

## ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES TECNICAS SEROLOGICAS PARA LA INVESTIGACION DE AGLUTININAS FEBRILES

*Auramarina Villalobos de Roldán\**  
*Haydée Chirinos\**  
*Marina Camacaro\*\**

### AGRADECIMIENTO

Al Instituto Hematológico de Occidente, al personal de ORDO y al personal de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina.

### RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo de 3 técnicas serológicas (fijación de superficie, aglutinación en láminas y en tubos) para la investigación de aglutininas febriles con el fin de compararlas y ver si los resultados obtenidos con las mismas eran similares y reproducibles. Para esto se utilizaron muestras de suero de 100 donantes de sangre y 8 provenientes de pacientes con fiebre tifoidea y brucelosis en quienes se confirmó el diagnóstico por el aislamiento bacteriológico del agente causal.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la prueba de fijación de superficie se correlaciona bien con las otras dos pruebas y sus resultados son reproducibles, por lo que nos permitimos recomendarla, sobre todo como prueba de descarte al estudiar grandes poblaciones.

\* Profesor Asociado. Cátedra de Microbiología - Facultad de Medicina.

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

## INTRODUCCION

Existen una serie de enfermedades infecciosas como las fiebres entéricas, brucelosis, tífus, enfermedad de inclusión citomegálica, hepatitis, chagas, etc., donde el diagnóstico etiológico puede hacerse mediante el aislamiento y la identificación del agente infectante; sin embargo, existen algunos casos, donde este aislamiento es difícil, sobre todo en pacientes que han sido observados tardíamente o que han recibido previamente terapia antimicrobiana (1). Es en estos casos donde debemos recurrir a pruebas indirectas de diagnóstico, utilizando pruebas serológicas, con el fin de detectar y cuantificar la presencia de anticuerpos en el suero.

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

La reacción de Widal (3) es utilizada para el diagnóstico de las fiebres tifoideas y paratifoideas, y permite orientar al clínico durante el manejo de un enfermo con fiebre tifoidea (4).

La prueba de Weil-Félix se utiliza en casos de sospecha de enfermedades producidas por Rickettsias como: tífus murino o endémico, tífus epidémico, etc. Esta reacción no es muy específica, puesto que utiliza antígenos obtenidos de cepas de Proteus, pero es altamente útil en el diagnóstico de las rickettsiosis (5).

En el diagnóstico serológico de brucelosis se utiliza la reacción de Bang, la cual utiliza como antígeno *Brucella abortus* (6).

Todas las reacciones mencionadas, pueden ser realizadas tanto en lámina, como en tubos; la primera se utiliza como prueba de descarte en grandes poblaciones y es especialmente útil cuando hay que realizar gran cantidad de exámenes; la segunda se utiliza para confirmar un resultado positivo en la prueba en lámina y además sirve para descartar reacciones de aglutinación falsas 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.

Aparte de las pruebas serológicas en lámina o tubos, existe otro procedimiento que permite estudiar la respuesta de anticuerpos en pacientes con infección entérica y esta es la prueba de fijación de superficie de Ruiz-Castañeda (7-10), la cual ha permitido contar con un método fácil, rápido, específico y altamente sensible para el diagnóstico de las mismas.

El propósito de este trabajo es el de emplear las pruebas de aglutinación en lámina y en tubos y la prueba de fijación de superficie de Ruiz-Castañeda, en un grupo de donantes de sangre y de pacientes con infecciones entéricas, a fin de comparar los resultados obtenidos con cada una de ellas y determinar la efectividad de las mismas.

## MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 100 muestras de suero, obtenidas de donantes de sangre del Instituto Hematológico de Occidente (Maracaibo), 8 muestras de pacientes con infección causada por *Salmonella typhi* y 1 con infección causada por *Brucella abortus*; todos ellos confirmados por el aislamiento del germen causal.

En estas 109 muestras se investigó la presencia de aglutininas febriles, mediante las técnicas de aglutinación en láminas y tubos (11-14) utilizando antígenos de *Salmonella typhi* "O" y "H", *Brucella* y *Proteus* OX19, obtenidos de los Laboratorios Lee (Lee Laboratories, Inc. Georgia, USA) y la prueba de Fijación de Superficie en papel (7-10), obtenido del Laboratorio de Desarrollo Dr. M. Ruiz Castañeda, Hospital Infantil de México.

### *Prueba de aglutinación en láminas:*

Para realizar esta prueba se colocan en una lámina de vidrio dividida en cuadrados de 1 1/2 pulgadas, las siguientes cantidades de suero: 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005 ml.; luego se les agregó una gota de suspensión del antígeno correspondiente a cada una de las divisiones, se mezclan de derecha a izquierda con un aplicador, luego a las láminas se les imprimen movimientos rotatorios por no más de un minuto y se observa la aparición o no de aglutinación, siguiendo el siguiente esquema:

- a) 100% de organismos aglutinados.
- b) 75% de organismos aglutinados.
- c) 50% de organismos aglutinados.
- d) 25% de organismos aglutinados.
- e) menos del 25% de organismos aglutinados
- f) no se observó aglutinación.

Se consideró como positivas aquellas pruebas que dieron entre un 100% y un 50% de organismos aglutinados.

Las diluciones finales con la prueba en lámina van desde 1:20 hasta 1:320; sin embargo, esta prueba no es recomendada para establecer títulos, pero puede ser usada para conocer un aproximado del título del suero en estudio.

A todo suero que mostró un título de 1:80 o más para *Salmonella typhi* "O" y "H" y *Brucella* y para *Proteus* de 1:160, se le practicó la prueba en tubos, siguiendo la siguiente metodología:

### *Prueba de aglutinación en tubos:*

Para realizar esta prueba se toman 10 tubos de 13 x 100 los cuales son identificados con números del 1 al 10. Al primer tubo se le agrega 0,9 ml. de solución salina al 0,85%; a los tubos restantes se les coloca 0,5 ml. Luego se agrega 0,1 ml. del suero

en estudio al tubo No. 1, se mezcla y se transfiere 0,5 ml. al tubo No. 2 y así sucesivamente hasta el tubo No. 10, de donde después de mezclar se descarta 0,5 ml. Repitiendo este procedimiento, obtuvimos diluciones al doble del suero, comenzando con una dilución de 1:20 hasta 1:10.240. Luego a cada uno de los tubos se le agregó 0,5 ml. del antígeno correspondiente previamente diluido en solución salina (Salmonella Typhi "O" y "H" y Proteus OX19 1:100 y Brucella 1:50). Se mezclan y se incuban en baño maría según el siguiente esquema:

Salmonella Typhi "O"	45-50°C	durante 18 horas
Salmonella typhi "H"	45-50°C	durante 1 hora
Brucella	37°C	durante 48 horas
Proteus OX19	45-50°C	durante 18 horas

Después de la incubación los tubos son sacados del baño maría y se observa la presencia o no de aglutinación, usando una lámpara de luz indirecta. Para la interpretación de los resultados se emplea el siguiente esquema:

a- (++++) Todos los organismos aparecen aglutinados en el fondo del tubo y el sobrenadante claro.

b- (+++) Aproximadamente el 75% de los organismos aparecen aglutinados y el sobrenadante ligeramente turbio.

c- (++) Aproximadamente el 50% de los organismos aparecen aglutinados y el líquido sobrenadante moderadamente turbio.

d- (+) Aproximadamente el 25% de los organismos aparecen aglutinados y el líquido sobrenadante es turbio.

e- (-) no se observa aglutinación.

Se toma como título del suero a la mayor dilución del mismo que muestra de ++ a ++++ de aglutinación.

Con ambas pruebas de aglutinación (lámina y tubos), se tomaron las siguientes precauciones:

1.- Los sueros fueron congelados a -20°C hasta el momento de ser procesados.

2.- Todos los sueros estaban claros, libres de contaminación bacteriana.

3.- El suero no fue inactivado antes de practicar dichas pruebas.

4.- Todos los antígenos fueron guardados a 2-8°C.

5.- Se utilizó siempre una suspensión uniforme del antígeno.

6.- Con ambas pruebas se montaron simultáneamente sueros testigos positivos y negativos.

7.- La prueba en lámina fue leída inmediatamente después de transcurrido un minuto de la reacción, tal cual recomienda la casa comercial.

8.- La prueba en tubo fue leída inmediatamente después de transcurrido el período de incubación y tratando de no moverlos al ser sacados del baño maría.

### *Prueba de fijación de superficie:*

Este método consiste en utilizar papel filtro de calidad y tamaño adecuado, el cual en su porción inferior posee manchas secas de antígeno 9,12 de *Salmonella typhi*, *Brucella* y *Proteus OX19*. La prueba se practica aplicando sobre las manchas los sueros en estudio, siendo requisito indispensable colocar sueros controles. Una vez aplicados los sueros se suspenden las tiras de papel dentro de una suspensión de cloruro de sodio al 8.5% procurando que al sumergir el papel, el nivel del líquido quede un poco por debajo de las manchas, de manera que al ascender por capilaridad, el líquido pasa sobre las manchas, arrastrando la mezcla de antígeno y suero negativo en forma tal que al llegar a la parte superior del papel deje una huella en forma de cometa. Por contraste, las manchas tratadas con suero positivo quedarán retenidas en proporción al contenido en anticuerpo. La huella que dejan las manchas tratadas con sueros positivos pueden ser, por comparación con el control, desde completa fijación hasta proporciones que se calculan desde 100% hasta títulos de 75, 50, 25 y 10%.

Si una mancha queda completamente fija la reacción es 100% (equivale a una aglutinación intensa). Dividiendo la distancia recorrida por los controles en 4 partes, la cola del cometa puede ser de 75% - 50 ó 25% y la intensidad es inversa al tamaño de la huella.

Con respecto a la fiebre tifoidea el 100% de fijación significa tifoidea actual, el 75% es significativa hasta la edad de 10 años, baja su valor hasta los 14 años y pierde su valor en adultos.

El 50% sólo es significativo hasta la edad de 5 años; baja hasta los 14 años; pierde su valor en adultos.

El 25% sólo es sospechosa en los primeros años (menos de 5 años).

En cuanto a la brucelosis, es significativa a todas las edades y a cualquier título, pero sólo indica presencia de anticuerpos. Si es más de 60% es muy sugestiva de infección actual.

En lo que se refiere al tifo, la reacción al *Proteus OX19*, sólo tiene valor a títulos muy altos (más del 70%) y siempre que esté de acuerdo con la clínica. Sin embargo hay casos de tifo con reacciones débiles.

### *RESULTADOS:*

De las 100 muestras de sueros provenientes de los donantes analizados mediante la prueba en lámina, sólo 9 mostraron títulos de 1:80 o más con el antígeno somático "O" de *Salmonella typhi*, mientras que 91 mostraron títulos por debajo de 1:80, cuando utilizamos el antígeno de *Brucella* ninguno mostró aglutinación por encima

de 1:40 y cuando utilizamos el antígeno de Proteus OX19 sólo 9 mostraron títulos de 1:160 o más, lo cual se muestra en el Cuadro No. 1.

El Cuadro No. 2 muestra la distribución de las muestras de donantes de acuerdo a los resultados obtenidos utilizando la prueba de fijación de superficie; en él podemos observar que 99 de las 100 muestras mostraron menos del 70% de fijación con el antígeno de Salmonella typhi. Y sólo 1 presentó un 70% de fijación. Con el

CUADRO No. 1

**DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS DE DONANTES DE ACUERDO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS UTILIZANDO LA PRUEBA EN LAMINAS**

**MARACAIBO 1981**

ANTIGENOS	RESULTADOS						TOTAL
	NEG	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	
SALMONELLA TYPHI "O"	38	28	25	8	1	—	100
BRUCELLA	95	4	1	—	—	—	100
PROTEUS OX19	43	22	19	9	5	2	100

F. de I.: Instituto Hematológico de Occidente, 1981.

CUADRO No. 2

**DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS DE DONANTES DE ACUERDO A RESULTADOS OBTENIDOS UTILIZANDO LA PRUEBA DE FIJACION DE SUPERFICIE**

**MARACAIBO 1981**

% DE FIJACION	No. DE MUESTRAS		
	SALMONELLA TYPHI	BRUCELLA	PROTEUS OX19
100 %	—	—	—
90 %	—	—	—
80 %	—	—	—
70 %	1	—	2
70 %	99	100	98

F. de I.: Instituto Hematológico de Occidente, Maracaibo 1981.

antígeno de Brucella todos mostraron menos del 70% de fijación y con el antígeno de Proteus OX19 sólo 2 mostraron un 70% de fijación y 98 dieron menos del 70%.

En el Cuadro No. 3 se comparan los resultados de las 3 pruebas empleadas en 8 casos que mostraron títulos de 1:80 o más con la prueba en lámina, utilizando el antígeno "O" de Salmonella typhi; estos títulos se correspondieron con la prueba en tubos y los resultados con la prueba de fijación de superficie, no mostraron variación significativa.

En el Cuadro No. 4 comparamos los resultados de las 3 pruebas empleadas en 7 casos que mostraron títulos de 1:160 o más cuando utilizamos el antígeno de Pro-

**CUADRO No. 3**  
**SEROLOGIA COMPARATIVA EN DONANTES DE SANGRE QUE MOSTRARON**  
**TITULOS DE 1:80 O MAS, UTILIZANDO Ag. "O" DE SALMONELLA TYPHY**  
**MARACAIBO 1981**

MUESTRAS	PRUEBA EN LAMINAS	PRUEBA EN TUBOS	FIJACION DE SUPERFICIE
1	1:80	1:80	✓ 50 %
2	1:80	1:80	✓ 50 %
3	1:80	1:80	✓ 50 %
4	1:80	1:80	✓ 50 %
5	1:80	1:80	✓ 50 %
6	1:80	1:80	✓ 50 %
7	1:80	1:80	✓ 50 %
8	1:80	1:80	✓ 50 %
9	1:160	1:160	✓ 70 %

F. de I.: Instituto Hematológico de Occidente, Maracaibo 1981.

**CUADRO No. 4**  
**SEROLOGIA COMPARATIVA EN DONANTES DE SANGRE QUE MOSTRARON**  
**TITULOS DE 1:160 O MAS, UTILIZANDO Ag. DE PROTEUS OX19**  
**MARACAIBO 1981**

MUESTRAS	PRUEBA EN LAMINAS	PRUEBA EN TUBOS	FIJACION DE SUPERFICIE
1	1:160	1:160	✓ 45 %
2	1:160	1:160	✓ 50 %
3	1:160	1:160	✓ 50 %
4	1:160	1:160	✓ 50 %
5	1:160	1:160	✓ 50 %
6	1:320	1:320	✓ 70 %
7	1:320	1:320	✓ 70 %

F. de I.: Instituto Hematológico de Occidente, Maracaibo 1981.

teus 0X19 en la lámina. En él podemos observar que ambas pruebas de aglutinación (lámina y tubos) se corresponden y los resultados obtenidos con la prueba de fijación de superficie se correlaciona también con ellos.

En el Cuadro No. 5 se comparan las 3 pruebas utilizadas en 8 casos comprobados de Fiebre Tifoidea; en él podemos observar la correlación que existe entre las 3 pruebas utilizadas.

En el Cuadro No. 6 mostramos la correlación existente entre las 3 pruebas en un caso de Brucelosis comprobada.

CUADRO No. 5  
SEROLOGIA COMPARATIVA EN FIEBRE TIFOIDEA  
MARACAIBO 1981

NIVELES DE ANTICUERPOS "O" DE SALMONELLA TYPHI		FIJACION DE SUPERFICIE
LAMINAS	TUBOS	
1:160	1:320	✓ 80 %
1:160	1:160	✓ 75 %
1:320	1:320	✓ 80 %
1:160	1:160	✓ 80 %
1:320	1:320	✓ 90 %
1:320	1:320	✓ 80 %
1:320	1:320	✓ 80 %
1:320	1:320	✓ 80 %

F. de I.: Hospital Central "Dr. Urquinaona". Maracaibo 1981.

CUADRO No. 6  
SEROLOGIA COMPARATIVA EN UN CASO DE BRUCELOSIS  
MARACAIBO 1981

NIVELES DE ANTICUERPOS PARA BRUCELLA		FIJACION DE SUPERFICIE
LAMINAS	TUBOS	
1:320	1:640	≥ 90 %

F. de I.: Hospital Central "Dr. Urquinaona". Maracaibo 1981.

## DISCUSION:

La utilización de pruebas serológicas para la detección y cuantificación de aglutininas febriles, continúa siendo un procedimiento que asociado a los datos clínicos constituye un recurso valioso para el diagnóstico presuntivo de una infección causada por Salmonella, Brucella o Rickettsias, antes de la confirmación bacteriológica.

Dentro de ésta se realiza rutinariamente la prueba de aglutinación en lámina, como prueba de descarte y la prueba en tubos, cuando queremos determinar con exactitud el título de aglutininas (11-14). A pesar de que algunos investigadores (15,16), no han encontrado una buena correlación de los resultados obtenidos con estas dos pruebas, nosotros al igual que Senewiratne (17) siempre hemos podido correlacionar ambas pruebas. Sin embargo quisimos utilizar una tercera técnica a fin de poder hacer un reporte más rápido de la misma (pocos minutos) y además obtener un resultado que según muchos autores (7-10) es más específico, pues ha sido demostrado por ellos, que la prueba de fijación de superficie es más sensible y más específica para la determinación de anticuerpos dirigidos contra Salmonella, Brucella y Proteus OX19; de allí que en nuestro estudio quisimos utilizar esta técnica a fin de comparar las tres pruebas y ver si los resultados obtenidos con ellas eran similares y reproducibles; para esto escogimos un grupo de 100 donantes de sangre del Instituto Hematológico de Occidente, por ser más fácil de obtención de las muestras; así mismo utilizamos como grupo testigo 8 muestras de pacientes con fiebre tifoidea y una con brucelosis, confirmados todos ellos por el aislamiento del agente causal.

De los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos concluir que la prueba de fijación de superficie se correlaciona bien con los resultados obtenidos con las otras dos pruebas utilizadas y además que los resultados son reproducibles, por lo que nos permitimos recomendarla como prueba de rutina, sobre todo para utilizarla como prueba de descarte cuando se estudian grandes poblaciones a fin de consumir menor cantidad de reactivos; sólo que dadas las condiciones climáticas de nuestra región es recomendable tomar muy en cuenta las recomendaciones hechas por el Laboratorio de Desarrollo Dr. M. Ruiz Castañeda; por otra parte hay que tomar en cuenta que el papel reactivo sólo se prepara en dichos Laboratorios lo que disminuye su utilidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. WOOD, E.: *Brucellosis as a hazard of blood transfusion*. Brit. Med. J. 1: 27, 1955.
2. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio Todd-San Ford. Salvat Editores S. A., p. 1098.
3. WIDAL, F.: *Serodiagnostic de la fievre typhoide*. Bull. Soc. Med. Hosp. (Paris) 13: 561, 1896.
4. WILSON, G., Miles, A.: *Topley and Wilson's principles of Bacteriology and Immunity*. 5a. Ed. Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1964.
5. FISET, P., Ormsbee, R., Silberman, M., Peacock, R., Spieiman, S.: *A microagglutination technique for detection and measurement of Rickettsial antibodies*. Acta Viol, 13:60.
6. CERMYSEVA, M., Knjazerva, E., Egorova, L.: *Study of the plate agglutination test with rose bengal antigen for diagnosis of human brucellosis*. Bouletin of the Word Health Organization. 55(6): 669, 1977.
7. RUIZ-CASTAÑEDA, M.: *Surface fixation a new method for detecting certain immunologic reactions*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73: 46, 1950.
8. VILLALOBOS-Roldán, A., Rodríguez, F., García, F., Kumate, J. *Metabolismo de los antígenos de Salmonella typhi administrados por vía oral*. Invest. Clin. 20: 127, 1979.
9. GUTIERREZ, T., Benavides, L., Kumate, J., Rangel, L.: *Encuesta inmunológica en la población infantil. 1. Investigación de anticuerpos contra S. typhosa por medio de la reacción de fijación de superficie*. Bol. Med. Hosp. Infa. (México) 19: 107, 1962.
10. RUIZ-Castañeda, M.: *Reacciones inmunológicas sobre papel filtro. Fijación en superficie*. Academia Nacional de Medicina. Primer Centenario. Tomo II. pp. 199, 1964.
11. HUDDLESON, F., Abell, E.: *Rapid macroscopie agglutination for serum diagnosis of bangis abortion disease*. J. Infec. Dis. 42: 242, 1962.
12. Recommendations specifications for Microbiological reagents, third edition 1968, US. Departament of Health, Education and Welfare, Center of Disease Control, Atlanta, Georgia.
13. HALL, W., Manion, R.: *Comparison on the Coombs test with other methods for Brucella agglutinins in human serum*. J. Clin. Invest. 32:96, 1953.
14. SPINK, W., Anderson, D.: *Correlation of a rapid slide agglutination test in screening suspected cases of human brucellosis*. J. Lab. Clin. Med. 46: 593, 1952.
15. REYNOLDS, D., Carpenter, R., Simon, W.: *Diagnostic specificity of Widal's reaction for typhoid fever*. J.A.M.A. 214: 2192, 1970.
16. SCHROEDER, S.: *Interpretation of serologic test for typhoid fever*. J.A.M.A. 206: 839, 1968.
17. SENEWIRATNE, B., Chir., B., Senewiratne, K.: *Reassessmento of Widal test in the diagnosis of typhoid*. Gastroenterology. 73:233, 1977.