

**INVESTIGACION DE ANTICUERPOS CONTRA BRUCELLA  
UTILIZANDO TRES PRUEBAS SEROLOGICAS  
EN DONANTES DE SANGRE**

**INVESTIGATION OF ANTIBODIES AGAINST BRUCELLA  
UTILIZING THREE SEROLOGIC TESTS IN BLOOD  
DONORS**

*A. Villalobos de Roldán\**

*M. Urbina\**

*A. Muñoz\*\**

**RESUMEN**

Se investigó la presencia de anticuerpos contra Brucella en cien (100) donantes de sangre y en un (1) caso de Brucelosis humana, utilizando tres pruebas serológicas. En el grupo de donantes, no se encontraron títulos significativos, a diferencia del caso de Brucelosis, donde sí se observaron. Además se pudo demostrar buena relación de los resultados con las tres pruebas utilizadas.

**PALABRAS CLAVES:** Anticuerpos contra Brucella. Donantes de sangre.

Recibido 25-03-93

Received 25-03-93

Aceptado 05-10-93

Accepted 05-10-93

- \* Profesora Titular. Cátedra de Microbiología. Escuela de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.
- \*\* Profesor Asociado. Cátedra de Medicina. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.

## ABSTRACT

It was investigated the presence of antibodies against *Brucella* in a hundred (100) blood donors and in one (1) case of human Brucellosis, utilizing three serologic tests. In the blood donors were not found significant titles; unlike the Brucellosis case, where it was observed. Besides it could demonstrate good relation of the results with the three utilized tests.

KEYWORDS: Antibodies against *Brucella*. Blood donors.

## INTRODUCCION

La Brucelosis es una enfermedad de alta prevalencia en las especies animales susceptibles y de poca frecuencia en humanos, donde la mayoría de los casos no son reportados o su cuadro clínico pasa desapercibido, conociéndose bien la enfermedad, pero no su grado de antropozoonosis.<sup>27</sup>

La transmisión de esta enfermedad en el humano puede ser por diferentes vías: consumo de leche y sus derivados sin tratamientos sanitarios y térmicos adecuados; ingesta de aguas contaminadas; contacto directo con heces, mucosa rectal del bovino; fetos contaminados; líquidos o envoltorios fetales; por inhalación y a través de la piel sana o comúnmente en presencia de heridas y manipulación de vacunas C-19.<sup>3-7-14-25-26.</sup>

Muchos consideran a la Brucelosis como una enfermedad ocupacional, por la gran exposición de las personas que trabajan o están en contacto con animales de alta susceptibilidad.

Las especies de *Brucella* más comúnmente aisladas en el humano son: *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*, apareciendo su importancia en el orden mencionado, de acuerdo a la severidad de la infección en el hombre,<sup>1-27</sup> ya que en los animales no se distingue mayor sintomatología clínica.

El diagnóstico etiológico de estos cuadros, puede hacerse mediante el aislamiento y la identificación del agente infeccioso, pero existen casos, donde esto se dificulta, especialmente en aquellos casos en que acuden al médico tardíamente o bien han recibido previamente terapia antimicrobiana,<sup>30</sup> en estos últimos, la única forma de hacer el diagnós-

tico es a través de pruebas indirectas de diagnóstico, utilizando pruebas serológicas, a fin de detectar y cuantificar la presencia de anticuerpos en el suero.

Dentro de las pruebas serológicas existen varias como: la aglutinación, la cual puede hacerse tanto en placa como en tubos.<sup>2,13,26</sup> La primera se utiliza como prueba de descarte en grandes poblaciones y es de mucha utilidad 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 pueden obtenerse con la primera, además 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 dos pruebas mencionadas, existe otra que permite estudiar la respuesta de anticuerpos en pacientes con ciertas infecciones como: infección entérica, rickettsiosis, brucelosis, etc., y ésta es la prueba de fijación de superficie de Ruiz Castañeda,<sup>20,21</sup> la cual nos permite contar con un método fácil, rápido, específico y altamente sensible, para el diagnóstico de las mismas.

El propósito del siguiente trabajo, es el 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, con el objeto de investigar en ellos la presencia de anticuerpos contra Brucella y comparar los resultados obtenidos con cada una de ellas, a fin de determinar la efectividad de las mismas y estudiar la posibilidad de utilizar la última de ellas en el diagnóstico de la Brucelosis bovina.

## MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 100 muestras de suero, obtenidas de donantes de sangre del Instituto Hematológico de Occidente (Maracaibo) y 1 obtenida de un paciente con infección causada por Brucella abortus, confirmada por el aislamiento del germen causal.

En todas las muestras se investigó la presencia de aglutininas mediante las técnicas de aglutinación en láminas y tubos,<sup>11,24</sup> utilizando antígeno de Brucella obtenido de los Laboratorios Lee (Lee Laboratories, Inc., Georgia,

U.S.A.) y la prueba de fijación de superficie en papel,<sup>20, 21</sup> obtenido del Laboratorio de Desarrollo Dr. M. Ruiz Castañeda, Hospital Infantil de México.

## **PRUEBA DE AGLUTINACION EN LAMINA**

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 y 0.05 ml.; luego se les agrega una gota de suspensión del antígeno (0,03 ml) de Brucella a cada una de las divisiones, se mezclan de derecha a izquierda con un aplicador, luego a la lámina se le imprime 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 observa aglutinación

En esta técnica se considera positiva aquella prueba que da 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 muestre un título de 1:60 para Brucella, se le debe practicar la prueba en tubos, siguiendo la siguiente metodología:

## **PRUEBA DE AGLUTINACION EN TUBOS**

Para realizar esta prueba se toman 10 tubos de 12 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 le agrega 0.1 ml del suero en estudio al tubo N° 1, se mezcla y se transfiere 0.5 ml al tubo N° 2 y así sucesivamente hasta el tubo N° 10, de donde después de mezclar se descarta 0.5 ml. Repitiendo este procedimiento, se obtienen diluciones que van desde 1:20 hasta 1:10.240. Luego a cada uno de los tubos se les agregó 0.5 ml del antígeno de Brucella diluido en solución salina 1:50, se mezclan y se incuban en baño María a 37°C durante 48 horas. Después de esta incubación 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 líquido 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) Se trabajó con sueros no hemolizados, claros, que podrían indicar la posible contaminación bacteriana.
- 3) El antígeno fue guardado a temperatura de 2-8°C.
- 4) Se utilizó siempre una suspensión uniforme del antígeno.
- 5) Con ambas pruebas se montaron simultáneamente sueros testigos positivos y negativos.
- 6) La prueba en lámina fue leída inmediatamente después de haber transcurrido un minuto de la reacción, tal cual recomienda la casa comercial.

- 7) La prueba en tubos fue leída inmediatamente después de haber transcurrido el período de incubación y tratando de no moverlos al ser sacados del baño María.

## PRUEBA DE FIJACION DE SUPERFICIE

Este método consiste en utilizar papel de filtro de calidad y tamaño adecuado, los cuales en su porción inferior poseen manchas secas de antígenos 9.12 de *Salmonella typhi*, *Brucella* y *Proteus OX19* (en nuestro caso, sólo se utilizó el antígeno de *Brucella*). La prueba se practica aplicando sobre la mancha los sueros en estudio, siendo requisito indispensable colocar sueros controles. Una vez aplicados los sueros se suspenden las tiras de papel dentro de una solución de cloruro de sodio al 0.85%, 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 pase 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, quedaron retenidas en proporción al contenido en anticuerpos. 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%.

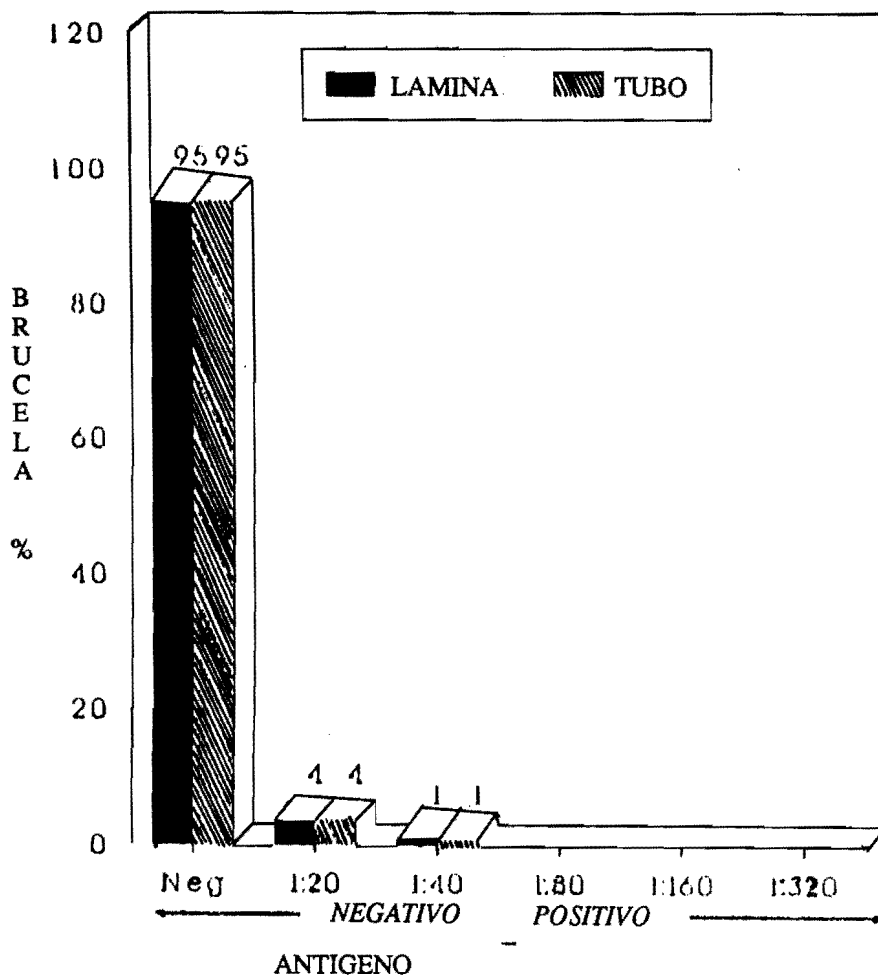
Si una mancha queda completamente fija, la reacción es 100% (equivale a una aglutinación intensa). Dividiendo la distancia recorrida por los controles en cuatro partes, la cola del cometa puede ser de 75%, 50% ó 25% y la intensidad es inversa al tamaño de la huella.

Con respecto a la Brucelosis, la fijación de superficie es significativa a todas las edades y a cualquier título, pero sólo indica presencia de anticuerpos. Si es más de 60%, es muy sugestivo de infección actual.

## RESULTADOS

En la Figura Nº 1, de las cien (100) muestras de suero analizadas, mediante las pruebas en lámina y en tubos, ninguna de las dos pruebas mostró aglutinación por encima de 1:40.

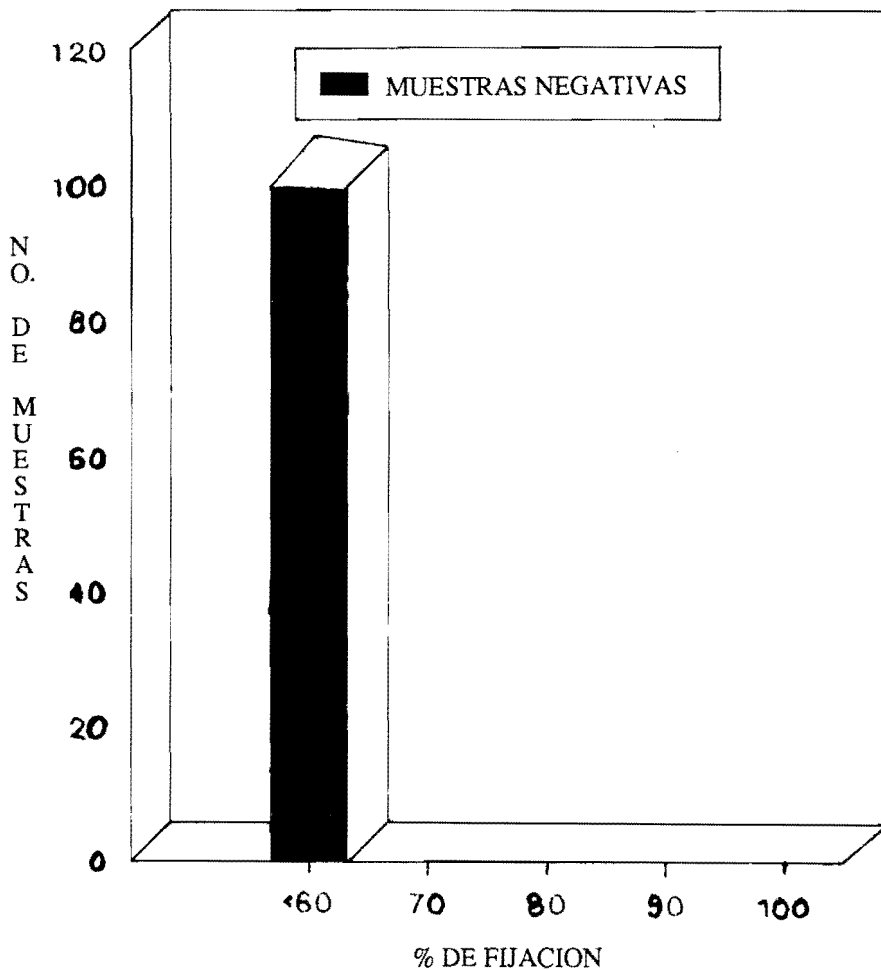
FIGURA No. 1. DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS DE ACUERDO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS UTILIZANDO LAS PRUEBAS: LAMINAS Y TUBOS



F. de I.: INSTITUTO HEMATOLOGICO DE OCCIDENTE, MARACAIBO 1988-1990

En la Figura Nº 2, muestra la distribución de las muestras de acuerdo a los resultados obtenidos, utilizando la prueba de fijación de superficie, donde podemos observar que todas mostraron menos del 60% de fijación.

FIGURA No. 2. DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS DE ACUERDO A LOS RESULTADOS AL UTILIZAR LA PRUEBA DE "FIJACION DE SUPERFICIE"



F. de I.: INSTITUTO HEMATOLOGICO DE  
OCCIDENTE, MARACAIBO 1988-1990



En la Tabla Nº 1 mostramos la serología obtenida en cada una de las tres pruebas, en un caso de Brucelosis comprobada.

**TABLA No. 1**  
**SEROLOGIA COMPARADA EN UN CASO**  
**DE BRUCELOSIS**  
**Maracaibo, 1988-1990**

**NIVELES DE ANTICUERPOS PARA BRUCELLA**

LAMINA	TUBOS	FIJACION DE SUPERFICIE
1:320	1:640	> 90%

F. DE I: CLINICA PRIVADA 1988

### DISCUSION

La utilización de pruebas serológicas para la detección y la cuantificación de anticuerpos, continúa siendo un procedimiento que asociado con los datos clínicos y epidemiológicos constituye un recurso valioso para el diagnóstico presuntivo de algunas enfermedades infecciosas, antes de la confirmación bacteriológica.

Dentro de éstas se realiza de rutina la prueba de aglutinación en lámina, como prueba de descarte y la prueba en tubo, cuando se quiere

determinar con exactitud el título de aglutininas.<sup>11, 24</sup> A pesar de que algunos investigadores,<sup>18, 22</sup> no han encontrado buena respuesta de los resultados obtenidos con estas dos pruebas, nosotros, al igual que Senewiratne<sup>23</sup> sí hemos podido relacionar ambas pruebas. Sin embargo, quisimos utilizar una tercera prueba, a fin de poder utilizarla en aquellos casos donde se hace necesario un reporte más rápido de la misma y además obtener un resultado que según muchos autores,<sup>8, 20</sup> es más específico, pues ellos han demostrado que la prueba de fijación de superficie es más sensible y más específica para la determinación de anticuerpos dirigidos no sólo en contra de *Brucella* sino también contra *Salmonella* y *Proteus* OX19, de allí que en este 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 la obtención de las muestras, asimismo utilizamos como testigo suero obtenido de un paciente con Brucelosis confirmada por el aislamiento del agente causal.

De los resultados obtenidos, podemos concluir que, la prueba de fijación de superficie, se relaciona bien con el paciente de las otras dos pruebas utilizadas y además los resultados son reproducibles, por lo que creemos que esta prueba puede ser utilizada como prueba de descarte, cuando se estudian grandes poblaciones, a fin de ahorrar reactivos y siempre y cuando se tomen muy en cuenta las recomendaciones dadas por el Laboratorio de Desarrollo Dr. Ruiz Castañeda. La única desventaja que le vemos a esta técnica, es que el papel reactivo sólo se prepara en dichos laboratorios, lo que dificulta la obtención de dicho material.

El tiempo de realización de la prueba es rápido, por lo cual abreviaría la obtención de los resultados.

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. ACHA, Pedro; SAYFRES, Boris. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Organización Mundial de la Salud. 2da. Edición, Washington, New York, 1986. Publicación Científica Nº 503, 989 pp.
2. ALTON, G.C.; JONES, L.M.; PIETZ, D.F. Las Técnicas de Laboratorio en la Brucelosis. Organización Mundial de la Salud, 2da. Edición, Ginebra, 1976, (Serie de Monografías Nº 55), 175 pp.
3. BEER, Joachin. Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. España, Editorial Acribia, 1981, Tomo II, 344 pp.
4. BELLANTI, J.A. Inmunología. 3ra. Edición, México, Nueva Editorial Interamericana, 1986, 662 pp.
5. CARTER, G.R. Bacteriología y Micología Veterinarias. Aspectos Esenciales. El Manual Moderno, Editorial México, 1985, 335 pp.
6. CERMYSEVA, M.; KNJAZERVA, E.; EGORAVA, L. Study of the Plate agglutination test with rose bengal antigen for diagnosis of human brucellosis. Bouletin of the World Health Organization, 1977, 55: 669.
7. CORBEL, M.J.; STUART, F.A.; BREWER, R.A.; JEFFREY, M.; BRADLEY, R. Arthropathy Associated with Brucella Abortus Strain 19 Vaccination in Cattle. British Veterinary Journal, 1989, 145, 337.
8. GUTIERREZ, T.; BENAVIDES, L.; KUMATE, J.; RANGEL, L. Encuesta Inmunológica en la Población Infantil. 1- Investigación de Anticuerpos contra S. thyphosa por medio de la reacción de fijación de superficie. Boletín Médico del Hospital Infantil de México, México City, 1962, 19: 107.
9. HALL, W.; MANION, R. Comparison on the Coombs test with other methods for Brucella agglutinius in human serum. Journal of Clinical Investigation, 1953, 32: 96.
10. HORSCH, Friedhelm. Inmunoprofilaxis de los Animales Domésticos. España, Editorial Acribia, 1984, 153 pp.
11. HUDDLESON, F.; ABELL, E. Rapid macroscopic agglutination for serum diagnosis of bangis abortion disease. Journal of Infection Diseases, 1962, 42: 242-247.
12. I.I.C.A. Salud Animal. I.I.C.A. Dirección de Salud Animal. San José de Costa Rica, Publicación Científica Nº 1, 1982, 536 pp.
13. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRIA. Técnicas Serológicas aplicadas en el Diagnóstico de la Brucelosis. Dirección de Investigación, Centro de Investigaciones Veterinarias, Servicio de Brucelosis, Maracay, Venezuela, 1973.
14. NICOLET, Jackes. Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. Zaragoza-España, Editorial Acribia, 1986, 275 pp.
15. O.I.E. Brucelosis Bovina, Ovina y Caprina. Paris-Francia, s/e, 1987, Serie Técnica Nº 6, 282 pp.

16. O.M.S. Diagnóstico de la Salud Animal en las Américas. Organización Mundial de la Salud, 1983, Publicación Científica Nº 452, 282 pp.
17. O.P.S. Programa de Adiestramiento en Salud Animal para América Latina. Cuarentena Animal. Enfermedades Cuarentenables. Organización Panamericana de la Salud, s/1, Volumen 1, 1986, 371 pp.
18. REYNOLDS, D.; CARPENTER, R.; SIMON, W. Diagnostic specificity of Widal's reaction for typhoid fever. *Journal of the American Medical Association*, 1970, 214: 2.192.
19. RICHTER, F.; ANDRINO, L.R. "Estudio Comparativo de la Prueba de Aglutinación en Placa y en Tubo para el Diagnóstico de Brucelosis". *Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología*, 1966, 8: 129-131.
20. RUIZ CASTAÑEDA, M. Surface Fixacion a New Method for Detecting Certain Immunologic Reaction. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1950, 73: 46-49.
21. RUIZ CASTAÑEDA, M. Reacciones Inmunológicas sobre Papel Filtro. Fijación en Superficie. *Academia Nacional de Medicina, México, Primer Centenario, Tomo II*, 1964, 199 pp.
22. SCHROEDER, S. Interpretation of Serologic Test for Typhoid Fever. *Journal of the American Medical Associations*, 1968, 206: 839-840.
23. SENEWIRATNE, B.; CHIR, B.; SENEWIRATNE, K. Reassessment of the Widal test in the diagnosis of typhoid. *Gastroenterology*, 1977, 73: 233-236.
24. SPINK, W.; ANDERSON, D. Correlation of a Rapid Slide Agglutination test in screening suspected cases of human brucellosis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1952, 46: 593.
25. RIMONEY, John; GILLESPIE, James; SCOTT, Fredrie; BARLONGH, Jeffrey. Hagan and Bruner's. *Microbiology and Infections Diseases*. Eight Edition, London, Editorial Comostock, Publishing Associates, 1988, 951 pp.
26. UNIVERSIDAD DEL ZULIA. "Curso de Actualización en Brucelosis". Facultad de Ciencias Veterinarias, División de Postgrado, Maracaibo, 1985.
27. VILORIA, Lourdes R. Brucelosis; Encuesta Epidemiológica con Melitina y Seroaglutinación en Personas aparentemente Sanas y en contacto con Ganado Vacuno. *Kasmera*, 1977, 5: 347-437.
28. VILLALOBOS-ROLDAN, A.; RODRIGUEZ, F.; GARCIA, F.; KUMATE, J. Metabolismo de los Antígenos de Salmonella Typhi Administrados por vía oral. *Investigaciones Clínicas*, 1979, 20: 127.
29. WILSON, G.; MILES, A. Topley and Wilson's. *Principles of Bacteriology and Immunity*, 6a. Edición, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1964.
30. WOOD, E. Brucellosis as a hazard of blood transfusion. *British of Medical Journal*, 1955, 1: 27.
31. WOOKCOCK, L.B. *Infección Bacteriana e Inmunidad de los Animales Domésticos*. Edit. Acribia, España, 1984, 253 pp.