enzimático	ELISA
Inmunoglobulina A	IgA
Inmunoglobulina G	IgG
Inmunoglobulina M	IgM
Inmunoglobulinas totales	Ig tot
Microlitros	µl
Mililitros	mL
Nanometros	nm
Revoluciones por minuto	rpm
Rosa de bengala	RB
Valor de corte	V.C.

DETECCION DE ANTICUERPOS EN SUERO DE PACIENTES CON BRUCELOSIS POR LA TECNICA DE ELISA.

I.- RESUMEN:

La brucelosis es una zoonosis muy importante que prácticamente se halla distribuida en todo el mundo, especialmente en países en desarrollo, es causada por bacterias del género *Brucella* que tienen como reservorio natural cabras, vacas, ovejas y en general animales domésticos (Hernández I 1996) ver tabla 1.

En México la brucelosis continua siendo un problema de salud, que en países desarrollados ya ha sido controlado, la seroprevalencia de anticuerpos a nivel nacional es de 3.42% en humanos y afecta anualmente a cerca del 8 % del ganado en el país, con las consiguientes pérdidas económicas para los productores y además de ser a de una zoonosis muy seria con al rededor de 6,000 personas infectadas al año (Hernandez I 1996). Aunque se han identificado bien todos los elementos para el control de la brucelosis en humanos, una de las principales limitantes para su total erradicación es la dificultad para lograr un diagnostico oportuno y confiable, ya que es una enfermedad que clínicamente puede ser confundida con muchas otras (Hernandez I 1996).

En el presente trabajo se analizaron 107 sueros mediante el inmunoensayo de ELISA para detectar anticuerpos anti *Brucella* tanto para Ig totales como para IgM, IgG e IgA. De los cuales 14 son sueros de pacientes con brucelosis confirmada por cultivo. Como testigos se estudiaron 85 individuos aparentemente sanos y 8 casos de cólera confirmados por cultivo. El antígeno utilizado es un extracto sonicado de *B. abortus* 99s cepa lisa.

El valor de corte en ELISA anti *Brucella* fue de 0.210 para Ig tot., 0.152 en IgM, 0.262 en IgG y 0.100 en IgA. Al evaluar las características operativas del ELISA anti *Brucella* se encontró que: La sensibilidad y especificidad cuando se buscaron Ig totales fue de 92.86% y 97.65%, para IgM es de 57.14% y 92.94%, para IgG es de 92.86% y 96.47% y para IgA es de 100% y 98.82% respectivamente. Al contrastar con las pruebas estándares mediante el estadístico de Kappa se encontró que el mayor coeficiente de concordancia (k) fue de 0.96 entre 2-ME y ELISA para IgG, de 0.92 entre AMPA y ELISA para Ig tot, con una $\alpha=0.05$. En tanto que la concordancia resultó menor cuando se analizaron los diferentes isotipos de anticuerpos.

Al evaluar las cinéticas de los catorce pacientes con cultivo positivo a *Brucella* se encontró que trece son de *B. melitensis* y uno a *B. abortus*, en ELISA se observa que la respuesta inmune humoral hacia el antígeno de *B. abortus* es muy variable y depende de cada paciente ya que esta enfermedad tiende fuertemente a evolucionar a un proceso crónico, por lo que se mantienen los niveles de anticuerpos y principalmente de IgG, por lo que se debe relacionar con signos y síntomas.

II INTRODUCCION.

II.1 Historia de la brucelosis.

Durante la guerra de Crimea (1854-1856) se observaron numerosos casos de fiebres prolongadas que no podían compararse a las enfermedades entonces conocidas por lo que se sospecho que se trataba de una enfermedad nueva. Esta sospecha se confirmo con la aparición de casos cada vez más numerosos en los países mediterráneos y particularmente en la isla de Malta. Sin embargo, en la historia de la medicina se considera que la brucelosis era conocida desde Hipócrates, (400 años a.c.) pero las primeras descripciones de la enfermedad en casos clínicos, que se presenta con claridad son las de Cleghorn (1751). En 1859 , Marston hizo estudios clínicos y autopsias de casos de fiebres mediterráneas remitentes, presentando más tarde en 1863 una descripción detallada de la enfermedad tal como ocurría en Malta, la que fue confirmada por otros autores, no solamente en esa isla, sino en otras zonas, considerándose desde entonces como padecimiento endémico característico de los países bañados por el mediterráneo (Ruíz M 1954).

El agente causal de la brucelosis fue descubierto por Bruce (1886), en el bazo de personas fallecidas por esa infección. Más tarde logró aislar la cepa de enfermos y pudo demostrar la virulencia para el mono del agente infeccioso, entonces llamado ***Micrococcus melitensis*** (Ruíz M 1954).

En 1897 Wright y Semple desarrollaron un método de diagnóstico basado en la propiedad aglutinante del suero sanguíneo de enfermos, sobre cultivos de *Micrococcus melitensis* . Sin embargo transcurrieron casi 20 años desde que se descubrió a *Brucella* (1886) hasta que fue encontrada la forma en que el hombre adquiría la infección (1905) (Ruíz M 1954).

En 1905 Zammit informó haber encontrado anticuerpos aglutinantes en el suero de cabras, lo que fue seguido del descubrimiento de Horrocks, con la presencia del agente en la leche y orina de estos animales. Se acepta que la brucelosis fue conocida en Texas y en Nuevo México desde 1885 sin embargo los primeros casos fueron estudiados por Craig en 1905, durante algún tiempo se tuvo la idea de que se trataba de un padecimiento exótico introducido al importarse cabras de la isla de Malta.

En nuestro país, el primer aislamiento del agente causal se logró en 1921 por Placeres en Puebla, aportando las pruebas serológicas y bacteriológicas necesarias (Ruíz M 1954).

En 1924 Ocaranza y Varela observaron un caso de brucelosis en el Distrito Federal del que se aisló *B. melitensis* (Ruíz M 1954).

II.2 Que es la brucelosis.

La brucelosis es un problema de salud pública y de importancia económica significativa. Es una infección del grupo de las zoonosis que afecta a una amplia variedad de animales, tanto domésticos como silvestres y que en determinadas circunstancias puede transmitirse al hombre. Esta enfermedad es causada por especies de bacterias del género *Brucella*, que inicialmente fueron descritas en los animales que se mencionan en el siguiente cuadro (Hernández I 1996).

Tabla 1. Especie de *Brucella* y reservorio animal.

ESPECIES DE <i>Brucella</i>	AISLADA DE
<i>B. melitensis</i>	CABRAS
<i>B. abortus</i>	VACAS
<i>B. suis</i>	CERDOS
<i>B. ovis</i>	OVEJAS
<i>B. canis</i>	PERROS
<i>B. neotomae</i>	ROEDORES

Sin embargo hoy sabemos que no son específicas de especie, por lo que una mismo organismo de *Brucella* puede afectar a diferentes hospederos (Hernández I 1996).

En humanos sólo se han aislado en orden de importancia *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*. La enfermedad que provocan se identifica en el mundo con diferentes nombres(Ruíz M 1954):

- Enfermedad de Bang.
- Fiebre de Chipre.
- Fiebre Continua.
- Fiebre de Gibraltar.
- Fiebre de Malta.
- Fiebre del Mediterráneo
- Fiebre del Río Grande.
- Fiebre Ondulante.
- Fiebre Recurrente.
- Fiebre Sudoral.
- Melitoccia.
- Septicemia de Bruce.
- Septicemia melitensis.
- Tuberculosis Mediterránea.

II.3 Distribución geográfica de la brucelosis.

La brucelosis se distribuye principalmente en países en desarrollo, estadísticas de la FAO en salud animal para 1982 reporta a 160 ciudades en el mundo con ganado infectado con *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. ovís* (Matyas Z. y Fujikura T. 1987).

En nuestro país la brucelosis en humanos, estudiados por métodos serológicos, se ha reportado en prácticamente toda la República, sin embargo los estudios bacteriológicos sólo se han realizado en los estados de Chihuahua , Nuevo León, Tamaulipas, Coahuila , Zacatecas, Jalisco , Guanajuato, Sonora, Querétaro, Michoacán, Baja California y Puebla. Para 1997, la SSA reporta por entidad federativa el número de casos que aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2: Distribución de la brucelosis en México.
 Notificación de casos de Brucelosis hasta la semana 22.
 Boletín de Epidemiología SSA.

ESTADO	1996	1997*
Aguascalientes	11	--
Baja California	34	18
Baja California Sur	--	--
Campeche	4	1
Coahuila	311	121
Colima	7	2
Chiapas	11	4
Chihuahua	28	42
Distrito Federal	8	8
Durango	345	89
Guanajuato	763	409
Guerrero	22	4
Hidalgo	7	20
Jalisco	128	56
México	130	6
Michoacán	160	48
Morelos	18	5
Nayarit	41	13
Nuevo León	311	69
Oaxaca	13	2
Puebla	130	35
Querétaro	88	36
Quintana Roo	6	7
San Luis Potosí	50	26
Sinaloa	187	77
Sonora	127	45
Tabasco	11	11
Tamaulipas	130	29
Tlaxcala	45	5
Veracruz	95	30
Yucatán	5	3
Zacatecas	82	51
Total	3308	1272

III.- CLASIFICACION BACTERIOLOGICA DE *Brucella* :

Establecer una clasificación con un criterio filogenético y sistematizado ha sido un problema de enorme magnitud en general para todas las bacterias. Lo vasto y diversificado del grupo, no permite usar la mayoría de los criterios que han sido útiles para los grupos con organización eucariótica. Así ha sido necesario utilizar criterios diferentes y métodos novedosos, especialmente relacionados con estructuras moleculares. El concepto mismo de la especie es muy discutible en las bacterias y en muchos casos se utiliza en forma arbitraria, siguiendo un criterio utilitario, debido a la dificultad de remarcar los límites dentro de los cuales está confinada una entidad específica (*Brucella*), ya que muchas características van desapareciendo gradualmente de unas cepas a otras, mientras que otras van apareciendo también en forma gradual (Escobar A 1987).

Las brucelas se ubican de la forma siguiente:

REINO : Monera.

SUBREINO : Bacteria.

ORDEN : Eubacteriales

FAMILIA : Brucellaceae.

GENERO : *Brucella*

ESPECIE : *B. melitensis*

B. abortus

B. suis

B. canis

B. ovís

B. neotomae

III.1 El género *Brucella*.

El género *Brucella* es un grupo de bacterias de las cuales los caracteres de cultivo y serológicos se mezclan uno en otro, de tal modo que para su identificación por especies, se deben realizar pruebas bioquímicas, metabólicas e inmunológicas (Cowan S 1985). Existen ocho biotipos de *B. abortus* cuatro de *B. suis* y tres de *B. melitensis*, las cuales pueden ser diferenciadas en formas lisas (S), Intermedias (I) y rugosas (R) de todas ellas sólo las formas lisas son patógenas. Son parásitos intracelulares facultativos cuya morfología son pequeños cocobacilos o bacilos cortos (0.5 a 0.7 μm) por (0.5 a 1.5 μm) gram negativos, inmóviles, no esporulados, dispuestos en pares y cadenas cortas, son aerobios pero para algunos biotipos su crecimiento está influido o depende de una atmósfera de CO_2 al 10%. No hay crecimiento en condiciones estrictamente anaeróbicas. Los organismos crecen en Agar soya tripticaseína (TSA), con un pH de 6.6 a 6.8 incubado a 37°C; su crecimiento es lento, y su cultivo puede ser positivo hasta las seis semanas. En medio sólido, las colonias de *Brucella* crecen lisas, esféricas, traslúcidas, de 2 a 7 mm de diámetro y de un color azul pálido o ámbar. *B. canis* y *B. ovis* crecen rugosas y algo gelatinosas, requiriendo en su primer aislamiento una atmósfera del 10% de CO_2 (Cowan S.T.1985., López A. 1991 y Hernández I. 1996). El aislamiento y la identificación es primordial para el diagnóstico de brucelosis, sin embargo esto no siempre es posible, siendo la proporción de cultivos positivos del 20 al 25% cuando la muestra es hemocultivo y este porcentaje se incrementa cuando la muestra es mielocultivo. Dado que no es posible esperar el tiempo que se requiere para lograr el aislamiento y que éste no siempre se logra, los métodos indirectos son de gran utilidad cuando se han observado signos y síntomas compatibles con brucelosis (Hernandez I. 1996).

Las especies mayores de *Brucella* difieren en el grado de invasividad y virulencia; la *B. melitensis* es la más invasiva y produce la enfermedad más severa; la *B. suis* es muy invasor y destructiva, produce enfermedad supurativa ; la *B. abortus* es la menos invasiva y causa enfermedad moderada. A pesar de estas variaciones, la patogénesis de la enfermedad es similar para las tres especies (López A. 1991.,González S. y col. 1987).

III.2 Estructura de la pared de *Brucella*.

La pared celular de la *Brucella* es característica del grupo de las gram negativos que básicamente están constituidos por :

- Membrana plasmática.
- Espacio periplásmico.
- Capa de peptidoglicana.
- Membrana Externa.

Esta última es la primera estructura que entra en contacto con el sistema inmune del huésped en el momento de la infección (López A 1991).

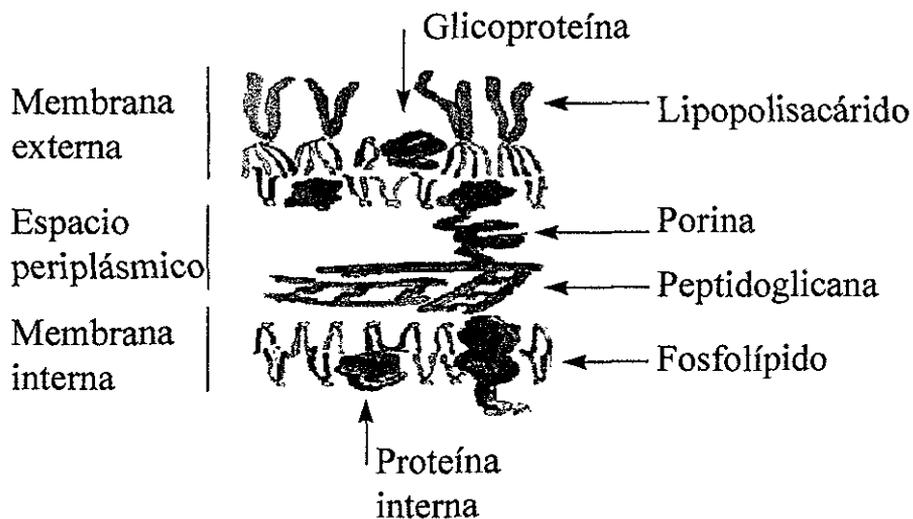


Figura 1 : Pared de *Brucella*.

La pared de la *Brucella* se diferencia de otras bacteria gram negativas por ser más resistentes a la acción de detergentes y también lo son a la polimixina B, a la proteólisis por enzimas y a la digestión por lisozima (López A 1991).

III.3 Composición antigénica de la *Brucella*.

Varios componentes celulares contribuyen a la sobrevivencia y antigenicidad del género *Brucella*, pero no se ha llevado a cabo la identificación de la mayoría de ellos, la investigación de los componentes antigénicos se ha orientado principalmente al estudio de la membrana externa (López A 1991).

El antígeno A es el principal determinante de superficie, tanto de *B. abortus* como de *B. suis* y es un determinante secundario (a) en *B. melitensis*; en cambio, el antígeno M predomina en *B. melitensis* y es un determinante secundario (m) en las otras especies. Este es el fundamento básico para la producción de antiseros utilizados en la tipificación de cepas (Berman T y cols 1980).

El lipopolisacárido (LPS) está compuesto por una cadena polisacáridica o antígeno "O" específico, oligosacárido central y lípido "A", siendo este lipopolisacárido de gran valor en el diagnóstico e identificación serológica de las especies de *Brucella* ya que contiene los determinantes antigénicos A y M. Este LPS, produce reacción cruzada por la presencia de perosamina; que en *B. abortus* es un homopolímero de unidades 4,6 didesoxi 4 formamido alfa -D manopiranosil unidas por enlaces 1-2 y en *B. melitensis* es un pentasacárido en donde cuatro unidades se unen por enlace 1-2 y una unidad por enlace 1-3 (Cloekaert A y col. 1993).

En cepas lisas de bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica* O:9 además de ser el principal antígeno de superficie; es un antígeno inmunodominante (Meyer E.M. y Cameron S.H. 1958), por lo que los anticuerpos anti LPS son los primeros en aparecer después de la infección por *Brucella* (López A 1991).

El polisacárido "B" que es un carbohidrato bajo en peso molecular . Se obtiene tanto de *B. abortus* como de *B. Melitensis* después de tratarlos con ácido tricloroacético; su importancia parece residir en la utilidad para distinguir animales vacunados de infectados, se identifica como un polímero cíclico que contiene entre 17 y 24 residuos de glucosa. (Moreno y col.1987).

Las proteínas que contienen son del grupo 2 o porinas (35 a 40 KDa y del grupo 3 (25 a 30 KDa) (Verstreat D. 1982., Cloeckaert y col 1990) .

La lipoproteína ancla a la peptidoglicana con la membrana externa a través de un enlace covalente parecido al que presenta *E.coli* con la diferencia que en *Brucella* se observa expuesta en la superficie celular por lo que es una molécula reconocida por el sistema inmune (López A 1991).

IV.- PATOGENIA:

El período de incubación varía dependiendo de la virulencia de la cepa, vía de entrada, dosis infectante, estado nutricional, enfermedades concurrentes y el estado inmunológico del huésped. Las bacterias pasan rápidamente del sitio de entrada por vía linfática a los nódulos linfáticos regionales en donde parte de las bacterias es destruida y parte de ellas alcanza sangre periférica unas cuantas horas después y son fagocitadas por los leucocitos polimorfonucleares y monocitos, localizándose posteriormente en los órganos ricos en estas células del sistema reticuloendotelial (hígado, bazo, médula ósea y riñón). Los cocobacilos quedan en vacuolas fagocitadas en los leucocitos y ahí se multiplican rápidamente; los leucocitos se rompen liberando material antigénico, lo cual activa los mecanismos formadores de anticuerpos y por otro lado, las células fagocíticas del sistema reticuloendotelial ingieren las bacterias, pudiendo persistir en este lugar semanas o meses. Las células invadidas tienden a agruparse formando nódulos, en los que aparecen células del epitelio y se rodean de linfocitos formando lesiones granulomatosas con focos de necrosis central (Gonzalez y cols.1987).

Las células necróticas pueden liberar bacterias en forma importante, que pueden sobrepasar la capacidad fagocítica ocasionando sintomatología. Si las bacterias no son eliminadas por completo persisten pequeños focos de infección de localización intracelular inaccesibles para los antibióticos y los mecanismos de defensa celulares y humorales, que pueden liberar organismos y endotoxinas a la circulación en forma periódica, lo cual prolonga la sintomatología y la enfermedad adquiere un carácter crónico. (Gonzalez y col. 1987 .,Lopez A 1991).

IV.1 Tipos de brucelosis.

La brucelosis adopta principalmente dos formas, según su evolución: brucelosis aguda y brucelosis crónica.

Brucelosis Aguda.

Los signos y síntomas de la brucelosis aguda en los niños son básicamente iguales a los que se presentan en el adulto. El período de incubación es variable, generalmente de dos a tres semanas, aunque puede prolongarse hasta tres meses(4). En más de la mitad de los casos el establecimiento de la enfermedad es insidioso con sintomatología vaga y poco específica (López A 1991).

Brucelosis crónica :

La frecuencia de la brucelosis crónica es difícil de precisar, ya que se debe descartar inicialmente que la evolución sea debida a un tratamiento inadecuado. Se considera crónica a esta enfermedad cuando los síntomas persisten por más de un año. Por lo general existe una historia recurrente en la que están involucrados cuatro síntomas principales : decaimiento, cefalea, mioartralgias y diaforesis. El decaimiento puede ser moderado o bien llegar a ser verdaderas crisis de depresión e histeria, imposibilitando al paciente para realizar su trabajo cotidiano (Gonzalez y col. 1987 ,Lopez A 1991).

IV.2 Cuadro clínico y transmisión de *Brucella*.

En el cuadro clínico para brucelosis humana los principales signos y síntomas que se presentan son(González 1991) :

Fiebre	Artralgias.
Calosfrío.	Confusión mental.
Sudor.	Insomnio.
Debilidad.	Dolor abdominal.
Malestar general.	Esplenomegalia.
Dolor de espalda.	Hepatomegalia.
Cefalea.	Linfadenopatía cervical y axilar.

La enfermedad sin tratamiento puede durar algunas semanas o meses, dependiendo de la gravedad de los síntomas, el curso normal de la enfermedad es de un paciente que presenta fiebre continua durante dos o tres semanas, la cual desaparece espontáneamente permaneciendo asintomático durante varios días; posteriormente la fiebre reaparece junto con todos los síntomas, lo cual le confiere las características de fiebre ondulante o recurrente. (López A 1991).

Los animales que constituyen los mayores reservorios son las cabras, ovejas, vacas, cerdos y perros, que además de padecer la enfermedad presentan lesiones en órganos, principalmente en tejido placentario, en donde su crecimiento está favorecido por la presencia abundante de eritritol, Constituyen la fuente directa o indirecta de infección en humanos. Así mismo las brucelas permanecen viables en agua hasta por 72 días; sin embargo, su exposición al sol reduce su supervivencia a unas cuantas horas; en refrigeración aumenta su sobrevivencia, por lo cual pueden mantenerse viables en helados, mantequillas o quesos no pasteurizados (López A 1991., Hernández I 1996).

En México la principal vía de entrada del agente etiológico de la brucelosis la constituye el aparato digestivo, a través de la ingestión de leche y sus derivados, contaminada; aunque también puede penetrar a través del contacto directo, la piel o conjuntivas, o por vía respiratoria mediante inhalación, al manipular suspensiones de brucelas vivas en el laboratorio y en personas en contacto con tejidos animales contaminados (Hernández I 1996).

También pueden adquirirse a través de transfusiones de sangre, aunque estas formas de transmisión son raras y poco importantes .

Aunque la brucelosis ocurre todo el año, es más frecuente en los meses de verano, y no se han descrito casos de infecciones congénitas (López A 1991).

En México, más del 80% de los casos son debidos a *B. melitensis* la cepa predominante. Se ha visto que los estudiantes y las amas de casa es la población más afectada.

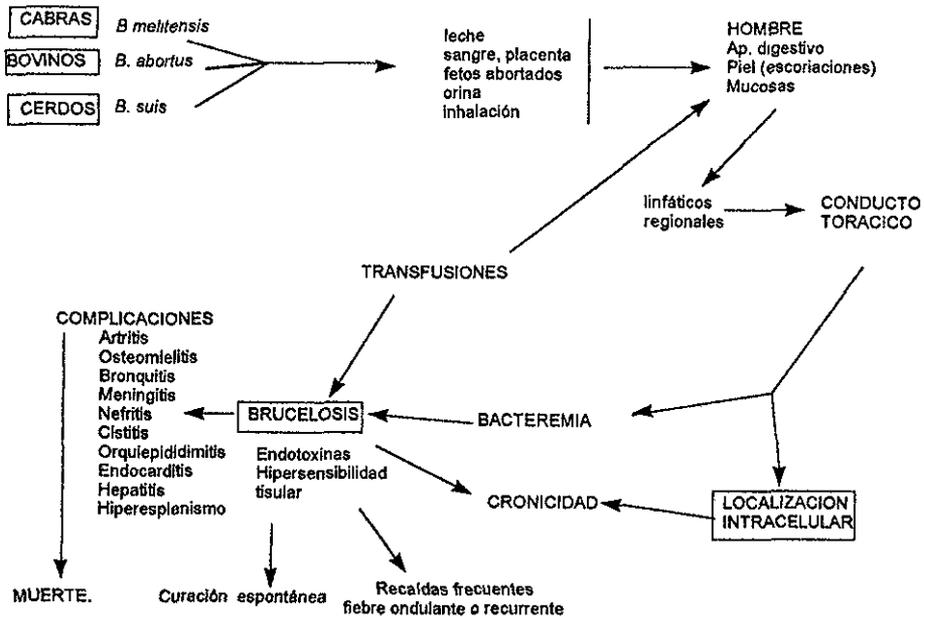


Figura 2 : Infección por *Brucella* en humanos.

IV. 3 Métodos de diagnóstico.

Las pruebas utilizadas en el diagnóstico de brucelosis humana son :

- ROSA DE BENGALA.
- PRUEBA DE COOMBS.
- RADIOINMUNOENSAYO.
- MICROAGLUTINACION EN PLACA.
- MICROAGLUTINACION CON 2-MERCAPTOETANOL.
- ELISA.

ROSA DE BENGALA (RB).

Es un método de aglutinación rápido en placa, cualitativo, que ha reemplazado a la prueba de Huddleson en el conjunto de las llamadas pruebas febriles. La prueba es positiva cuando hay anticuerpos específicos de cualquiera de las clases IgM, IgG e IgA, por lo que es positiva desde el inicio de la sintomatología. Se considera una prueba tamiz.

MICROAGLUTINACION EN PLACA (AMPA).

Es una prueba que determina anticuerpos IgM, IgG e IgA; se atribuyen resultados negativos al fenómeno de prozona, que en realidad se presenta en un porcentaje muy bajo de sueros. Un título mayor o igual a 1:80 se considera positivo.

MICROAGLUTINACION EN 2-MERCAPTOETANOL (2-ME).

Variante de la microaglutinación en placa, emplea como agente reductor para disociar la IgM, detectando solo IgG e IgA, valora la eficacia de la quimioterapia ya que paralela a la mejoría clínica se deben alcanzar valores negativos para considerar el tratamiento adecuado.

RADIOINMUNOENSAYO (RIA).

Fue introducido en el diagnóstico de brucelosis por Parrat en 1977. El radioinmunoensayo y la inmunofluorescencia indirecta no se usan debido a la dificultad del empleo y los riesgos de radiación e incluso de lecturas subjetivas como sucede en la prueba de inmunofluorescencia.

ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA).

El ELISA es usado para la cuantificación de antígeno y anticuerpos. Fue desarrollado por Engvall y Perlmann(1971), observando que es una valiosa técnica por ser altamente sensible en el diagnóstico de diversas enfermedades.

V.- INMUNOLOGIA DE *Brucella*.

Junto con los anticuerpos y la respuesta mediada por células, existen factores no específicos que juegan un papel importante en la primera línea de defensa de la respuesta del huésped hacia *Brucella*. La resistencia natural está mediada por el sistema de complemento, factores sericos, leucocitos, Polimorfonucleares (PMN) y macrófagos. *B. abortus* es más susceptible al efecto bactericida del suero humano normal carente de anticuerpos anti *Brucella*, se ha encontrado que para que ocurra una rápida y eficiente fagocitosis por los PMN se requiere que las brucelas sean opsonizadas previamente, tanto cepas lisa como rugosas.

V.1 Respuesta celular.

La *Brucella* comúnmente llega por vía digestiva debido a la ingestión de lácteos, pasan por vía linfática a los ganglios regionales, luego a sangre periférica donde son fagocitadas por polimorfonucleares, atraídos por quimiotaxis, la bacteria se opsoniza y se adhiere a los receptores de la célula fagocítica favoreciendo la formación del fagosoma; se puede dar el caso que los polimorfonucleares permitan la sobrevivencia y crecimiento de la bacteria, además de transportarla hacia órganos del sistema fagocítico mononuclear. También puede sobrevivir en los macrófagos (López A 1991).

La inmunidad protectora como en otros parásitos intracelulares esta mediada por macrófagos. En este proceso la participación de los anticuerpos específicos quedo bien establecida: las brucelas dentro del macrófago se facilita la fusión fagosoma-lisosoma, esta activación es inducida por componentes como el LPS. La especificidad de la inmunidad celular recae en los linfocitos T, CD 4+ y CD8+ (López A 1991).

El efecto protector más sobresaliente de los linfocitos T involucra la síntesis de Linfocinas IL-2 e interferón γ lo que incrementa la actividad bacteriolítica de los macrófagos.

V.2 Respuesta humoral.

La respuesta de anticuerpos presenta una cinética clásica en la brucelosis humana aguda (Figura 3), los anticuerpos de la clase IgM aparecen después de la primera semana de la infección y alcanzan su máximo nivel a las cuatro semanas. De manera progresiva aparecen y se incrementan los anticuerpos IgG e IgA, posteriormente disminuyen al iniciar el tratamiento hasta que prácticamente desaparecen al cabo de algunas semanas (López A 1991., Hernández I 1996).

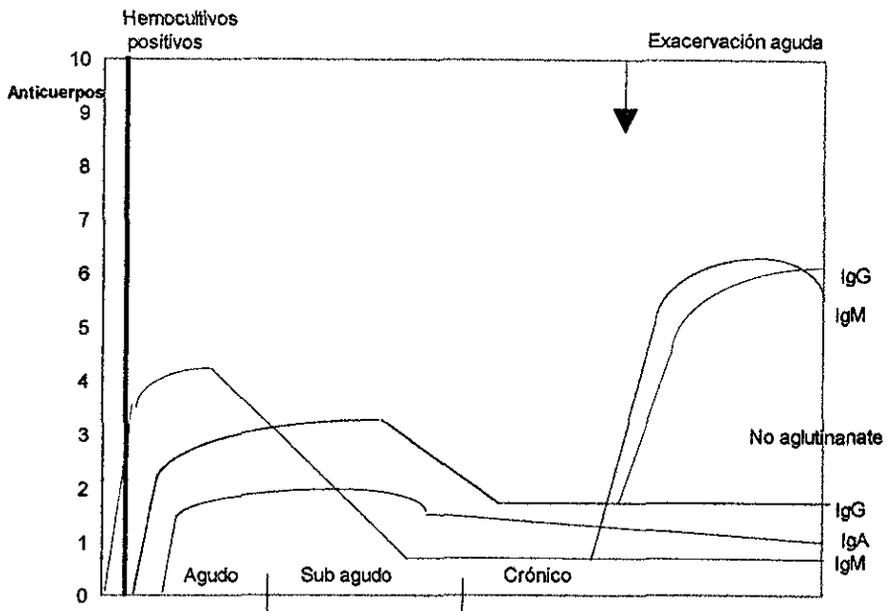


Figura 3 : Respuesta de anticuerpos en la brucelosis(11).

V.- JUSTIFICACION:

Actualmente el diagnóstico serológico se basa en las pruebas de aglutinación que en general son de baja sensibilidad, dado que la brucelosis presenta una fuerte tendencia a desarrollar procesos crónicos es necesario reforzar el diagnóstico con una prueba más sensible: ELISA (Sippel E y cols 1982).

Se sabe que la aglutinación en microplaca estándar se debe a anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA . Con la microaglutinación en 2-mercaptoetanol, se inactiva la IgM y queda presente la aglutinación de IgG y en menor proporción la de IgA. Así mismo el ELISA nos permite saber específicamente el tipo de anticuerpo presente en el suero (Cuauhtécatl H 1989 y Hernández I.1996).

Es necesario saber las características operativas en ELISA como lo es la especificidad y sensibilidad de la prueba. Así como sus ventajas en el diagnóstico de brucelosis humana.

VII.- ANTECEDENTES:

El ELISA es una técnica que se ha utilizado en anteriores trabajos para la búsqueda de anticuerpos de las clases IgM, IgG, IgA anti *Brucella* en suero de pacientes sospechosos.

Araj (1986) evaluó un ELISA con un extracto de *B. melitensis* en pacientes con brucelosis crónica y determinaron anticuerpos de las clases IgG, IgM, e IgA, en 173 pacientes que previamente se habían probado por los métodos de aglutinación rosa de bengala, antígeno de *B. abortus* y *B. melitensis*. Se encontró que a un título mayor o igual a 1:1600 para IgG se tiene una especificidad y sensibilidad del 98 % . En tanto que para IgA con título mayor a 1:200 la sensibilidad es del 98 % y la especificidad es del 99 %.

Gazapo, González, Subiza, Vaquero, Gil y de la Concha (1988) probaron un ELISA con el lipopolisacárido de *B. abortus* en 52 sueros de pacientes con cultivo positivo a *Brucella*, el seguimiento fue durante 13 meses, se encontró un pico inicial en 29 pacientes (56%) en el que identificaron tanto, anticuerpos IgM como IgG dentro de los primeros dos meses y en los restantes 23 sueros (44%) se presentó otro pico en los meses siguientes pero solo de IgG. Se muestra que el ELISA es un excelente método tanto para el diagnóstico y el seguimiento de pacientes con brucelosis.

Ariza, Pellicer, Pallares, Gudiol, (1992) comparan los resultados de las técnicas (aglutinación en tubo, la prueba de Coombs y el ELISA) para la detección de anticuerpos anti *Brucella*. Estudiaron 761 muestras de suero de 75 pacientes con brucelosis además se les practico cultivo, 61 pacientes (83%) fueron positivos a *B. melitensis*; en 1 para *B. abortus* y 13 fueron negativos. El antígeno es el lipopolisacarido de *B. abortus* cepa 99s. Los resultados muestran que en 63 casos la tasa de persistencia de positividad de el ELISA según el método Kaplan - Meier fue de 25% de positivos a IgM, 69% para IgA y 89% para IgG, en 12 pacientes se encontró un pico de IgA e IgG después de 12 meses, así mismo los altos títulos de anticuerpos en el suero de los pacientes se debe principalmente a IgG que por sí sola no es un buen indicador de brucelosis crónica.

En el laboratorio de Brucelosis INDRE, Velázquez (1994) detecto anticuerpos en suero de población abierta en cuatro estados de la República Mexicana, Jalisco, Guanajuato, Estado de México y Distrito Federal por ELISA con cuatro antígenos solubles dos salinos obtenidos de *B. abortus* y *B. Melitensis* constituidos por proteínas y dos lipopolisacaridos de cada una de las mismas especies. Se encontró que no hay una marcada respuesta de anticuerpos hacia cada uno de los cuatro antígenos ya que todos presentaron respuestas similares. De un total de 2119 sueros, 1036 fueron positivos a la técnica de microaglutinación en placa, el 50% resultaron positivos a la técnica de ELISA por lo menos a uno de los antígenos. Por estado, en Guanajuato, aproximadamente el 40% dieron positivos tanto en ELISA como en microaglutinación, en los estados de Jalisco, Distrito Federal y Estado de México, hubo aproximadamente 10% más de positivos a la técnica de ELISA.

VIII.- OBJETIVOS:

- Objetivo general.

- Establecer la eficacia diagnóstica de una ELISA para IgM, IgG e IgA utilizando un antígeno soluble de *B. abortus* cepa 99s obtenido por sonicación para diferenciar casos de brucelosis aguda y crónica.

- Objetivos particulares:
 - Determinar la sensibilidad y especificidad en el método de ELISA para cada clase de anticuerpo.
 - Ver la correlación que hay entre los datos obtenidos por los métodos de microaglutinación y el método de ELISA.
 - Hacer una cinética de respuesta de anticuerpos totales y de las clases IgM, IgG, IgA para cada paciente con brucelosis.

IX.- MATERIAL Y METODOS.

El fundamento de la técnica (ELISA), se basa en la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). En este trabajo se utiliza un antígeno soluble de *B. abortus* 99s como marcador para la identificación de anticuerpos anti *Brucella* en el suero de seres humanos.

El análisis inmunoenzimático, se fundamenta en la propiedad de las enzimas de ser conjugadas o unidas a anticuerpos en forma covalente, sin que el conjugado resultante (antígeno-enzima o anticuerpo-enzima) pierda sus características de reactividad inmunológica o enzimática. La característica de las enzimas para catalizar la conversión de un gran número de moléculas de sustrato, proporciona la base para amplificar y detectar indirectamente una reacción Ag-Ac Figura 7.

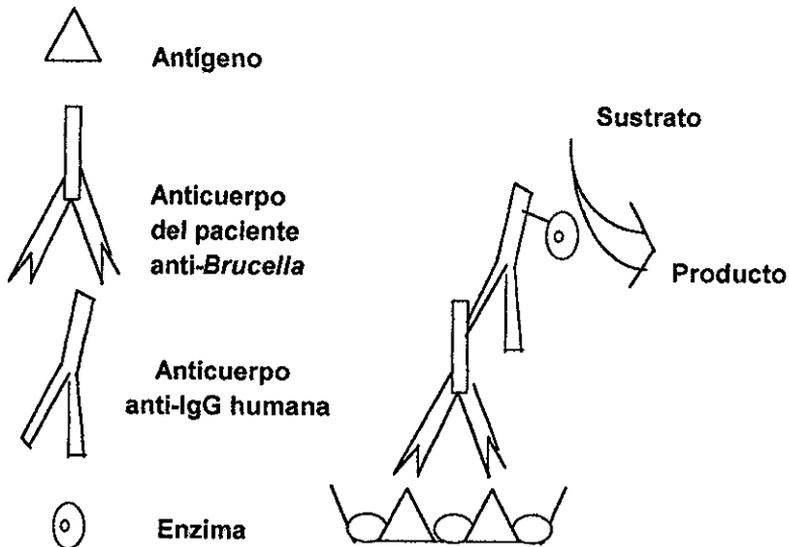


Figura 7: Análisis Inmunoenzimático indirecto en fase sólida.

Sueros evaluados.

Se trabajaron tres grupos de sueros humanos:

- Grupo I de sueros de pacientes Negativos a *Brucella* (n = 85).

Los sueros de individuos negativos a *Brucella* fueron donados por el Banco Central de Sangre del Centro Medico "La Raza" del IMSS. Son de individuos aparentemente sanos, donadores de sangre. El 80% son hombres y el 20 % mujeres de 18 a 50 años de edad(ver tabla 3).

- Grupo (II) de sueros de pacientes con serología positiva y cultivo positivo a *Brucella*. (n = 14)

Se tomaron sueros del laboratorio de brucelosis del INDRE de pacientes que resultaron positivos a cultivo de *Brucella* de los cuales 13 son de *B. melitensis* y 1 a *B. abortus*, además tuvieron un seguimiento en su diagnostico serologico de rutina, rosa de bengala (RB). aglutinación estándar (AMPA), aglutinación en presencia de 2-mercaptoetanol (2-ME) y que por lo menos se contara con tres muestras por paciente. El 35.7% son hombres y el 64.3% son mujeres de entre 4 y 55 años (ver tabla 4).

- Grupo III de sueros con *Vibrio cholera*. (n= 8)

Son sueros de pacientes que fueron donados por el laboratorio de Producción de sueros del INDRE con cultivo positivo a *Vibrio cholera*(ver tabla 5).

Antígeno.

Se trabajó con un antígeno soluble de *B. abortus* de la cepa 99s obtenido por el método de Ruiz Castañeda modificado, la obtención del antígeno se llevó a cabo en el laboratorio de brucelosis del INDRE.

Se descongeló un vial del cepario del Laboratorio de brucelosis con la cepa de *B. abortus* 99 s y se sembró en cajas petri en medio de agar soya biotriptasa, (TSA) al cabo de tres días se observó la morfología característica de *Brucella*.

Aglutinando con suero polivalente anti *Brucella* y acriflavina se confirmó que fuera la cepa de *Brucella* y que ésta se conservara lisa .

Se preparó una suspensión de brucelas con una concentración de 10^9 bacterias / mL que corresponde al tubo 4 del nefelómetro de MacFarland y se inocularon botellas con medio TSA. Se dejaron crecer durante 48 horas a 37 °C.

Nuevamente se les realizó aglutinación con suero polivalente y acriflavina, se desecharon las botellas donde la cepa dio acriflavina positivo que indica que es una cepa rugosa, se cosecharon las botellas con cepa lisa y se obtuvo una suspensión de bacterias de la que se sembraron en cuatro matraces de 1 L con caldo *Brucella*. Se incubaron a 37°C en agitación a 160 rpm, durante 48 h., posteriormente a este tiempo se fija las bacterias con formol al 1 % durante 24 horas, a 4°C. Se centrifugaron las bacterias a 4.8 x g y se desecho el sobrenadante y se obtuvo el sedimento.

Las bacterias se ajustaron a una concentración al 20% en solución salina y se rompieron con ultrasonido a 4 Hertz durante 10 minutos efectivos en series de un minuto sonificado y un minuto de descanso.

Se centrifuga el antígeno sonificado a 10,000 rpm 10 min y se retiró el precipitado, el sobrenadante es el antígeno soluble de *B. abortus* 99 s.

Tipo de placas.

Las placas que se utilizaron fueron de poliestireno Marca Corning cat. 25801 las cuales son utilizadas en el INDRE en inmunoensayos de diagnóstico in vitro, presentan una clara óptica, óptima unión a proteínas y mantiene un fondo uniforme.

Para la titulación de los reactivos se seleccionaron sueros en el laboratorio de brucelosis que por las técnicas de rutina son fuertemente positivos(+++), sueros positivos débiles (+/-), así como negativos (--) al diagnóstico de brucelosis.

Titulación del antígeno.

Para elegir la concentración óptima de antígeno se diseñó un experimento que permitió analizar dos factores a la vez (concentración de antígeno y dilución de conjugado) con tres concentraciones, para antígeno 2.5, 5 y 10 µg y dos diluciones para conjugado 1:4000 y 1:6000. Con una dilución fija de suero 1:400.

		CONCENTRACION DE Ag B. abortus												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A														Conj 1:4000 anti Ig's
B		I					II				III			
C														
D														
E													Conj 1:6000 anti Ig's	
F		IV					V				VI			
G														
H														

- I Ag 2.5 µg/Conj 1:4000
- II Ag 5 µg/Conj 1:4000
- III Ag 10 µg/Conj 1:4000
- IV Ag 2.5 µg/Conj 1:6000
- V Ag 5 µg/Conj 1:6000
- VI Ag 10 µg/Conj 1:6000

Fila A - Blancos

Fila B - Control positivo (+++)

Fila C - Control débil positivo (+-)

Fila D - Control (-)

Fila E - Blancos

Fila F - Control positivo (+++)

Fila G - Control débil positivo (+-)

Fila H - Control (-)

Columna 1, 2, 5, 6, 9, 10, sin Antígeno

Columna 3, 4, 7, 8, 11, 12, con Antígeno

Figura 4 Diseño para la titulación del antígeno de *B. Abortus* 99s

Titulación del conjugado.

A partir de que se fijo la dilución de Ag en 5 µg se procedió a titular el conjugado en un diseño que permitió analizar tres diluciones.

		CONCENTRACION DE Ag <i>B.abortus</i> 5 µg /mL												
		99s1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A														Conj IgA
B														
C			I				II				III			
D														
E														Conj IgM
F														
G			IV				V				VI			
H														

- I Conjugado 1:250 IgA
- II Conjugado 1:500 IgA
- III Conjugado 1:1000 IgA
- IV Conjugado 1:250 IgM
- V Conjugado 1:500 IgM
- VI Conjugado 1:1000 IgM

- Fila A - Blancos
- Fila B - Control positivo (+++)
- Fila C - Control débil positivo (+-)
- Fila D - Control (-)
- Fila E - Blancos
- Fila F - Control positivo (+++)
- Fila G - Control débil positivo (+-)
- Fila H - Control (-)

- Columna 1, 2, 5, 6, 9, 10, sin Antígeno
- Columna 3, 4, 7, 8, 11, 12, con Antígeno

Figura 5: Diseño para la titulación de IgA e IgM.

Con el mismo diseño se titulo los conjugados de IgG y anti gamaglobulinas

totales.

CONCENTRACION DE Ag *B. abortus* 5 µg /mL

	99s1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													Conj IgG
B		I				II				III			
C													
D													
E													Conj Ig tot
F		IV				V				VI			
G													
H													

- I Conjugado 1:7,000 IgG
- II Conjugado 1:8,000 IgG
- III Conjugado 1:10,000 IgG
- IV Conjugado 1:4000 Ig tot
- V Conjugado 1:5000 Ig tot
- VI Conjugado 1:6000 Ig tot

Fila A - Blancos

Fila B - Control positivo (+++)

Fila C - Control débil positivo (+-)

Fila D - Control (-)

Fila E - Blancos

Fila F - Control positivo (+++)

Fila G - Control débil positivo (+-)

Fila H - Control (-)

Columna 1, 2, 5, 6, 9, 10, sin Antígeno

Columna 3, 4, 7, 8, 11, 12, con Antígeno

Figura 6 Diseño para la titulación de IgG e Ig tot.

Sensibilización.

En las placas Corning se colocaron 100µl de amortiguador de boratos pH 8.4 con antígeno soluble de *B. abortus* . 99s a una concentración de 5µg/mL. incubando durante 18 h a 4 °C. En seguida se hicieron tres lavados con PBS Tween 20.

Bloqueo.

Para bloquear las placas se utilizó leche Svelty al 2 % en amortiguador de fosfatos- Tween 20 (PBS-T), en cada pozo se colocaron 200µL de esta solución, se incubaron durante 1 h. a 37 °C con la finalidad de eliminar al máximo las reacciones inespecíficas. Al finalizar el tiempo se lavaron tres veces con PBS -Twenn 20.

Adición del suero.

A los sueros se les hizo una dilución 1 :400 en PBS-T . De esta dilución se colocaron 100 µL a cada uno de los pozos, incubando 1 h a 37°C lavándose tres veces con PBS - T.

Adición del conjugado.

La concentración óptima de antígeno para la sensibilización de las placas fue de 5µg, con esta concentración se titularon los diversos conjugados y se eligió la dilución respectivamente :

- Anti- Ig totales 1 : 5000.
- Anti- IgG 1 :10,000.
- Anti- IgM 1 :250.
- Anti- IgA 1 :250.

A esta concentración de antígeno y de los conjugados el ensayo es estable, se observa el menor coeficiente de variación y los valores de absorbancia para el control positivo son cercanos a 1 de D.O., lo que indica que hay una buena correlación entre la concentración del anticuerpo y la absorbancia.

Se adicionó a cada pozo 100 µL de cada dilución del conjugado dejándose reaccionar por 1 h a 37°C. Se lavaron las placas tres veces con PBS - T.

Adición del sustrato.

El sustrato utilizado fue peróxido de hidrógeno y ortofenilén diamina en amortiguador de PBS-T a pH 7.4, preparado en las siguientes cantidades : por cada 25 mL de amortiguador de fosfatos , se colocaron 10 µL de peróxido de hidrógeno y 10 mg de ortofeniléndiamina . Esta solución se preparó en el momento en que iba a ser utilizada.

A cada pozo se le colocaron 100 μ L de esta solución, dejándose reaccionar por 20 minutos a 37 °C en la obscuridad. Transcurrido el tiempo se paró la reacción adicionando 50 μ L de ácido sulfúrico 4 N en cada pozo.

Lectura.

Se realizó inmediatamente después de parar la reacción en un lector de ELISA (Multiscan Plus) a una longitud de onda de 492 nm.

Valor de Corte.

El punto de corte se determinó mediante la característica de operación receptora o curva ROC, en esta curva mientras más se aproxima a la esquina superior izquierda del gráfico, más precisa es la prueba debido a que la tasa de verdaderos positivos es 1 y la tasa de falsos positivos es cero (Navarro F 1988).

Para Ig tot es de 0.210, el de IgM 0.152, para IgG 0.262 y para IgA 0.1 de densidad óptica medida a 490 nm en lector de ELISA. En las siguientes gráficos se observa en donde cruza el valor de corte en las tres poblaciones de sueros.

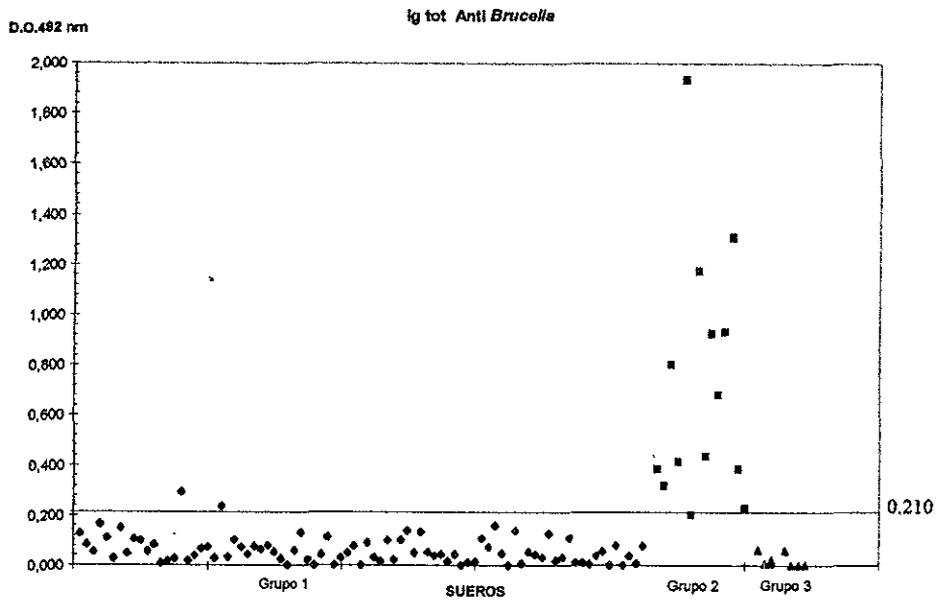


Figura 8: Punto de corte para Inmunoglobulinas totales.

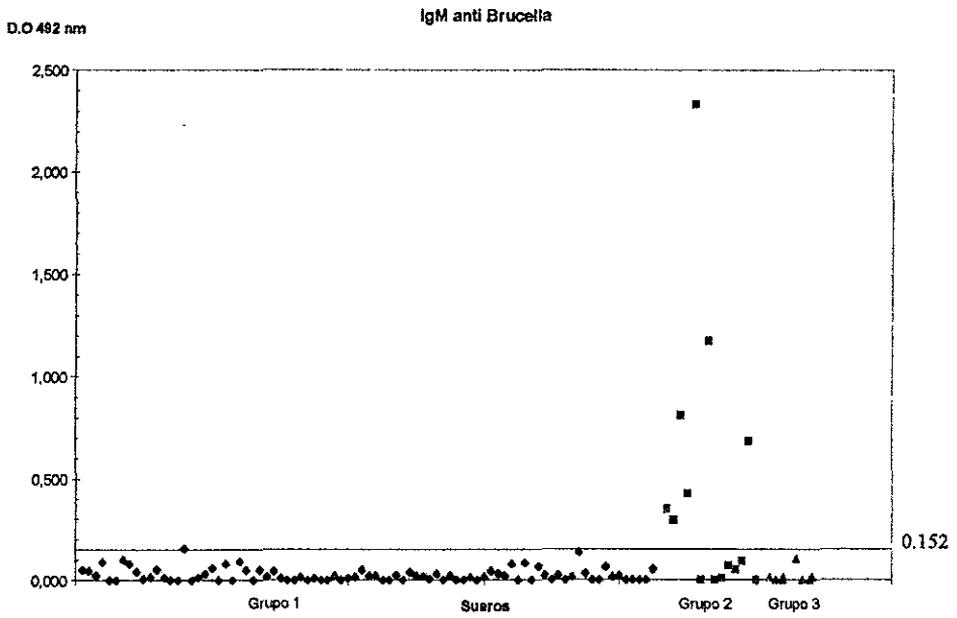


Figura 9: Punto de corte para IgM.

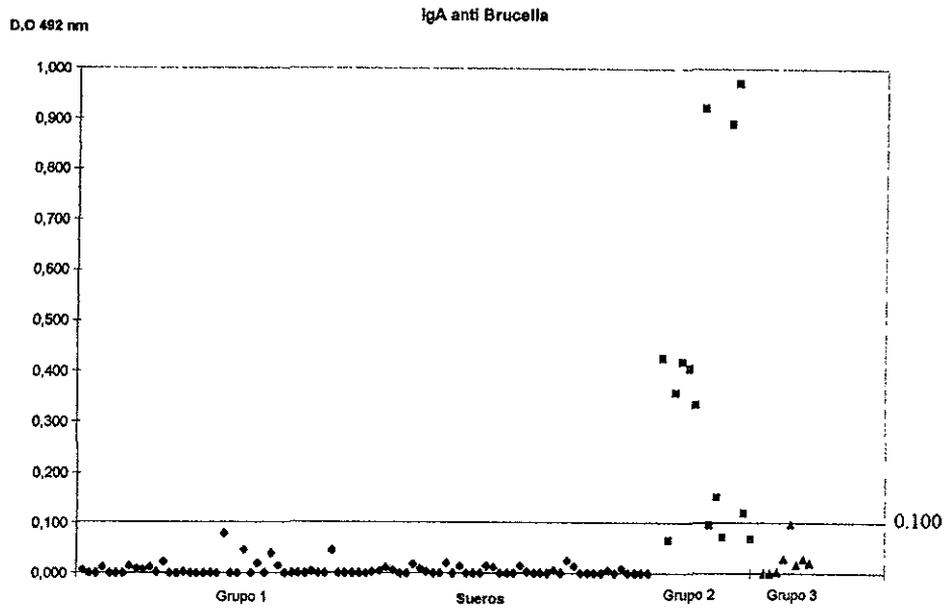


Figura 11: Punto de corte para IgA.

X - RESULTADOS:

En las siguientes tablas (3) se muestran los valores promedio obtenidos de las poblaciones bajo estudio mediante las técnicas tanto de aglutinación como de ELISA para la detección de las diferentes clases de anticuerpos anti *Brucella*, éstos valores son expresados como densidad óptica de la intensidad de respuesta inmune humoral hacia antígenos del extracto soluble de *Brucella*.

Tabla 3 Grupo 1, Individuos aparentemente

MUESTRA	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
14635	NEGATIVO	0	0	0.127	0.049	0.235	0.006
14637	POSITIVO	0	0	0.081	0.045	0.164	0.000
14639	NEGATIVO	0	0	0.053	0.023	0.111	0.000
14640	NEGATIVO	0	0	0.165	0.088	0.289	0.011
49970	NEGATIVO	0	0	0.109	0.000	0.062	0.000
49971	NEGATIVO	0	0	0.028	0.000	0.112	0.000
73141	NEGATIVO	0	0	0.151	0.099	0.077	0.000
73145	NEGATIVO	0	0	0.047	0.078	0.049	0.014
73148	NEGATIVO	0	0	0.105	0.040	0.000	0.009
73150	NEGATIVO	0	0	0.100	0.007	0.243	0.007
73152	NEGATIVO	0	0	0.057	0.014	0.130	0.013
73171	NEGATIVO	0	0	0.082	0.051	0.000	0.002
73172	NEGATIVO	0	0	0.010	0.010	0.054	0.023
73173	NEGATIVO	0	0	0.016	0.000	0.093	0.000
73174	NEGATIVO	0	0	0.027	0.000	0.095	0.000
73175	POSITIVO	40	0	0.292	0.152	0.263	0.002
73176	NEGATIVO	0	0	0.018	0.000	0.095	0.000
73178	NEGATIVO	0	0	0.039	0.012	0.096	0.000
82652	NEGATIVO	0	0	0.069	0.031	0.148	0.000
82654	NEGATIVO	0	0	0.072	0.059	0.146	0.000
82656	NEGATIVO	0	0	0.027	0.000	0.125	0.000
82657	NEGATIVO	0	0	0.236	0.078	0.393	0.079
82658	NEGATIVO	0	0	0.034	0.000	0.177	0.000
82659	POSITIVO	0	0	0.101	0.092	0.216	0.000
82660	NEGATIVO	0	0	0.072	0.047	0.016	0.047
82758	NEGATIVO	0	0	0.045	0.000	0.088	0.000
82760	NEGATIVO	0	0	0.076	0.048	0.088	0.019
82761	NEGATIVO	0	0	0.064	0.017	0.061	0.000

Tabla 3 Continuación: Grupo 1, Individuos aparentemente

MUESTRA	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
82762	NEGATIVO	0	0	0.079	0.043	0.066	0.040
82763	POSITIVO	0	0	0.031	0.005	0.045	0.001
82764	NEGATIVO	0	0	0.024	0.000	0.053	0.000
82766	NEGATIVO	0	0	0.000	0.000	0.094	0.000
82767	NEGATIVO	0	0	0.059	0.016	0.145	0.000
82768	NEGATIVO	0	0	0.131	0.000	0.130	0.000
82770	NEGATIVO	0	0	0.024	0.008	0.094	0.003
82771	NEGATIVO	0	0	0.000	0.000	0.063	0.000
82772	NEGATIVO	0	0	0.043	0.000	0.148	0.000
82773	NEGATIVO	0	0	0.113	0.019	0.098	0.045
82774	NEGATIVO	0	0	0.000	0.000	0.127	0.000
82790	NEGATIVO	0	0	0.029	0.009	0.023	0.000
82791	POSITIVO	0	0	0.038	0.000	0.008	0.000
82792	NEGATIVO	0	0	0.077	0.048	0.139	0.000
82793	NEGATIVO	0	0	0.000	0.021	0.001	0.000
82794	POSITIVO	0	0	0.092	0.021	0.108	0.003
82795	NEGATIVO	0	0	0.033	0.000	0.041	0.004
82796	NEGATIVO	0	0	0.016	0.001	0.037	0.011
82797	NEGATIVO	0	0	0.099	0.022	0.094	0.006
82798	NEGATIVO	0	0	0.024	0.000	0.091	0.000
82799	NEGATIVO	0	0	0.103	0.038	0.085	0.000
82816	NEGATIVO	0	0	0.138	0.019	0.293	0.018
82817	POSITIVO	0	0	0.051	0.018	0.079	0.009
82818	NEGATIVO	0	0	0.135	0.004	0.134	0.003
82819	NEGATIVO	0	0	0.052	0.028	0.058	0.000
82821	NEGATIVO	0	0	0.039	0.000	0.050	0.000
82822	NEGATIVO	0	0	0.042	0.019	0.119	0.021
82823	NEGATIVO	0	0	0.017	0.000	0.000	0.000

Tabla 3 Continuación: Grupo 1, Individuos aparentemente

MUESTRA	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
82824	NEGATIVO	0	0	0.043	0.000	0.184	0.014
82825	NEGATIVO	0	0	0.000	0.012	0.000	0.000
82843	NEGATIVO	0	0	0.011	0.000	0.002	0.000
82844	NEGATIVO	0	0	0.015	0.016	0.037	0.000
82845	POSITIVO	0	0	0.107	0.042	0.135	0.015
82846	NEGATIVO	0	0	0.074	0.033	0.158	0.012
82847	NEGATIVO	0	0	0.160	0.019	0.147	0.000
82849	NEGATIVO	0	0	0.048	0.076	0.063	0.000
82850	NEGATIVO	0	0	0.000	0.000	0.033	0.000
82851	NEGATIVO	0	0	0.139	0.083	0.110	0.015
82852	NEGATIVO	0	0	0.008	0.000	0.038	0.003
83041	NEGATIVO	0	0	0.053	0.065	0.088	0.000
83042	NEGATIVO	0	0	0.042	0.023	0.040	0.000
83043	NEGATIVO	0	0	0.033	0.000	0.000	0.000
83044	NEGATIVO	0	0	0.127	0.022	0.279	0.006
83046	NEGATIVO	0	0	0.019	0.000	0.091	0.000
83047	NEGATIVO	0	0	0.032	0.015	0.083	0.025
83048	POSITIVO	0	0	0.109	0.133	0.021	0.014
83049	NEGATIVO	0	0	0.011	0.032	0.003	0.000
83052	NEGATIVO	0	0	0.012	0.000	0.000	0.000
83053	NEGATIVO	0	0	0.005	0.000	0.004	0.000
83054	NEGATIVO	0	0	0.038	0.063	0.000	0.000
83055	NEGATIVO	0	0	0.056	0.014	0.134	0.006
83056	NEGATIVO	0	0	0.000	0.019	0.003	0.000
83057	NEGATIVO	0	0	0.080	0.000	0.209	0.010
83058	NEGATIVO	0	0	0.000	0.000	0.000	0.000
83059	NEGATIVO	0	0	0.037	0.000	0.083	0.000
83063	NEGATIVO	0	0	0.007	0.000	0.016	0.000
83065	NEGATIVO	0	0	0.077	0.052	0.039	0.000

La tabla (4) presenta los resultados de las técnicas de Rosa de Bengala, Aglutinación estándar de *B. abortus*, Aglutinación en presencia de 2-ME y ELISA, para los casos de brucelosis. En cada caso se realizó un seguimiento.

Tabla 4: Grupo 2, casos de pacientes con brucelosis.

CASO 1 BIR
 SEXO FEMENINO * Cultivo de
 EDAD 38 AÑOS *B. melitensis* 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	640	160	0.386	0.349	0.428	0.427
1	POSITIVO	80	40	0.245	0.059	0.449	0.078
2	POSITIVO	80	20	0.060	0.013	0.180	0.064
3	POSITIVO	40	20	0.080	0.036	0.195	0.065
4	POSITIVO	20	0	0.000	0.039	0.190	0.014

CASO 2 ADP
 SEXO FEMENINO * Cultivo de
 EDAD 26 AÑOS *B. melitensis* 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	1280	80	0.320	0.294	0.415	0.067
1	POSITIVO	80	40	0.077	0.056	0.212	0.000
2	POSITIVO	40	20	0.147	0.076	0.308	0.002

CASO 3 ARG
 SEXO MASCULINO * Cultivo de
 EDAD 25 AÑOS *B. melitensis* 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	80	40	0.803	0.810	0.648	0.359
1	POSITIVO	640	80	0.209	0.073	0.357	0.079
2	POSITIVO	40	0	0.268	0.064	0.478	0.060
3	POSITIVO	40	20	0.245	0.055	0.522	0.061

CASO 4 JGS
 SEXO FEMENINO * Cultivo de
 EDAD 44 AÑOS *B. melitensis* 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	640	80	0.416	0.425	0.557	0.420
1	POSITIVO	160	80	0.203	0.136	0.404	0.169
2	POSITIVO	80	40	0.188	0.084	0.414	0.136
3	POSITIVO	80	40	0.218	0.092	0.449	0.155
4	POSITIVO	160	20	0.092	0.048	0.238	0.070

En todos los casos la primera muestra tuvo resultado positivo para el hemocultivo. Sólo en los casos 5 y 13 se obtuvo un cultivo positivo en una muestra posterior.

Tabla 4 Continuación: Grupo 2, casos de pacientes con

CASO 5 CCL
SEXO FEMENINO * Cultivo de
EDAD 10 AÑOS *B. melitensis* 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	2560	1280	1.931	2.332	0.828	0.407
1	POSITIVO	320	160	1.406	1.000	0.793	0.157
2	POSITIVO	80	40	0.728	0.164	0.528	0.109
* 3	POSITIVO	80	40	0.400	0.159	0.290	0.207
4	POSITIVO	80	80	0.116	0.000	0.116	0.016
5	POSITIVO	80	40	0.205	0.000	0.279	0.029

CASO 6 MCMP
SEXO FEMENINA * Cultivo de
EDAD 35 AÑOS *B. melitensis* 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	320	160	0.205	0.000	0.291	0.337
1	POSITIVO	160	80	0.553	0.020	0.750	0.337
2	POSITIVO	80	40	0.216	0.000	0.518	0.101
3	POSITIVO	80	40	0.280	0.000	0.595	0.127
4	POSITIVO	80	80	1.046	0.150	0.419	1.600

CASO 7 EBA
SEXO MASCULINO * Cultivo de
EDAD 45 AÑOS *B. melitensis* 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
0	POSITIVO	1280	320	1.178	1.175	0.576	0.923
1	POSITIVO	1280	1280	1.925	2.399	0.745	1.299
* 2	POSITIVO	160	40	0.525	0.206	0.742	0.344
3	POSITIVO	80	20	0.289	0.112	0.522	0.122
4	POSITIVO	80	0	0.183	0.060	0.399	0.035
5	NEGATIVO	0	0	0.055	0.031	0.164	0.037

CASO 8 GCH
SEXO MASCULINO * Cultivo de
EDAD 30 AÑOS *B. melitensis* 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	80	80	0.435	0.000	0.584	0.097
1	POSITIVO	80	40	0.294	0.000	0.492	0.031
2	POSITIVO	80	40	0.229	0.000	0.489	0.009
3	POSITIVO	40	20	0.241	0.000	0.497	0.014

Tabla 4 Continuación: Grupo 2, casos de pacientes con brucelosis

CASO 9 DSC

SEXO FEMENINO

EDAD 12 AÑOS

* Cultivo de

B. melitensis 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	80	80	0.927	0.009	0.750	0.153
1	POSITIVO	80	40	0.941	0.012	0.758	0.134
2	POSITIVO	40	40	0.360	0.017	0.516	0.046
3	POSITIVO	40	20	0.170	0.000	0.351	0.021
4	POSITIVO	20	0	0.035	0.000	0.072	0.015

CASO 10 RMA

SEXO MASCULINO

EDAD 28 AÑOS

*Cultivo de

B. melitensis 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	160	80	0.683	0.07	0.505	0.073
1	POSITIVO	80	80	0.522	0.02	0.5135	0.0145
2	POSITIVO	40	20	0.381	0.01	0.3565	0.0115
3	NEGATIVO	0	0	0.222	0.02	0.276	0.044
4	NEGATIVO	0	0	0.353	0.03	0.362	0.202
5	NEGATIVO	0	0	0.418	0.02	0.3755	0.067

CASO 11 VMDP

SEXO MASCULINO

EDAD 55 AÑOS

* Cultivo de

B. melitensis 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	320	160	0.935	0.052	0.502	0.891
1	POSITIVO	160	160	0.434	0.000	0.400	0.256
2	POSITIVO	80	40	0.393	0.003	0.485	0.133
3	POSITIVO	80	40	0.459	0.007	0.428	0.131

CASO 12 JHM

SEXO FEMENINO

EDAD 4 AÑOS

* Cultivo de

B. melitensis 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	320	320	1.311	0.090	0.268	0.972
1	POSITIVO	160	160	0.404	0.019	0.377	0.191
2	POSITIVO	80	80	0.479	0.028	0.295	0.230
3	POSITIVO	80	20	0.307	0.039	0.085	0.223
4	POSITIVO	80	0	0.180	0.025	0.016	0.157
5	POSITIVO	20	0	0.106	0.028	0.000	0.143
6	NEGATIVO	0	0	0.105	0.035	0.000	0.153

Tabla 4 Continuación: Grupo 2, casos de pacientes con brucelosis

CASO 13 MML

SEXO FEMENINO

* Cultivo de

EDAD 32 AÑOS

B. abortus

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	320	80	0.386	0.682	0.430	0.122
1	POSITIVO	160	40	0.092	0.124	0.306	0.018
2	POSITIVO	160	40	0.273	0.289	0.564	0.059
3	POSITIVO	80	20	0.081	0.084	0.324	0.006
* 4	POSITIVO	40	0	0.173	0.035	0.536	0.062
5	POSITIVO	20	0	0.038	0.014	0.174	0.006
6	POSITIVO	20	20	0.056	0.032	0.210	0.019
7	POSITIVO	20	0	0.047	0.026	0.176	0.012
8	POSITIVO	20	0	0.057	0.037	0.191	0.025
9	POSITIVO	0	0	0.075	0.058	0.130	0.032

CASO 14 ATS

SEXO FEMENINO

*Cultivo de

EDAD 18 AÑOS

B. melitensis 1

MES	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
* 0	POSITIVO	80	40	0.230	0.000	0.319	0.070
1	POSITIVO	80	20	0.221	0.000	0.320	0.048
2	POSITIVO	80	40	0.141	0.000	0.245	0.025
3	POSITIVO	40	20	0.284	0.035	0.377	0.070
4	POSITIVO	80	20	0.167	0.000	0.264	0.030
5	POSITIVO	80	0	0.219	0.001	0.333	0.042
6	POSITIVO	80	20	0.152	0.001	0.267	0.058
7	POSITIVO	40	20	0.117	0.001	0.221	0.050
8	POSITIVO	40	20	0.199	0.000	0.292	0.082
10	POSITIVO	20	0	0.158	0.026	0.262	0.068
11	POSITIVO	40	20	0.211	0.056	0.242	0.074

* En el caso 13 el cultivo es positivo a *B. abortus*, tanto en la muestra inicial como en el 5 mes.

Para valorar si existe reacción cruzada con *Vibrio cholera* se determina la respuesta hacia el extracto soluble de *Brucella* en suero de individuos con cólera, confirmados por cultivo, bajo las mismas condiciones usadas para el grupo casos de con *Brucella*. Los resultados para la técnica de ELISA y aglutinación se presentan en la siguiente tabla 5.

Tabla 5 : Grupo 3, Casos de pacientes con colera.

MUESTRA	RB	AMPA	2-ME	IgS	IgM	IgG	IgA
700	NEGATIVO	0	0	0.061	0.01	0.2095	0
702	NEGATIVO	0	0	0.006	0	0.0205	0
711	NEGATIVO	0	0	0.022	0	0.0615	0.002
701	NEGATIVO	0	0	0.006	0	0	0.03
717	NEGATIVO	0	0	0.058	0.1	0.022	0.099
713	NEGATIVO	0	0	0	0	0.0135	0.0155
710	POSITIVO	20	20	0	0	0	0.0285
715	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0.02

En la tabla (6) se presenta la media y desviación estándar a partir de la densidad óptica obtenida en la técnica de ELISA de los tres grupos de trabajo :
 Grupo 1 individuos aparentemente sanos, Grupo 2 pacientes con brucelosis confirmada por cultivo. y el Grupo 3 Pacientes con cólera confirmada por cultivo.

Tabla 6: Medidas de tendencia central de los grupos de trabajo.

Grupo	IgG	IgM	IgG	IgA
	Media (DS)	Media (DS)	DO _{492nm}	
1	0.060(0.054)	0.025(0.032)	0.094(0.060)	0.006(0.013)
2	0.724(0.495)	0.449(0.651)	0.507(0.165)	0.380(0.328)
3	0.019(0.026)	0.014(0.036)	0.040(0.068)	0.024(0.033)

Se observa claramente que las medias y desviación estándar promedio del grupo de casos uno y tres son similares lo que contrasta con el grupo 2 que son los casos con brucelosis.

Así mismo en la figura (12), se representan las diferencias entre cada grupo de trabajo para cada tipo de anticuerpo así como los valores extremos.

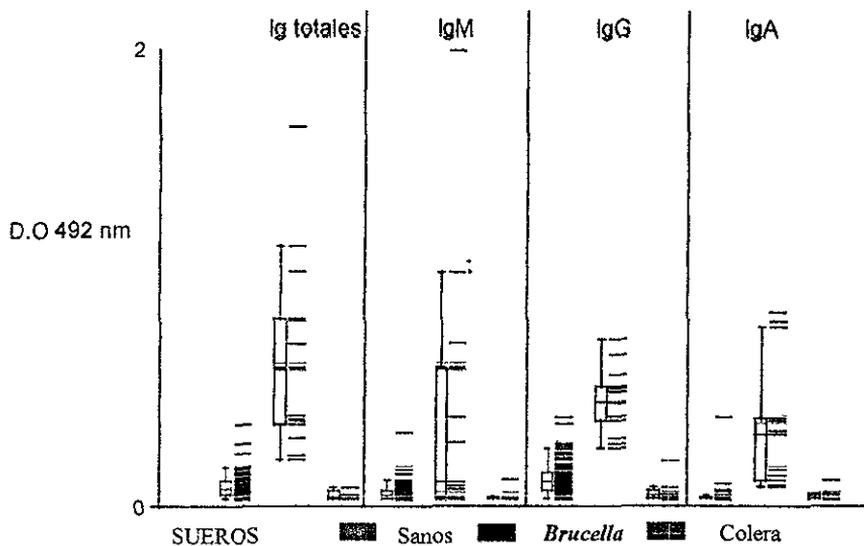


Figura 12: Distribución, dispersión y tendencia central (mediana) de los grupo de trabajo y valores extremos para Ig totales e isotipos de anticuerpos.

Al comparar el gráfico de caja y bigote, se observa que los datos tienen valores extremos y estos posiblemente afectan la determinación de estimadores de tendencia central como es la media aritmética. Estos gráficos también sugieren que los resultados no provienen de una población con distribución normal, lo cual es congruente con la prueba de bondad de ajuste para una distribución normal (10).

Así mismo el grupo de aparentemente sanos y los de cólera confirmada por cultivo presentan la respuesta inmune humoral medida en forma indirecta en el inmunoensayo ELISA muy similar. Así mismo en la primera muestra de casos de brucelosis, confirmada por hemocultivo, presenta una mayor respuesta inmune humoral hacia antígenos del extracto crudo de *B. abortus*. Estos resultados se compararon mediante una prueba no paramétrica para más de dos muestras independientes como es la de Kruskal-wallis. Esta prueba no apoya la hipótesis nula de igualdad de respuesta inmune humoral hacia antígenos presentes en el extracto soluble de *B. abortus*. con una $P < 0.05$.

Con el fin de sacar la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA se tomo como base una tabla de 2 X 2 a partir del valor promedio de las replicas, la absorbancia a 492 nm en los grupos de suero, de 14 casos de *Brucella*, como de los 87 sueros de personas aparentemente sanas del banco de sangre tabla 8.

Tabla 8: Diseño de la tabla de 2 X 2 para determinar las características operativas para el diagnóstico de brucelosis por la técnica de ELISA.

ELISA	Brucella	
	Brucella +	Brucella -
ELISA +	E +/ B +	E +/ B-
ELISA -	E -/ B +	E -/ B-

En la tabla (9) se muestran los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo para cada tipo de Anticuerpo.

Tabla 9: Características operativas de ELISA para *Brucella*.

Ac	VALOR DE CORTE	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN	TFP	TFN
Ig tot	0.210	92.86 %	97.65 %	86.67%	98.81%	2.35%	7.14%
IgM	0.152	57.14 %	92.94 %	57.14%	92.94%	7.06%	42.86%
IgG	0.262	92.86 %	96.47 %	81.25%	98.80%	3.53%	7.14%
IgA	0.100	100 %	98.82%	93.33%	100%	1.16%	0%

VPP - Valor predictivo positivo. VPN - Valor predictivo negativo.
TFP - Tasa de falsos positivos. TFN - Tasa de falsos negativos.

Con el fin de comparar las pruebas de aglutinación con el ELISA, se realizó un análisis de concordancia mediante el estadístico de Kappa, se encontró que el mayor coeficiente de concordancia (k) fue de 0.92 entre AMPA y ELISA para Ig totales, de 0.96 entre 2-ME y ELISA para IgG con una $\alpha=0.05$. En tanto que la concordancia resultó menor cuando se analizaron los diferentes isotipos de anticuerpos como se muestra en la tabla (10).

Tabla 10: Concordancia entre las pruebas estándar y ELISA.

		Métodos estándar		
		RB	AMPA	2ME
ELISA	Ig totales	0.67 0.98-0.86	0.92 0.72-1	0.88 0.68-1
	IgM	0.45 0.28-0.61	0.65 0.47-0.84	0.59 0.40-0.78
	IgG	0.63 0.44-0.83	0.85 0.66-1	0.96 0.66-1
	IgA	0.54 0.36-0.71	0.77 0.58-0.96	0.81 0.61-1

Todos los valores de concordancia son estadísticamente significativos con una $P < 0.05$.

Aunque la concordancia sea menor, cuando se compararon los isotipos, como el valor que mide la significancia estadística de Cochran es pequeño(0.31), resulto ser significativa la diferencia, por lo que estas diferencias se deben a la pruebas empleadas y no se deben a la población.

Así mismo no es posible considerar estas diferencias ya que los intervalos de confianza son amplios, de tal manera seria conveniente hacer un estudio longitudinal prospectivo, en donde se deben estudiar más casos tanto del grupo 2 como del grupo 3 para tener un intervalo de confianza que valide el estudio.

Cuando se les realizó el seguimiento a los casos del grupo 2 se observa que la respuesta de anticuerpos no es homogénea, depende de cada individuo su respuesta así como su recuperación probable, medida en relación a la baja respuesta a anticuerpos anti *Brucella* en densidad óptica D.O. tal como se muestra en las gráficas para cada paciente (representadas en las figuras 13 a 26) .

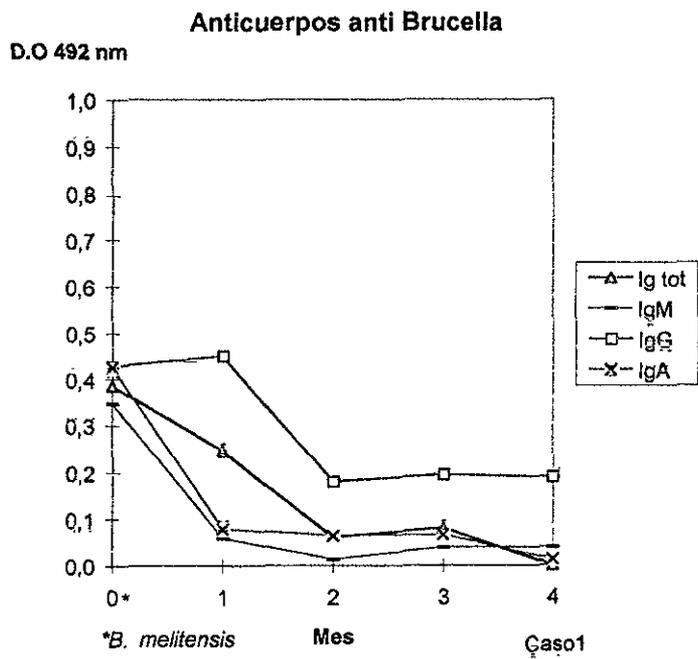


Figura 13: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 1.

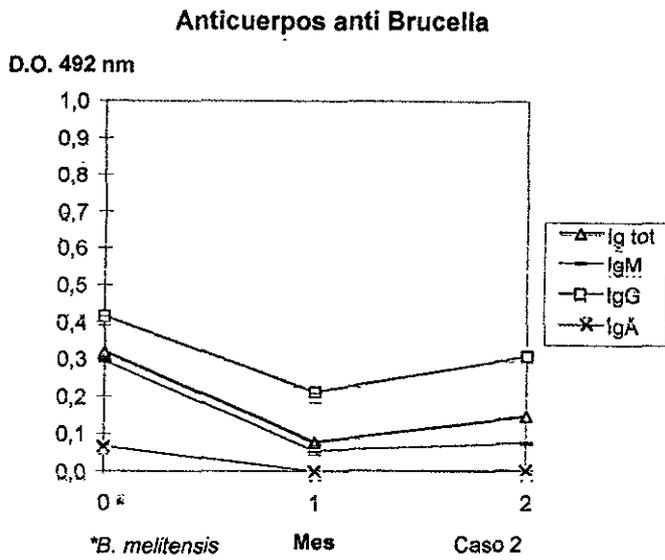


Figura 14: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 2.

FALTA PAGINA

No. 61

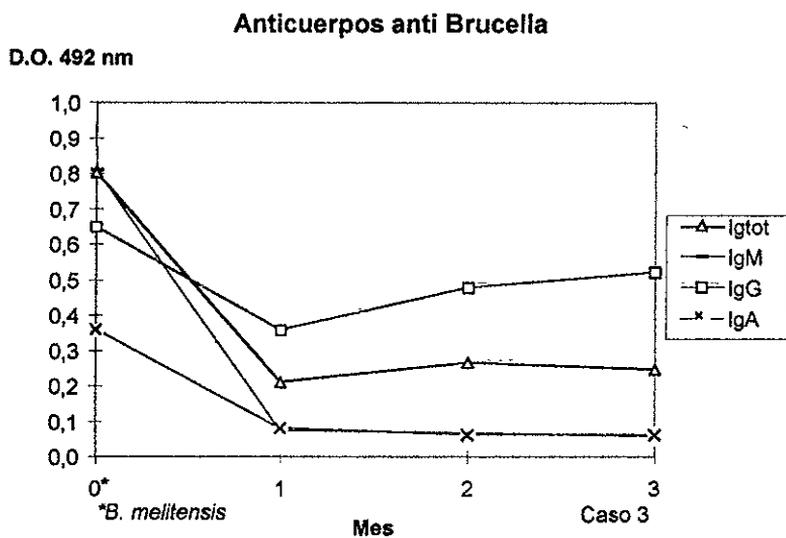


Figura 15: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 3.

D.O. 492 nm

Anticuerpos anti *Brucella*

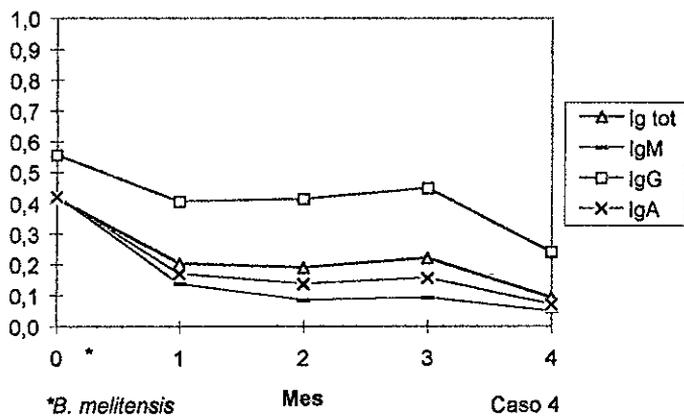


Figura 16: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 4.

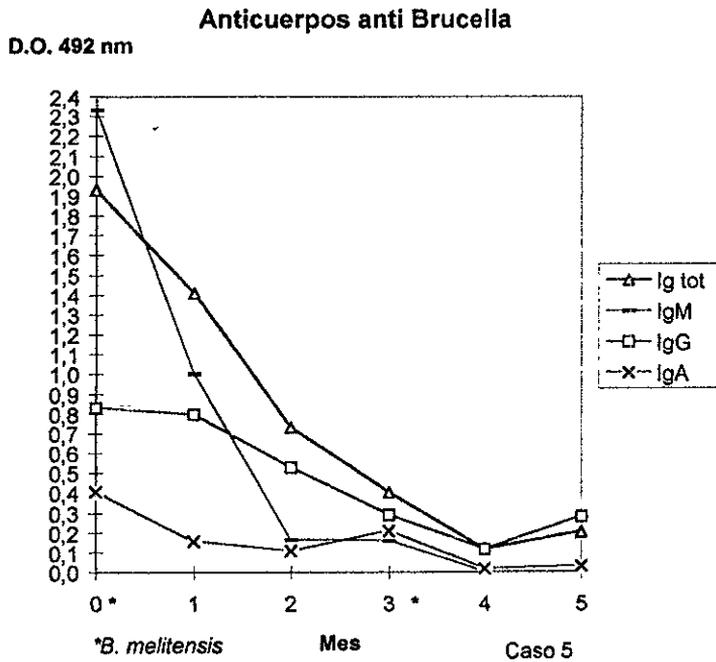


Figura 17: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 5.

D.O.492 nm

Anticuerpos anti Brucella

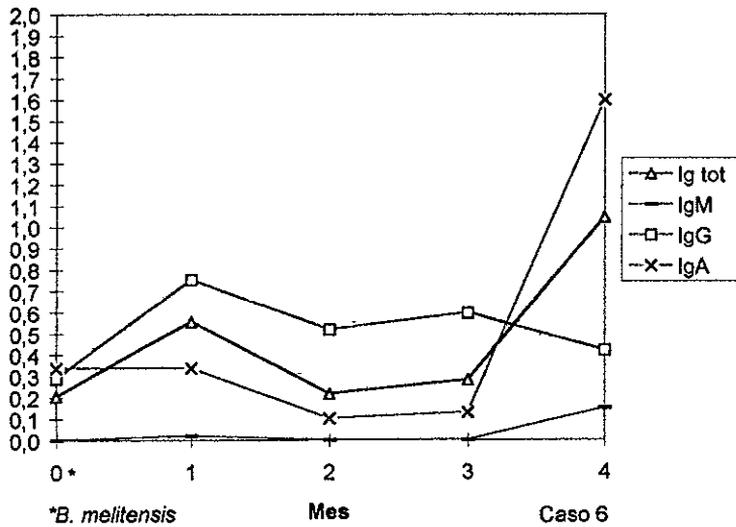


Figura 18: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 6.

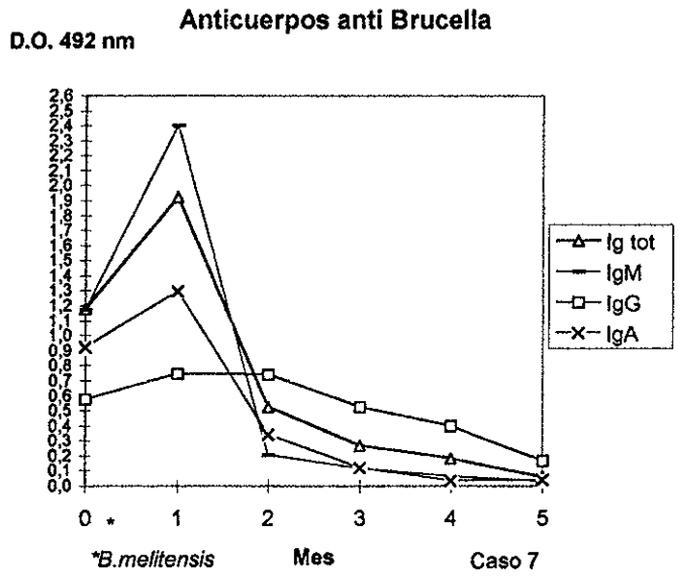


Figura 19: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 7.

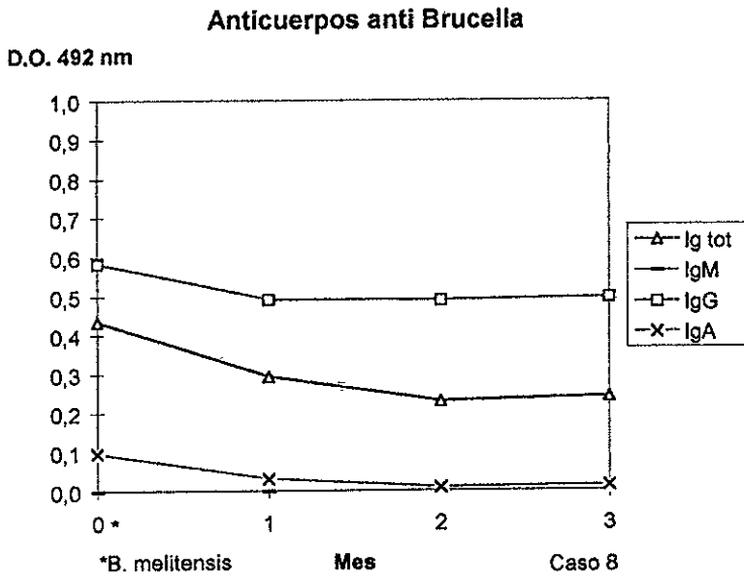


Figura 20: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 8.

D.O. 492 nm

Anticuerpos anti Brucella

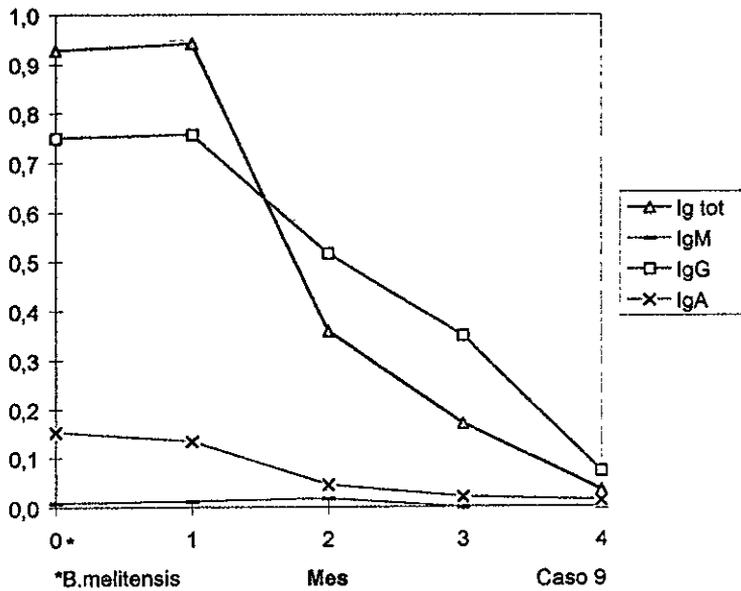


Figura 21: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 9.

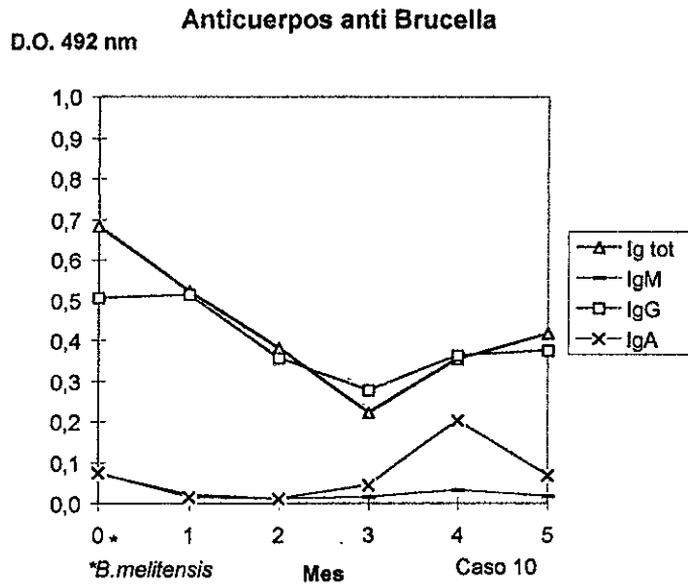


Figura 22: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 10.

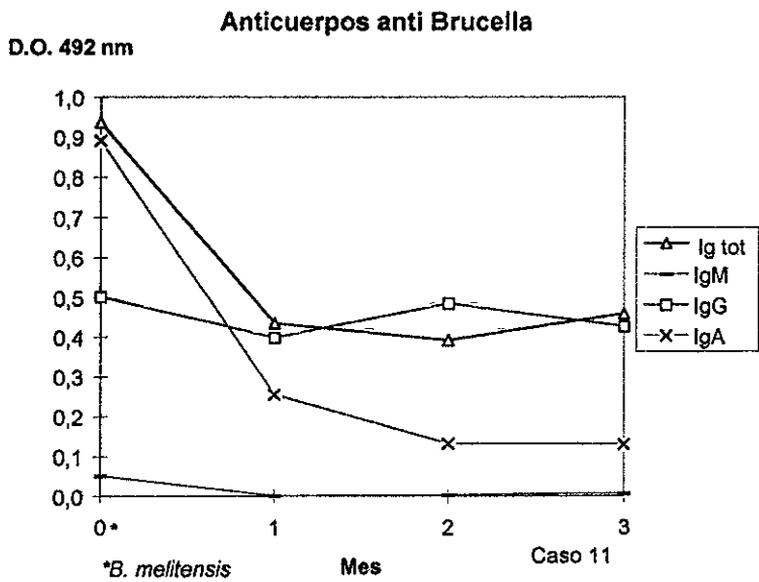


Figura 23: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 11.

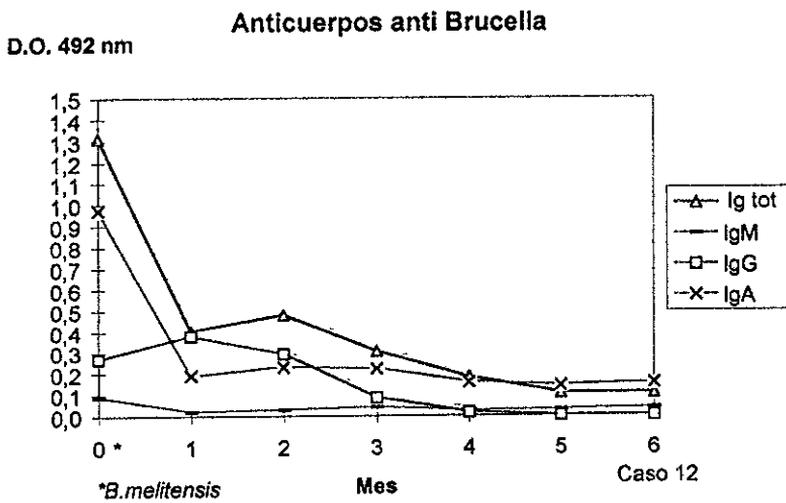


Figura 24: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 12.

Anticuerpos anti Brucella

D.O. 492

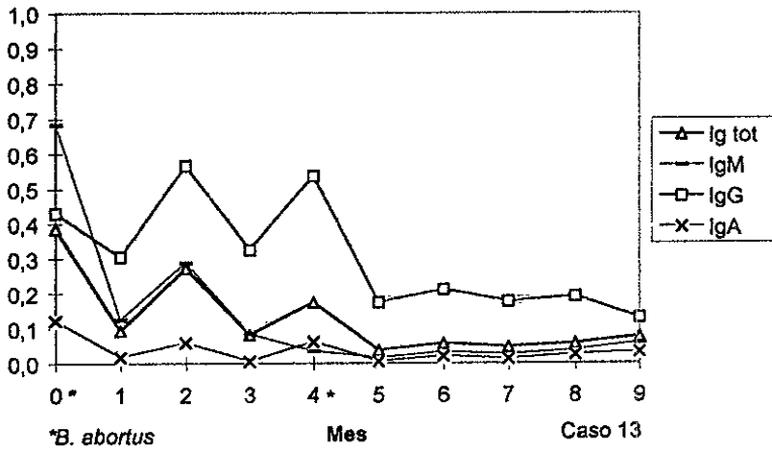


Figura 25 : Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 13.

D.O. 492 nm

Anticuerpos anti Brucella

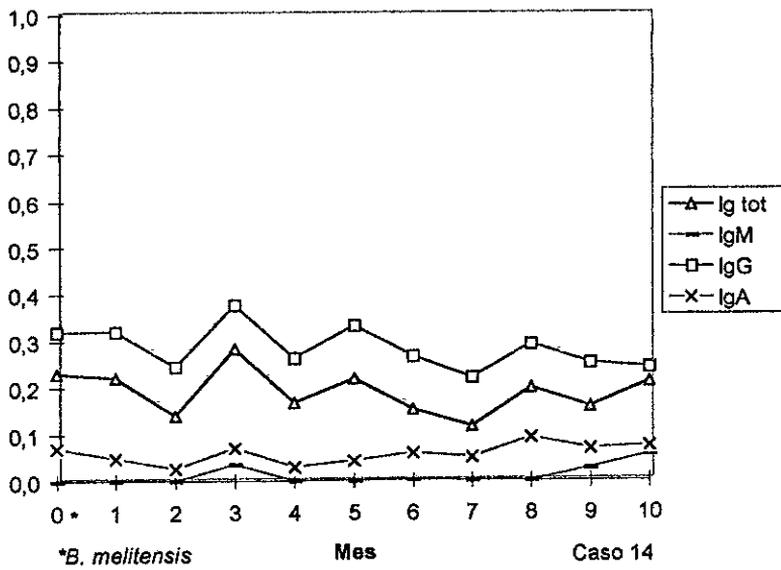


Figura 26: Cinética de anticuerpos anti *Brucella* presentes en el suero del caso 14.

Como se observa en las figuras anteriores la respuesta de anticuerpos anti *Brucella* es muy heterogénea cada individuo responde diferente, mientras que en el caso 9 la respuesta baja en el tiempo, en el caso 14 la respuesta se mantiene alta presentando IgG aún después de 10 meses, es poco probable que el incremento en los títulos de anticuerpos propicie la posibilidad de aislamiento de *Brucella* e incluso los anticuerpos se elevan en un momento posterior como en el caso 6. En general la IgG se mantiene en el tiempo mientras que la IgM tiende a bajar y la IgA puede bajar y presentar incrementos posteriores como en el caso 6.

XI - DISCUSION .

Como el aislamiento del agente causal (*Brucella*) no siempre es posible, el inmunodiagnóstico de la brucelosis humana se basa principalmente en las pruebas estándares que son métodos serológicos indirectos como aglutinación con rosa de bengala (RB), con antígeno blanco (AMPA) y en presencia de 2-mercaptoetanol (2-ME), recomendadas por la Norma Oficial Mexicana NOM - 022 (12), las cuales son de baja sensibilidad.

- Para validar los resultados en este estudio retrospectivo sería conveniente hacer un estudio longitudinal prospectivo donde la población estudiada de casos y controles diera un intervalo de confianza más aceptable.

- Este estudio también sugiere la posibilidad de establecer una ELISA indirecta para *saliva como muestra biológica con el fin de detectar IgA anti Brucella por sus valores de sensibilidad y especificidad.*

- El ELISA para Ig totales promete ser de utilidad en población abierta de área endémica en Bancos de Sangre y Centros de Referencia con el fin de reforzar el diagnóstico serológico de rutina.

XII - CONCLUSIONES:

En este estudio se establece un ELISA indirecta para el diagnostico de brucelosis humana para detectar anticuerpos, Ig totales así como IgM, IgG e IgA.

- El ELISA resulta ser altamente sensible y específico para el diagnostico de brucelosis humana para Ig totales, IgG e IgA pero no para IgM.
- La concordancia de ELISA es mayor cuando se compara Ig totales con respecto a la aglutinación estándar y la IgG con respecto a la prueba de 2-ME.
- Todos los valores de concordancia Kappa son significativos con una $P < 0.05$.

XIII - ANEXO.

I. MATERIAL Y EQUIPO :

Agitador magnético.

Balanza analítica.

Balanza granataria.

Botellas para agar.

Botellas Roux.

Cajas petri

Centrifuga Clínica.

Congelador -20 °C.

Cubreobjetos

Charolas de plástico para micropipeta

Espectófotometro.

Gradilla para 60 tubos.

Gradilla para tubos eppendorf.

Guantes de Cirujano.

Incubadora a 37°C.

incubadora con agitación a 37°C.

Lector de ELISA.

Matraz Erlenmeyer de 2 L.

Matraz aforado de 2L.

Matraz aforado de 50 mL.

Micropipeta con tango de 1 a 10 μ L.

Micropipeta de 1 mL.

Micropipeta de 100 μ L.

Micropipeta multicanal de 200 μ L.

Micropipeta multicanal de 50 μ L..

Microscopio.

Placas de ELISA Corning 96 pozos.

Portaobjetos

Probeta de 50 mL..

Puntas para micropipeta 1 mL.

Puntas para micropipeta 200 μ L.

Refrigerador.

Sonicador.

Tubos de 12 x 75 mm.

Tubos eppendorf de 1.5 mL.

Tubos eppendorf de 200 μ L.

Ultracentrifuga.

Vaso de precipitado de 100 mL.

Vaso de precipitado de 2 L.

II. MATERIAL BIOLÓGICO:

Cepa de *Brucella abortus* 99s donada del cepario del laboratorio de brucelosis.

Sueros de pacientes aparentemente sanos donadores del Banco Central de Sangre del Centro Médico "La Raza", IMSS.

Sueros de Pacientes con Brucelosis confirmada por cultivo de *Brucella*.

Sueros de Pacientes con Cólera confirmada por cultivo de *Vibrio cholerae*.

Conjugado anti-IgG humana en cabra acoplada a peroxidasa. Marca PIERCE .

Conjugado anti-IgM humana en cabra acoplada a peroxidasa. Marca SIGMA.

Conjugado anti-Ig's totales humanas en cabra acoplada a peroxidasa Marca CAPPEL.

Conjugado anti-IgA humanas en cabra acoplada a peroxidasa. Marca SIGMA.

Ortofenilendiamina Marca SIGMA.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

III. CUANTIFICACION DE PROTEINAS METODO DE LOWRY.

Con la finalidad de cuantificar las proteínas presentes en el antígeno soluble de *B. abortus* se realizó la medición por la técnica de Lowry 1951(33).

Se prepararon las siguientes soluciones:

En siete tubos se colocaron 1 mL de agua destilada . Se les retiró 5,10,20,40,80,100 y 200 μ L de volumen que corresponden a la albúmina agregada para construir una curva estándar de referencia.

Se agitan los tubos en el vortex y en seguida se agregan 3 mL de la solución A (vea soluciones) y se dejan reposar 10 minutos.

Luego se agregan 0.3 mL. de solución B y se deja reposar 1 hora.

Al antígeno soluble de *B. abortus* cepa 99s se le realizaron dos diluciones 1 : 100 y 1 : 50.

Las muestras se midieron en el espectrofotómetro a 500 nm en luz visible, al intrapolarse las muestras la concentración obtenida fue de 1.7 mg/mL.

IV. SOLUCIONES.

I. Acriflavina

Acriflavina	0.1g
H ₂ O	100 mL

II. Albumina serica bovina al 1%.

ASB	10 mg
H ₂ O	10 mL

III. Amortiguador de boratos pH 8.4.

NaCl	4.38 g
Na ₂ BO ₃ *10 H ₂ O	9.53 g
H ₃ BO ₃	6.18 g
H ₂ O	1000 mL

IV. Amortiguador de fosfatos (PBS 0.1 M pH 7.4 + 0.05 % tween 20).

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O	2.9 g
KCl	0.2 g
H ₂ O	1,000 mL

V. Caldo Brucella

Caldo Brucella	28g
Dextrosa	20g
Extracto de levadura	3g
Glicerol	10mL
H ₂ O	1000 mL

VI. Leche svelty al 2%

Leche svelty	2g
PBS Tween 20	100mL

VI. Medio Agar soya tripticaseina.

Agar TSA	43g
Dextrosa	20g
Extracto de levadura	3g
Glicerol	10 mL
H ₂ O	1000 mL

VII Solución Salina

NaCl	8.5 g
H ₂ O	1,000 mL

XIV.- BIBLIOGRAFÍA:

- Acha N.P. Szyfres B. ZONOSIS Y ENFERMEDADES TRANSMISIBLES COMUNES AL HOMBRE Y A LOS ANIMALES. O.P.S. Obra Científica 134 U.S.A. : 6 - 24.

- Araj F. G. Lulu A. R. Saadah M. A. 1986 Rapid Diagnosis of central nervius system brucellosis by ELISA. *J. Neuroimmunol.* 12 :173 - 182

- Araj. F.G. 1986 Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. *J.Hyg.,Camb.* 97 : 457-469.

- Araj F.G. 1988 ELISA *versus* routine tests in the diagnosis of patients with systemic and neurobrucellosis. *APMIS* 96 : 171- 176.

- Araj F.G. 1988 Profiles of Brucella-specific immunoglobulin G subclasses in sera of patients with acute and chronic brucellosis. *Clin. Infec. Dis.* 2 : 401 - 410.

- Ariza J. Pellicer T. 1992 Specific Antibody profile in Human Brucellosis. *Clin. Infec. Dis* : 413 - 40.

- Berman T.D. Wilson L. B. Moreno E. 1980 Characterization of *Brucella abortus* soluble antigen employed in immunoassay. *J.Clin. Microbiol.* 11,4 : 355-362.

- Bernard D.D., Dulbecco R. TRATADO DE MICROBIOLOGIA Salvat 1983
México : 838 - 843.

- Buchanan M. T. y Faber C. L. 1980 2-Mercaptoethanol *Brucella* agglutination tests: Usefulness for predicting recovery from Brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 11,6 : 691 - 693.

- Cloeckaert A. Wergifosse P. Dubray G. Limet J. 1990 Identification of seven surface-exposed *Brucella* Outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: Immunogold labeling for electron microscopy and Enzyme- Linked Immunossorbent Assay. *Infec. Immunity.* 58,12 : 3980 - 3987.

- Cloeckaert. A. Zygmunt. S. M. Dubray. G. 1993 Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115. *J. Gen. Microbiol.* 139 :1551- 1556.

- Cowan S.T. Steel K.J. MANUAL PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA MEDICA. CECSA 1985 México : 128-130.

- Cuauhtécatl H.A. y López M.A. 1989 Adaptación del método de aglutinación a microplaca para el diagnostico de brucelosis. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 31 :181- 185.

- Delgado S. Fernández M. Carmenes P. 1995 Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of sheep infected and vaccinated with *Brucella melitensis*. **J. Vet. Diagn. Invest.** 7 : 206 - 209.

- Díaz A. E. Marin C. Alonso U. B. 1994 Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of Goats. **J. Clin. Microbiol.** 32,5 : 1159 - 1165.

- Escobar G. A. ATLAS DE BACTERIOLOGIA. Galo 1987 México D.F : 124.

- Ficapal A. Alonso-Urmeneta B. Velasco J. Moriyón I. Blasco M.J. 1995 Diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as conjugate. **Vet. Record.** 137 : 145 - 147.

- Gazapo E. González J. y cols. 1989 Changes in IgM and IgG Antibody Concentrations in Brucellosis Over Time: Importance for Diagnosis and Follow - up. **J Infec Dis.** Vol.159 N.2 : 219 -225.

- González S. N. Torales T. A. González B. D. INFECTOLOGIA CLINICA PEDIATRICA. Trillas 1987 México : 608 - 625.

- Gómez -Miguel, M.J. Moriyón I. 1986 Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of *Brucella* spp. *Infec. and Immunity*, 53,3 : 678-684.

- Gotuzzo E. Carrillo C. Guerra J. Llosa L. 1986 An Evaluation of Diagnostic Methods for Brucellosis - The value of Bone marrow culture. *J. Infec. Dis.* 153,1 : 122 - 125.

- Hernández M. I. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO INDRE / SAGAR BRUCELOSIS 19. INDRE SSA. 1996 : 57.

- Higuera F. BRUCELOSIS. *Infectología*, 1981 México :163-168

- Kittelberger R. Hilbink F. Hansen F.M. 1995 Identification and characterization of immunodominant antigens during the course of infection with *Brucella ovis*. *J. Vet. Diagn Invest.* 7 : 210 - 218.

- Krambovitis Elias, Tselentis J y Tsoukatos D. 1992 A Simple enzyme immunoassay for detecting brucellosis antibodies. *FEMS Microbiology Immunology* 89 : 129 - 136.

- Kumate J. Gutiérrez G. MANUAL DE INFECTOLOGIA. M.C. 1987 México : 78-86

- López Merino Ahide BRUCELOSIS AVANCES Y PERSPECTIVAS. Publicación Técnica del I.N.D.R.E. 6.SSA. 1991 México :54.

- López M. A., Migranas O R. 1992 Seroepidemiología de la Brucelosis en México. **Salud Publica de México.** : 230 - 240.

- Lowry H. O. Rosebrough J. N. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193 :265 - 275.

- Macdonald A. y Elmslie H. W. 1967 Serological Investigations in suspected brucellosis. 18 :380 - 382.

- Matyas Z. Fujikura T. 1987 Brucellosis as a world problem. **Develop,biol. Standard.** 56 : 3 - 20.

- Metz C.E. 1978 Basic principles of ROC analysis. **Semin Nucl Med.** 8 : 283 - 298.

- Meyer E. M y Cameron S. H. 1958 Species metabolic patterns within the genus *Brucella*. **Am. J. Vet. Res.** :754 - 748.

- Moreno Edgardo ,Berman T. David, Boettcher A. Louise 1981 Biological Activities of *Brucella abortus* Lipopolysaccharides. **Infection and Immunity** : 362 - 370.

- Mousa M. R. Abdul, Elhag m. Kamal, Khogali Mustafa , Marafie A. Amin 1988 The Nature of Human Brucellosis in Kuwait: Study of 379 cases. *Rev. Infec. Dis.* 10 ,1 : 211 - 217.

- Murray R. Patrick *MICROBIOLOGIA MEDICA* Mosby Year Book 1993 España. : 155 - 157.

- Navarro Fierro Ricardo *INTRODUCCION A LA BIOESTADISTICA: Análisis de variables binarias.* Mc GRAW-HILL 1988 México : 59 - 72.

- Nelson P. M. García M. Elvins. Nan E. Pigott 1987 Comparison of serologic screening tests for brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 25,10 : 1969 - 1972.

- Norma Oficial Mexicana **NOM-022-SSA2-1994**, Para la prevención y control de la brucelosis en el hombre, en el primer nivel de atención. *Diario Oficial de la Federación*, 30 de noviembre 1995 : 1-12.

- Romero C. Pardo M. Grillo M.J. Díaz R. Blasco M.J. López-Gofii I. 1995 Evaluation of PCR and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 35,12 : 3198 - 3200.

- Ruíz C.M. *BRUCELOSIS.* Prensa Médica Mexicana. 1954 México : 302.

- Saravi M.A. Wright P. F. Gregoret R.J. Gall E.J. 1995 Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Conventional assay in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. **Vet. Immun. and Immunopathology.** 47 : 93 - 99.

- Shields J.G. Turner M.W. 1986 The importance of antibody quality in sandwich ELISA systems. **J. Immunol. Methods.** 87 : 29 - 33.

- Sippel E. J. El-Masry A. N. Farid Z. 1982 Diagnosis of human brucellosis with ELISA. **The Lancet** 3 :19 - 21.

- Staszkievicz J. Lewis C.M. 1991 Outbreak of *Brucella melitensis* among microbiology laboratory workers in a community hospital. **J. Clin. Microbiol.** 29,2 : 287 - 290.

- Uzal A.F. Carrasco E.A. Echaide S. 1995 Evaluación of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis. **J.Vet. Diagn. Invest.** 7 : 473 - 475

- Verstreate, D.R., Creasy, M.T Caveney, N.T. Baldwin, C.L . Blab M.W. and Winter A .J.1982 Outer Membrane Proteins of *Brucella abortus*: Isolation and Characterization. **Infection and Immunity** : 979 - 989.

- Wallach C.J. Miguel E. S. Baldi C.P. 1994 Urban outbreak of a *Brucella melitensis* an Argentine family: Clinical and diagnostic aspects. **FEMS Immun. and Med. Microbiol.** 8 : 49 - 56.

- Young J. E. 1983 Human brucellosis. **Rev. Infec. Dis.** 5, 5 : 821 - 842.

- Young J. E. 1991 Serologic Diagnosis of Human Brucellosis: Analysis of 214 cases by Agglutination Tests and Review of the Literature. **Rev. Infec. Dis.** 15 : 359 - 371.