

COMPARACION DE LOS TITULOS OBTENIDOS PARA AGLUTININAS FEBRILES EN "LAMINA, TUBO Y MICROTITULACION"

Lic. Iris Sánchez de Leal*
Dra. Alis Amesty de Valbuena*
Lourdes Adrianza de Jurado**
Margarita Cruz Alvarado**
Liana Fernández Guillén**

RESUMEN

Se hizo la determinación de aglutininas febriles en 30 muestras de suero empleando los métodos de: lámina y tubo. Al mismo tiempo se utilizó una técnica de microtitulación, con la finalidad de comparar los resultados con los métodos anteriores. Encontramos una buena correlación con los tres métodos y concluimos que la microtitulación puede ser empleada como prueba rutinaria, en sustitución de los métodos de lámina y tubo, por necesitar menor cantidad de suero, reactivos y por ser de fácil realización.

INTRODUCCION

El mejor método para establecer la etiología de una enfermedad infecciosa es aquel que combina el aislamiento y la identificación bacteriológica del agente

* Profesora de la Cátedra de Microbiología - Facultad de Medicina - Universidad del Zulia - Maracaibo - Venezuela.

** Estudiante de la Escuela de Bioanálisis - Facultad de Medicina - Universidad del Zulia - Maracaibo - Venezuela.

causal, sin embargo, hay casos donde éste es difícil, sobre todo en aquellos pacientes que han sido observados tardíamente y/o en aquellos que han recibido previamente tratamiento y éste haya suprimido parcialmente el organismo invasor (1); en éstos casos es posible detectar la presencia de anticuerpos en el suero, utilizando pruebas serológicas, las cuales representan un método indirecto de diagnóstico.

Dentro de las pruebas serológicas, la aglutinación tiene un valor definido en el diagnóstico de muchas enfermedades como en las llamadas fiebres entéricas: tifoidea, paratifoidea, brucelosis y tífus (2).

La reacción de Widal (3), se utiliza para el diagnóstico de las fiebres tifoidea y paratifoidea; la de Weil-Félix es utilizada en casos de enfermedades producidas por Rickettsias como: tífus epidémico, tífus endémico o murino, fiebre moteada de las montañas rocosas, tífus Scrub (Tsutsugamusi); sin embargo, ésta reacción utiliza antígenos obtenidos de cepas de *Proteus*, por lo que no es específica, pero si es altamente útil en el diagnóstico serológico de las rickettsiosis (4).

La reacción de Bang, es utilizada para el diagnóstico de la brucelosis humana y utiliza como antígeno *Brucella abortus* (5).

Todas éstas reacciones mencionadas, se realizan tanto en lámina como en tubo; la primera es utilizada como prueba de descarte en grandes poblaciones, y es especialmente útil cuando debe hacerse gran cantidad de exámenes la segunda sirve para confirmar un resultado positivo en la prueba en lámina y además sirve para descartar reacciones de aglutinación erróneas o equívocas que puedan haber sido obtenidas con la primera; por otro lado, nos ayuda a determinar con exactitud la variación que ocurre en los títulos de anticuerpos séricos durante los diferentes estadios de la enfermedad.

Al igual que con otras pruebas serológicas se ha intentado hacer la adaptación del macrométodo al micrométodo, como ha sido realizado por Gualtney y col. (6).

La microtécnica para determinar aglutininas febriles tiene el mismo fundamento de las reacciones de aglutinación, pero a diferencia de los métodos anteriores (lámina-tubo) se utilizan cantidades menores de reactivos y es menos laboriosa.

El objetivo del presente estudio fue el de estandarizar la microtécnica para aglutininas febriles y luego comparar los títulos obtenidos por los métodos de lámina-tubo con la microtécnica, y observar la correlación de los resultados obtenidos.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 30 sueros obtenidos de trabajadores del Frigorífico Industrial Bolívar y de pacientes del Hospital Universitario de Maracaibo; en los cuales se investigó la presencia de aglutininas febriles mediante las técnicas de aglutinación en lámina, tubo (macrotécnica) y la microtécnica.

REACTIVOS UTILIZADOS

Los antígenos utilizados para las tres pruebas antes mencionadas fueron obtenidos de los Laboratorios Lee (Lee Laboratories, Inc. Georgia, U.S.A.).

ANTIGENOS

Los antígenos utilizados fueron los siguientes: *Brucella abortus*; *Proteus* (OXK, OX2; OX19); *Salmonella* Grupo A (somático y flagelar); *Salmonella* Grupo B (somático y flagelar); *Salmonella* Grupo C (somático y flagelar); *Salmonella* Grupo D (somático y flagelar); *Salmonella* Grupo E (somático).

DILUENTES

I) Está constituido por una mezcla de 78 ml. de NaCl 0,15M-NaH₂PO₄ 0,2M; más 22 ml. de NaCl 0,15M-Na₂HPO₄ 0,2M. El pH final de la solución debe ser de 6.2. A ésta solución de trabajo se le adiciona Safranina al 0.2%, en una proporción de 1 ml. para cada 500 ml. del diluyente, a fin de aumentar la visibilidad de la sedimentación del antígeno.

II) Como diluyente del antígeno se utilizó solución salina fisiológica al 0.95%.

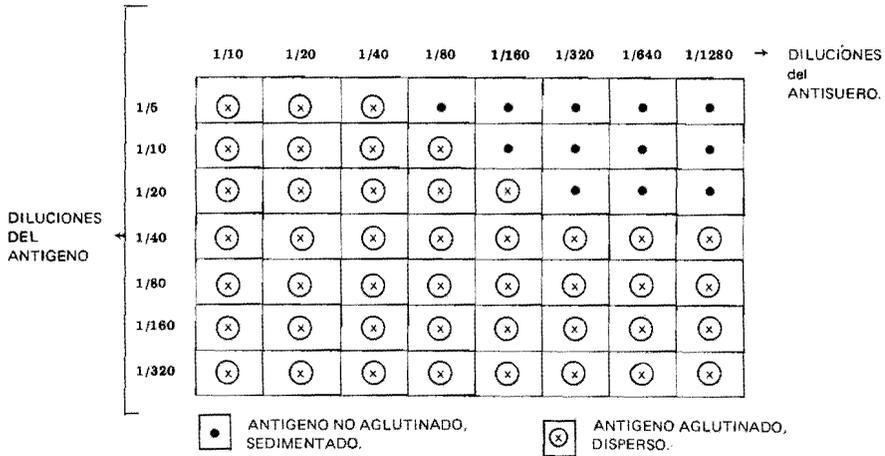
TECNICAS UTILIZADAS

Las técnicas de aglutinación en lámina y en tubo se realizaron según las normas ya establecidas (7). La microtécnica se realizó siguiendo las recomendaciones sugeridas por Gaultnez y cols. (6), según el siguiente protocolo: antes de la titulación de los sueros según ésta última técnica, se determinó la dilución óptima para cada antígeno contra cada suero control, la cual se realizó en placas de microtitulación con fondo en V (titulación en bloque, ver diagrama No. 1). Para esto se prepararon diluciones seriadas al doble del antígeno desde dilución 1:5 hasta 1:320. De cada dilución del antígeno se agregó 0.05 ml. en los hoyos de la placa de microtitulación que contenía las diluciones apropiadas del antisuero.

Las placas fueron cerradas con cubiertas plástica, se incubaron durante 18-24 horas en estufa a 37°C y luego a 4°C por 2 a 4 horas.

La óptima dilución del antígeno fue determinada buscando la más alta dilución del antígeno con la más alta dilución del antisuero que no mostrara aglutina-

DIAGRAMA No. 1 TITULACION EN BLOQUE



CUADRO No.1

PROTOCOLO DE LA TECNICA DE MICROTITULACION PARA DETERMINAR AGLUTININAS FEBRILES

Hoyito No.	Diluyente (MI)	Suero diluido al 1:5 (MI)	Dosis óptima del antígeno	Dilución final del suero
1		0.05	0.05	1/10
2	0.05	0.05	0.05	1/20
3	0.05	0.05	0.05	1/40
4	0.05	0.05	0.05	1/80
5	0.05	0.05	0.05	1/160
6	0.05	0.05	0.05	1/320
7	0.05	0.05	0.05	1/540
8	0.05	0.05	0.05	1/1280

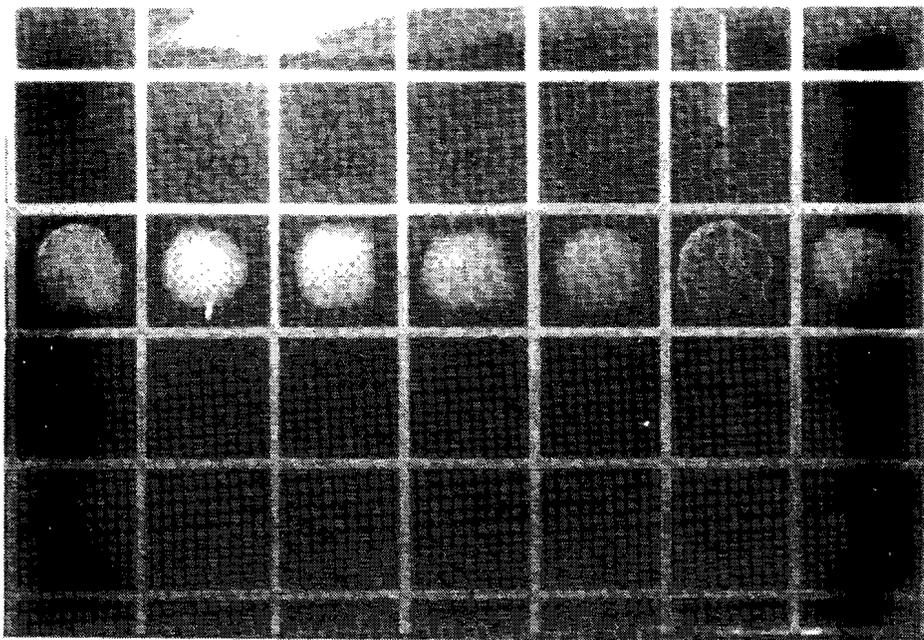
ción, por tanto, el punto final se designa como una reacción negativa, debido a que el antígeno no aglutinado es más fácil de definir como un botón que cuando está disperso o pobremente aglutinado.

Los sueros fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos y luego fueron titulados en placas de microtitulación en V, haciendo diluciones seriadas al doble del mismo, comenzando con una dilución 1:5; posteriormente se le agrega 0.05 ml. de la dilución óptima del antígeno a cada una de las diluciones, obteniéndose las diluciones finales desde 1:10 hasta 1:1280 (de acuerdo al protocolo que se muestra en el Cuadro No. 1).

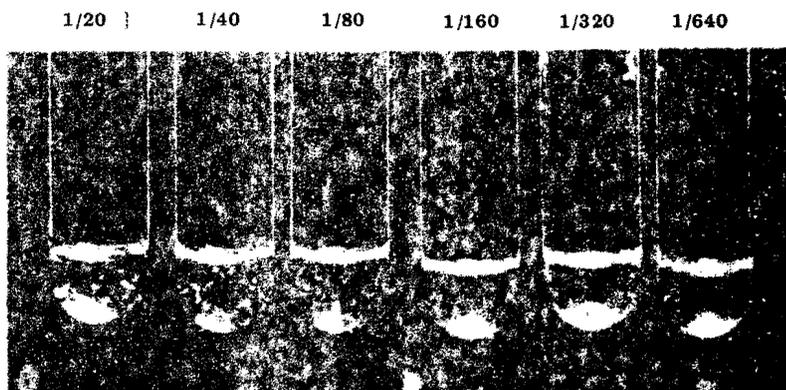
Las placas fueron selladas con cubierta plástica e incubadas en estufa a 37°C toda la noche, y luego a 4°C durante 2 horas antes de ser leídas, tomándose como título el recíproco de la mayor dilución del suero que mostrara el antígeno aglutinado (observándose éste disperso).

En cada prueba se incluyeron testigos positivos y negativos.

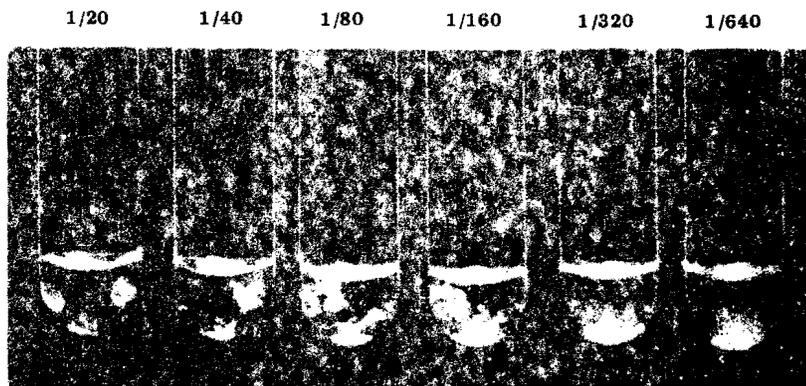
En las fotografías No. 1, 2 y 3, se observan las pruebas en lámina, tubo y microtitulación respectivamente utilizadas en el presente estudio.



Fotografía No. 1. Se observa claramente la aglutinación en lámina del suero problema hasta la dilución 1:20. El control positivo muestra aglutinación franca. El control negativo no muestra aglutinación.



AGLUTINACION SOMATICA "O"

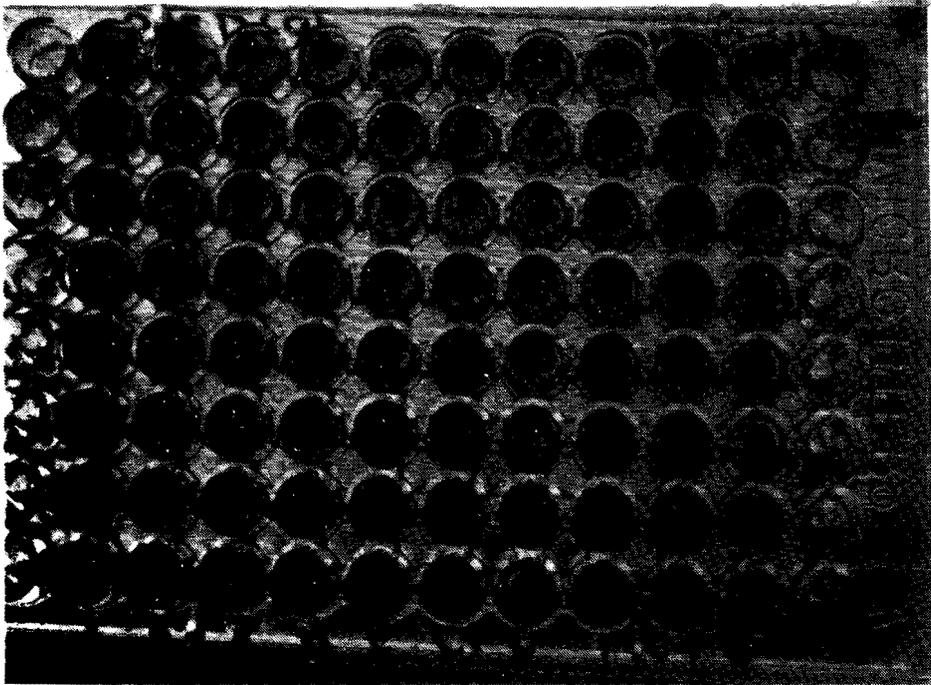


AGLUTINACION FLAGELAR "H"

Fotografía No. 2: Se observa aglutinación franca en tubo hasta la dilución 1:80 para antígeno somático y aglutinación hasta la dilución 1:160 para antígeno flagelar.

RESULTADOS

De las 30 muestras de suero analizadas, 3 fueron positivas para Salmonella Grupo A; 2 para Salmonella Grupo B; 6 para Salmonella Grupo C; 12 para Salmonella Grupo D, 4 para Brucella abortus y 3 para Proteus OX19; lo cual se muestra en el Cuadro No. 2.



Fotografía No. 3: En el método de microtitulación cada línea de hoyos representa un suero problema. Están incluidos también sueros controles positivos y negativos. El suero No. 2 muestra un título de 1:80 para antígeno somático de Salmonella. El control positivo muestra también un título de 1:80. El control negativo no muestra aglutinación.

En el Cuadro No. 3 se presentan los títulos de aglutininas febriles dirigidas contra antígeno flagelar de Salmonella Grupo A. No se observó ninguna variación en los títulos con las tres pruebas utilizadas.

En el Cuadro No. 4 se muestran los títulos de aglutininas dirigidas contra antígenos flagelar de Salmonella Grupo B, tampoco se observó variación alguna en los resultados.

En el Cuadro No. 5 se muestran los valores obtenidos para aglutininas dirigidas contra el antígeno somático de Salmonella Grupo C. Los títulos obtenidos fueron los mismos.

En el Cuadro No. 6 se muestran los valores obtenidos para aglutininas dirigidas contra el antígeno de Salmonella Grupo D, de las cuales 6 tenían aglutininas contra el antígeno somático (O) y 6 contra el antígeno flagelar (H).

CUADRO No. 2
DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS POSITIVAS POR
LAMINA, TUBO Y MICROTITULACION
MARACAIBO 1978 - 1979

ANTIGENOS	No. de MUESTRAS POSITIVAS
SALMONELLA GRUPO A	3
SALMONELLA GRUPO B	2
SALMONELLA GRUPO C	6
SALMONELLA GRUPO D	12
BRUCELLA ABORTUS	4
PROTEUS OX19	3
TOTAL	30

F. de I.: Frigorífico Industrial Bolívar. Distrito Bolívar, Zulia, Venezuela, 1978-1979
Hospital Universitario de Maracaibo. Maracaibo - Zulia, Venezuela, 1978-79

CUADRO No. 3
TITULOS DE AGLUTININAS FEBRILES vs. SALMONELLA GRUPO A
ANTIGENO FLAGELAR (H) EN LAMINA,
TUBO Y MICROTITULACION
MARACAIBO 1978 - 1979

	PRUEBAS SEROLOGICAS		
	LAMINA	TUBO	MICROTITULACION
1	1/160	1/160	1/160
2	1/320	1/640	1/320
3	1/320	1/320	1/320

F. de I.: Frigorífico Industrial Bolívar. Distrito Bolívar. - Zulia, Venezuela, 1978-79.
Hospital Universitario de Maracaibo. Maracaibo-Zulia, Venezuela, 1978-79

CUADRO No. 4

TITULOS DE AGLUTININAS FEBRILES Vs. SALMONELLA GRUPO B
ANTIGENO FLAGELAR (H) EN LAMINA, TUBO Y
MICROTITULACION. MARACAIBO 1978-1979

No. de Muestras	PRUEBAS SEROLÓGICAS		
	LAMINA	TUBO	MICROTITULACION
1	1/400	1/640	1/640
2	1/160	1/160	1/160

F. de l.: Frigorífico Industrial Bolívar. Distrito Bolívar-Zulia, Venezuela
1978-1979

Hospital Universitario de Maracaibo. Maracaibo-Zulia, Venezuela,
1978-1979.

CUADRO No. 5

TITULOS DE AGLUTININAS FEBRILES Vs. SALMONELLA GRUPO C
ANTIGENO SOMÁTICO (O) EN LAMINA, TUBO Y
MICROTITULACION. MARACAIBO 1978-1979

No. de MUESTRAS	PRUEBAS SEROLOGICAS		
	LAMINA	TUBO	MICROTITULACION
1	1/160	1/160	1/80
2	1/80	1/80	1/80
3	1/160	1/320	1/160
4	1/320	1/640	1/320
5	1/160	1/160	1/160
6	1/320	1/320	1/320

F. de l.: Frigorífico Industrial Bolívar. Distrito Bolívar-Zulia, Venezuela, 1978-1979.
Hospital Universitario de Maracaibo. Maracaibo-Zulia, Venezuela, 1978-1979

En el Cuadro No. 7 se muestran los títulos obtenidos contra antígenos de *Brucella abortus*, en él se puede observar que en la muestra No. 4, los títulos en lámina y tubo se corresponden, pero en microtitulación se observó un título de 1:1280; el resto de las muestras no mostraron ninguna variación de los mismos.

En el Cuadro No. 8 se presentan los títulos obtenidos para antígenos de *Proteus OX19* donde se observa una muy buena correlación de los títulos obtenidos con las tres pruebas.

CUADRO No. 6

TITULOS DE AGLUTININAS FEBRILES Vs. SALMONELLA GRUPO D
ANTIGENO SOMATICO (O) Y FLAGELAR (H) EN LAMINA, TUBO
Y MICROTITULACION. MARACAIBO 1978-1979

No. DE MUESTRAS	PRUEBAS SEROLOGICAS		
	LAMINA	TUBO	MICROTITULACION
1(H)	1/320	1/640	1/320
2(H)	1/320	1/640	1/320
3(H)	1/160	1/320	1/320
4(H)	1/160	1/320	1/160
5(H)	1/160	1/80	1/160
6 (H)	1/160	1/160	1/320
7(O)	1/80	1/80	1/160
8(O)	1/160	1/160	1/160
9(O)	1/80	1/160	1/160
10(O)	1/160	1/320	1/320
11(O)	1/160	1/160	1/160
12(O)	1/320	1/640	1/640

F. de I.: Frigorífico-Industrial Bolívar. Distrito Bolívar-Zulia, Venezuela 1978-1979.
Hospital Universitario de Maracaibo. Maracaibo-Zulia, Venezuela, 1978-1979

CUADRO No. 7

TITULOS DE AGLUTININAS FEBRILES Vs. BRUCELLA ABORTUS
EN LAMINA, TUBO Y MICROTITULACION
MARACAIBO 1978-1979

No. DE MUESTRAS	PRUEBAS SEROLOGICAS		
	LAMINA	TUBO	MICROTITULACION
1	1/80	1/40	1/40
2	1/80	1/80	1/160
3	1/80	1/80	1/80
4	1/3200	1/2560	1/1280

F. de I.: Frigorífico Industrial Bolívar. Distrito Bolívar-Zulia, Venezuela 1978-1979.
Hospital Universitario de Maracaibo. Maracaibo-Zulia, Venezuela, 1978-79.

CUADRO No. 8

TITULOS DE AGLUTININAS FEBRILES Vs. PROTEUS OX19
EN LAMINA, TUBO y MICROTITULACION
MARACAIBO 1978-1979

No. DE MUESTRAS	PRUEBAS SEROLOGICAS		
	LAMINA	TUBO	MICROTITULACION
1	1/160	1/320	1/160
2	1/160	1/80	1/80
3	1/80	1/80	1/80

F. de I.: Frigorífico Industrial Bolívar. Distrito Bolívar-Zulia, Venezuela, 1978-1979.
Hospital Universitario de Maracaibo. Maracaibo-Zulia, Venezuela, 1978-79.

DISCUSION

La determinación de aglutininas febriles continúa siendo el método serológico de diagnóstico empleado en aquellos casos donde se sospecha de una infección causada por Salmonella, Brucellas o Rickettsias.

Esta determinación rutinariamente se realiza en lámina, como prueba de descarte y en tubos con la finalidad de determinar con exactitud el título de aglutininas (7). A pesar de que algunos investigadores (8, 9), no han encontrado una buena correlación de los resultados obtenidos con estas dos pruebas, nosotros siempre hemos obtenido una buena correlación entre ambas. Sin embargo, a pesar de esto quisimos utilizar una tercera prueba a fin de consumir no sólo menor cantidad de reactivos, sino también poder hacer un reporte más rápido de la misma (24 horas); de allí que en nuestro estudio utilizamos también una microtécnica a fin de comparar las tres pruebas y ver si los resultados obtenidos con ellos eran similares y reproducibles.

De los resultados obtenidos en nuestro estudio comparativo pudimos concluir que la microtécnica utilizada da resultados que se correlacionan bien con los obtenidos con las otras dos pruebas y además éstos resultados son reproducibles, por lo que nos permitimos recomendarla como prueba de rutina, obviándose de esa forma el uso de la determinación en lámina y en tubo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.— Serología Clínica por: BENNETT, C. W. Editorial Panamericana. Buenos Aires, pág. 130 - 131, 1977.
- 2.— Diagnóstico Clínico por el Laboratorio por Todd-San Ford. Salvat Editores S. A. pág. 1098-1102.
- 3.—HAMINTON, T. R., and HALMINTON, B. W., by MILLER, SE. Diagnosis of bacterial infections cultural and Immunological aspects. A textbook of Clinical Pathology. Baltimore, Wilkins, p: 477-481.
- 4.— FISET, P. A., ORMSBEE, R., SILBERMAN, M. PEACOCK, R. and SPIEMAN, S. A.. A microagglutination technique for detection and measurement of Rickettsial antibodies. *Acta Virol.* 13: 60-66.
- 5.— CERNYSERVA, M. I., KNJAZEVA, E. N. and EGOROVA, L. S.: Study of the plate agglutination test with rose bengal antigen for diagnosis of human brucellosis. *Bulletin of the World Health Organization.* 55(6): 669-674, 1977.
- 6.— GAULTNEY, J. B., WENDE, R. D. and WILLIAMS, R. D.: Microagglutination procedures for febrile agglutination test. *Applied Microbiology.* p: 635-640, Oct. 1971.
- 7.— HUDDLESON F. and ABELL, E.: Rapid macroscopic agglutination for serum diagnosis of bangs abortion disease. *J. Infec. Dis.* 42: 242-247, 1962
- 8.—HALL, W. H. and MANION, R. E.: Comparison on the coombs test with other methods for Brucella agglutinins in human serum. *J. Clin. Invest.* 32: 96-105, 1953.
- 9.— SPINK, W. W., and ANDERSON, D.: Correlation of a rapid slide agglutination test in screening suspected cases of human brucellosis. *J. Lab. Clin. Med.* 46: 593 - 600, 1952.