UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA LEGAL, PSIQUIATRIA,

Y SALUD PUBLICA.

CATEDRA DE MEDICINA PREVENTIVA Y SOCIAL

"BRUCELOSIS: DIAGNOSTICO SEROLOGICO EVOLUTIVO. ESTUDIO PROSPECTIVO"

José Mª Navarro Marí

Granada, 1989

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 1988 a 1989 Folio 47 vta Número 95

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. José María Navarro Mari, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: "Brucelosis: Diagnóstico serológico evolutivo estudio prospectivo".

Terminada la lectura y contestadas la objecciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este le calificó de Apto "cum laude"

Granada 20 de mayo de 1989

EL PRESIDENTE,

El Secretario del Tribunal,

Fdo.: Gonzalo Piedrola Angulo

Fdo.: Miguel Delgado Rodríguez

EL VOCAL,

EL VOCAL,

EL VOCAL,

Fdo.: Antonio Rodríguez Torres

Fdo.: Ramón Gálvez Vargas

Fdo.: Ramón Díaz García

FIRMA DEL GRADUANDO,

Medicina Preventiva

D. MANUEL DE LA ROSA FRAILE, JEFE DE SERVICIO DE MICROBIOLOGIA DE LA C.S. "VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA", Y D. RAFAEL RODRIGUEZ-CONTRERAS PELAYO, PROFESOR TITULAR DE LA CATEDRA DE MEDICINA PREVENTIVA Y SOCIAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, D. JOSE Mª NAVARRO MARI, sobre el tema: "BRUCELOSIS: DIAGNOSTICO SEROLOGICO EVOLUTIVO. ESTUDIO PROSPECTIVO", ha sido realizada bajo nuestra dirección en condiciones que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado TRibunal.

Fdo. M. de la Rosa Fraile

Fdo. R. Rodríguez-Contreras

A *Celia* y a nuestras dos hijas

Begoña y *Rosa*.

Es una satisfacción personal el poder expresar aquí mi gratitud hacia todos aquellos que han hecho posible que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

En primer lugar, quiero agradecer la comprensión demostrada por las personas mas allegadas de mi entorno familiar, que con su cariño me ayudaron a superar los momentos de desánimo.

El consejo, aliento y dirección infatigable de D. Manuel de la Rosa Fraile, Jefe de Servicio, de Microbiología y Parasitología de la C.S. "Virgen de las Nieves", ha hecho que se soslayaran todos los problemas presentados en la realización de la tésis.

Mi amigo y compañero de trabajo D. Joaquín Mendoza Montero, me introdujo en el tema de la tesis, su apoyo y espíritu crítico continuo durante estos años ha sido inestimable.

Es de justicia hacer constar la valiosa ayuda que con su colaboración desinteresada , me han prestado el resto de amigos del staff, residentes y becarios del Servicio de Microbiología de la C.S. "Virgen de las Nieves".

Igualmente debo expresar mi gratitud a D. Rafael Rodriguez Contreras, Profesor Numerario de la Facultad de Medicina de Granada, por brindarse amablemente a dirigir esta tesis, cuyos consejos y experiencia han facilitado mi labor en la realización de la misma.

A D. Gonzalo Piedrola Angulo y a D. Ramón Gálvez Vargas, por haberme iniciado el conocimiento de la Microbiología, Epidemiología y Salud Pública durante mis años de formación en la licenciatura de Medicina, y que me ha llevado a la selección del tema elegido para la realización de la presente memoria.

Al Servicio de Medicina Interna de la CS "Virgen de las Nieves", y especialmente a la labor de D. Juan Jiménez Alonso (Jefe de Servicio) y de D. Ignacio Ruiz, debo por la ayuda prestada, en gran manera el que este trabajo haya podido llevarse a cabo.

No puedo olvidar la labor realizada a lo largo de estos años por los ATS, TEL y personal auxiliar de nuestro laboratorio; su apoyo incondicional ha sido de valor incalculable.

Quiero recordar a mis amigos que fuera del hospital han sabido soportarme y animarme en todo momento; y que me permitirán mencionar especialmente a D. Juan Benítez Funes por la asistencia prestada en la realización del estudio estadístico.

Han sido muchos los que me han ayudado y apoyado, y ante la imposibilidad de enumerarlos individualmente: a todos, muchas gracias.

INDICE GENERAL

	Páginas
BASES TEORICAS	1-38
I. ESTUDIO MICROBIOLOGICO DEL GENERO *BRUCELLA*	2-6
I-I. Introducción histórica	2
I-II. Características microbiológicas del género *Brucella*	3-6
I-II-A. Características morfológicas, nutricionales y bioquímicas.	3-4
I-II-B. Características de cultivo	4-6
II. EPIDEMIOLOGIA	7-9
III. CLINICA EN HUMANOS	9-12
IV. DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS	13-34
IV-I. Diagnóstico bacteriológico	13-14
IV-II. Diagnóstico serológico	14-34
IV-II-A. Estructura antigénica del género *Brucella*	15-19
IV-II-A-1. Antígenos superficiales en fase lisa	15-17
IV-II-A-2. Antígenos de superficie en fase rugosa	17-18
IV-II-A-3. Antígenos internos	18
IV-II-A-4. Reacción cruzada con otros géneros	18-19
IV-II-B. Respuesta inmune frente a *Brucella*	19-22
IV-II-C. Técnicas serológicas en Brucelosis	23-34
IV-II-C-1. Técnica de aglutinación	25-27
IV-II-C-2. Aglutinación con 2-Mercaptoetanol y Ditio treitol	27-28
IV-II-C-3. Prueba de Rosa de Bengala	28-29
IV-II-C-4. Prueba de Coombs anti-*Brucella*	29-30

IV-II-C-5. Reacción de fijación de complemento 30-31
IV-II-C-6. Proteina C-reactiva 32-34
V. TRATAMIENTO DE BRUCELOSIS 35-38

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS 39-43
I. JUSTIFICACION 40-42
II.OBJETIVOS 43

MATERIAL Y METODOS 44-87
I. PRESENTACION DE LA POBLACION ESTUDIADA Y CONTROLES REALIZADOS 45-56
I-I. Enfermos 45-46
I-II. Seguimiento clínico 47-53
I-III.Control bacteriológico 53-54
I-IV Seguimiento serológico 54-56
II. PAUTAS TERAPEUTICAS ENSAYADAS 57
III. CRITERIOS DE MALA EVOLUCION 58
IV. DESCRIPCION DE TECNICAS SEROLOGICAS 59-85
IV-I. Aglutinación directa 59-64
IV-I-A. Fundamento 59-61
IV-I-B. Descripción de la técnica de aglutinación 62-64
IV-II. Test de Coombs 65-68
IV-II-A. Fundamento 65
IV-II-B. Descripción de la técnica de test de Coombs 66-68
IV-III.Reacción de fijación de complemento 69-78
IV-III-A. Fundamento 69
IV-III-B. Valoración de los componentes 70-75

IV-III-C. Procedimiento para la realización de RFC 76-78
IV-IV. Rosa de Bengala cuantitativo 79-81
IV-IV-A. Fundamento 79
IV-IV-B. Técnica 79-81
IV-V. Prueba de aglutinación con 2-Mercaptoetanol y Ditiotreitol 82-83
IV-V-A. Fundamento 82
IV-V-B. Técnica 82-83
IV-VI. Determinación de Proteina C-reactiva mediante sistema TDx. 84-85
IV-VI-A. Fundamentos del sistema 84
IV-VI-B. Realización de la técnica 85
V. METODO ESTADISTICO 86-87

RESULTADOS 88-147
I. PRESENTACION GENERAL DE LA POBLACION ESTUDIADA 89-95
I-I. Enfermos con buena evolucion 90-94
I-II. Enfermos con mala evolución 94-95
II. CORRELACION ENTRE PRUEBAS SEROLOGICAS 96-101
II-I. Correlación entre Rosa de Bengala cuantitativo y aglutinación 96-98
II-II. Correlación entre aglutinación con 2-Mercaptoetanol y aglutinación con Dititreitol 99-101
III. SEROLOGIA EN EL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO, INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EVOLUCION PREVIO 102-109
III-I. Resultados iniciales con las diferentes pruebas serológicas 102

III-II. Influencia del tiempo de evolución en la respuesta serologica inicial 103-109

III-II-A. Resultados obtenidos con aglutinación 103

III-II-B. " " " 2-Mercaptoetanol 104

III-II-C. " " " test de Coombs 105

III-II-D. " " " Rosa de Bengala 105

III-II-E. " " " RFC 106

III-II-F. " " " PCR 106

III-II-G. Comparación entre los resultados obtenidos con aglutinación normal y con 2-Mercaptoetanol 107-109

IV. RESPUESTA CLINICA AL TRATAMIENTO 110-112

IV-I. Influencia del tiempo de evolución 110

IV-II. " del tipo de tratamiento 111-112

V. COMPORTAMIENTO GLOBAL DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO 113-121

V-I. Resultados de PCR cuantitativa 114

V-II. " " microaglutinación 115

V-III. " " test de Coombs 116

V-IV. " " Rosa de Bengala 117

V-V. " " 2-Mercaptoetanol 118

V-VI. " " RFC

V-VII. Comportamiento de las pruebas serológicas en respuesta al tratamiento de acuerdo con la evolución posterior 120-121

VI. CAPACIDAD DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS PRE Y POSTRATAMIENTO PARA PREDECIR LA EVOLUCION 122-144

VI-I. Resultados con pruebas independientes 112-130

VI-II. Resultados con pruebas asociadas 131-135

VI-III. Análisis discriminante lineal 136-141

VI-IV. Regresión logística 142-144

VII. VALORACION DE LA RESPUESTA SEROLOGICA EN FASES AVANZADAS DE LA ENFERMEDAD 145-147

DISCUSION 148-159

I. CORRELACION ENTRE PRUEBAS SEROLOGICAS 150-151

II. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EVOLUCION PREVIO EN LA SEROLOGIA INICIAL DE PACIENTES CON BRUCELOSIS 152-1[illegible]

III. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EVOLUCION PREVIO AL TRATAMIENTO Y DEL TIPO DE TRATAMIENTO EN LA EVOLUCION POSTERIOR DE LA ENFERMEDAD 153-154

IV. RESPUESTA SEROLOGICA TRAS TRATAMIENTO INICIAL 154-155

V. CAPACIDAD DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS PRE Y POSTRATAMIENTO PARA PREDECIR LA EVOLUCION 155-158

VI. SEROLOGIA EN FASES AVANZADAS DE LA ENFERMEDAD SEGUN EVOLUCION 158-159

CONCLUSIONES 160-162

BIBLIOGRAFIA 163-165

BASES TEORICAS

I.- ESTUDIO MICROBIOLOGICO DEL GENERO BRUCELLA

I-I.- INTRODUCCION HISTORICA.

El género *Brucella* debe su nombre en razón de su aislamiento por Bruce en 1877 del bazo de cuatro pacientes que murieron en Malta de Fiebre Mediterranea. El las describió como cocos y los denominó como *Micrococcus melitensis*, rememorando el nombre romano de la isla (Melita).

El segundo miembro del género, fue aislado por Bang en Copenhage en 1895 del exudado existente entre la pared uterina y la membrana fetal de un aborto de vaca, describiéndolos como bacilos a los que denominó *Bacillus abortus*. Hasta 1918 no se estableció la similitud entre los dos microorganismos anteriores por Evans, y dos años después se adoptó el nombre generico de *Brucella*.

Traum, 1914, describió en Meanwhile la *Brucella suis* , tras su aislamiento de higado, estómago y riñones de un cerdo prematuro, en una granja donde el aborto en cerdas era muy habitual. *B. ovis*, fue aislada en Nueva Zelanda por Buddle en 1956,, y es aparentemente la causa de epididimitis de carnero; *B. neotomae* fue aislada por Stoenner y Lackman en 1957 de ratas madereras en el desierto de Utah, en USA. *B. canis*, es la especie mas recientemente descrita, siendo aislada por primera vez por Carmichael en 1966. (33)

I-II.- CARACTERÍCTICAS MICROBIOLOGICAS DEL GENERO *BRUCELLA*.

I-II-A..- Caracterícticas morfológicas, nutricionales y bioquímicas.

En el manual Bergey se incluye al género *Brucella* en el apartado de "Cocos y Bacilos Gram-negativos aerobios" en un grupo de "Géneros de clasificación imprecisa" (39).

Las especies del género *Brucella* son cocobacilos gram-negativos , no móviles, no formadores de esporas, y generalmente no capsulados, de crecimiento aeróbico, a menudo aumentado en atmósferas ricas en CO_2, y nunca se desarrollan en condiciones anaerobias estrictas. Son inmóviles a 22 y 37ºC. Su crecimiento es lento sobre los medios de cultivo idóneos para su aislamiento.

Requieren tiamina , niacina, y biotina para crecer; temperatura óptima de 37ºC.

Son en general catalasa positivo, oxidasa positivo (excepto *B. ovis* y *B. neotomae*), y reducen nitratos a nitritos. No fermentan Hidratos de Carbono, ni producen indol. Su metabolismo es fundamentalmente oxidativo.

Se diferencian 6 especies: *B. mellitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, y *B. ovis*.

En *B. mellitensis*, se han descrito tres biotipos (de 1 a 3), en *B. abortus* nueve (de 1 a 9), y en *B. suis* cuatro (de 1 a 4); en las otras especies se reconoce un solo biotipo.

La producción de SH_2, resistencia a tionina y fucsina básica, hidrólisis de la urea, y la susceptibilidad a diferentes fagos, entre los que cabe incluir seis grupos, de los que destacan: Fago Tb, Fi (Firenze), Wb (Weybridge), BK (Berkeley), R, e Iz (Izatnagar), son útiles para diferenciar las especies y biotipos. (143, 39, 91)

I-II-B.-Caracteristicas del cultivo.

Las brucelas crecen mal en medios ordinarios. Si se utilizan medios de cultivo y condiciones de incubación adecuados , se puede observar crecimiento en 48-72 horas, aunque en general no crecen hasta pasada la primera semana. Se pueden utilizar tanto medios sólidos como líquidos, habiendose recomendado para el cultivo de muestras de sangre u otros líquidos corporales el uso de medio bifásico tipo Castañeda.

Los medios sólidos deben ser medios basales, no selectivos, enriquecidos con 50 a 100 ml de suero de caballo por litro. La fuente del medio basal va a depender de las posibilidades del laboratorio; un medio basal puede ser considerado satisfactorio si es capaz de permitir crecer a la mayoría de las cepas de *Brucella* con un mínimo inóculo; así se han recomendado los siguientes medios:

-Suero-Dextrosa agar (SDA) (50-100 ml de suero y 10 g de dextrosa añadidos a suficiente cantidad de medio basal para dar un volumentotal de 1 litro).

-Medio comercial (Tripticasa soja, agar triptosa, o alguna base de agar de buena calidad suplementada con suero).

-Agar sangre (50 ml de sangre de cordero añadida a suficiente cantidad de agar base para conseguir un volumen total de 1000 ml).

Como medios liquidos pueden utilizarse caldo de tripticasa soja, caldo de triptosa o caldos comerciales preparados para brucelas.

Ocasionalmente pueden utilizarse medios selectivos por la adición de determinados antibióticos del tipo de bacitracina, polimixina B, cicloheximida, vancomicina, acido nalidixico, o nistatina.

La incubación debe realizarse en atmósfera que contenga un 5-10% de CO_2.

Las colonias de brucelas muestran una marcada tendencia a la disociación liso-rugosa (S-R), pudiendo observarse en un mismo cultivo colonias en fase lisa (S), o en fases no lisas como son las formas rugosas (R), o mucoides (M), así como formas intermedias entre los tipos S y R que incluyen las fases SI e I.

Esta tendencia a la disociación colonial suele ir acompañada de cambios en su virulencia, sensibilidad a fagos, propiedades serológicas y en sus características antigénicas.

Las colonias en fase S, se caracterizan por ser de forma redondeada, (200 µm de diametro), aspecto mucoso, translúcidas con bordes completos, dando una tonalidad blanco-azulada al observarlas en luz reflejada, aunque son de color amarillo pálido con luz transmitida.

Las colonias en fases no S (R o M), son a menudo ligeramente mayores y tienen una suprficie mas granular o viscosa. Su color varía de blanco apagado a pardo con luz transmitida o refleja. Habitualmente son translucidas, pero pueden ser opacas.

Las brucelas pueden transformarse en formas L, cuando son expuestas a antibióticos u otros preparados químicos, en experimentación , o bien durante el tratamiento de pacientes con brucelosis. Estas formas L, son aeróbicas y crecen en agar semisólido (15 g/litro), que debe contener 200-250 ml de suero de caballo por litro. La morfología colonial varía desde formas en "huevo frito" tipo *Mycoplasma*, hasta aquellas similares a las formas normales de crecimiento de *Brucella*. A menudo son autoaglutinables, no pudiendo realizarse la reacción de aglutinación con antisueros específicos. Es posible observarlas con inmunofluorescencia utilizando anticuerpos marcados a fluoresceina frente a fase S o R. Su reversión a la forma normal no siempre se acompaña de la restitu-

ción íntegra de sus propiedades antigénicas, de virulencia o de composición química. (173, 91, 74, 39).

II.- EPIDEMIOLOGIA

Las especies del género *Brucella* producen enfermedades propias en diversas especies animales , pudiendo ocasionalmente infectar a partir de estos al hombre, la transmisión interhumana es excepcional.

Los animales habitualmente infectados por cada una de las especies son:

-*B. mellitensis*.....Ovejas y cabras.
-*B. abortus*.....*Ganado vacuno.*
-*B. suis*.....*Cerdos.*
-*B. canis*.....Perros.
-*B. neotomae*.....Ratas del desierto.
-*B. ovis*.....Carnero.

En general son causa de aborto expontáneo o epididimitis en los animales infectados.

Las cuatro primeras especies tienen implicaciones clínicas en humanos

Aparentemente existen diferencias respecto a la virulencia de estas cuatro especies, de forma que:

- *B. abortus* suele causar enfermedad ligera, de manera esporádica, y puede provocar granulomas no caseificados en órganos del SRE.

-*B. suis* se asocia habitualmente con lesiones supurativas y destructivas, y tiende a provocar formas crónicas localizadas, y causar granulomas caseificados indistinguibles de tuberculosis.

- *B. melitensis* comunmente se asocia a enfermedad severa aguda, y complicaciones localizadas.

- *B. canis causa* enfermedad similar a *B. abortus* pero con más tendencia al curso crónico y tórpido del cuadro.

la única fuente de contagio importante para el hombre está representada por los animales infectados y sus productos.

Las vias fundamentales de transmisión son el contacto directo con animales infectados (abrasiones cutáneas ligeras), y la ingestión de productos contaminados derivados de los mismos, sobre todo leche cruda y quesos frescos ; menos frecuentemente se transmite por via aérea a través de aerosoles que pueden inhalarse o contaminar la conjuntiva (De gran importancia en el contagio de personal de laboratorio). Se considera una enfermedad de marcado carácter profesional.

Los organismos del género *brucella* mueren si se hierve o pasteurizan los productos por ellos infectados. De igual forma es rara la infección a partir de quesos fermentados.

La transmisión de la infección por *brucella* al hombre y su prevalencia en las diferentes partes del mundo, depende sobre todo de los hábitos alimenticios, métodos de procesamiento de la leche para la obtención de nata, quesos, mantequilla, etc., condiciones climáticas, y en gran medida de los actitudes higiénicas adoptadas por el personal en contacto con los animales fuentes de infección. (173, 112, 138,154,80)

España se encuentra a la cabeza de los países del mundo en cuanto a la frecuencia de Brucelosis tanto animal como humana, con las implicaciones que ello tiene desde el punto de vista sanitario y económico. (18)

En nuestro país la especie más frecuentemente implicada es *B. melli-tensis*. (18, 80)

III.-CLINICA EN HUMANOS.

La brucelosis humana es una infección generalizada que puede evolucionar de forma inaparente, aguda o crónica, y en el curso de la cual se pueden presentar manifestaciones y complicaciones que afectan a los más diversos órganos y tejidos. (74, 154, 33)

Tras un periodo de incubación que es muy variable, pero que suele rondar de 1 a 3 semanas, sigue en general un periodo prodrómico caracterizado por astenia psicomotora, pérdida de apetito, junto a sensación

de malestar general, y se establece la enfermedad cuya manifestación fundamental es la fiebre, en general alta y de predominio vespertino, que suele acompañarse de sudoración profusa, astenia y artromialgias. A la exploración física suele observarse esplenomegalia, y no es rara la hepatomegalia. Hematológicamente puede existir anemia o pancitopenia debida al hiperesplenismo (40).

La brucelosis establecida puede seguir muy diferentes cursos evolutivos, desde formas prácticamente asintomáticas, hasta formas febriles, septicémicas con afectación visceral, pasando por cuadros de localización en un solo órgano. (106, 11, 155)

Las diferentes formas clínicas de brucelosis se pueden clasificar (175) en :

-Infección subclínica.- Cuando existe evidencia de brucelosis anterior por los datos serológicos, en personas sin historia de enfermedad aguda o crónica. Todos los cultivos son negativos, mientras la serología es positiva. Se da con mayor frecuencia en pastores, veterinarios, y en aquellas personas que por su ocupación estan en estrecho contacto con animales.

-Brucelosis bacteriémica.- Se asocia habitualmente con sintomatología general, y se da aislamiento del germen de sangre o médula ósea. Suele acompañarse de altos títulos de aglutinación en suero.

-Brucelosis serológica.- Viene definida por la aparición de serología positiva (Títulos altos o incremento significativo de los mismos en dos sueros estudiados en paralelo), clínica compatible y cultivos negativos.

-Brucelosis localizada.- El organismo no esta presente en sangre, pero se aisla de tejidos concretos tales como: huesos, articulaciones, LCR, hígado, riñon, bazo, piel, etc. Puede ser la principal manifestación de una brucelosis bacteriémica, ser manifestación de una infección crónica, o representar una primoinfección. En el último caso la serología puede ser negativa.

-Brucelosis crónica.- Esta denominación se utiliza cuando el cuadro persiste durante un periodo de tiempo superior a 6 meses. Su comienzo puede ser insidioso , seguir a una brucelosis aguda, deberse a la existencia de multiples recaidas, localizacion del microorganismo en ciertos organos, o por no respuesta a la terapia antibiotica.(113, 37).

Las complicaciones más comunes a que puede dar lugar la brucelosis son espondilitis, artritis periféricas, especialmente de cadera, rodilla y hombro, orqui-epididimitis, y tromboflebitis. No es rara en zonas de alta prevalencia la afectación neurológica, generalmente como síndrome meníngeo crónico, y mas rara vez como aracnoiditis, síndromes radiculares, etc. (173, 146, 47, 84, 149, 106, 111, 155)

Se considera *recaida* en aquellos casos en que tras buena evolución inicial, tanto desde el punto de vista clínico como bacteriológico (Cultivos negativos), y tras un periodo asintomático reaparece el cuadro, [illegible]ándose en cultivo la misma cepa inicial. Probablemente se deba a la persistencia del microorganismo en interior de células, protegido de los agentes antimicrobianos utilizados. Suele ocurrir dentro de los tres primeros meses del diagnóstico inicial, aunque puede darse hasta pasados varios años del mismo. (154)

IV.-DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS

IV-I.-DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO.

La única prueba que garantiza el diagnóstico de brucelosis es el aislamiento del agente etiológico.

El hemocultivo es la técnica más común, útil y conveniente de las realizadas rutinariamente, para el diagnóstico de *Brucella*. El aislamiento del germen es tanto más probable cuanto mas precoz se realice el cultivo en el curso de la enfermedad (173)

El cultivo de aspirado de médula ósea de cresta iliaca o esternón, es cada vez más utilizado y su rentabilidad parece fuera de toda duda.(83) Menos frecuentemente se recurre al aislamiento de LCR, liquido de derrame pleural, sinovial, de abscesos , biopsias,etc.(174)

Para aumentar la eficacia del hemocultivo, debemos tener en cuenta las siguientes consideraciones:

-La toma de sangre se debe realizar, si es posible, antes de empezar cualquier tratamiento con antibióticos, y siguiendo las más estrictas normas de esterilidad, para evitar el crecimiento mas rápido de otros microorganismos contaminantes.

-No deben utilizarse medios que contengan polianetolsulfonato sódico, siendo preferible utilizar como anticoagulante citrato trisódico. (175)

-El método más utilizado hasta ahora es el basado en el empleo de medios bifásicos tipo Castañeda; no obtante se han mostrado eficaces otros medios líquidos, tipo caldo tripticasa soja.

-Es aconsejable la incubación en atmósfera rica en CO_2; sobre todo si se sospecha infección por *B. abortus*.

-No debe descartarse como negativo un frasco hasta pasados 21 dias; y aún así son aconsejables los pases ciegos periódicos en medios sólidos adecuados.

-En fase aguda de la brucelosis la bacteriemia suele ser continua, aunque de pequeña intensidad; en fases subagudas o crónicas , suele ser intermitente. Por ello es aconsejable obtener dos frascos en cada toma, y repetir las tomas de 2 a 4 veces. (74)

- Los resultados positivos pueden obternerse tanto en enfermos febriles como apiréticos

IV-II.-DIAGNOSTICO SEROLOGICO.

Hay que recurrir a él , dado que en múltiples ocasiones, ya sea por existencia de tratamientos previos, o porque el enfermo acude a consulta en fases avanzadas de la enfermedad, o por errores técnicos , las técnicas de cultivo del microorganismo no siempre son positivas.

IV-II-A.- **Estructura antigénica del género *Brucella*.**

I -II-A-1.-*Antigenos superficiales en fase lisa.*

En la fase lisa estas bacterias, en estudios realizados sobre todo con la cepa de *B. melitensis* 16M y *B. abortus* 1119-3, se ha podido demostrar que poseen en su pared celular dos componentes antigénicos específicos de dicha fase que son el lipopolisacárido (S-LPS) y el polisacárido hapténico (Hapteno nativo (HN)) (52, 26, 59, 58,121,122,123,). Ambas estructuras se encuentran en la fase fenólica cuando se realiza en las células el método de extracción fenol-agua en caliente.

El lipopolisacárido es una macromolécula que contiene los determinantes antigénicos propios de los aglutinógenos A y M, y corresponde a la estructura anatómica responsable de las propiedades endotóxicas atribuidas a los microorganismos de este género.(15, 16, 105, 121,122)

Estructuralmente el lipopolisacárido brucelar (compuesto por lípido A y un polisacárido O (1,2-4,6-dideoxi-4-formamido-α-D- residuos mannopiranó

sidos y 2-ceto-3-deoxioctanuto (KDO) en *B. abortus* 1119-3) posee estrechas semejanzas con los lipopolisacáridos (Endotoxinas) de las enterobacteriaceas, aunque difiere en algunas de sus propiedades, como por ejemplo, en no contener heptosa, siendo sus carbohidratos principales: glucosa, manosa, glucosamina, y quinovosamina; y la composición química del lípido A es diferente (contiene fosfolipidos , glucosamina, y acidos grasos). (25, 23, 121, 122 123, 22, 2, 60, 67)

El lipopolisacárido es la única estructura que ha podido demostrarse que interviene en las pruebas serológicas clásicas, cuando se emplean suspensiones de células bacterianas enteras en fase lisa, ya que cuando se absorbe suero de un animal con brucelosis con el LPS se eliminan los anticuerpos que intervienen en las pruebas Rosa de Bengala, seroaglutinación , Test de Coombs indirecto y Reacción de Fijación de complemeno (54). Las suspensiones de bacterias en fase rugosa no pueden emplearse como antígeno en RFC por carecer de LPS específico de la fase lisa. (73).

El HN , cuya función biológica se desconoce, se encuentra en la superficie de las células en fase lisa; pero es interesante señalar que en el contenido citoplasmático de la cepa rugosa de *B. melitensis* 115 se encuentra un polisacárido (Polisacárido B) (58, 51, 50, 122), que es inmunológicamente indistinguible de HN. Estos antígenos no intervienen en las pruebas serológicas clásicas en las que se emplean suspensiones de brucelas en fase lisa. (125)

El HN no posee actividad endotóxica, ni ácidos grasos, KDO o proteinas, y puede ser obtenido por autoclavaje de células en fase S, seguidas de precipitación con etanol. (121, 124, 173)

Por otra parte cuando se absorbe un suero con el HN o el polisacárido B se eliminan los anticuerpos específicos frente a ellos, pero no frente al LPS (55).

Para algunos autores posiblemente el HN (dada su semejanza con la cadena O polisacárida de LPS) sea una parte de la molécula del lipopolisacarido, y el polisacárido B situado en el citoplasma, pueda actuar como precursor de la molécula de LPS, no obtante estas hipótesis estan pendientes de confirmación definitiva. (122; 174)

Otros antigenos superficiales que se han descrito aparte del LPS y HN son el antigeno "f" (75), y los antigenos "χ", "β" y "γ" (140, 141).

En la superficie de células en fase lisa existen determinantes antigénicos de tipo protéico (Proteinas de membrana externa OMP)(53, 125, 78), habiéndose diferenciado dos grupos mayores de estas proteinas con peso molecular de 36-38K y 25-37K respectivamente, que no intervienen en las pruebas serológicas clásicas y su interés diagnóstico está por determinar. (145, 173)

V-II-A-2.-*Antígenos de superficie en fase rugosa.*

Las brucelas en fase rugosa también poseen un lipopolisacárido especifico de superficie (R-LPS), que aparece en la fase acuosa tras extracción agua fenol de células R, sin interés hasta el momento, en clínica humana. La diferencia fundamental con el S-LPS, es que carece de quinovosamina y su menor contenido proteico. (123, 49)

Las cepas no lisas poseen determinantes antigénicos comunes a la mayoría de ellas. Determinantes antigénicos especie-específicos pueden también estar presentes (49).

Al menos dos antígenos superficiales pueden aparecer en algunas cepas no lisas, uno de los cuales se asocia con la fase colonial mucoide y puede ser cepa específico. (176).

IV-II-A-3.-*Antígenos internos.*

Usando extractos salinos de cepas rugosas de *B. melitensis* 115, (en la que se probó que no existían Ag LPS (A+M), ni polisacárido B) como AG en técnicas de contrainmuno electroforesis para demostrar AC en pacientes con brucelosis, se obtienen entre 1 y 8 líneas de precipitación, lo que demuestra la existencia de otros AG capaces de provocar respuesta de AC en pacientes con brucelosis. La naturaleza y localización precisa de estos AG está por determinar definitivamente. (53, 174, 16, 17)

Dado que las bandas en CIE no aparecen si tratamos el extracto salino con enzimas proteolíticos , es lógico pensar en la naturaleza proteica o glicoproteica de dichos antígenos..

IV-II-A-4.-*Reacción cruzada con otros géneros.*

El estudio de relación antigénica del género Brucella con microorganismos de otros géneros, ha permitido demostrar que existen determinantes antigénicos comunes en el lipopolisacárido de *Brucella* y en el lipopolisacárido del serotipo 9 de *Yersinia enterocolitica (120, 22,173)*, *Vibrio cholerae (62)*, Escherichia coli 0:157 y O:116, y *Salmonella landau, S. urbana, y S. godesberg* (probablemente por la gran semejanza estructural de la cadena polisacárida O del lipopolisacárido de estas bacterias y la del LPS brucelar), y que el serotipo mencionado de *Y. enterocolitica* posee un polisacárido que da reacción de identidad total con el HN.(22, 173, 174)

No se ha podido determinar relación antigénica con especies de otros géneros estudiados, tales como *Bordetella, Haemophilus, Pasteurella, Klebsiella, Enterobacter y Serratia.*

No existe comunidad antigénica entre *Brucella* y *Y. enterocolitica* ser. 9 en lo referente a los antígenos protéicos, por lo que para diferenciar infecciones producidas por ambos microorganismos habría que acudir a técnicas que detectaran AC frente a dichos antígenos, tales como técnicas de inmunodifusión en gel.(39. 50)

No ha podido ser caracterizado un antigeno de *Brucella* especifico de especie ni de biotipo, por lo que hasta ahora no se puede precisar que especie o biotipo infecta a un determinado paciente solo por pruebas serológicas.

IV-II-B.-**Respuesta inmune frente a *brucella***

La infección por *Brucella* induce en el huesped respuesta tanto de tipo humoral como celular. La magnitud y duración de esta respuesta, puede verse afectada por multitud de factores, tales como: virulencia de la cepa infectante, inóculo, edad, sexo, estado inmune previo del huesped etc.

Un patron preciso y especifico de reactividad humoral en cada uno de los periodos evolutivos de la enfermedad está por definir, habiendo sido muchas las pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico de esta enfermedad y sus complicaciones, sin ser ninguna de ellas plenamente eficaz.(3, 4, 5, 13, 24, 30, 31, 44, 72, 88, 92, 93, 134,

La respuesta de anticuerpos en el paciente ante *Brucella* es predominantemente de las clases de inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA, cambiando los niveles de los diferentes anticuerpos en el curso de la enfermedad.(39, 94, 95, 119)

Siguiendo la evolución natural de la infección en humanos se observa que al inicio de la enfermedad y durante pocos dias la IgM frente a *Brucella* son las únicas inmunoglobulinas presentes, como se demuestra por la reduc-

ción del poder aglutinante del suero tras tratarlo con 2-mercaptoetanol (173, 65) .

El pico de IgM se produce a los 3 meses de enfermedad, y puede persistir en estados crónicos.

2 a 3 semanas después del inicio de la infección aparecen las IgG, que alcanzan sus mayores niveles a las 6-8 semanas, permaneciendo altos , si la enfermedad no se trata y evoluciona a la cronicidad. IgA aparecen poco despues de IgG, y evolucionan de forma paralela a las mismas.(27, 168, 175, 142)

IgE especificas pueden aparecer en relación con fenómenos hiperérgicos, sobre todo de tipo cutáneo.(98)

En casos de buena evolución de la enfermedad a los 6 meses las IgG han a menudo desaparecido, mientras que pueden quedar suficiente concentración de IgM como para dar positiva la prueba de aglutinación a títulos bajos durante un tiempo prolongado. (33).

Sin embargo, estos anticuerpos están poco relacionados con la protección frente a la infección, que es sobre todo de tipo celular, y sirven sólo como marcadores de la actividad de la infección. (175)

Tanto IgM como IgG son anticuerpos aglutinantes. (170)

IgM y algunas subclases de IgG (IgG_1) fijan el complemento, aunque IgM no lo haga en las condiciones en que se realiza la prueba (Tras inactivar los sueros a 56ºC durante 30 minutos). (97, 98, 173)

IgA pueden ser aglutinantes o no aglutinantes, pero no fijan el complemento. (98, 99)

En el curso de la enfermedad y posterior a los anticuerpos aglutinantes, aparecen anticuerpos bloqueantes, que son del tipo IgG e IgA, nunca IgM. (170, 139)

IV-II-C.- **Técnicas serológicas en el diagnóstico de brucelosis.**

Prácticamente todo tipo de pruebas serológicas descritas en la literatura han sido aplicadas en el diagnóstico de esta enfermedad. Hecho que probablemente se deba a que con ninguna prueba se puede garantizar el diagnóstico del 100% de brucelosis humana, y menos aún resolver el problema de si el paciente está curado o evoluciona hacia la cronicidad.

Todas las pruebas están basadas en una reacción antígeno-anticuerpo que se evidencia directamente o en una segunda etapa de la prueba.

Cabe mencionar como técnicas utilizadas en la actualidad en mayor o menor grado:

- Aglutinación directa.
- Reacción de fijación de complemento.
- Inmunofluorescencia indirecta.
- Test de Coombs indirecto.
- Hemaglutinación pasiva.
- Precipitación en medio sólido.
- Prueba de aglutinación con 2-Mercaptoetanol y Ditiotreitol
- Prueba del Rosa de Bengala.
- Tecnicas inmunoenzimaticas (ELISA).

Ninguna de estas pruebas por si sola es capaz de detectar específicamente la respuesta de un determinado tipo de inmunoglobulinas.

En general se admite que:

-la prueba de aglutinación en tubo detecta tanto IgM como IgG. (33, 170, 175)

-IgM y algunas subclases de IgG también fijan el Complemento, (aunque IgM no fija el complemento en las condiciones en que se realiza la prueba de RFC). (97, 173, 33, 139)

-Anticuerpos IgA pueden ser aglutinantes o no aglutinantes, pero no fijan el complemento . (98, 99)

- Los anticuerpos no aglutinantes de las clases IgA e IgG pueden ser demostrados por el test de Coombs indirecto (Antiglobulina) (99, 170,168, 33) o por las técnicas inmunoenzimáticas (46,2,13,24,29 32, 86, 87,110, 151, 198,160,161,163,133) o de inmunofluorescencia (61).

-Con las técnicas del 2-Mercaptoetanol y Ditiotreitol se pretenden eliminar las IgM que intervienen en la aglutinación normal, y medir solo las microglobulinas con capacidad aglutinante. (100, 118,21)

El antígeno usado en los test serológicos para detectar infección por *B. melitensis*, *B. abortus*,o *B. suis*, se preparan de suspensiones de brucelas en las que las colonias estaban en fase lisa. En algunos laboratorios se utilizan en paralelo antígenos preparados tanto de *B. abortus*, como de *B. melitensis*, sin que ello permita diferenciar las infecciones causadas por

las dos especies, ya que el antígeno fundamental en todas las reacciones serológicas (Excepto en las reacciones de precipitación en fase sólida - CIE-, en que se demuestran AC precipitantes frente a Antígenos proteicos) es el LPS de superficie en fase lisa, que es indistinguible en ambas especies.

Aunque en general se acepta que en fases iniciales de la enfermedad la respuesta serológica es fundamentalmente a base de IgM, pasando a hacerse predominante en el curso de la enfermedad la IgG, casi exclusiva en los casos crónicos, dado el carácter cada vez más atípico de la presentación de la enfermedad, la frecuencia con que aparecen reinfecciones o recaidas etc. existen grandes diferencias en las características de la curva de evolución de los anticuerpos de unos enfermos a otros.

Ya que en la mayoría de las pruebas serológicas mencionadas la respuesta de AC se mide sobre todo frente a LPS, no habiéndose podido demostrar que los AC frente a HN, Polisacárido B, o proteinas solubles intervengan en dichas pruebas, hoy día se están desarrollando técnicas para intentar poner en evidencia estos AC, tales como la Inmunodifusión Radial Inversa, que detecta AC frente a HN y Polisacárido B, y la precipitación en gel, Fijación de Complemento, y Hemaglutinación pasiva con hematies tanizados, utilizando como AG citosol de cepas en fase rugosa, que detectan AC frente a proteinas solubles del interior celular, aunque de momento no permite distinguir frente a que proteinas en concreto. (48,55)

IV-II-C-1.- *Técnica de aglutinación.*

Fuè descrita por Gruber y Durham en 1896, y utilizada por primera vez para el diagnóstico de fiebre de Malta por Wright y Smith en 1897, y con pocas modificaciones, que incluyen la aglutinación en tubo descrita por McCullough (116) y las más recientes técnicas de microaglutinación (79), es la más utilizada en la actualidad en el diagnóstico serológico de brucelosis, siendo en algunos paises en que la incidencia de la enfermedad es baja, como en los EEUU, la única técnica utilizada.

Requiere que el antígeno utlizado sea obtenido de *Brucella* en fase lisa para evitar los falsos resultados positivos obtenidos, si se usa antígeno de *Brucella* en fase rugosa , en ciertas enfermedades febriles (Kala-Azar, tifoidea, tuberculosis), e incluso en individuos sanos, lo que desacreditó la técnica en sus comienzos.

La mayoría de los pacientes con brucelosis aguda tienen títulos de anticuerpos de 1/160 o mayores, sin embargo en personas frecuentemente expuestas a *Brucella*, como manipuladores de ganado, veterinarios, etc. pueden aparecer títulos de este rango sin existencia real de la enfermedad, por lo que es preciso una interpretación cuidadosa de los resultados en estos casos; mas aún cuando el diagnóstico certero que se obtendría con la puesta en evidencia de seroconversión en los títulos de dos sueros secuenciales, muy rara vez es posible dado que por las caracteristicas del curso de esta enfermedad es difícil que el enfermo sea visto en consulta en las fases iniciales de la misma.(143, 33)

Entre las limitaciones que podrían señalarse a este test cabe citar:

-Existencia de fenómenos prozona, por exceso de anticuerpos, que pueden dar si se prueban solo los sueros a bajo título resultados falsos negativos. Este fenómeno prozona puede deberse también a la acción de anticuerpos bloqueantes, que recubren los antígenos, impidiendo su unión a anticuerpos aglutinantes. (170, 139, 33)

-No detección de anticuerpos incompletos (no aglutinantes), ni de AC bloqueantes, relativamente frecuentes en la brucelosis. (99)

-Existencia de reacciones cruzadas por similitud del LPS utilizado como AG entre *Brucella* y sobre todo *Yersinia enterocolítica* tipo 9, *Francisella tularensis y Vibrio cholera*. (22)

-No permite diferenciar de que tipo de brucelosis se trata. (173)

IV-II-C-2.-*Aglutinación con 2-Mercaptoetanol y con Ditoitreitol*

Desde 1968, y especialmente en la última década se ha introducido en el diagnóstico serológico de Brucelosis una modificación de la técnica de aglutinación clásica, que pretende poner en evidencia la existencia de AC IgG, a menudo enmascarados por los AC de la clase IgM.

Esta modificación consiste en el tratamiento previo de los sueros con el compuesto sulfidrilo 2-Mercaptoetanol (2ME) o con Dithiothreitol (DTT) capaces de destruir a una concentración adecuada de 0,0025 M a 0,005M , a pH entre 7 y 8 y a 37ºC, la IgM presentes en la muestra, por ruptura de de los puentes disulfuro. Concentraciones superiores a 0,01M, valores de pH mayores de 8, y temperaturas de incubación superiores a 40ºC producen formación de gel en la muestra que inutiliza la prueba.(100, 21, 128, 101, 6)

Con ambos compuestos se obtienen resultados similares, por lo que se recomienda utilizar DTT por sus caracterícticas de mejor olor y carecer de las propiedades irritativas del 2-ME.

La importancia de utilizar esta técnica radica en que para algunos autores la presencia de IgG anti-brucella es considerada un marcador de infección activa, y en pacientes con síntomas de enfermedad crónica la persistencia de anticuerpos IgG significa recrudescencia o persistencia de infección activa . (175, 33, 97, 27,142)

El pico en el título de AC aglutinantes totales se alcanza en el primer mes de iniciado el tratamiento para después declinar lentamente permaneciendo positivos durante varios años; mientras que las IgG 2-ME y DTT resistentes solo son demostrables, si la enfermedad evoluciona favorablemente, durante el primer año. (175, 65)

IV-II-C-3.-*Prueba del Rosa de Bengala.*

La prueba de aglutinación en porta **"Rosa de Bengala"**, que utiliza como antígeno una suspensión de brucelas matadas con calor, teñidas con rosa de bengala y suspendidas en un tampón de ácido láctico a pH 3,6, (antígeno desarrollado por Peitz D. en el U S. Dept. of Agriculture, Ames) ha sido utilizada ampliamente en el diagnóstico de brucelosis animal (19, 45, 54, 159), y desde los años setenta se ha introducido también en el diagnóstico serológico de brucelosis humana (28, 55, 129, 126).

Es una prueba cualitativa, que ha demostrado una mayor sensibilidad, especificidad y precocidad diagnóstica, que la prueba de aglutinación en tubo, sobre todo en los casos de brucelosis crónica. Mide esencialmente AC de la clase IgG. Al igual que aglutinación en tubo no detecta anticuerpos incompletos, y aparecen resultados falsos positivos en los casos de infección por *Yersinia enterocolytica* ser.9, *Vibrio cholera y Franciscella tularensis*. (33, 173)

Dada su fácil ejecución y su alta sensibilidad es una técnica propuesta por muchos como método de criba en grandes encuestas epidemiológicas, e incluso diversos autores la consideran como el primer método a utilizar en el diagnóstico de brucelosis humana. (33)

No es una prueba idónea para detección de antígenos proteicos, como algunos han sugerido (55), y su utilidad en LCR no está suficientemente

evaluada, así como los intentos de convertir a la misma en un test cuantitativo.

IV-II-C-4.-*Prueba de Coombs anti-Brucella*

La prueba de la **antiglobulina o test de Coombs anti-brucella**, fué aplicada por primera vez para el diagnóstico de la brucelosis humana por Wilson MM, y Merrifield EVO (171), basándose en la técnica de Coombs descrita para detección del factor Rh en células sanguíneas; se basa en la demostración de anticuerpos anti-*Bruella* no aglutinantes, y bloqueantes. Esencialmente consiste en la aglutinación por acción de un suero antiglobulina humana de una suspensión de *Brucella* sensibilizada con anticuerpos incompletos anti-*Brucella* presentes en el suero de enfermos con brucelosis.

Los títulos en la prueba de Coombs han de ser al menos iguales a los obtenidos con la técnica de aglutinación simple.

La importancia de esta prueba radica en que permite detectar anticuerpos incompletos de la clase IgG e IgA que predominan en la brucelosis crónica, así como anticuerpos bloqueantes (IgA) que pueden enmascarar una reacción positiva en la técnica de aglutinación en brucelosis agudas.(97, 99, 71,127)

IV-II-C-5.- *Reacción de Fijación de Complemento.*

La técnica de **Reacción de Fijación de Complemento** (RFC.), fue aplicada al diagnóstico serológico de brucelosis por primera vez por Larson en 1912.

Trabajos posteriores la hacían poco aconsejable en el diagnóstico de brucelosis aguda, con respecto a la técnica de aglutinación.

Una de las principales ventajas que se le otorga a la RFC es su utilidad para detectar microglobulinas (Sobre todo IgG 7S)), que parecen estar relacionadas con la actividad de la infección. (97, 139)

Una RFC positiva en casos donde la aglutinación es negativa y el test de Coombs positivo, sugiere que este Test de Coombs positivo se deba en parte a la presencia de microglobulinas.

Por RFC se pueden detectar también anticuerpos no aglutinantes de la clase IgG.

IV-II-C-6.- *Proteina C-reactiva.*

La Proteina C-reactiva (PCR), se considera en general un reactante de fase aguda similar a ceruloplasmina, haptoglobina, etc.

Se sintetiza primariamente por el higado, pero el mecanismo por el cual su producción aumenta es escasamente conocido. Parece influenciado por mediadores humorales, tales como pirógenos endógenos provenientes de leucocitos y prostaglandina PGE_1. (169, 136)

Fué descubierta en 1930 por Tillett y Francis (166), que observaron en suero de pacientes con enfermedad aguda de diversa índole, la presencia de una sustancia capaz de reaccionar con un polisacárido (Fracción C) extraido de pared celular del *Streptococcus pneumoniae*. La capacidad del suero de precipitar el Polisacárido C desaparece habitualmente en fase convalesciente, y no existe generalmente en individuos sanos.

El 90% de los adultos sanos tienen una concentración plasmática de PCR inferior a 3µg/ml; y el 99% menor de 10µg/ml. Los picos máximos de concentración de PCR suelen alcanzarse en las primeras horas del inicio de la enfermedad. (136)

La PCR está compuesta de 5 subunidades (polipéptidos no glicosilados) simples con un peso molecular de aproximadamente 23.000, unidas en forma no covalente y asociadas como un pentámero cíclico. (169)

PROPIEDADES FUNCIONALES DE PCR

Precipita sustancias solubles y aglutina sustancias particuladas.

Una vez unida a otras sustancias es un potente activador de la via del complemento que comienza con C1q. Es tan eficiente activador del complemento como las inmunolobulinas IgG, contribuyendo a fijar C4b y C3b, mediadores importantes en las reacciones de adherencia; asi mismo fija los complejos C5b-C9, que producen lisis de superficies celulares. (130,35)

La PCR se une selectivamente a los linfocitos T modificando algunas de sus funciones, suprime las reacciones de activación y agregación de las plaquetas, aumenta la actividad y motilidad de las células fagocíticas.

El papel de la PCR "in vivo" no se conoce, aunque bajo algunas circunstancias puede causar inflamación; así mismo, hay evidencias de que los depósitos locales de PCR pueden contribuir a la cronicidad de las lesiones en las vasculitis cutáneas.

Su aumento se ha demostrado tanto en enfermedades infecciosas como no infecciosas

La reacción de la PCR con otras sustancias es dependiente del calcio. Se une especificamente a fosforil colina, fosfátidos de colina, polianiones (DNA, acido hialurónico, heparina, etc.), policationes (protamina e histona), e hidratos de carbono.

"In vivo" se ha descrito la unión de PCR a células necróticas, lo que puede contribuir a la resolución y reparación de los tejidos. Probablemente también contribuya a detoxificar el suero de materias tóxicas procedentes del daño tisular. (136)

APLICACIONES DE LA MEDIDA DE CONCENTRACIONES DE PCR EN LA CLINICA PRACTICA EN LA ACTUALIDAD.

Se ha constatado un aumento en la producción de PCR de forma precoz en la mayoria de las formas de infección microbiana (115, 144, 114). Por este motivo su medida se ha mostrado útil en el manejo de septicemias neonatales y meningitis (137, 34, 14, 42 , 153,); facilita el reconocimiento de infecciones intercurrentes en Lupus Eritematoso Sistemico y leucemias (89, 109); de complicaciones infecciosas tras cirugía cardiaca (81), etc.

Asi mismo se ha encontrado en distintos estudios una buena correlación entre los niveles de PCR en suero y la respuesta al tratamiento de diferentes enfermadades infecciosas. (89, 150)

La concentración de PCR aumenta en procesos inflamatorios no infecciosos del tipo de colagenosis, Sindrome de Reiter, artropatia psoriasica, enfermedad de Crohn, etc.

En la actualidad no existe una pauta terapéutica que haya mostrado ser totalmente eficaz para evitar recidivas, o para alterar sustancialmente el curso de una brucelosis crónica; con cualquiera de las descritas hasta ahora, siguen apareciendo, fracasos terapeuticos y recaidas

Una vez que *Brucella* entra en el organismo invade los nódulos linfáticos regionales, y si no es destruida inmediatamente se multiplica e invade el torrente circulatorio, acantonándose en las células del Sistema Retículo Endotelial. en bazo, hígado, riñones, médula ósea y nódulos linfáticos distantes, donde están protejidos de la acción de muchos de los antibióticos para los que son sensibles "in vitro".

Para conseguir una correcta terapia en brucelosis , hemos de tener en cuenta los siguientes aspectos:

-El agente antimicrobiano debe penetrar intracelularmente, dada la tendencia a localizarse en el interior de las células del Sistema Retículo Endotelial de este microorganismo.

-Es necesaria una terapia prolongada para prevenir las posibles recaidas de la enfermedad, con lo que la posibilidad de fenómenos tóxicos debidos a fármacos se incrementa.

-La terapia debe instaurarse lo mas precoz posible, sin esperar a la confirmación bacteriológica, si existe apoyo diagnóstico serológico precoz.

-Al no existir un fármaco que por si sólo sea eficaz en el tratamiento de brucelosis, habitualmente hay que recurrir a la combinación de diferentes antibióticos que potencien su efecto.

Son muchos los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la brucelosis, de ellos los que se han mostrado como más útiles son :

-Tetraciclinas: Tiene una CMI menor de 1µg/ml. Su dosis efectiva es de 0,25 a 0,50 g cuatro veces al día, de acuerdo con el peso del paciente (64). Utilizada sola son frecuentes las recaidas, que disminuyen cuando se asocia a otros fármacos del tipo de estreptomicina, rifampicina o SXT (108). Es más efectiva y menos tóxica que la asociación clásica de estreptomicina más sulfadiazina. No puede ser utilizada en niños ni en embarazadas por sus efectos colaterales. Hoy día tiende a usarse con mayor asiduidad la Doxiciclina , a la dosis de 200mg día, que posee la ventaja de su larga vida media, lo que permite su administración en pocas dosis. (7, 8, 23, 66)

-Estreptomicina: Su utilización junto con tetraciclinas, a la dosis de 1 g día im, durante las 2 o 3 primeras semanas, parece disminuir la aparición de recaidas, y el desarrollo de complicaciones localizadas. Presenta los problemas de otctoxicidad y existencia de un alto porcentaje de cepas

resistentes. (Feiz JM 1969; Fountain NW 19850) Diferentes estudios han mostrado que gentamicina y Kanamicina son más activos in vitro frente a Brucella que estreptomicina, pero su utilización en clínica no se ha implantado. (167)

-Trimetoprim-sulfametoxazole. Usado altas dosis (480mg de trimetoprim / 2400 mg de sulfametoxazole) y durante al menos 4 semanas se ha mostrado útil en el tratamiento de la brucelosis; presentando pocos efectos colaterales. Utilizado solo es alto el indice de recaidas. (103, 90, 82, 41, 23, 7)

-Rifampicina: Es el fármaco más recientemente introducido en el tratamiento de la enfermedad, dada su excelente penetración dentro de los fagocitos y en el SNC. En brucelosis se usa habitualmente a una dosis de 900mg/dia en una sola toma. No debe usarse sola, ya que se han descrito rápida aparición de resistencias. (8, 23, 107)

Basándose en la alta sensibilidad de *Brucella* a los fármacos expuestos, cada grupo de trabajo tiende a emplear pautas terapeuticas con matices propios.

En la última reunión del comité de expertos en brucelosis de la OMS celebrada en Genova en 1986 (173), se han dictado las siguientes recomendaciones terapéuticas en el tratamiento antibiótico de la enfermedad:

Brucelosis aguda:

-Rifampicina 900mg/dia, asociada a doxiciclina 200mg/día; durante al menos 6 semanas.

-Trimetoprim sulfametoxazole (160mg de Trimetoprim mas 800mg de sulfametoxazole) tres veces al día durante 2 semanas , seguidas de 2 veces al día durante 4 semanas más. Asociado a alguno de los fármacos anteriores y a estreptomicina.

-En embarazo la droga de elección es la rifampicina.

Brucelosis crónica.

Habitualmente se precisa más de un curso de tratamiento de los expuestos. Cuando la respuesta al tratamiento prolongado y repetido es pobre, hay que buscar un posible foco de infeción.

Por otro lado muchas de las manifestaciones de brucelosis crónica parecen tener un mecanismo de reacción autoinmune, por lo que habrá que recurrir a otros medicamentos distintos de los antibióticos.

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

De todo lo expuesto en la introducion podemos concluir que si bien para el diagnóstico inicial de la Brucelosis en general no existen problemas, con los métodos de cultivo y serológicos utilizados rutinariamente en clínica, si pueden presentarse éstos en determinadas situaciones como son:

-Presencia de serología positiva en personas en estrecho contacto con animales posiblemente enfermos, en razón de su profesión (Veterinarios , matarifes, etc), o por residir en zonas donde la enfermedad existe de forma endémica, sin manifestaciones clínicas evidentes, y con cultivos a *Brucella* negativos, lo que dificulta la interpretación de los resultados.

-Inicio solapado de la enfermedad, con pocas manifestaciones clínicas , que hacen que el enfermo en muchas ocasiones se diagnostique en una fase muy avanzada del proceso, donde la respuesta serológica es muy dispar, y los cultivos suelen ser negativos por encontrarse el microorganismo acantonado en las células del SRE..

-Comienzo de la enfermedad de manera focalizada, sin prácticamente respuesta serológica.

Más problemas plantea el seguimiento clínico de los enfermos tras el diagnóstico inicial, ya que este resulta con frecuencia difícil de valorar, y no existen unos criterios bien establecidos que nos permitan afirmar la curación del proceso, y en este punto el valor de la serología convencional es al menos cuestionable, ya que es poco lo que se conoce del comportamien-

to de las distintas pruebas serológicas utilizadas rutinariamente en cuanto a su comportamiento en las diferentes situaciones clínicas que pueden presentarse en el curso de la enfermedad (Recaidas, evolución a cronicidad, fracaso terapeutico, etc), por falta de estudios prospectivos, bien controlados y con suficiente numero de enfermos como para extraer conclusiones fiables.

De igual forma no existen estudios que permitan extraer conclusiones sobre la eficacia de las pruebas serológicas clásicas para evaluar la respuesta al tratamiento en enfermos con brucelosis.

Por todo ello en la actualidad se tiende a buscar nuevas técnicas de laboratorio que nos permitan realizar un control de estos enfermos con mayor confianza (ELISA, Western-blot etc). No obtante se hace necesario antes de pasar a la utilización en clínica práctica de estas nuevas metodologías, el realizar un estudio prospectivo, bien diseñado y con suficiente número de enfermos como para poder extraer conclusiones válidas con respecto al comportamiento de los test serológicos utilizados habitualmente en las diferentes situaciones clínicas que pueden presentarse en el curso de brucelosis, así como en la evaluación de la respuesta al tratamiento correcto de la enfermedad.

En la ultima reunion del Comité de Expertos en *Brucella*" de la OMS, se recomienda profundizar en la importancia que pueda desempeñar en el diagnóstico de brucelosis humana la utilización del test "Rosa de Bengala", prueba de fácil ejecución, que permite su utilización en areas rurales don

de no es posible disponer de los medios técnicos necesarios para realizar las restantes pruebas serológicas para el diagnóstico de brucelosis, además de la rapidez en la obtención de resultados; por lo que consideramos de interés el contrastar dicha técnica con las habitualmente utilizadas dentro de un amplio estudio prospectivo. cuantificando la reacción.

La determinación de la concentración de PCR se ha mostrado util como marcador inespecífico, para el seguimiento de infecciones bacterianas, así como para evaluación de la respuesta al tratamiento en las mismas. Por ello consideramos de interés el comprobar la posible utilidad de este marcador inespecífico en el control evolutivo y de respuesta al tratamiento de los enfermos con brucelosis.

En el tratamiento de brucelosis existe gran controversia sobre cual es la pauta más idónea a utilizar. Siguiendo las recomendaciones del Comité de Expertos en Brucelosis de la OMS, en cuanto a los antibióticos a utilizar en esta enfermead, hemos diseñado dos pautas de tratamiento, para evaluar dentro de este estudio prospectivo.

Dado que nos encontramos en una de las zonas con mayor tasa de brucelosis, con lo que ello supone desde el punto de vista sanitario, y económico, consideramos necesario la realización de este estudio con el fin de mejorar en la medida de lo posible la asistencia a los pacientes afectos de esta enfermedad, de evolución muchas veces tórpida, con alto índice de fracasos terapéuticos y de difícil erradicación, por lo qua es presumible que debamos enfrentarnos a este problema durante bastante tiempo.

II.-OBJETIVOS

1.- Evaluar la eficacia como marcadores evolutivos clínico terapéuticos, de las pruebas serológicas clásicamente usadas en el diagnóstico de brucelosis.

2.- Papel que pueden desempeñar reactantes inespecificos de fase aguda, tipo PCR , como control del tratamiento y evolución en brucelosis.

3.- Contrastar los resultados obtenidos con tecnicas que detecten anticuerpos similares, con el fin de obtener conclusiones prácticas que permitan reducir la diversidad de pruebas utilizadas en diagnóstico de brucelosis.

4.-Evaluar la eficacia de 2 pautas terapeuticas diferentes en brucelosis, sobre enfermos adultos perfectamente controlados.

A/ Estreptomicina 1 g/dia (21 dias) + Doxiciclina 100mg/12h (45 dias)

B/ Doxiciclina 100mg/12h (45 dias) + Rifampicina 900mg/dia (45 dias).

MATERIAL Y METODOS

I.-PRESENTACION DE LA POBLACION ESTUDIADA Y CONTROLES REALIZADOS.

I-I.-ENFERMOS

Se han estudiado 86 enfermos sin historia previa de infección por *Brucella*, diagnosticados por primera vez de brucelosis, por tener clínica compatible y cumplir uno de los siguientes criterios:

-Hemocultivo positivo a microorganismos del género *Brucella*,

y/o

-Título de anticuerpos frente a *Brucella* detectados por aglutinación mayor o igual a 1/80,

y/o

-Título de anticuerpos frente a *Brucella* detectados por test de Coombs indirecto mayor o igual a 1/320.

Así, el diagnóstico se produjo:

-Sólo por hemocultivo positivo: 7 pacientes.

-Hemocultivo positivo + Aglutinaciones >= 1/80: 1 paciente.

- " + Test de Coombs >= 1/320: 5 "

- " + " " " " " + Aglutinación >= 1/80: 32 pacientes.

-Aglutinaciones >= 1/80 + Test de Coombs >= 1/320: 30 pacientes.

-Solo test de Coombs >= 1/320: 14 pacientes.

69 eran varones y 17 hembras.

La distribución por edades fué:

- Entre 0 y 10 años: 0
- " 11 y 20 " : 10
- " 21 y 30 " : 16
- " 31 y 40 " : 15
- " 41 y 50 " : 12
- " 51 y 60 " : 23
- " 61 y 70 " : 9
- Mayor de 71 " : 1

El enfermo de menor edad tenía 14 años y el de mayor edad 71. (No atendimos pacientes pediátricos).

I-II.-SEGUIMIENTO CLINICO

Se llevó a cabo en una consulta creada en el Servicio de Medicina Interna de la Ciudad Sanitaria "Virgen de las Nieves" de Granada para tal fin.

A todos los enfermos se les realizó el control clínico, atendiendo a la presencia de los siguientes datos:

Edad..... Fecha de consulta.....Sexo..... Estado civil.....

Trabajo actual.....Carnet de manipulador SI... NO...

Antecedentes personales:

Fumador	SI...	NO...	Ulcus	SI...	NO...	BRUCELOSIS	SI...	NO...
Alcoholismo	...	...	Antiacidos	...	...	Fecha	Tratamiento	
Diabetes	...	...	Artropatía	...	...	.....	.....	
Hepatopatias	...	...	Otros.....			.....	.....	

Mecanismo de contagio:

VIA DIGESTIVA SI... NO...

...Leche cruda		...Agua
... " Hervida	...Cabra	...Carnes
... " Envasada	...Vaca	...Verduras
...Queso fresco	...Oveja	...Sangre
... " curado	...Otros	...Visceras
...Mantequilla.		...Otros
...Calostros	...Requeson, Helados	

CONTACTO DIRECTO SI... NO... Erosiones cutáneas SI... NO...

...Contacto animal ...Cabra ...Manipulacion laboratorio

...Ordeño ...Vaca ...Transfusiones

...Abortos, partos ...Oveja ...Picaduras

...Carnes enfermas ...Cerdos ...Autoinoculación en vacunación

...Piel de animales ...Otros animal

...Estiercol... ...Venerea.

Caracteristicas de la vivienda:

...Entrada común para personas y animales

...Comunica con lugares donde estan animales

...Separada de los animales.

¿Los animales están vacunados? SI... NO...

FUENTE DECONOCIDA ...

DATOS CLINICOS:

Periodo de incubación.....

Sintomas iniciales.....

Forma clínica de comienzo: Aguda... Atenuada... Tóxica... Visceral...

Dias inicio admisión.....

Tratamiento previo: Farmacos.....

Duración

Síntomas

	SI	NO
Fiebre		
Escalofrios		
Sudoración		
Malestar general		
Astenia		
Anorexia		
Perdida de peso		
Mialgias		
Artralgias		
Dolor abdominal		
Nauseas		
Vómitos		
Estreñimiento		
Diarrea		
Pirosis		
Dolor de columna		
Dolor sacroiliaco		
Tos		
Expectoración		
Dolor torácico		
Disnea		
Insomnio		
Depresión		
Impotencia		
Cefaleas		
Mareos		
Vértigos		
Alt. de marcha		
" " visión		
Sdrome miccional		
Dolor testicular		
Alt. menstruales		

Signos clínicos

Fiebre SI... NO...

Continua ... ...

Ondulante ... ...

Agujas ... ...

Frecuencia cardiaca.....

Tensión arterial.....

Palidez SI... NO...

Ictericia ... ...

Adenopatías ( ) ... ...

Exantema ... ...

Abscesos cutáneos ... ...

Ulceras piel ... ...

Eritema nodoso ... ...

Púrpura ... ...

Hepatomegalia ... ...

Esplenomegalia ... ...

Hemorragia digestiva.. ...

Ulceras bucales ... ...

Epixtasis ... ...

Bronquitis ... ...

Neumonía ... ...

Derrame pleural ... ...

Hemoptisis ... ...

Absceso pulmonar ... ...

Adenopatía hiliar SI... NO...

T.E.P. ... ...

Tromboflebitis ... ...

Endocarditis ... ...

Ulceras en cornea ... ...

Queratitis ... ...

Uveitis ... ...

Papiledema ... ...

Atrofia óptica ... ...

Retinitis ... ...

Iridociclitis ... ...

Meningoencefalitis ... ...

Ciática ... ...

Polineuritis ... ...

Hemorragia subaracnoidea. ...

Orquiepididimitis ... ...

Infección urinaria ... ...

Pielonefritis ... ...

Anexitis ... ...

Bursitis ... ...

Artritis ( ) ... ...

Sacroileitis ( ) ... ...

Espondilitis ( ) ... ...

Osteomielitis ... ...

Nódulo pulmonar ... ... Absceso paravertebral.. ...

Exploraciones complementarias

ECG.....

Radiología: Torax.....

Abdomen.....

Osea.....

Ecografía abdominal

Otros/Clínica.....

PRUEBAS BIOQUIMICAS

Hematíes.....	Glucosa.....	Bilirrubina D.....
Hemoglobina.....	Urea.....	" I.....
Hematocrito.....	Creatinina.....	" T.....
VCM.....	Cloro.....	Proteinas totales....
CHM.....	Sodio.....	Albumina.....
CHCM.....	Potasio.....	Alfa 1.....
Reticulocitos.....	Hierro.....	Alfa 2.....
Leucocitos.....	Acido urico....	Beta.....
Neutrófilos.....	Calcio.....	Gamma.....
Cayados.....	Fosforo.....	Albuminuria.....
Linfocitos.....	Colesterol.....	Hematuria.....
Eosinófilos.....	Triglicéridos...	Urobilinuria.....
Monocitos.....	Fibronectina....	Piuria.....

Basófilos..... GOT..... Cilindros.....

Metamielocitos..... GPT..... IgG.....IgA.... IgM...

VSG..... Fosfat. Alcalina. Test de etanol.....

PRUEBAS DE COAGULACION

Plaquetas.....

Actividad de Protrombina.....

TTPA.....

PDF

ESTUDIO LCR

Células.....

Glucosa.....

Pandy.....

Proteinas.....

Inmunoglobulinas...

ESTUDIO LIQUIDO PLEURAL

Células .....

Proteinas.....

Glucosa.....

Hematies.....

.....

Los enfermos fueron revisados clínicamente a diario durante un mínimo de 10 días, tras el diagnóstico inicial, y posteriormente fueron citados a consulta a los 45 días, 6 , 12, 18, y 24 meses; y siempre que surgió algún problema evolutivo.

Se descartaron todos aquellos pacientes con historia anterior de brucelosis.

Al final del estudio la distribución de los enfermos en cuanto al tiempo de seguimiento fué, una vez descartados aquellos controlados menos de 6 meses:

- Seguimiento durante 24 meses: 9
- " " 18 " : 25
- " " 12 " : 27
- " " 6 " : 24

I-III.-CONTROL BACTERIOLOGICO

Se tomaron muestras de sangre para hemocultivos a todos los enfermos en la primera consulta, y previo a cualquier tratamiento antibiótico.
A cada paciente se le extrajeron tres tomas para hemocultivo de 5 ml con intervalos de 30-45 minutos, que se inocularon en frascos Bactec NR 6A de 30 ml.

La lectura de los frascos se realizó por sistema Bactec NR-730 (Becton Dickinson Labs.), que detecta el crecimiento bacteriano por medida de la concentración de dióxido de carbono liberado en el frasco, a las 18 y 48 horas, y a los 10 días de incubación.

En todos aquellos casos en que no se obtuvo resultado positivo pasados los 10 días, se realizó un pase ciego a los 10 y 14 días en agar chocolate , que se mantuvo 48 horas de incubación en atmósfera rica en CO_2 (5-7%), antes de ser descartado como negativo.

Por otro lado se realizaron hemocultivos siempre que surgió algún problema evolutivo.

Efectuamos cultivo para descartar infección por *Brucella* de todas aquellas muestras, aparte de sangre, que en cualquier momento del seguimiento clínico, se considerara que podrían aportar datos de interés sobre la evolución y complicaciones en cada caso : LCR, líquido sinovial, biopsia hepática, colección líquida en orquitis, etc.

I-IV.-SEGUIMIENTO SERO[illegible]ICO

Fué realizado por nosotros en el Servicio de Bacteriología de la Ciudad Sanitaria "Virgen de las Nieves".

A todos los enfermos se le extrajeron muestras de suero para estudio serológico en la primera consulta, a los 45 días de evolución (Postrata-

miento), a los 6, 12, 18 y 24 meses, coincidiendo con las revisiones clínicas; así mismo realizamos control serológico siempre que se consideró que existía algún problema evolutivo.

En la fecha de la extracción a todos los sueros se les realizaron las técnicas serológicas de :

-Microaglutinación directa.

-Test de Coombs antibrucelas.

-Rosa de Bengala cuantificado.

El resto de suero que no se utilizó para estas pruebas se mantuvo congelado a -40ºC en alicuotas, para la realización posterior de las técnicas:

-Reacción de Fijación de Complemento.

-Microaglutinación con 2-Mercaptoetanol.

- " " Ditiotreitol.

Se consideró que existía diferencia significativa desde el punto de vista serológico para cada una de las técnicas, con la serie de sueros de cada enfermo, cuando existía variación en 2 o más diluciones entre los sueros probados en las distintas revisiones, realizados en paralelo.

A todos los sueros se les determinó, partiendo de las alicuotas congeladas , la concentración de Proteina C-reactiva, por el sistema TDx y la Velocidad de Sedimentación Globular.

Todos estos resultados fueron anotandose en fichas similares a las que siguen:

Enfermo.....Edad..... Sexo.....nº.....

Hemocultivo: Positivo... Negativo... Fecha:.....

Recaida: Si... No.. Fecha:.....

Otros cultivos: Muestra.....Resultado.....Fecha:.....

Tratamiento: A... B...

Evolución:Buena... Mala... (Recaida..., Fracaso terapeutico...,
Cronicidad...,localización...)

Control serológico

	Suero	Fecha	AGL	Coombs	RB	RFC	2-ME	DDT	PCR	VSG
Inicial										
45 dias										
6 meses										
12meses										
18meses										
24meses										
Otros										

A su vez se realizó una ficha por técnica serológica con el siguiente formato

Técnica.....

Enfermo nº	Sueros						
	Inicial	45 dias	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses	Otros

II.-PAUTAS TERAPEUTICAS ENSAYADAS.

Incluimos en el estudio 2 pautas terapéuticas diferentes, denominadas como A y B :

A: Streptomicina 1 g/dia (21 dia) + Doxiciclina 100mg/12h (45 dias)

B: Doxiciclina 100 mg/12h (45 dias) + Rifampicina 900mg/dia (45 dias)

La inclusión de cada enfermo en uno u otro protocolo se realizó inicialmente atendiendo al orden de entrada en el estudio de forma alterna, es decir, a los impares se les trató con la pauta A y a los pares con la B, con independencia de la edad y sexo.

Dado que los primeros fracasos terapéuticos y recaidas se produjeron en enfermos tratados con la pauta B, y ante la evidencia clínica de una mejor respuesta a la pauta A, se optó por tratar al resto de enfermos una vez conseguido un grupo de 32 casos para cada pauta, sólo con la pauta A, utilizándose la B en aquellos casos de mala evolución tratados con pauta A inicialmente.

Atendiendo al tratamiento inicial el numero de enfermos que recibió cada una de las pautas fue:

-Pauta A: 54 enfermos.

- " B: 32 " .

III.-CRITERIOS DE MALA EVOLUCION

Consideramos que existió mala evolución de los pacientes, si se dió alguno de las siguientes parámetros:

-Fracaso terapéutico: Entendiendo por tal la persistencia durante más de 10 días tras iniciado el tratamiento de uno de los síntomas o signos mayores de la enfermedad (fiebre, visceromegalia, focalidad, etc..).

-Recaida: Reactivación de los síntomas iniciales, tras curación aparente , con cultivo positivo a la cepa de *Brucella* causante del proceso inicial.

-Cronificación: Persistencia de sintomatología durante mas de 6 meses.

-Complicación: Localización del proceso en un organo o tejido determinado (Meningitis, espondilitis, orquitis , etc..), tras correcto tratamiento.

IV-I.-AGLUTINACION CUANTITATIVA.

IV-I-A.-*Fundamento.*

Capacidad de inmunoglobulinas de bajo y alto peso molecular (IgG e IgM) existentes en el suero de enfermos con brucelosis de aglutinar antigeno lipopolisacárido (LPS) de *Brucella*.

La reacción de aglutinación consiste en la agrupación de partículas matrices (Células o material sintético) antígenos en si mismas, o unidas de forma covalente o adsorvidas a determinados antígenos solubles y originariamente en suspensión, por anticuerpos frente a dichos antígenos denominados aglutininas (127).

La reacción de aglutinación se produce en 2 fases.

- Combinación específica de antígeno y anticuerpo.
- Visualización de la agregación de partículas.

Ambas fases están mediadas por la atracción especifica entre anticuerpo y antígeno.

Las partículas matrices utilizadas en esta reacción tienen en superficie una ligera carga negativa, que hace que de forma natural tiendan a repelerse. Las inmunoglobulinas aglutinantes actúan como puentes de unión entre

estas partículas, formando conglomerados que facilitan la visualización de la reacción.

Cuando a pesar de producirse unión de Ag-AC en una primea fase no se produce unión entre partículas se habla de *Aglutinación incompleta*. En estos casos la reducción de la carga iónica del medio con proteina o solutos inorgánicos, reduce la distancia entre partículas, facilitando la formación de puentes de unión por AC, y la consiguiente reacción de aglutinación.

De igual manera parece ser que la viscosidad del medio es otro importante factor favorecedor de la reacción de aglutinación, por lo que la adición de polímeros de baja carga, tales como dextrano aumentan la aglutinación.

Los anticuerpos IgM, en base sobre todo a su tamaño, son mucho más eficientes aglutinantes que las IgG e IgA (750 veces más aglutinantes), produciendose más reacciones de aglutinación incompleta con IgG e IgA (127).

El fenómeno *prozona* consiste en la no visualización de reacción de aglutinación a pesar de existir en el suero AC altamente aglutinantes en altos niveles, y puede deberse a:

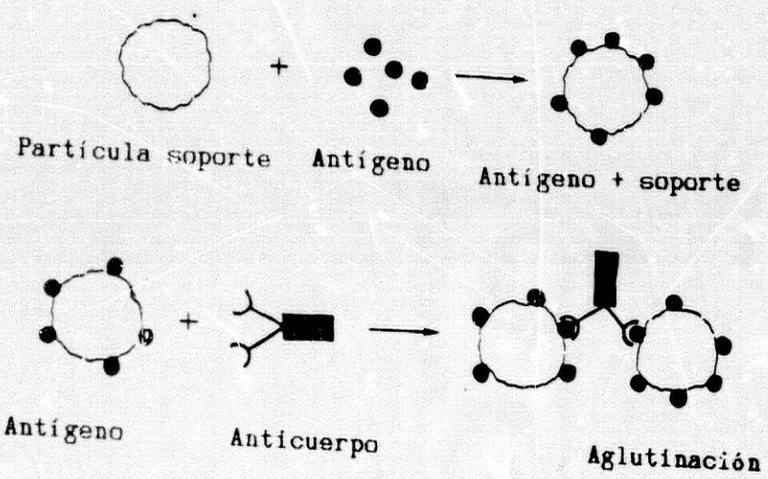
-Presencia de altas tasas de AC "Bloqueantes": AC que unidos específicamente a los AG ocupan los lugares de unión de los AC aglutinantes, impidiendo la reacción.

-Existencia de una concentración excesiva de antígeno.

-Alteración de las proteinas del suero (pe mala conservación).

-Cantidad excesiva de material coloide extraño a la reacción, que de alguna manera actúa como alfombrilla que cubre los puntos de unión de AC a AG.

Fig.1 Reacción de aglutinación



IV-II-B.-**Descripción de la técnica de aglutinación.**

Utilizamos como antígeno suspensión bacteriana de *Brucella abortus* cepa 19 (Cromatest) suministrada por los laboratorios Knickerbocker (M101).

La determinación se efectúa ensayando diluciones dobladas del suero problema, en solución salina, con volumenes iguales de suspensión antigénica estandarizada. (El titulo de 1/80 obtenido con este antígeno en aglutinación utilizando como suero anti-*Brucella* el II patrón internacional de suero anti-*Brucella abortus* preparado por el Central Veterinary Laboratory de Weybridge, se corresponde aproximadamente con 100 U.I., título límite menor fijado por la OMS para considerar diagnóstico de brucelosis en técnica de aglutinación). Tras su incubación se determina la dilución más alta de suero que presenta aglutinación en presencia del antígeno específico.

En nuestro estudio hemos realizado una modificación de la prueba clásica en tubo, adaptando los volúmenes de reactivo a utilizar al sistema microtiter, lo que nos permite de modo mucho más simple el poder realizar la prueba a la vez con un número elevado de sueros.

Para ello en lugar de tubos utilizamos placas microtiter fondo U de 96 pocillos (8x12), de modo que para cada suero en principio utilizamos una columna de 8 pocillos (de A a H), por lo que se pueden probar 12 sueros por placa.

Procedimiento:

1.- Preparar una dilución previa de cada suero problema y de un control positivo y otro negativo al 1/20 en solución salina isotónica (0,85%); y colocar 50µl de cada una de estas diluciones en el primer pocillo de de la columna asignado a cada suero.

2.- Rellenar el resto de pocillos de la placa con 50µl de SS isotónica.

3.- Doblediluir, utilizando pipeta multicanal de 50µl o microdiluidor automático de 50µl, todos los sueros desde los pocillos A a H. Con lo que tendremos cada suero diluido de 1/20 a 1/2560.

4.- Poner 50µl de suspensión antigénica estandarizada (Título 1/1000 con el International Standard Serum del Weybridge Veterinary Laboratory; que se aproxima bastante a una suspensión antigénica con grado de turbidez 2 en la escala de McFarland) en todos los pocillos de la placa. De este modo cada suero queda doblediluido de 1/40 a 1/5120.

5.- Agitar la placa, cubrir con parafilm, e incubar a 37ºC durante 18 horas.

Lectura e interpretación de resultados:

Se lleva a cabo en espejo lector de placas microtiter.

La interpretación de la reacción en cada pocillo se determina como sigue:

-4+ (Aglutinación completa en todo el fondo del pocillo).

-3+ (Aglutinación aparente en el 75% del fondo del pocillo).

-2+ (Aglutinación en 50% del fondo del pocillo).

-1+ (Aglutinación tenue, con predominio del boton de sedimentación de las partículas no aglutinadas.).

-Negativo (No hay evidencia de aglutinación. Se aprecia botón central por sedimentación de las partículas no aglutinadas).

El título para cada suero viene dado por la mayor dilución del mismo que muestre al menos el 50% de aglutinación (2+).

IV-II.-TEST DE COOMBS

*IV-II-A.-**Fundamento.***

Utilización de antiglobulinas humanas como un segundo anticuerpo que se une a aquellos anticuerpos incompletos, no aglutinantes o anticuerpos bloqueantes, que de un modo u otro no provocan la reacción de aglutinación o la inhiben (127).

El fin de la reacción es la aglutinacion por acción de un suero antiglobulina humana de una suspensión de *Brucellas* sensibilizadas con los anticuerpos incompletos antibrucella, presentes en el suero de enfermos con brucelosis.

En diagnóstico de brucelosis se utiliza el test de Coombs "indirecto", indicando de esta forma que previamente se ha de producir una fase de sensibilización de los antígenos de *Brucella* con el suero del enfermo; a diferencia de la técnica "directa" en que partimos de antígenos que suponemos sensibilizados, técnica utilizada habitualmente para detectar problemas de incompatibilidad de grupos sanguíneos.

IV-II-B.-**Descripción de técnica de test de Coombs.**

Antígeno: Utilizamos la misma suspensión bacteriana empleada en microaglutinación, de *Brucella abortus* cepa 19 (Cromatest) suministrada por Knickerbocker .

Dado que esta suspensión es una mezcla de antigeno corpuscular (Célula bacteriana), y antígeno disuelto (Liberado de la misma), y ya que como demostró A. Foz se obtienen mejores resultados en el test de Coombs utilizando antígeno corpuscular puro, siguiendo sus indicaciones eliminamos el antígeno disuelto de la suspensión bacteriana.

Para obtener solo antígeno corpuscular, sometemos la suspensión bacteriana a centrifugación de 5.000-10.000 rpm durante 20 minutos; retiramos el sobrenadante y añadimos otro volumen igual al inicial de suspensión bacteriana, y centrifugamos tres veces más en las condiciones expuestas, retirando en cada caso el sobrenadante y reconstituyendo con volumenes iguales de solución salina isotónica, recientemente preparada.

Antes de utilizar el antígeno en la prueba debe someterse a agitación durante 2 horas en cámara fria (4ºC).

Sueros de enfermos: No deben utilizarse sueros muy hemolizados. El suero puede estar tanto activado como inactivado. Una vez obtenido el suero puede conservarse 2 o 3 días a 4ºC; si se ha de mantener durante más tiempo debe quedar congelado a -20ºC o -40ºC.

Suero antiglobulina humana: Utilizamos el suministrado por Knickerbocker , obtenido en ratón, a una dilución 1/20.

Al igual que en técnica de aglutinación, en nuestro estudio hemos adaptado la técnica de Coombs antibrucelar en tubo, para poder realizarla en sistema microtiter, utilizando placas de 92 pocillos y con distribución de sueros por placa similar a la realizada en microaglutinación.

Procedimiento

Esta técnica se realiza en dos tiempos separados por un intervalo de 18 horas.

1er. dia.: Los detalles técnicos en cuanto a la dilución de los sueros y adición de suspensión antigénica (En este caso solo antígeno corpuscular), son en todo similares a los realizados en prueba de microaglutinación.

2º día:

1.- Tras incubación, centrifugar las placas tres veces a 5.000 rpm durante 15 minutos, retirando el sobrenadante en cada caso y reconstituyendo con 150µl de SS, agitando las placas entre cada centrifugación.

2.- Después de última centrifugación , retirar el sobrenadante y añadir a cada pocillo 100µl de suero anti-humano. Agitar las placas, precintar e incubar a 35ºC durante 18 horas.

Lectura e interpretación de resultados

Los criterios son similares a los seguidos con técnica de microaglutinación; en general consideramos:

-Presencia de botón en fondo del pocillo .....Negativo.

-Ausencia " " " " " " .....Positivo.

El título para cada suero vendrá dado por la mayor dilución en que se aprecie ausencia de botón.

Como en aglutinación los títulos en principio pueden ir desde 1/40, hasta 1/5120. Los sueros que mostraron positividad a dilución 1/5120, se probaron a más diluciones hasta obtener el título real.

IV-III.-REACCION DE FIJACION DECOMPLEMENTO

IV-III-A.-Fundamento.

Se basa en la capacidad de determinados tipos de anticuerpos presentes en el suero de enfermos con brucelosis, de formar complejo con el antígeno brucelar con capacidad para fijar el complemento , inhibiendo la lisis de hematies por hemolisina activada si existe complemento libre (132).

La ausencia de hemolisis indica fijación de complemento en la prueba por los complejos AG-AC. Dado que los sueros de los enfermos contienen complemento residual, estos deben ser inactivados durante 30 minutos a 56ºC antes de ser probados (132).

Se han descrito muchas variantes técnicas de esta prueba, desde las que pretenden la fijación del complemento en un corto periodo de tiempo (1 hora 30 minutos) incubando a 37ºC; hasta las que prolongan este proceso durante 18 horas incubando en frío (4ºC).

La microtécnica utilizando volúmenes de los diferntes reactivos de 25µl, y placas microtiter facilita la automatización de la técnica y su realización con alto número de sueros.

El procedimieno requiere una cuidadosa predeterminación de todas las concentraciones de cada uno de los distintos componentes que intervienen en la reacción.

IV-III-B.-**Valoración de componentes**

Para ello seguimos el procedimiento propuesto por Grist (64-bis), estandarizando por un lado complemento y hemolisina, y por otro suero control positivo y antígeno.

En ambos casos la técnica se realiza enfrentando diluciones dobladas de cada uno de los pares de componentes a valorar en tablero de ajedrez, utilizando para ello placas microtiter.

Para estandarizar complemento y hemolisina se utilizan 12 diluciones de complemento en tampón Veronal (de 1/32 a 1/298), con un 20% de diferencia entre cada dilución, y 7 diluciones de hemolisina en solución de hematíes al 2% (de 1/50 a 1/3200).

La técnica se realiza en dos tiempos, separados con un intervalo de 18 horas; en una primera fase se añaden las dilucines de complemento, tras rellenar todos los pocillos de la placa con 50µl de MC, y tras incubación en frío durante 18 horas se añaden las distintas diluciones de hemolisina, con lo que el contenido de cada uno de los pocillos de la placa quedaría como sigue. (Figura 2)

Fig 2.- Contenido de los pocillos en placa microtiter, para la valoración de Complemento y hemolisina.

diluciones complemento

	32 1	40 2	50 3	62 4	90 5	122 6	152 7	190 8	238 9	298 10	TH 11	12
A	C32 H50	C40 H50	C50 H50	C62 H50	C78 H50	C90 H50	C122 H50	C152 H50	C190 H50	C238 H50	C298 H50	H50
B	C32 H100	C40 H100	C50 H100	C62 H100	C78 H100	C90 H100	C122 H100	C152 H100	C190 H100	C238 H100	C298 H100	H100
C	C32 H200	C40 H200	C50 H200	C62 H200	C78 H200	C90 H200	C122 H200	C152 H200	C190 H200	C238 H200	C298 H200	H200
D	C32 H400	C40 H400	C50 H400	C62 H400	C78 H400	C90 H400	C122 H400	C152 H400	C190 H400	C238 H400	C298 H400	H400
E	C32 H800	C40 H800	C50 H800	C62 H800	C78 H800	C90 H800	C122 H800	C152 H800	C190 H800	C238 H800	C298 H800	H800
F	C32 H1600	C40 H1600	C50 H1600	C62 H1600	C78 H1600	C90 H1600	C122 H1600	C152 H1600	C190 H1600	C238 H1600	C298 H1600	H1600
G	C32 H3200	C40 H3200	C50 H3200	C62 H3200	C78 H3200	C90 H3200	C122 H3200	C152 H3200	C190 H3200	C238 H3200	C298 H3200	H3200
H	C32	C40	C50	C62	C78	C90	C122	C152	C190	C238	C298	

= 1vol de MC (25mcl)
C50 = 1vol de complemento al 1/50, C200 = 1vol de complemento al 1/200, etc.
h2 = 1vol de hematies al 2%.
H100 = 1vol. de mezcla hemolitica con hemolisina al 1/100. etc.

Para la lectura interpretación de los resultados realizamos la siguiente valoración en cada uno de los pocillos:

-4 : Ausencia de lisis.

-3 : 75% de hematíes intactos, y 25% de lisis.

-2 : 50% de lisis.

-1 : 75% de lisis y 25% de hematíes intactos.

-Tr: Trazas de hematíes, hemólisis casi total.

-0 : Hemólisis total.

La "dosis óptima de hemolisina" (DOH), es la contenida en un volumen (25µl) de la más alta dilución de hemolisina, que da hemólisis total (0), con la más alta dilución de complemento.

Dado que la observación de 50% de hemólisis es más sensible que la observación de lisis total, se toma como una unidad de complemento (HD_{50}), la contenida en un volumen de la más alta dilución de complemento que da 50% de hemólisis (2), con la dosis óptima de hemolisina.

En la realización de la prueba de fijación de complemento se trabaja con 4 unidades de complemento ($4DH_{50}$) (4 dosis hemolíticas 50), que estarán contenidas en un volumen de una dilución 4 veces menor (1/4), de la que contenga $1DH_{50}$.

Para obtener la dilución óptima del antígeno a utilizar, así como el título del correspondiente antisuero se enfrentan en tablero de ajedrez, en placa microtiter, diluciones dobladas del antígeno comenzando por 1/2, hasta 1/128; y diluciones dobladas de antisuero comenzando por 1/8, hasta 1/256 (Previamente inactivadas a 56ºC durante 30 minutos). Se deben incluir controles del antígeno para cada dilución con complemento a $4DH_{50}$, y $2DH_{50}$; así como controles de cada dilución de antisuero para cada una de estas dosis de complemento.

Posteriormente y tras 18 horas de incubación a 4ºC se añade una mezcla hemolítica que contenga hematíes de carnero al 2% y hemolisina diluida al título de trabajo previamente establecido.

El contenido de los pocillos de la placa quedará como se muestra en la figura 3.

Fig.3.-Contenido de los pocillos en placa microtiter para la valoración de antígeno utilizado en Reacción de Fijación de Complemento.

diluciones sueros	diluciones antigeno 2 (1)	4 (2)	8 (3)	16 (4)	32 (5)	64 (6)	128 (7)	TNA 2 (8)	TNA 4 (9)	TS 4DH50 (10)	TS 2DH50 (11)	TC (12)
8	A2 S8 C H	A4 S8 C H	A8 S8 C H	A16 S8 C H	A32 S8 C H	A64 S8 C H	A128 S8 C H	NA2 S8 C H	NA4 S8 C H	. S8 C H	. S8 C2 H	. . C H
16	A2 S16 C H	A4 S16 C H	A8 S16 C H	A16 S16 C H	A32 S16 C H	A64 S16 C H	A128 S16 C H	NA2 S16 C H	NA4 S16 C H	. S16 C H	. S16 C2 H	. . C2 H
32	A2 S32 C H	A4 S32 C H	A8 S32 C H	A16 S32 C H	A32 S32 C H	A64 S32 C H	A128 S32 C H	NA2 S32 C H	NA4 S32 C H	. S32 C H	. S32 C2 H	. . C1 H
64	A2 S64 C H	A4 S64 C H	A8 S64 C H	A16 S64 C H	A32 S64 C H	A64 S64 C H	A128 S64 C H	NA2 S64 C H	NA4 S64 C H	. S64 C H	. S64 C2 H	. . C H
128	A2 S128 C H	A4 S128 C H	A8 S128 C H	A16 S128 C H	A32 S128 C H	A64 S128 C H	A128 S128 C H	NA2 S128 C H	NA4 S128 C H	. S128 C H	. S128 C2 H	
256	A2 S256 C H	A4 S256 C H	A8 S256 C H	A16 S256 C H	A32 S256 C H	A64 S256 C H	A128 S256 C H	NA2 S256 C H	NA4 S256 C H	. S256 C H	. S256 C H	
TA 4DG	A2 . C H	A4 . C H	A8 . C H	A16 . C H	A32 . C H	A64 . C H	A128 . C H	NA2 . C H	NA4 . C H	. . H	. . H	. . H
TA 2DH	A2 . C2 H	A4 . C2 H	A8 . C2 H	A16 . C2 H	A32 . C2 H	A64 . C2 H	A128 . C2 H	NA2 . C2 H	NA4 . C2 H		. .	. . H

. = 1 vol. de MC.
S8= 1 vol de suero a 1/8.
2 = 1vol. de suero a 1/2 etc.
C = 1 vol. de complemento a $4DH_{50}$, C2 = 1 vol. de complemento a $2DH_{50}$.
C1 = 1 vol. de complemento a $1DH_{50}$, C = 1 vol. de complemento a 1/2 DH_{50}.
H = 1 vol. de mezcla hemolitica.

TNA = Prueba que el falso antigeno, en presencia de suero, no fija el complemento inespecificamente a la dilucione 1/2 ni a dilucion 1/4.
TS = Prueba que el suero no fija inespecificamente (actividad anticomplementaria) el complemento en ausencia de antigeno
TA = Prueba que el antigeno (sin suero) no fija inespecificamente el complemento

Para interpretar los resultados en cada pocillo seguimos las mismas directrices descritas en la valoración de complemento y hemolisina.

Las lecturas se efectúan por inhibición total de hemólisis "4".

La combinación Antígeno/Anticuerpo, puede dar RFC con dos patrones de resultados:

1.- Manifestar un máximo o "pico", es decir, existe una dilución de antígeno a la que se presenta un título máximo de suero, es la denominada "dilución óptima de antígeno" (OPD, optimal peak dilution).

En tal caso los antígenos se utilizan a esta dilución.

2.- Dar un resultado "en plato", es decir, se mantiene un mismo título de suero con diversas diluciones de antígeno.

Una reacción de este tipo indica frecuentemente actividad anticomplementaria del antígeno a bajas diluciones, lo que se suele poner de manifiesto con $2DH_{50}$ de complemento, pero no con $4DH_{50}$.

En este caso se tomará como "unidad de antígeno" la contenida en un volumen de la más alta dilución de antígeno a la que se fije totalmente el complemento "4".

Para la realización de la prueba, con estos antígenos se trabaja preferentemente con 2 o 4 unidades de antígeno, siempre que no sean anticomplementarias.

Como título de suero se toma la más alta dilución de este que da una lectura 3 o 4 con el antigeno a su dilución de trabajo.

IV-III-C.-**Procedimiento para realización de prueba de RFC**

Se enfrentaran diluciones dobladas de cada suero problema, y de sueros controles positivos y negativos, con la dilución óptima de antígeno previamente calculada. A lo que se añadirá complemento a $4DH_{50}$, hematíes de carnero al 2% y hemolisina a su título de trabajo. Todo utilizando como diluyente MC frío.

Nosotros hemos adoptado el sistema microtiter, con el cual por cada placa se pueden probar 8 sueros diferentes, utilizando para cada una de ellos una fila, en la que se pueden colocar 7 diluciones dobladas, y los controles correspondientes para cada suero frente al complemento a $4DH_{50}$ y $2DH_{50}$. (Figura 4)

1º Preparar diluciones 1/8 de cada suero problema y de los sueros control, en MC frío, e inactivar 30 minutos a 56ºC.

2º Colocar 25µl de MC en todos los pocillos de la placa excepto en la primera columna. Añadir 25µl más a los pocillos de las columnas 8, 9 10, y 11.

3º Poner 50µl de la dilución 1/8 de cada suero en su pocillo correspondiente de la columna 1. Doblediluir en razón de 25µl de la columna 1 a la

7, con lo que tendremos los sueros diluidos de 1/8 a 1/512. Añadir 25µl de suero a 1/8 a las columnas 8 y 9 para control frente a complemento.

4º Preparar antígeno suficiente para las pruebas a realizar, a su dilución de trabajo, y añadir 25µl a todos los pocillos de la columna 1 a 7 y a los dos primeros pocillos de la columna 10.

5º Añadir 1 volumen de 25µl de complemento a $4DH_{50}$ a todos los pocillos de la columna 1 a 8, y a los primeros pocillos de la columna 10 y 11.

Añadir 25µl de complemento a $2DH_{50}$ a la columna 9, y a los segundos pocillos de las columnas 10 y 11.

Añadir 25µl de complemento a DH_{50}, y $1/2DH_{50}$ a los pocillos C y D de la columna 11 respectivamente.

6º Agitar las placas y mantener a 4ºC 18 horas.

7º Añadir 25 µl de mezcla hemolítica (Hematíes de carnero al 2% + Hemolisina a su dilución de trabajo, sensibilizados 30 minutos a 37ºC), a todos los pocillos de la placa. Con lo que el contenido de cada pocillo de la placa quedará como se muestra en la figura 4.

8º Incubar 40 minutos a 37ºC, agitando a los 15, 30 y 40 minutos. Centrifugar 10 minutos a 2000rpm.

9º Lectura e interpretación de resultados.

El título de fijación de complemento para cada suero vendrá dado por la máxima dilución del mismo, en que se observe lisis de hematíes inferior al 50% (Lecturas 4 o 3), siempre y cuando el suero no demuestre anticomplementariedad con $2DH_{50}$, ni con $4DH_{50}$ de complemento.

Fig.4.-Contenido de los pocillos en placa microtiter en realización rutinaria de la técnica de Reacción de Fijación de Complemento

		diluciones de suero							TS 4DH50	TS 2DH50	TA	TC	
		8 1	16 2	32 3	64 4	128 5	256 6	512 7	8	8 9	10	11	12
s+	A	s+8 A C H	s+16 A C H	s+32 A C H	s+64 A C H	s+128 A C H	s+256 A C H	s+512 A C H	s+8 C H	s+8 C2 H	A C H	C H	
s-	B	s-8 A C H	s-16 A C H	s-32 A C H	s-64 A C H	s-128 A C H	s-256 A C H	s-512 A C H	s-8 C H	s-8 C2 H	A C2 H	C2 H	
PROBLEMAS 3	C	3 8 A C H	3 16 A C H	3 32 A C H	3 64 A C H	3 128 A C H	3 256 A C H	3 512 A C H	3 8 A C H	3 8 A C2 H		C1 H	
4	D											C1/2 H	
5	E												
6	F												
7	G	7 8 A C H	7 16 A C H	7 32 A C H	7 64 A C H	7 128 A C H	7 256 A C H	7 512 A C H	7 8 C H	7 8 C2 H		H	
8	H												

s+8 = 1 vol de suero positivo control a 1/8 etc.
4 64 = 1 vol del suero 4 a 1/64 etc.
A = 1 volumen de antígeno a su título de trabajo (OPD ó 2 ó 4 OPD).
C = 1 volumen de complemento a $4DH_{50}$.
C2, C1, C1/2 = 1 vol. de complemento a 2, 1 y 1/2 DH_{50}.
H = 1 vol. de mezcla hemolítica.

IV-IV.-ROSA DE BENGALA CUANTITATIVO

*IV-IV-A.-**Fundamento.***

Es una prueba de aglutinación en porta para detección de anticuerpos anti-*brucella* en sueros animales y humanos. Utiliza como sustrato una suspensión bacteriana tamponada a pH 3,6 de *B. abortus*, coloreada con Rosa de Bengala.

Detecta sobre todo IgG.

La determinación se efectúa ensayando la suspensión bacteriana frente a los sueros problema, sobre porta.

La presencia o ausencia de una aglutinación visible en porta es indicativa de la presencia o ausencia de anticuerpos en la muestra ensayada.

IV-IV-B.-*Técnica*

Material

-Kits de Rosa de Begala, de Cromatest, (M110) suministrado por Knickerbocker, y que contiene:

-Antígeno "Rosa de Bengala". (5 ml) Suspensión tamponada de *B. abortus*. La unidad mínima detectable tras su preparación es de aproximadamente 25 UI/ml del 2º patrón internacional de suero anti*Brucella abortus* (Weybridge).

-Control positivo: (1 ml) Suero de conejo anti-*Brucella abortus*, con una actividad aglutinante de 100UI/ml, con 0,1% de azida sódica.

-Control negativo: (1 ml) Suero humano con una actividad aglutinante menor de 10UI/ml, con 0,1% de azida sódica.

-Agitador mecánico rotatorio a 100rpm.

-Suero problema. Claro, no contaminado, no hemolizado.

Realizacion de la prueba.

I.-Dejar que sueros problema y kits de prueba alcancen la temperatura ambiente. La sensibilidad del ensayo puede reducirse a temperaturas bajas. Los resultados óptimos se obtienen por encima de los 10ºC.

II.-Homogenizar el antígeno, aspirando y vaciando varias veces con el tapón gotero.

III.-En placas microtiter realizar diluciones de los sueros problema, poniendo 100µl del suero en pocillos A, y 50 µl de SS, en el resto de pocillos de la columna. Con microdiluidor de 50µl doblediluir de A hasta H, con lo que quedarán diluciones de suero de Puro a 1/128, en caso necesario se realizarán más diluciones.

IV.-Sobre porta y en compartimentos separados, colocar una gota de 50µl de cada una de las diluciones de cada suero problema, control positivo, y control negativo.

V.- Sobre cada una de las distintas diluciones colocar una gota (50µl) de antígeno Rosa de Bengala, y mezclar el contenido de cada compartimento con palillo desechable, procurando que se extienda en toda la superficie utilizada para cada prueba.

VI.- Colocar el porta sobre agitador rotatorio a 100rpm, durante 4 minutos.

VII.- Observar de inmediato con ayuda de luz adecuada, ya que retrasos en la lectura pueden conducir a una sobreestimación de la reactividad de la muestra, la aparición macroscópica de cualquier signo de aglutinación.

Lectura.

Se compara el aspecto de las muestras ensayadas con los controles.

En reacciones negativas se observa una suspensión uniforme sin cambio visible alguno.

Cualquier grado de aglutinación se considera reacción positiva.

Pueden aparecer falsos positivos si existe contaminación bacteriana de controles o muestras, tras congelación-descongelación de antígeno, por existencia de trazas de detergente residuales en los portas utilizados, o bien por usar productos caducados.

IV-V.-PRUEBA DE AGLUTINACION CON 2-MERCAPTOETANOL Y DITIOTHREITOL.

IV-V-A.- *Fundamento.*

Tanto el 2-Mercaptoetanol, como el Ditiothreitol son compuestos sulfidrilos, capaces de disociar las moléculas IgM de 19S, en subunidades 7S, que no tienen actividad de anticuerpo, dejando intactas las moléculas de IgG; de modo que ante una reacción de aglutinación que puede deberse tanto a anticuerpos IgG como IgM, permiten si tratamos previamente los sueros problema con alguna de estas sustancias, y por comparación con los resultados obtenidos con el mismo suero sin tratar, saber si la reacción de aglutinación se debe predominantemente a IgG o IgM.

Este hecho adquiere gran interés en brucelosis, donde la actividad de la infección clásicamente se relaciona con un predominio de IgG, en la respuesta serológica del individuo .

Es por tanto una prueba adicional a la prueba de aglutinación en tubo o en microtiter, y su interpretación de resultados siempre se hará por comparación con los obtenidos con la prueba de aglutinación clásica.

IV-V-B.-Técnica.

Preparación de Reactivos:

- 2-Mercaptoetanol (2ME): Se utiliza a una concentración 0,1M en solución salina. Para ello preparamos una solución que contenga 7 ml de 2ME puro en

980 ml de S.S. Esta solución debe utilizarse antes de 4 días. Hay que evitar cualquier contacto de producto con piel o mucosas, o inhalación, durante su preparación, por lo que se recomienda el uso de guantes y mascarilla, y realización en espacios bien aireados.

- Ditiothreitol (DTT): La utilizamos a una concentración 0,005M (77mg en 100 ml de SS). Si no se utiliza en la semana siguiente a su preparación, puede mantenerse congelada en alicuotas a -20ºC hasta 6 meses.

Material: Similar al utilizado en técnica de aglutinación, aparte de soluciones de 2ME o DTT.

Realización de la técnica:

I.-Preparar una dilución previa de los sueros problema al 1/20 en la solución de 2ME o DDT, según realicemos una u otra prueba, para ello colocar 15µl de cada suero en 300µl de solución de 2ME o DDT.

II.- Incubar 1 h a 35ºC al bañomaría, las diluciones previas de cada suero

III.- El resto de los pasos de estas dos pruebas son similares a los vistos para la realización de las técnicas de aglutinación, tanto en tubo como en microtiter, al igual que la lectura de los resultados.

IV-VI.-DETERMINACION DE PCR MEDIANTE SISTEMA TDx

IV-VI-A.-**Fundamentos del sistema.**

Es un sistema de inmunoanálisis por fluorescencia polarizada; cuyo principio físico es la lectura de fluorescencia emitida por una molécula determinada.

Para ello el aparato lector consta de:

-Lámpara o foco emisor: emite luz en todas las longitudes de onda posibles.

-Filtro de interferencia: Es un filtro de 485nm y actúa seleccionando las longitudes de onda adecuadas para excitar las moleculas de fluoresceina, eliminando las demás. La luz pasará en una sola longitud de onda, pero orientada en todas las direcciones, excitará los electrones de la molécula de fluoresceina que pasaran a un estado superior, volviendo luego a su estado original emitiendo el exceso de energia en forma de luz (fluorescencia).

-Polarizador: Hace que la luz vaya en una sola dirección (vertical u horizontal, secuencialmente).

-Cubeta portamuestras: en ella se incluirá la muestra del paciente, AC especificos frente a la sustancia que queramos determinar , y un marcador (Esta misma sustancia más fluoresceina)

Si el suero del paciente tiene alta cantidad de la sustancia a determinar esta actuará competitivamente con el marcador, quedando gran cantidad de

fluorocromo libre (marcador mas fluoresceina), que será detectado por el sistema lector.

Previamente el sistema ha de estar calibrado con los reactivos y muestras standars, que permiten obtener un rango de valores normales y patológicos.

Realizacion de la técnica

I.- Templar el kits de reactivos y sueros problema a temperatura ambiente durante 1 hora.

II.- Colocar el cajetín con reactivos de pretratamiento, trazador con fluoresceina y anticuerpos especificos, en su lugar correspondiente dentro del aparato.

III.- Rellenar el carrusel con cubetas de plastico en el exterior y de cristal en el interior.

IV.- Poner 75µl de controles y de muestras en cubetas de plastico exteriores, y colocar en su lugar correspondiente.

V.- Una vez puesta en marcha el aparato, previamente calibrado, efectuará a continuacion todos los pasos de la reacción e informará de los resultados.

Interpretación de los resultados:

Se consideraran valores positivos aquellos superiores a 1µg/dl, sea cual sea la cifra..

Dado que en las pruebas serológicas utilizadas se usa una escala de medida geométrica (doble dilución), se considera que los resultados se ajustan a una distribución log-normal, por ello se ha realizado antes de su análisis estadístico una transformación logarítmica (162).

Los valores de medias, desviaciones típicas, y errores standard, antes de su presentación han vuelto a ser transformados a la escala de medida original (título de dilución) con una transformación exponencial (162).

Los límites de confianza de las medidas centrales de dispersión para las pruebas serológicas se han calculado (con los datos transformados) y posteriormente han sido retransformados a la escala original. Dado que la unidad de medida es el salto de título de dilución, se dan como límites de confianza los valores extremos de títulos comprendidos en el intervalo de confianza calculado (162).

El análisis estadístico se ha realizado utilizando las siguientes técnicas:

-Intervalo de confianza = Media +/- 2 x Error standard (M+/-2SE)(10)

-Intervalo de confianza de una proporción: Aproximación normal de la distribución binomial. (10)

-Comparación de proporciones: Aproximación normal de la distribución binomial o χ^2. (10)

-Comparación de medias datos independiantes: t de Student (10)

-Comparación de medias datos pareados: t de Student (datos pareados)(10)

-Comparación de varias medias: Análisis de varianza unifactorial, utilizando para contrastes múltiples la técnica de Scheffé. (10)

-Comparación de distribuciones: Técnica no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov (38). En este caso se ha usado la prueba de una cola.

-Tablas de frecuencias: χ^2, prueba de McNemar. (38)

-Coeficiente kappa: (37) Es la proporción de concordancia entre dos pruebas una vez ha sido eliminada la proporción de concordancias que teóricamente se producirían al azar.

$$K=\frac{P_o-P_e}{1-P_e}$$, error standard de $K=\sqrt{\frac{P_o\,(1-P_o)}{N\,(1-P_e)}}$

-Indice de concordancia: (68) Cuando se comparan dos métodos es la probabilidad condicional de que una prueba de positiva en un test una vez que ha dado positiva en el otro.

-Coeficiente de correlación: Calculado por el método de los mínimos cuadrados. (10)

-Parámetros de eficacia: Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo positivo, Valor predictivo negativo, Eficiencia, e índice de Youden (77).

-Análisis discriminante lineal: Se ha utilizado la técnica clásica de regresión lineal con ajuste por mínimos cuadrados del polinomio de regresión (131).

-Regresión logística (102):

La mayoría de los cálculos estadísticos se han realizado con la ayuda de ordenador, aplicando el paquete SIGMA 1, y en el caso de la regresión logística el paquete BMDP.

RESULTADOS

I.- PRESENTACION GENERAL DE LA POBLACION ESTUDIADA.

Se muestran a continuación, diferenciando dos grupos según tuvieran buena o mala evolución. En total se han evaluado 86 pacientes, 69 que siguieron buena evolución, y 17 con mala evolución (uno de ellos fallecido en primeros meses sólo se incluyó en el estudio de respuesta al tratamiento).

En el grupo de buena evolución el 77% (53) eran varones, mientras el 23% (16) que eran mujeres, frente a los de mala evolución en que el 82% (14) eran varones, y el 18% (3) mujeres.

La mayor parte de los pacientes de ambos grupos referían contacto previo con animales o sus productos: 59 (85,5%) en el primer grupo (dos de ellos veterinarios), y 14 (83%) en el segundo grupo). En 12 casos (9 con buena evolución y 3 con mala) no se pudo encontrar fuente de contacto clara. En un enfermo, del grupo de buena evolución, se trató de un ATS de laboratorio, que intervenía en la manipulación de hemocultivos.

Los datos globales de edad y tiempo de evolución previo al diagnóstico se muestran en la tabla 1.

Tab 1 .- Edad (años) y tiempo de evolución (días) previo al diagnóstico de pacientes estudiados

		Medidas de dispersion			
		Edad		Tiempo evolucion	
Grupo	Parámetro	Media +/- 2SE	Rango	Media +/- 2SE	Rango
Buena evolución	Edad	38±3,9	14-68	27±1,2	6-360
Mala evolucion	Edad	47,8±6,4	25-71	37,6±18,5	4-150

I-I.-ENFERMOS CON BUENA EVOLUCION

Nº/Edad/Sexo	Contacto epidemiológico	E.prstratamiento	Clinica inicial	Tratamiento	Tiempo defervescencia	Seguimiento
1B/15/V	Ordeño/Alimentos y aborto de cabra,	45 dias	Mialgia, cefalea y fiebre,	D-45d E-21d	4 dias	24 meses
2B/50/V	Ordeño vaca y cabras	90 dias	Artralgia, fiebre	D-45d R-45d	5 dias	12 meses
3B/41/V	Leche de Cabra	25 dias	Cefalea, fiebre	D-45d E-21d	3 dias	24 meses
4B/57/V	Desconocido	6 dias	Mialgia, fiebre	D-45d E-21d	4 dias	12 meses
5B/14/V	Leche de cabra	14 dias	Fiebre	D-45d E-21d	6 dias	12 meses
6B/68/V	Ordeño cabras	7 dias	Dolor abdominal Fiebre	D-45d E-21d	5 dias	6 meses
7B/26/V	Veterinario	9 dias	Cefalea, fiebre	D-45d E-21d	4 dias	6 meses
8B/62/H	Requeson, calostros de cabra	90 dias	Lumbalgia, artralgia, fiebre	D-45d E-21d	6 dias	18 meses
9B/55/V	Aborto, ordeño cabras y ovejas	60 dias	Artralgia, fiebre	D-45d E-21d	3 dias	12 meses
10B/27/H	Contacto cabras	90 dias	Artralgia hombro	D-45d E-21d	5 dias	18 meses
11B/50/H	Queso fresco cabra	4 dias	Astenia, fiebre	D-45d E-21d	4 dias	24 meses
12B/17/V	Ordeño, calostros de cabra	7 dias	Artromialgia, fiebre	D-45d E-21d	5 dias	24 meses
13B/32/V	Ordeño vaca y cabra Calostros oveja	12 dias	Artralgia, fiebre	D-45d E-21d	3 dias	12 meses
14B/63/V	Contacto cabras	45 dias	Fiebre	D-45d R-45d	6 dias	24 meses

Nº/Edad/Sexo	Contacto epidemiológico	E.pretratamiento	Clinica inicial	Tratamiento	Tiempo defervescencia	Seguimiento
15B/33/V	Queso fresco cabra	14 dias	Fiebre	D-45d E-21d	4 dias	18 meses
16B/29/V	Desconocido	15 dias	Polimialgia, Fiebre	D-45d R-45d	4 dias	6 meses
17B/38/V	Desconocido	14 dias	astenia, fiebre	D-45d R-45d	5 dias	6 meses
18B/27/H	Personal de laboratorio	6 dias	Cefalea, fiebre	D-45d R-45d	5 dias	6 meses
19B/19/V	Parto cabras y vacas	10 dias	Fiebre	D-45d E-21d	7 dias	12 meses
20B/52/V	Queso fresco,y abortos de cabra,	15 dias	Cefalea, fiebre	D-45d E-21d	4 dias	6 meses
21B/45/V	Leche de cabra y oveja Parto de oveja	4 dias	Fiebre, mialgia	D-45d E-21d	4 dias	18 meses
22B/15/V	Contacto cabras y vacas	9 dias	Artromialgia fiebre	D-45d E-21d	5 dias	12 meses
23B/43/V	Contacto cabra	10 dias	Fiebre	D-45d E-21d	3 dias	12 meses
24B/38/V	Desconocido	105 dias	Mialgia, febricula	D-45d R-45d	6 dias	18 meses
25B/28/H	Queso fresco cabra	15 dias	Dolor oseo, fiebre	D-45d E-21d	4 dias	12 meses
26B/53/H	Queso fresco cabra	16 dias	Artralgia, fiebre	D-45d E-21d	4 dias	24 meses
27B/35/V	Aborto cabra	60 dias	Fiebre	D-45d E-21d	5 dias	13 meses
28B/55/V	Contacto cabras y ovejas	8 dias	Fiebre	D-45d E-21d	4 dias	12 meses
29B/47/H	Contacto cabras	7 dias	Astenia, fiebre	D-45d E-21d	3 dias	18 meses
30B/15/V	Queso fresco cabra	7 dias	Mialgia, fiebre	D-45d R-45d	5 dias	6 meses
31B/57/H	Desconocido	19 dias	Mialgia, cefalea fiebre,	D-45d E-21d	3 dias	6 meses

Nº/Edad/Sexo	Contacto epidemiológico	E.pretratamiento	Clínica inicial	Tratamiento	Tiempo defervescencia	Seguimiento
32B/65/V	Veterinario	15 dias	Astenia, fiebre	D-45d R-45d	4 dias	6 meses
33B/17/V	Leche de cabra	15 dias	Cefalea, fiebre	D-45d E-21d	3 dias	12 meses
34B/22/V	Parto, queso fresco de cabra,	8 dias	Fiebre	D-45d R-45d	5 dias	12 meses
35B/64/V	Contacto cabras	120 dias	Sacroileitis fiebre	D-45d R-45d	4 dias	18 meses
36B/58/V	Ordeño y parto de cabras, Queso fresco	12 meses	Dolor columna Fiebre	D-45d R-45d	4 dias	12 meses
37B/51/V	Contacto con cabras	30 dias	Artromialgia cefalea, fiebre	D-45d E-21d	3 dias	18 meses
38B/31/V	Contacto cabras y ovejas	21 dias	Cefalea, fiebre	D-45d E-21d	4 dias	12 meses
39B/54/V	Contacto cabras	21 dias	Astenia, fiebre	D-45d R-45d	5 dias	18 meses
40B/22/V	Contacto cabras y vacas	8 dias	Orquitis, fiebre	D-45d E-21d	3 dias	6 meses
41B/68/V	Contacto cabras	25 dias	Artralgia, fiebre	D-45d E-21d	6 dias	12 meses
42B/27/V	Queso fresco cabra	7 dias	Mialgia, cefalea fiebre	D-45d R-45d	3 dias	12 meses
43B/35/H	Desconocido	30 dias	Fiebre	D-45d R-45d	4 dias	6 meses
44B/42/H	Derivados leche de cabra	30 dias	Tos, fiebre, artralgia	D-45d E-21d	4 dias	18 meses
45B/35/V	Calostros cabra	14 dias	Dolor cadera fiebre	D-45d E-21d	3 dias	12 meses
46B/16/V	Parto de cabra	13 dias	Fiebre	D-45d R-45d	4 dias	12 meses
47B/14/V	Leche de cabra Contacto con animales	27 dias	Anorexia, fiebre	D-45d E-21d	5 dias	18 meses
48B/30/V	Queso fresco de cabra y oveja	90 dias	Fiebre ondulante	D-45d E-21d	6 dias	6 meses

Nº/Edad/Sexo	Contacto epidemiológico	E.pretratamiento	Clínica inicial	Tratamiento	Tiempo defervescencia	Seguimiento
49B/51/V	Queso fresco y contacto cabras	9 dias	Artromialgias Fiebre	D-45d E-21d	3 dias	18 meses
50B/23/H	Contacto cabras y ovejas	8 dias	Artromialgia fiebre	D-45d R-45d	3 dias	6 meses
51B/49/V	Contacto cabras	60 dias	Lumbalgia, fiebre	D-45d R-45d	4 dias	12 meses
52B/30/V	Desconocido	15 dias	Fiebre	D-45d E-21d	3 dias	12 meses
53B/59/H	Contacto cabras	18 dias	Fiebre, síncope	D-45d E-21d	3 dias	18 meses
54B/44/V	Calostros y contacto con cabras	10 dias	Fiebre	D-45d E-21d	4 dias	6 meses
55B/35/V	Contacto cobras	28 dias	Artromialgia, cefalea, fiebre	D-45d R-45d	5 dias	18 meses
56B/22/V	Queso fresco cabra y oveja	15 dias	Fiebre	D-45d R-45d	4 dias	12 meses
57B/41/V	Contacto cabras	30 dias	Cefalea, artralgia fiebre	D-45d E-21d	3 dias	18 meses
58B/55/H	Contacto cabras y ovejas	30 dias	Artralgia, fiebre	D-45d E-21d	3 dias	18 meses
59B/51/V	Contacto cabras y ovejas	40 dias	Fiebre	D-45d E-21d	4 dias	18 meses
60B/52/H	Contacto cabras	14 dias	Artralgia, fiebre	D-45d E-21d	3 dias	18 meses
61B/20/V	Contacto cabras	5 dias	Dolor abdominal vómitos, fiebre	D-45d E-21d	5 dias	6 meses
62B/23/V	Desconocido	7 dias	Fiebre, mialgia	D-45d R-45d	4 dias	6 meses
63B/17/V	Requesón y calostros de cabra	15 dias	Fiebre	D-45d R-45d	3 dias	6 meses
64B/65/H	Requesón y queso fresco de cabra	7 dias	Fiebre	D-45d E-21d	3 dias	18 meses
65B/18/V	Desconocido	10 dias	Astenia, fiebre	D-45d E-21d	5 dias	6 meses

Nº/Edad/Sexo	Contacto epidemiológico	F.pretratamiento	Clínica inicial	Tratamiento	Tiempo defervescencia	Seguimiento
66B/28/V	Leche de cabra	90 dias	Fiebre irregular	D-45d R-45d	6 dias	6 meses
67B/23/H	Contacto cabras	15 dias	Artralgia, fiebre	D-45d R-45d	3 dias	6 meses
68B/22/V	Queso fresco cabra	20 dias	Neuralgia intercostal, fiebre	D-45d E-21d	4 dias	12 meses
69B/67/V	Queso fresco cabra	20 dias	Dolor abdominal nauseas, fiebre	D-45d E-21d		

D: Doxiciclina 100mg oral, cada 12 horas; E: 1gr intramuscular diario; R: Rifampicina 900mg oral, dia.

* Tiempo de evolución con síntomas antes del tratamiento inicial.

I-2.-ENFERMOS CON MALA EVOLUCION

Nº/Edad /Sexo	Contacto epidemiológico	T. evolución	Clínica inicial (hemocultivo+)	Tratº inicio	Defery	T.libre síntomas (Hemocultivo+)	Evolución	T.Control
1M/54/V	Leche de cabra	50 dias	Artromialgia fiebre (SI)	D-45d R-45d	-	- (NO)	Tórpido	12 meses
2M/37/V	Desconocido	45 dias	Fiebre (NO)	D-45d E-21d	-	- (NO)	Tórpido	12 meses
3M/62/V	Contacto vacas	45 dias	Fiebre Artralgia (NO)	D-45d R-45d	-	- (NO)	Tórpido	6 meses
4M/35/V	Contacto cabras Queso fresco	27 dias	Fiebre (SI)	D-45d E-21d	4 dias	6 meses (SI)	Recaida	24 meses
5M/41/H	Contacto cabras	90 dias	Sacroileitis Fiebre (SI)	D-45d E-21d	3 dias	9 meses (SI)	Recaida	12 meses
6M/39/V	Contacto cabras Calostros	4 dias	Fiebre (SI)	D-45d E-21d	1 mes		Curación	18 meses
7M/29/V	Queso fresco de cabra	6 dias	Dolor inguinal Fiebre (SI)	D-45d R-45d	4 dias	12 meses (SI)	Recaida	18 meses
8M/56/V	Contacto cabras y ovejas	30 dias	Artralgia fiebre (SI)	D-45d E-21d	3 dias	3 meses (SI)	Recaida	12 meses
9M/48/V	Desconocido	45 dias	Fiebre Mialgia (SI) Fiebre (SI)	D-45d E-21d	5 dias	3 meses (SI)	Recaida	6 meses
10M/25/V	Queso fresco cabra	30 dias		D-45d R-45d	3 dias	1,5 meses (SI)	Recaida	18 meses

Nº/Edad /Sexo	Contacto epidemiológico	T. evolución	Clínica inicial (Hemocultivo+)	Trat º inicio	Defervescencia	T. libre síntomas (Hemocultivo+)	Evolución	T. Control
11M/46/V	Contacto cabra	4 días	Artralgia Fiebre (SI)	D-45d R-45d	-	- (NO)	Torpido	18 meses
12M/51/H	Contacto cabra	60 días	Tos, fiebre Hepatopatía(SI)	D-45d E-21d	-	- (NO)	Torpido	18 meses
13M/71/V	Contacto cabra	15 días	Fiebre Artralgia (SI)	D-45d R-45d	-	- (NO)	Torpido	24 meses
14M/39/V	Contacto cabra y oveja	15 días	Fiebre (SI)	D-45d R-45d	4 días	6 meses (SI)	Recaída	12 meses
15M/58/H	Contacto cabra Queso fresco	9 días	Neuralgia Fiebre (NO)	D-45d E-21d	6 meses		Curación	18 meses
16M/57/V	Queso fresco Contacto cabras	5 meses	Sacroileitis Fiebre (NO)	D-45d R-45d	-	- (NO)	Torpido	18 meses
17M/65/V	Desconocido	15 días	Fiebre (SI)	D-45d R-45d	-	- (NO)	Muerte	3 meses

T. evolución; Tiempo con síntomas antes de tratamiento inicial;
Trat º; Tratamiento (D:doxiciclina 100mg oral cada 12 horas, E; estreptomicina 1g im día, R:Rifampicina 900mg día
T. libre de síntomas; Intervalo entre desaparición de clínica inicial y aparición e recaída; Ev. final:Evolución final
T. control; Tiempo de seguimiento de evolución.

II.- CORRELACION ENTRE PRUEBAS SEROLOGICAS

Evaluamos la correlación existente entre aglutinación y Rosa de Bengala cuantificado; entre aglutinación con 2-Mercaptoetanol y aglutinacion con Ditiotreitol; y entre aglutinación normal y aglutinación con 2-Mercaptoetanol.

II-I.- CORRELACION ENTRE ROSA DE BENGALA CUANTIFICADO Y AGLUTINACION.

Se realizó de modo global utilizando 361 sueros pertenecientes a los 85 enfermos incluidos en el estudio, en diferentes periodos evolutivos de la enfermedad.

Se obtuvo una recta de regresión (coeficiente de correlación de 0,74195), de fórmula "y = 0,051x -0,16989", donde "x" sería el valor de la aglutinación (Inversa de título de trabajo), e "y" el valor teórico que correspondería a Rosa de Bengala para dicho valor de aglutinación.

Dado que con el antígeno utilizado en la técnica de aglutinación un título de 1/80 se corresponde con 100 UI, utilizando el suero anti-*Brucella abortus* II patrón internacional, preparado por el Central Veterinary Laboratory de Weybridge, (título límite inferior fijado por la OMS para considerar diagnóstico en técnicas de aglutinación)(173,174,43), esta cifra se correspondería con un título de 1/4 de Rosa de Bengala.

Para comprobar si efectivamente podiamos aceptar un título de 1/4 de RB, como límite a partir del cual considerar diagnóstica esta técnica en sueros de pacientes con brucelosis aguda, contrastamos las diferencias existentes de cara al diagnóstico entre utilizar el título de 1/4 por RB, o el título de 1/80 por MA, como límites diagnósticos en 107 sueros de enfermos con brucelosis aguda.

Como se observa en tabla 2 y figura 5, en 74 casos se dieron ambos criterios, en 6 se obtuvo un título de RB mayor o igual a 1/4 siendo menor de 1/80 la aglutinación; en 12 MA fue mayor o igual a 1/80, con RB menor de 1/4, y en 15 casos ambas técnicas dieron resultados inferiores a los establecidos.

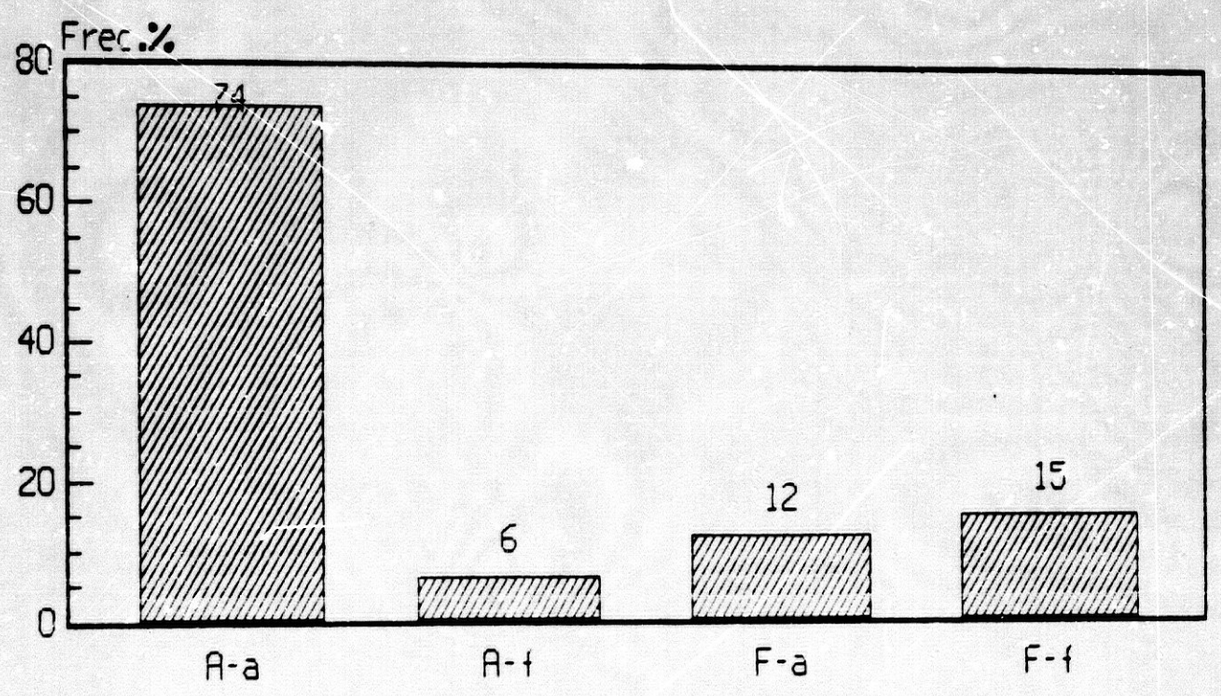
La prueba de McNemar ($p<0,05$) establece que no es significativa la diferencia, por lo que en nuestro estudio, en sueros en fase aguda podemos aceptar que no hay diferencia significativa en cuanto al número de enfermos diagnosticados entre utilizar como criterio diagnóstico de brucelosis aguda un título de RB de 1/4 o mayor o un título, de 1/80 o mayor de aglutinación.

Tab 2.- Capacidad diagnóstica de Aglutinación y Rosa de Bengala cuantificado , en brucelosis aguda

		Aglutinación (Título >=1/80) +	-	Total
Rosa Bengala (Título>=1/4)	+	74	6	80
	-	12	15	27
Total		86	21	107

χ^2=2 (MacNemar); p>0,05
Kappa= 0,52 SE= 0,1
Indice de Concordancia= 0,90 SE= 0,02;

Fig 5.-CAPACIDAD DIAGNOSTICA DE ROSA DE BENGALA CUANTIFICADO Y AGLUTINACION EN 107 ENFERMOS DE BRUCELOSIS AGUDA.



ROSA DE BENGALA: A = acierto, F = fallo, en diagnóstico
AGLUTINACION: a = acierto, f = fallo en diagnóstico.

II-II.- CORRELACION ENTRE AGLUTINACION CON 2-MERCAPTOETANOL Y AGLUTINACION CON DITIOTREITOL.

Contrastamos estas dos técnicas, ya que ambas utilizan compuestos sulfidrilos, capaces de inactivar las inmunoglobulinas de la clase IgM, y por tanto permitir la detección de otras inmunoglobulinas aglutinantes distintas de IgM, sobre todo IgG (21,128,101); con el fin de observar si existían diferencias que hicieran ventajosa la utilización de una sobre otra.

La correlación se realizó utilizando los resultados obtenidos con 362 sueros de 85 enfermos con brucelosis en diferentes periodos evolutivos.

En 340 casos los títulos obtenidos con una y otra prueba fueron idénticos o sólo difirieron en una dilución (discrepancia menor), por lo que la proporción de resultados coincidentes entre ambas técnicas desde el punto de vista serológico fué del 93,9%. (Tabla 4). Observándose una gran correlación entre las dos técnicas (Coeficiente de correlación de 0,91), ($p<0,01$).

En 22 ocasiones hubo diferencias de 2 o más diluciones (Discrepancias mayores), de las cuales 16 se agrupaban en los sueros de 4 enfermos, por lo que en los restantes 346 sueros sólo se observó diferencias mayores en títulos en 6 ocasiones, correspondiendo a sueros de 81 enfermos diferentes.

Por otro lado observamos la diferencia existente entre cada una de las pruebas y la aglutinación, en el sentido de producir una reducción significativa del título (mayor de una dilución) de aglutinación, para ello utili-

zamos 198 sueros en los que se habían obtenido títulos de aglutinación de 1/80 o mayores. Los resultados se muestran en tabla 3. No se observó diferencia significativa en los resultados obtenidos con ambas técnicas (Prueba de Mac Nemar $\chi^2=1,9$, $p>0,05$), por ello se utilizó para todos los análisis posteriores sólo la técnica de 2-Mercaptoetanol.

Tab 3.-Comparación de los resultados obtenidos con 2-Mercaptoetanol y aglutinación con Ditiotreitol. (Resultado positivo= Capacidad de inducir un descenso significativo, mayor o igual a dos diluciones, en la aglutinación).

		Aglut. 2-ME +	Aglut. 2-ME -	Total
Aglut DTT	+	81	9	90
	-	4	104	108
Total		85	113	198

$\chi^2 = 149,2$ $p<0,001$

χ^2(McNemar) = 1,92 $p>0,05$; Indice Concordancia = 0,925;

Kappa = 0,87±0,008.

Tab 4.- Resultados de las pruebas de aglutinación con 2-Mercaptoetanol y Ditiotreitol en 362 sueros. (Inversos del título)

		2-Mercaptoetanol							
		<40	40	80	160	320	640	1280	2560
Ditiotreitol	<40	142	-	4	2	1	1	-	-
	40	-	84	-	2	-	1	-	-
	80	-	-	53	-	1	1	-	-
	160	3	-	-	36	-	1	3	-
	320	-	-	-	-	15	-	1	-
	640	-	-	-	-	-	7	-	-
	1280	-	-	-	-	1	-	2	-
	2560	-	-	-	-	-	-	-	1

Kappa = 0,92±0,03; χ^2=1903,2

III.-SEROLOGIA EN EL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO, INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EVOLUCION PREVIO.

En este apartado presentamos por un lado los resultados obtenidos de forma general con cada una de las pruebas serológicas, en el momento del diagnóstico, previo a iniciar el tratamiento, y por otro los resultados de cada prueba separados en grupos según el tiempo de evolución de la enfermedad previo al diagnóstico con el fin de observar la posible influencia de este factor en los resultados obtenidos.

III-I.- RESULTADOS INICIALES CON LAS DIFERENTES PRUEBAS SEROLOGICAS.

Se muestran en tabla 5. Consideramos positivos títulos de aglutinación, 2-ME y ditiotritiol mayores o iguales a 1/80; test de Coombs mayor o igual a 1/320, Rosa de Bengala de 1/4 o mayor: y RFC mayor o igual a 1/32.(43,98)

Tab 5.- Resultados de las diferentes pruebas serológicas en el momento del diagnóstico inicial en 85 enfermos con brucelosis.

	Reciproco del título			
Tecnica	Media+/-2SE	Moda(n)	Rango	% de positivos
Aglutinación	160	160 (25)	<40-2560	76,5
2-ME	80	<40 (22)	<40-2560	54
Ditiotritiol	40-60	<40 (27)	<40-1280	45
Rosa Bengala	4-8	4 (16)	0-≥128	70
Test de Coombs	1280	640 (24)	<40-≥10240	92
RFC	64-128	128 (18)	<8-≥512	83
PCR	4,8±0,8	-	0-16	85

III-II.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EVOLUCION EN LA RESPUESTA SEROLOGICA INICIAL.

Para realizar este estudio dividimos los pacientes en tres grupos en razón del tiempo de evolución previo:

-A: menor de 15 días : 29 pacientes.

-B: entre 15 y 30 días: 28 pacientes.

-C: mas de 30 días: 28 pacientes.

Para cada una de las pruebas comparamos (análisis de la varianza) entre los resultados obtenidos en los diferentes grupos.

III-II-A.-RESULTADOS OBTENIDOS CON AGLUTINACION

Se muestran en tabla 6. No observándose diferencias significativas en los títulos obtenidos en cada grupo de enfermos.

Tab 6.- Títulos de aglutinación en 85 enfermos de brucelosis de acuerdo con el tiempo de evolución

Tiempo de evolución	Media +/- 2EE	Moda (n)	Rango
Menor de 15 dias	160-320	160 (11)	<40-2560
15 a 30 dias	160-320	160 (8)	<40-1280
Mas de 30 dias	80-160	160 (6)	<40-1280

F = 0,523 p > 0,05

III-II-B.-RESULTADOS OBTENIDOS CON 2-MERCAPTOETANOL

Aparecen reflejados en tabla 7. No se observa diferencia significativa entre enfermos de los distintos grupos, aunque de forma relativa se aprecia una tendencia al alza de los títulos conforme el tiempo de evolución es mayor.

Tab 7.- Títulos de aglutinación con 2-Mercaptoetanol en 85 enfermos de brucelosis de acuerdo con el tiempo de evolución

Tiempo de evolución	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Menor de 15 dias	40-80	<40 (8)	<40-320
15 a 30 dias	80	<40 (9)	<40-1280
Mas de 30 dias	80-160	40 (8)	<40-2560

$F = 1,934$ $p > 0,05$

III-II-C.-RESULTADOS OBTENIDOS CON TEST DE COOMBS

Se observan en tabla 8. No existió diferencia entre los resultados obtenidos en los tres grupos.

Tab 8.- Títulos de test de Coombs en 85 enfermos de brucelosis de acuerdo con el tiempo de evolución

Tiempo de evolucion	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Menor de 15 dias	1280	640 (7)	160-≥10240
15 a 30 dias	1280	640 (9)	<40-≥10240
Mas de 30 dias	1280	640 (8)	160-5120

F = 0,121 p > 0,05

III-II-D.-RESULTADOS OBTENIDOS CON ROSA DE BENGALA.

Aparecen en tabla 9. No observándose diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos

Tab 9.- Títulos de Rosa de Bengala en 85 enfermos de brucelosis de acuerdo con el tiempo de evolución

Tiempo de evolución	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Menor de 15 dias	4	2 (8)	0-≥128
15 a 30 dias	4-8	4 (7)	0-≥128
Mas de 30 dias	4-8	4 (6)	0-≥128

F = 1,633 p > 0,05

III-II-E.-RESULTADOS OBTENIDOS CON RFC.

Como se muestra en tabla 10. No se aprecia diferencia en resultados obtenidos entre grupos A, B y C.

Tab 10.- Titulos de Reacción de Fijación de Complemento en 85 enfermos de brucelosis de acuerdo con el tiempo de evolución

Tiempo de evolución	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Menor de 15 dias	64	128 (7)	<8-≥512
15 a 30 dias	64-128	128 (6)	<8-≥512
Mas de 30 dias	64-128	256 (7)	8-≥512

F = 1,966 p > 0,05

III-II-F.-RESULTADOS OBTENIDOS CON PCR.

Se expresan en tabla 11. No existe diferencia entre los tres grupos

Tab 11.- Resultados de PCR en 85 enfermos de brucelosis de acuerdo con el tiempo de evolución

Tiempo de evolución	Media +/- 2SE(µg/dl)	% positivo
Menor de 15 dias	4.8±0,6	93
15 a 30 dias	4,5±0,6	85
Mas de 30 dias	4±0,8	89

F = 0,43 p > 0,05

III-II-G.-COMPARACION ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON AGLUTINACION NORMAL Y CON 2-MERCAPTOETANOL.

El objeto de realizar esta comparación fue comprobar cual sería el comportamiento de las inmunoglobulinas en el enfermo sin tratamiento. Por ello contrastamos los resultados de aglutinacion normal detecta tanto IgG como IgM aglutinantes, con aglutinación con 2-ME, que sólo detecta IgG.

Los resultados se observan en tabla 12 y figuras 6 y 7.

Conforme el tiempo de evolución previo al diagnóstico es mayor la diferencia entre los resultados obtenidos con ambas técnicas (aglutinación con y sin tratamiento con 2-Mercaptoetanol) es menor, no existiendo diferencias significativas si el tiempo de evolución es mayor de 30 días.

Tab 12.- Diferencias de títulos obtenidos con aglutinación normal y con 2-Mercaptoetanol, en 85 sueros de brucelosis aguda.

Tiempo de evolución	Media recíproco del título +/- 2SE 2-ME	Aglutinación	Media de caída del título en diluciones +/- 2SE
Menor de 15 días	40-80	160-320	2-3
15 a 30 días	80	160-320	1-2
Mas de 30 días	80-160	80-160	0-1

F = 23,24 p < 0,01 (Significativo)

Comparaciones múltiples de medias de caída de título.

Grupos	Nivel de significación*
A - B	p<0,01
A - C	p<0,001
B - C	p<0,05

A= Menor de 15 días; B= Entre 15 y 30 días; C= 30 o más días

* Análisis de varianza. Contraste de Shaffe para comparaciones múltiples.

Fig 6.- MEDIAS DE TITULOS DE AGLUTINACION Y 2-MERCAPTOETANOL EN EL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO INICIAL SEGUN EL TIEMPO DE EVOLUCION PREVIO.

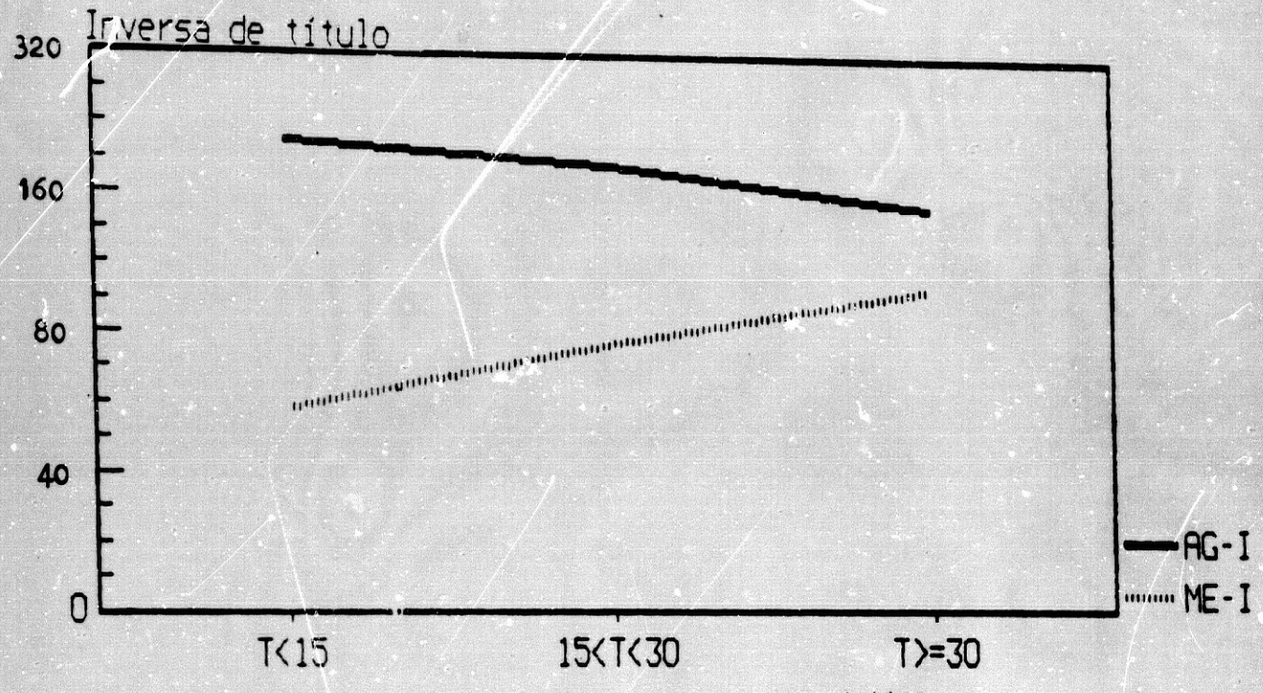
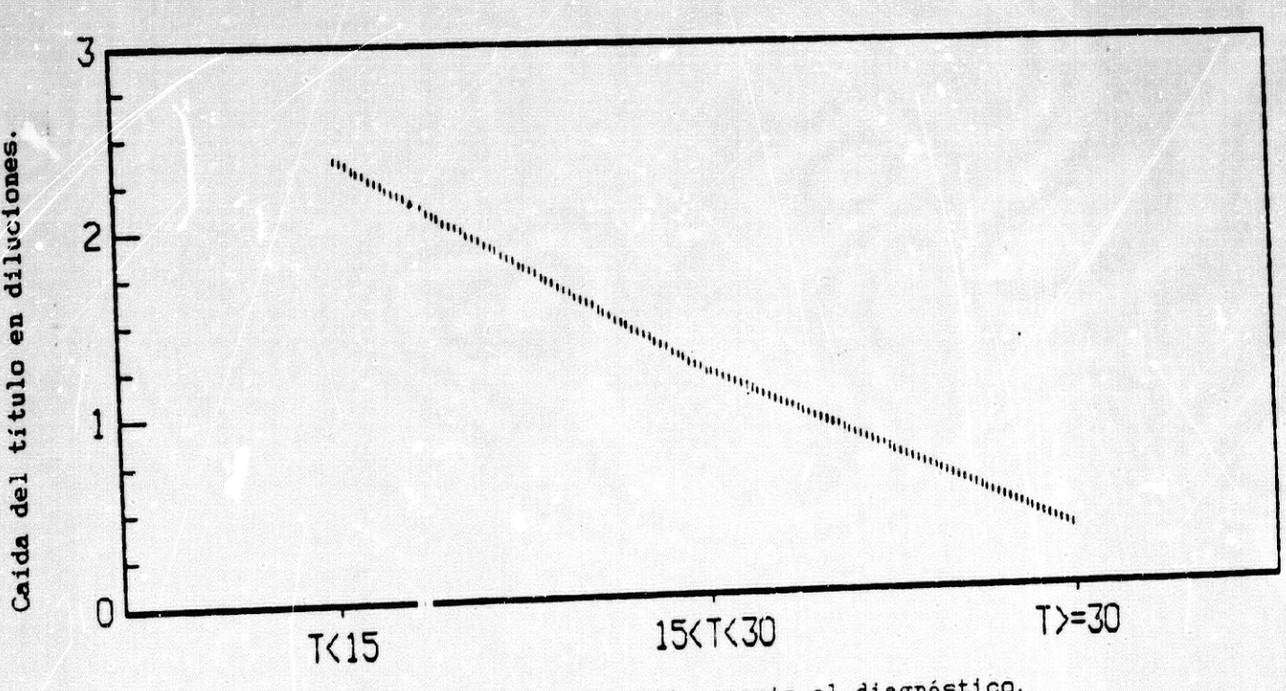


Fig 7.- CAIDA DEL TITULO EN DILUCIONES DE 2-MERCAPTOETANOL RESPECTO A AGLUTINACION EN EL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO INICIAL SEGUN EL TIEMPO DE EVOLUCION PREVIO.



IV.- RESPUESTA CLINICA AL TRATAMIENTO

Básicamente los enfermos se han distriduido en dos grupos de trabajo:

-A.- 69 enfermos con buena evolución tras tratamiento inicial.

-B.- 16 enfermos con mala evolución tras tratamiento inicial, (7 recaidas y 9 evoluciones tórpidas o hacia la cronicidad).

1 caso fallecido antes de los tres primeros meses de seguimiento, solo se tuvo en cuenta para valorar la respuesta al tratamiento, no incluyéndose en el resto de análisis efectuados).

IV-I.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EVOLUCION

Con respecto al tiempo de evolución de la enfermedad previo al diagnóstico diferenciamos 3 grupos:

A.- Menos de 15 dias: 29 enfermos.

B.- Entre 15 y 30 dias: 28 enfermos.

C.- Mas de 30 dias: 28 enfermos

De los enfermos con mala evolución cuatro pertenecían al grupo A (1 recaida y 3 evoluciones tórpidas), tres al B (2 recaidas y 1 evolución tórpida), y nueve al grupo C (4 recaidas y 5 evoluciones tórpidas)

Realizamos la comparación de porcentajes entre los resultados obtenidos en los tres grupos (13%, 10,7%, y 32,1% respectivamente),, no observándose diferencia claramente significativa. ($p=0,073$)

Si agrupamos los enfermos de menos de 30 días y los comparamos con el grupo de más de 30 días (tabla 13), si aparece una diferencia estadísticamente significativa (12,2%, frente a 32,1%. $\chi^2 = 4,56$, $p<0,05$)

IV-II.- INFLUENCIA DEL TIPO DE TRATAMIENTO

Con ambos grupos de enfermos se ha comparado la respuesta frente a los dos tipos de tratamiento utilizados en el estudio.

En total recibieron tratamiento A, (Estreptomicina 1g/dia, 21 dias + Doxiciclina 100mg/12h,. 45 dias), 54 enfermos; de los cuales 8 evolucionaron mal. (14,81%).

El tratamiento B, (Doxiciclina 100mg/12h, 45 dias + Rifampicina 900mg/dia, 45 dias),se administró a 32 enfermos, de los cuales 9 tuvieron mala evolución. (28,13%)

La proporción en conjunto de enfermos que evolucionaron mal fué

$$P=0,1976 \pm 0,085 \quad (\alpha=0,05)$$

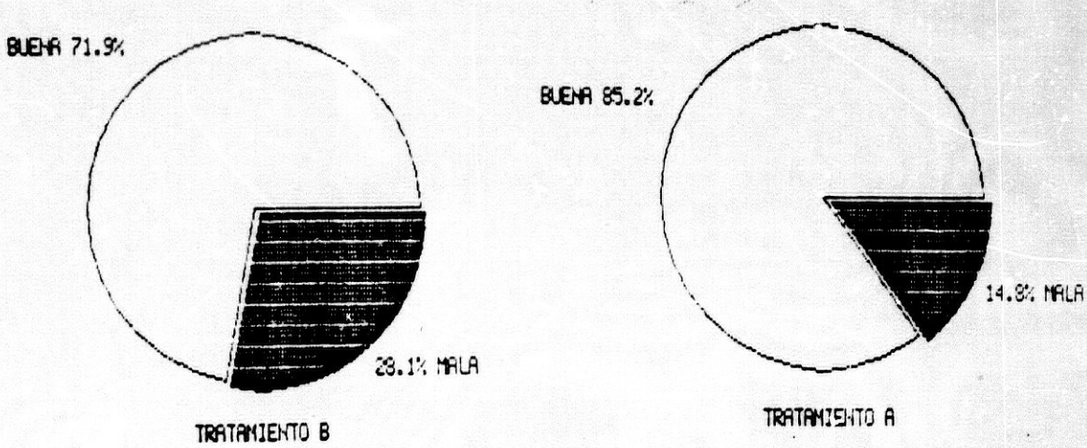
, La proporción de enfermos que evolucionaron mal con el tratamiento A fué $P_A=0,1481 \pm 0,047$ ($\alpha=0,05$), y con el tratamiento B $P_B=0,2813 \pm 0,079$ ($\alpha=0,05$). No siendo estadísticamente significativa esta diferencia. (Figura 8)

Tabla 13.- Porcentaje de enfermos con mala evolución en relación con el tiempo de evolución de la enfermedad antes de iniciar el tratamiento.

Tiempo(dias)	Nº de enfermos	Nº mala evolución (Recaidas + Torpidos)	% recaidas por periodo
Menor 30	57	7 (3R+4T)	12,2
Más de 30	28	9 (4R+5T)	32,1
TOTAL	85	16	18,8

$\chi^2 = 4,58$ $p < 0,05$

Fig 8.- EVOLUCION DE 85 CASOS DE BRUCELOSIS AGUDA, SEGUN TIPO DE TRATAMIENTO



(Rifampicina + Doxiciclina) **(Estreptomicina + Doxiciclina)**

V.- COMPORTAMIENTO GLOBAL DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Para realizar este estudio contrastamos los resultados obtenidos con cada una de las pruebas en el suero tomado en el momento del diagnóstico, y en el obtenido 45 días después una vez concluido el tratamiento.

Aparte de las pruebas serológicas clásicas en el diagnóstico de brucelosis en este estudio se incluyó la evaluación de la Proteina-C reactiva.

La evaluación se realizó por comparación de medias, de modo global y por datos pareados.

Los resultados para cada prueba se muestran en los diferentes apartados.

De forma general no se observó diferencias significativas de las medias entre los resultados obtenidos en los dos grupos de sueros, excepto con PCR, en que se obtuvo diferencia significativa, con clara disminución en sueros postratamiento. No obstante al realizar la comparación con datos pareados (contrastando los sueros de cada enfermo individualmente), si se observa caida significativa de título entre suero inicial y postratamiento en los resultados obtenidos con Aglutinación ($p<0,001$), Test de Coombs ($p<0,05$), Rosa de Bengala cuantitativo ($p<0,001$), y PCR cuantitativa.

Con la prueba de Kolmogorov Smirnov (38), que indica la tendencia de la serie de resultados de cada grupo de sueros se aprecia de modo significati-

vo, una tendencia a la disminución de los títulos en sueros postratamiento respecto a pretratamiento con las pruebas de aglutinación y Rosa de Bengala.

V-I.-RESULTADOS DE PCR CUANTITATIVA EN 85 PACIENTES DE BRUCELOSIS AGUDA EN EL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO Y AL FINALIZAR EL TRATAMIENTO.

	Concentración de PCR (µg/dl)		
Periodo evolutivo	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Pretratamiento	4,8±0,87	-	0-16,3
Postratamiento	0,6±0,27	-	0-6,5

Comparación de medias (datos pareados): $p<0,001$.

Comparación de medias: $p<0,001$

V-II.- RESPUESTA SEROLOGICA DE 85 PACIENTES DE BRUCELOSIS AGUDA EN EL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO Y AL FINALIZAR EL TRATAMIENTO CON MICROAGLUTINACION.

Tab 14.- Resultados obtenidos para cada título con aglutinación.

Título	Pretratamiento (%)	Postratamiento (%)
<40	8 (9)	10 (12)
40	12 (14)	12 (14)
80	7 (8)	19 (22)
160	25 (29)	26 (31)
320	21 (25)	16 (19)
640	6 (7)	1 (1)
1280	4 (5)	1 (1)
2560	2 (2)	0 (0)
Nº Total	85 (100)	85 (100)

	Recíprocos del título		
Periodo evolutivo	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Pretratamiento	160	160 (25)	<40-2560
Postratamiento	80-160	160 (26)	<40-1280

Comparación de medias (datos pareados): $p<0,001$.

Test de Kolmogorov-Smirnov (1 cola)= $p < 0,05$

Comparación de medias: $p>0,05$

V-III.- RESPUESTA SEROLOGICA DE 85 PACIENTES DE BRUCELOSIS AGUDA EN EL MOMENTO DEL DIANOSTICO Y AL FINALIZAR EL TRATAMIENTO CON TEST DE COOMBS.

Tab 15.- Resultados obtenidos para cada titulo con Test de Coombs.

Titulo	Pretratamiento (%)		Postratamiento (%)	
<40	1	(1)	2	(2)
40	0	(0)	1	(1)
80	1	(1)	1	(1)
160	4	(5)	10	(12)
320	8	(9)	11	(13)
640	24	(28)	14	(16)
1280	17	(20)	21	(25)
2560	13	(15)	11	(13)
5120	15	(18)	11	(13)
≥10240	2	(2)	3	(4)
Nº Total	85	(100)	85	(100)

Periodo evolutivo	Reciproco del titulo		
	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Pretratamiento	640-1280	640 (24)	<40-≥10240
Postratamiento	640-1280	1280 (21)	<40-≥10240

Comparación de medias (datos pareados): $p<0,05$.

Test de Kolmogorov Smirnov (1 cola $p > 0,05$

Comparación de medias: $p>0,05$

V-IV.- RESPUESTA SEROLOGICA DE 85 PACIENTES DE BRUCELOSIS AGUDA EN EL MOMENTO DEL DIANOSTICO Y AL FINALIZAR EL TRATAMIENTO CON ROSA DE BENGALA.

Tab 16 - Resultados obtenidos para cada titulo con Rosa de Bengala.

Titulo	Pretratamiento (%)	Postratamiento (%)
Neg.	3 (4)	7 (8)
1	10 (12)	11 (13)
2	13 (15)	16 (19)
4	18 (21)	27 (32)
8	16 (19)	9 (11)
16	10 (12)	10 (12)
32	9 (11)	0 (0)
64	4 (5)	2 (2)
128	2 (2)	3 (4)
Nº Total	85 (100)	85 (100)

	Reciproco del titulo		
Periodo evolutivo	Media +/- 2EE	Moda (n)	Rango
Pretratamiento	4-8	4 (18)	Neg-128
Postratamiento	4	4 (27)	Neg-128

Comparación de medias (datos pareados): $p<0,001$.

Test de Kolmogorov Smirnov (1 cola)= $p < 0,05$

Comparación de medias: $p>0,05$

V-V.- RESPUESTA SEROLOGICA DE 85 PACIENTES DE BRUCELOSIS AGUDA EN EL MOMENTO DEL DIANOSTICO Y AL FINALIZAR EL TRATAMIENTO CON 2-MERCAPTOETANOL.

Tab 17.- Resultados obtenidos para cada título con 2-Mercaptoetanol.

Título	Pretratamiento (%)	Postratamiento (%)
<40	22 (26)	24 (28)
40	17 (20)	15 (18)
80	16 (19)	18 (21)
160	14 (16)	16 (19)
320	11 (13)	10 (12)
640	2 (2)	1 (1)
1280	2 (2)	1 (1)
2560	1 (1)	0 (0)
Nº Total	85 (100)	85 (100)

	Recíproco del título		
Periodo evolutivo	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Pretratamiento	80	<40 (22)	<40-2560
Postratamiento	40-80	<40 (24)	<40-1280

Comparación de medias (datos pareados): $p>0,05$.

Test de Kolmogorov Smirnov (1 cola)= $p > 0,05$

Comparación de medias: $p>0,05$

V-VI.- RESPUESTA SEROLOGICA DE 85 PACIENTES DE BRUCELOSIS AGUDA EN EL MOMENTO DEL DIANOSTICO Y AL FINALIZAR EL TRATAMIENTO CON REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO.

Tab 18.- Resultados obtenidos para cada titulo con RFC.

Titulo	Pretratamiento (%)	Postratamiento (%)
<8	6 (7)	3 (3)
8	4 (5)	4 (5)
16	5 (6)	6 (7)
32	13 (15)	14 (16)
64	13 (15)	17 (20)
128	18 (21)	11 (13)
256	12 (14)	15 (17)
512	14 (16)	15 (17)
Nº Total	85 (100)	85 (100)

	Reciproco del titulo		
Periodo evolutivo	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Pretratamiento	64-128	128 (18)	<8-512
Postratamiento	64-128	64 (17)	<8-512

Comparación de medias (datos pareados): $p>0,05$.

Test de Kolmogorov Smirnov (1 cola) = $p > 0,05$

Comparación de medias: $p>0,05$

V-VII.- COMPORTAMIENTO DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE ACUERDO CON LA EVOLUCION POSTERIOR.

Para evaluar el comportamiento de las diferentes pruebas en respuesta al tratamiento se realizó el estudio dividiendo los sueros en dos grupos para cada periodo de tiempo según que la evolución posterior hubiese sido buena o mala.

El estudio se realizó por comparación de medias de modo general y con datos pareados (10).

Como se muestra en tablas 19 y 20 con medias globales la única técnica que muestra diferencias significativas en los resultados obtenidos es la PCR al contrastar sueros pre y postratamiento en enfermos con buena evolución, en que se aprecia una disminución de la concentración de PCR en sueros postratamiento respecto a pretratamiento.

Al realizar el análisis con datos pareados (por enfermos individualizados) se observa diferencia significativa en los títulos de aglutinación tanto en sueros de enfermos con mala como en los de buena evolución, cayendo de manera significativa los títulos como resultado del tratamiento.

Se observan también diferencias significativas en los niveles de PCR y en los títulos de Rosa de Bengala en los sueros de enfermos con buena evolución, en el sentido de disminución de título en sueros postratamiento con respecto al suero pretratamiento.

Tab 19.-COMPARACION DE RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS DIFERENTES PRUEBAS SEROLOGICAS CON SUEROS PRE Y POSTRATAMIENTO EN ENFERMOS CON BUENA EVOLUCION.

	Media reciproco del titulos +/- 2SE		Comparación de medias	
Técnica	Suero inicial	Suero postrat.	Globales	Datos pareados
Aglutinación	160-320	80-160	p>0,05	p<0,001
2-Mercaptoetanol	40-80	40-80	p>0,05	p>0,05
Rosa de Bengala	4-8	2-4	p>0,05	p<0,001
Test de Coombs	640-1280	640-1280	p>0,05	p>0,05
R.F.C.	64	64	p>0,05	p>0,05
P.C.R. (µg/dl)	4,7±0,5	0,51±0,14	p<0,001	p<0,001

Tab 20.-COMPARACION DE RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS DIFERENTES PRUEBAS SEROLOGICAS CON SUEROS PRE Y POSTPATAMIENTO EN ENFERMOS CON MALA EVOLUCION.

	Media reciproco del titulo +/- 2SE		Comparación de medias	
Técnica	Suero inicial	Suero postrat.	Globales	Datos pareados
Aglutinación	80-320	80-160	p>0,05	p<0,05
2-Mercaptoetanol	40-160	40-160	p>0,05	p>0,05
Rosa de Bengala	8	4-8	p>0,05	p>0,05
Test de Coombs	1280-5120	640-2560	p>0,05	p>0,05
R.F.C.	128-256	128-212	p>0,05	p>0,05
P.C.R. (µg/dl)	4,9±1	1,75±0,82	p<0,05	p<0,05

VI.- CAPACIDAD DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS PRE Y POSTRATAMIENTO PARA PREDECIR LA EVOLUCION

Comparamos resultados pre y postratamiento de enfermos que evolucionaron bien, frente a los que evolucionaron mal, con el fin de observar si en alguna de las pruebas serológicas clásicas se detecta en estos sueros alguna tendencia que indique la posible evolución ulterior de la enfermedad. El estudio global para cada prueba se realizó por comparación de medias (10) y prueba de Kolmogorov Smirnov (38)..

Hemos valorado a su vez los parámetros de eficacia como predictores del tipo de evolución de cada uno de los títulos obtenidos al realizar una prueba concreta, para pruebas en que se detectado una diferencia significativa entre los sueros de enfermos con buena y mala evolución, calculando de modo independiente para cada uno de los valores: Sensibilidad, especificidad, valor predictivo de un resultado positivo, valor predictivo de un resultado negativo, e Indice de Youden (77).

VI-I.- RESULTADOS CON PRUEBAS INDEPENDIENTES

Se muestran en tablas de 21 a 31

Podemos observar que en los enfermos que evolucionan mal los títulos obtenidos por Reacción de Fijación de Complemento, son significativamente

mayores que en los que evolucionan bien, tanto en los sueros pretratamiento, como en los sueros postratamiento.

Con el resto de pruebas sólo se observa diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de positividad de PCR en sueros postratamiento, superior en los enfermos que evolucionaron mal.

Tab 21.-SUEROS PRETRATAMIENTO: AGLUTINACION. RESPUESTA SEROLOGICA SEGUN EVOLUCION POSTERIOR.

Título Aglutinación	Nº de enfermos con el título indicado (%) n total = 85	
	Buena evoluc. n=69	Mala evoluc. n=16
<40	6 (9)	2 (12)
40	11 (16)	1 (6)
80	6 (9)	1 (6)
160	18 (26)	7 (44)
320	20 (29)	1 (6)
640	4 (6)	2 (12)
1280	2 (3)	2 (12)
2560	2 (3)	0

Grupo	n	Recíprocos del título Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Buena evolución	69	160-320	320(20)	<40-2560
Mala evolución	19	80-320	160 (7)	<40-1280

Test de Kolmogorov Smirnov = p>0,05 Comparación de medias: p>0,05

Tab 22.-SUEROS POSTRATAMIENTO: AGLUTINACION. RESPUESTA SEROLOGICA SEGUN EVOLUCION POSTERIOR.

Título Aglutinación	Nº de enfermos con el título indicado (%) n total = 85	
	Buena evoluc. n=69	Mala evoluc. n=16
<40	8 (12)	2 (12)
40	9 (13)	3 (19)
80	16 (23)	3 (19)
160	22 (32)	4 (25)
320	12 (17)	4 (25)
640	1 (1)	0
1280	1 (1)	0

Grupo	n	Recíprocos del título Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Buena evolución	69	80-160	160 (22)	<40-1280
Mala evolución	19	80-160	160 y 320(4)	<40-320

Test de Kolmogorov Smirnov = p>0,05 Comparación de medias: p>0,05

Tab 23.- SUEROS PRETRATAMIENTO: TEST DE COOMBS. RESPUESTA SEROLOGICA SEGUN EVOLUCION POSTERIOR.

	Nº de enfermos con el título indicado (%) n total = 85	
Título T. Coombs	Buena evoluc. n=69	Mala evoluc. n=16
<40	0	1 (6)
40	0	0
80	1 (1)	0
160	4 (6)	0
320	7 (10)	1 (6)
640	22 (32)	2 (13)
1280	14 (20)	3 (19)
2560	11 (16)	2 (13)
5120	10 (14)	5 (31)
≥10240	0	2 (13)

		Recíprocos del título		
Grupo	n	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Buena evolución	69	640-1280	640 (22)	80-5120
Mala evolución	19	1280-5120	5120 (5)	<40-≥10240

Test de Kolmogorov Smirnov = p>0,05 Comparación de medias: p>0,05

Tab 24.- SUEROS POSTRATAMIENTO: TEST DE COOMBS. RESPUESTA SEROLOGICA SEGUN EVOLUCION POSTERIOR.

	Nº de enfermos con el título indicado (%) n total = 85	
Título T. Coombs	Buena evoluc. n=69	Mala evoluc. n=16
<40	1 (1)	1 (6)
40	1 (1)	0
80	1 (1)	0
160	9 (13)	1 (6)
320	8 (11)	3 (19)
640	14 (20)	0
1280	19 (27)	2 (13)
2560	8 (11)	3 (19)
5120	7 (10)	4 (25)
≥10240	1 (1)	2 (13)

		Recíprocos del título		
Grupo	n	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Buena evolución	69	640-1280	1280 (19)	<40-≥10240
Mala evolución	19	640-2560	5120 (4)	<40-≥10240

Test de Kolmogorov Smirnov = p>0,05 Comparación de medias: p>0,05

Tab 25.- SUEROS PRETRATAMIENTO: ROSA DE BENGALA. RESPUESTA SEROLOGICA SEGUN EVOLUCION POSTERIOR.

	Nº de enfermos con el título indicado (%) n total = 85	
Título R. Bengala	Buena evoluc. n=69	Mala evoluc. n=16
0	1 (1)	2 (12)
1	10 (14)	0
2	11 (16)	2 (12)
4	16 (23)	2 (12)
8	13 (19)	3 (19)
16	7 (10)	3 (19)
32	7 (10)	2 (12)
64	3 (4)	1 (6)
≥128	1 (1)	1 (6)

		Recíprocos del título		
Grupo	n	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Buena evolución	69	4-8	4 (16)	0-≥128
Mala evolución	19	8	8-16 (3)	0-≥128

Test de Kolmogorov Smirnov = p>0,05 Comparación de medias: p>0,05

Tab 26.- SUEROS POSTRATAMIENTO : ROSA DE BENGALA. RESPUESTA SEROLOGICA SEGUN EVOLUCION POSTERIOR.

	Nº de enfermos con el título indicado (%) n total = 85	
Título R. Bengala	Buena evoluc. n=69	Mala evoluc. n=16
0	5 (7)	2 (12)
1	10 (14)	1 (6)
2	15 (22)	1 (6)
4	23 (33)	4 (25)
8	7 (10)	2 (12)
16	7 (10)	3 (19)
32	0	0
64	1 (1)	1 (6)
≥ 128	1 (1)	2 (12)

		Recíprocos del título		
Grupo	n	Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Buena evolución	69	2-4	4 (23)	0-≥128
Mala evolución	19	4-8	4 (4)	0-≥128

Test de Kolmogorov Smirnov = p>0,05 Comparación de medias: p>0,05

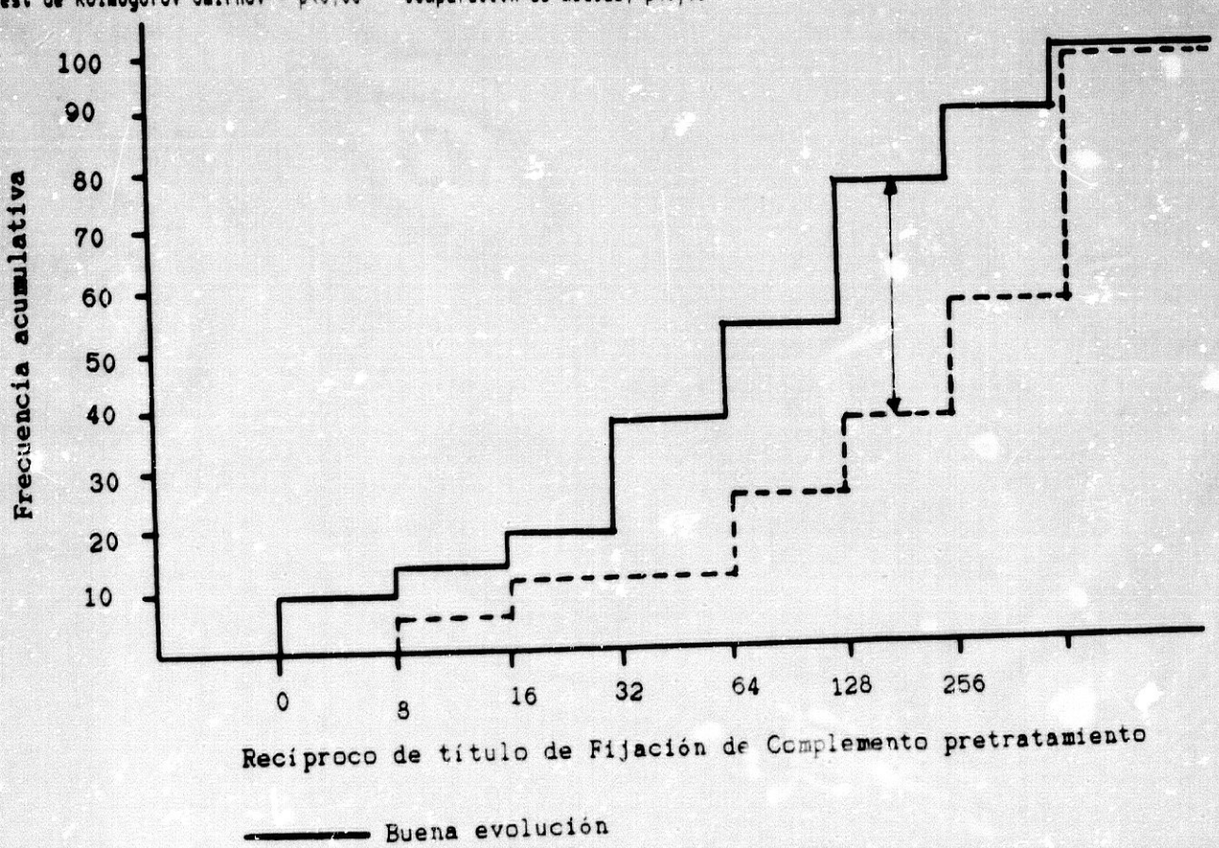
Tab 27.-SUEROS PRETRATAMIENTO: REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO. RESPUESTA SEROLOGICA SEGUN EVOLUCION POSTERIOR..

Título	Nº de enfermos con el título indicado (%) n total = 85		Parámetros de eficacia del título de R,F,C, como predictor de evolución*					
	Buena evoluc. n=69	Mala evoluc. n=16	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	% error	I. Youden
<8	6 (9)	0	100	0	19	0	81	0
8	3 (4)	1 (6)	100	8	20	100	74	0,08
16	4 (6)	1 (6)	93	13	20	90	72	0,06
32	13 (19)	0	87	19	20	86	67	0,06
64	11 (16)	2 (13)	87	38	25	93	52	0,25
128	16 (23)	2 (13)	75	53	27	90	42	0,28
256	9 (13)	3 (19)	62	77	38	89	26	0,39
≥512	7 (10)	7 (43)	44	77	50	87	19	0,21

* Referidos al hallazgo de un título igual o superior al indicado

Grupo	n	Recíprocos del título: Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Buena evolución	69	64	128 (15)	<8-≥512
Mala evolución	19	128-256	≥512 (7)	8-≥512

Test de Kolmogorov Smirnov = p<0,05 Comparación de medias: p<0,05



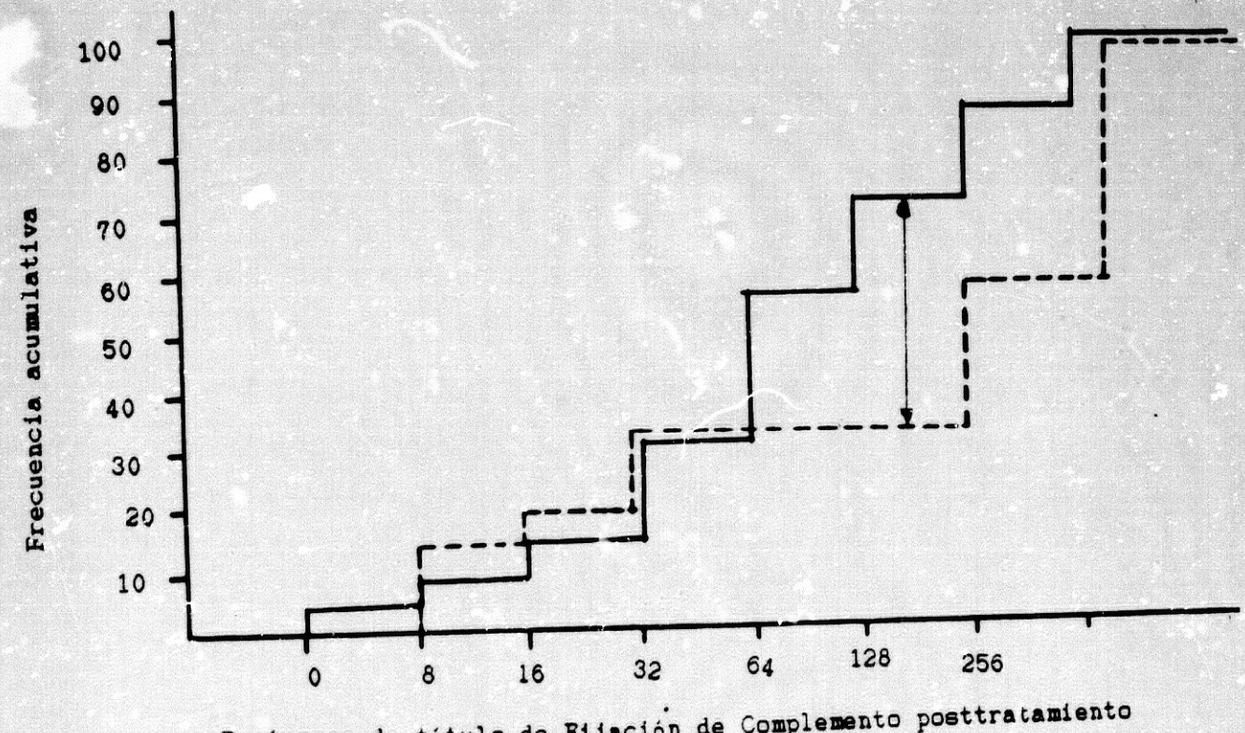
Tab 28.-SUEROS POSTRATAMIENTO: REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO. RESPUESTA SEROLOGICA SEGUN EVOLUCION POSTERIOR.

Título	Nº de enfermos con el título indicado (%) n total = 85		Parámetros de eficacia del título de R.F.C. como predictor de evolución*					
	Buena evoluc. n=69	Mala evoluc. n=16	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	% error	I. Youden
<8	3 (4)	0	100	0	19	0	81	0
8	2 (3)	2 (13)	100	4	19	100	78	0,04
16	5 (7)	1 (6)	87	7	18	71	78	-0,06
32	12 (17)	2 (13)	81	14	18	77	73	-0,05
64	17 (25)	0	68	30	19	81	61	0
128	11 (16)	0	68	56	24	89	41	0,24
256	11 (16)	4 (25)	68	72	37	91	28	0,40
≥512	8 (12)	7 (44)	43	86	47	87	20	0,3

* Referidos al hallazgo de un título igual o superior al indicado

Grupo	n	Recíprocos del título		
		Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Buena evolución	69	64	64 (17)	<8-512
Mala evolución	19	128-512	≥512 (7)	8-≥512

Test de Kolmogorov Smirnov : $p<0,05$ Comparación de medias: $p<0,05$



Tab 29.- SUEROS PRETRATAMIENTO: 2-MERCAPTOETANOL. RESPUESTA SEROLOGICA SEGUN EVOLUCION POSTERIOR.

Nº de enfermos con el título indicado (%)
n total = 85

Título 2-Mercaptoetanol	Buena evoluc. n=69	Mala evoluc. n=16
<40	18 (26)	4 (25)
40	14 (20)	3 (19)
80	13 (19)	3 (19)
160	11 (16)	3 (19)
320	9 (13)	2 (12)
640	2 (3)	0
1280	2 (3)	0
2560	0	1 (6)

Grupo	n	Recíprocos del título: Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Buena evolución	69	80	<40 (18)	<40-1280
Mala evolución	19	40-160	<40 (4)	<40-2560

Test de Kolmogorov Smirnov = p>0,05 Comparación de medias: p<0,05

Tab 30.-SUEROS POSTRATAMIENTO: 2-MERCAPTOETANOL. RESPUESTA SEROLOGICA SEGUN EVOLUCION POSTERIOR.

Nº de enfermos con el título indicado (%)
n total = 85

Título 2-Mercaptoetanol	Buena evoluc. n=69	Mala evoluc. n=16
<40	9 (29)	4 (25)
40	12 (17)	3 (19)
80	17 (25)	1 (6)
160	13 (19)	3 (19)
320	7 (10)	3 (19)
640	0	1 (6)
1280	0	1 (6)

Grupo	n	Recíprocos del título: Media +/- 2SE	Moda (n)	Rango
Buena evolución	69	40-80	<40 (20)	<40-320
Mala evolución	19	40-160	<40 (4)	<40-1280

Test de Kolmogorov Smirnov = p>0,05 Comparación de medias: p>0,05

Tab 31.- VALOR DE PCR EN SUEROS PRETRATAMIENTO.

Evolución	Media (µg/dl)+/-2SE	Rango	Nº de positivos (%)(PCR>1µg/dl)
Buena (n=69)	4,7 +/- 0,5	1,2-16,3	57 (82,6)
Mala (n=16)	4,9 +/- 1	0-15,9	16 (100)

Comparación de medias p>0,05. Comparación de proporción de positivos p>0,05

Tab 32.- VALOR DE PCR EN SUEROS POSTRATAMIENTO

Evolución	Media (µg/dl)+/-2SE	Rango	Nº de positivos (%)(PCR>1µg/dl)
Buena (n=69)	0,51 +/- 0,14	0-3,1	12 (17,3)
Mala (n=16)	1,75 +/- 0,82	0,5,7	13 (81,2)

Comparación de medias p<0,05. Comparación de proporción de positivos p<0,05

Tab 33.- Parámetros de eficacia de PCR positiva (mas de 1 µg/dl) en sueros postratamiento para predecir evolución en brucelosis.

Sensibilidad	0,81.
Especificidad	0,82.
Valor predictivo positivos	0,52
Valor predictivo negativos	0,95.
Indice de Youden	0,63

VI-II-A.-RESULTADOS CON PRUEBAS ASOCIADAS.

Para comprobar si los resultados en predicción del tipo de evolucion podían mejorarse asociando varias pruebas, contrastamos los resultados obtenidos con aquellas pruebas en que de modo independiente se obtuvo alguna significación en la predicción (RFC pretratamiento, RFC postratamiento, y PCR postratamiento).

De esta forma comparamos los resultados de los siguientes grupos de pruebas:

1.- PCR sola.

2.- PCR + RFC pretratamiento.

3.- PCR + RFC postratamiento.

4.- PCR + RFC pretratamiento + RFC postratamiento.

5.- RFC pretratamiento + RFC postratamiento.

6.- PCR o RFC pretratamiento.

7.- PCR o RFC postratamiento.

8.- PCR o RFC pretratamiento o RFC postratamiento.

9.- RFC pretratamiento o RFC postratamiento.

10.- RFC pretratamiento sola.

11.- RFC postratamiento sola

Para establecer los títulos tomados como punto de corte en RFC, consideramos aquel con que se obtenía el mayor porcentaje de aciertos en la predicción (positivo en enfermos que evolucionaron mal y negativo en los que evolucionaron bien), como se muestra en tablas 27 y 28, utilizando como

criterio estadístico el "Indice de Youden" (Sensibilidad + especificidad - 1) (77), por ser independiente de la prevalencia de ambos grupos de enfermos.

Los valores considerados positivos para cada una de las pruebas fueron:

-PCR mayor o igual a 1µg/dl.

-RFC pretratamiento mayor o igual a 1/256.

-RFC postratamiento " " " " 1/256.

El valor de 1 µg/dl para la PCR se adoptó por ser el valor en que se suelen ajustar las pruebas de detección analítica de PCR comunmente utilizadas (136).

Los resultados (Tablas 34 ,35, 36 y 37) muestran que la mayor sensibilidad (capacidad de acierto en los enfermos de mala evolución) se obtiene con los resultados de PCR y/o RFC postratamiento, la mayor especificidad si se asocian PCR y a RFC pretratamiento (ambas pruebas positivas a la vez). El mejor valor predictivo de un resultado positivo se observa al asociar los resultados de PCR + RFC pretratamiento, mientras que el mejor valor predictivo de un resultado negativo se obtiene con PCR sola.

La prueba que muestra un mejor resultado con independencia de la prevalencia es la PCR postratamiento que presenta un índice de Youden de 0,63.

Tab 34.- PARAMEIROS DE EFICACIA COMO PREDICTORAS DEL TIPO DE EVOLUCION DE LAS DIFERENTES PRUEBAS SEROLOGICAS EN 85 ENFERMOS CON BRUCELOSIS.

Prueba	Sensibil	Especif	VPP	VPN	Eficic.	I.Youden
PCR	0,81±0,18	0,82±0,08	0,52±0,18	**0,95±0,05**	0,82	**0,63**
RFC1	0,62±0,11	0,77±0,21	0,38±0,18	0,89±0,08	0,74	0,39
RFC2	0,68±0,11	0,72±0,22	0,36±0,17	0,72±0,12	0,71	0,4
PCR+RFC1	0,56±0,24	**0.94±0,05**	**0,69±0,25**	0,90±0,07	**0,87**	0,5
PCRóRFC1	0,81±0,18	0,66±0,10	0,36±0,16	0,66±0,10	0,69	0,47
PCR+RFC2	0,62±0,24	0,91±0,06	0,62±0,24	0,91±0,06	0,86	0,53
PCRóRFC2	**0,87±0,16**	0,63±0,11	0,35±0,15	0,95±0,06	0,68	0,5
RFC1+RFC2	0,62±0,24	0,85±0,08	0,50±0,22	0,90±0,07	0,81	0,47
RFC1óRFC2	0,75±0,21	0,63±0,11	0,32±0,15	0,91±0,08	0,65	0,38
PCR+FC1+FC2	0,56±0,24	0,94±0,05	0,69±0,25	0,90±0,07	0,87	0,5
PC2óFC1óFC2	0,87±0,16	0,55±0,11	0,31±0,13	0,95±0,06	0,61	0,42

PCR: PCR tras 45 de tratamiento; RFC1: Reacción de Fijación de Complemento previa a tratamiento inicial; RFC2: Reacción de Fijación de Complemento tras 45 dias de tratamiento.

Sensibil: Sensibilidad (% de aciertos en enfermos que evolucionaron mal).

Especif: Especificidad (% de aciertos en enfermos que evolucionaron bien).

VPP: Valor Predictivo de un resultado Positivo (% de mala evolución en enfermos con un resultado positivo).

VPN: Valor Predictivo de un resultado Negativo (% de buena evolución en enfermos con un resultado negativo).

Eficic: Eficiencia (% de enfermos correctamente clasificados, atendiendo a la prevalencia de las poblaciones estudiadas).

I.Youden: Indice de Youden (% de enfermos correctamente clasificados, independientemente de la prevalencia de las poblaciones).

Tab 35.- Parámetros de eficacia como predictor del tipo de evolución de la concentración de PCR tras 45 dias de tratamiento en 85 enfermos de brucelosis

	Evolución		Total
	Buena (n)	Mala (n)	
PCR positiva	12	13	25
PCR negativa	57	3	60
Total	69	16	85

S = 0,81±0,18; E= 0,82±0,08; VPP = 0,52±0,18; VPN = 0,95±0,05; EF = 0,82; IY= 0,63 *

Tab 36.- Parámetros de eficacia como predictor del tipo de evolución de la presencia simultánea de un positivo de PCR tras 45 dias de tratamiento y de RFC previo al tratamiento inicial en 85 enfermos con brucelosis.

	Evolución		Total
	Buena (n)	Mala (n)	
PCR + y RFC1 +	4	9	13
PCR + y RFC1 - ó PCR - y RFC1 + ó PCR - y RFC1 -	65	7	72
Total	69	16	85

S = 0,56±0,24; E = 0,94±0,05; VPP = 0,69±0,25; VPN = 0,90±0,07; EF = 0,87; IY= 0,5 *

PCR: PCR tras 45 de tratamiento; RFC1: Reacción de Fijación de Complemento previa a tratamiento inicial; RFC2: Reacción de Fijación de Complemento tras 45 dias de tratamiento.

* S: Sensibilidad; E: Especificidad; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; EF: Eficiencia; IY: Indice de Youden.

Tab 37.- Parámetros de eficacia como predictores del tipo de evolución de un resultado positivo de PCR o RFC tras 45 días de tratamiento inicial en 85 enfermos con brucelosis

	Evolución		Total
	Buena (n)	Mala (n)	
PCR + y RFC2 + ó PCR + y RFC2 - ó PCR - y RFC2 +	25	14	39
PCR - y RFC2 -	44	2	46
Total	69	16	85

S = 0,87±0,16; E = 0,63±0,11; VPP = 0,35±0,15; VPN = 0,95±0,06; EF = 0,68; IY =0,5 *

PCR: PCR tras 45 de tratamiento; RFC1: Reacción de Fijación de Complemento previa a tratamiento inicial; RFC2: Reacción de Fijación de Complemento tras 45 dias de tratamiento.

* S: Sensibilidad; E: Especificidad; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; EF: Eficiencia; IY: Indice de Youden.

El análisis discriminante (131) pretende determinar la capacidad de un factor (prueba de laboratorio) para asignar (predecir) cada paciente a uno de los dos grupos (buena o mala evolución) combinando en un único parámetro los resultados de todas las pruebas útiles para ello.

La función lineal discriminante es una ecuación de regresión que permite obtener una eficiente clasificación binaria de una población, cada uno de cuyos miembros puede ser descrito por un conjunto de variables.

Se determina un coeficiente de ponderación para cada variable, tal que el valor asignado a cada sujeto, (que es la suma de las variables ponderadas para cada uno de los sujetos) sea la combinación lineal de las variables clasificatorias (pruebas de laboratorio) mejor entre todas las que pudiesen usarse para clasificar a cada persona en uno o en otro de los dos grupos poblacionales mutuamente excluyentes (en este caso grupos de buena y mala evolución).

Es decir, se intenta predecir que enfermos de brucelosis aguda evolucionarán mal a partir de una combinación de resultados de las pruebas de laboratorio efectuadas.

Esta técnica de análisis estadístico construye una función lineal (función discriminante)(1):

$$Z = B_1X_1 + B_2X_2 + \ldots + B_iX_i$$

En que X_1, X_2, X_i, son los valores de los resultados de las distintas pruebas de laboratorio (variables independientes) y Z es una variable dependiente, construida de tal manera que su distribución en los dos grupos comparados esté lo más separada posible, con el objeto de intentar predecir, de acuerdo con el valor que tome en cada paciente, a que grupo (buena o mala evolución) pertenece cada sujeto.

Si el modelo se cumple, el nuevo parámetro Z (variable independiente) puede ser interpretado como normalmente distribuido y estimar su media y varianza para cada grupo. Pudiendose, calcular las posibilidades de clasificación errónea y la probabilidad de que un individuo determinado evolucione bien o mal, para un conjunto de valores de las pruebas de laboratorio (variables predictoras).

La eficacia de la discriminación conseguida puede medirse por lo que se llama la "distancia generalizada entre la distribuciones", que no es mas que la diferencia de medias de la variable independiente (Z) entre los dos grupos, medida en desviaciones standard.

La magnitud de esta diferencia, mide la eficacia de la discriminación obtenida, pues cuanto mayor sea, menor solapamiento existirá entre ambos grupos.

El análisis se ha realizado primero de forma individual con cada prueba, para definir si su resultado está relacionado con el tipo posterior de evolución (buena o mala) de los enfermos).

Los factores se han probado posteriormente combinados utilizando la técnica ascendente e incorporando en cada paso del análisis multivariante una nu[illegible]rueba.

Una vez completado el análisis de las únicas variables que han aportado significación, han sido los valores obtenidos con sueros inmediatamente después de finalizar el tratamiento (Tras 45 dias del diagnóstico inicial) de PCR ($p<0,0001$) y con RFC [illegible]=0,08).

La función discriminante obtenida ha sido:

$$Z = F + 5,28\ P$$

F= 3,32 log recíproco del título de RFC posttratamiento*-2

P= PCR posttratamiento en µg/100ml

La distancia generalizada (Δ) entre los dos grupos es 1,55.

El valor medio calculado para Z en el grupo buena evolución es de Z_1=6,88 y en el de mala evolución Z_2=14,98..

Como regla para minimizar errores de clasificación, si la proporción de individuos pertenecientes a cada grupo fuese la misma. se toma el valor Z intermedio (fig 10). Z_o = 10,91 que asigna un individuo al grupo de probable mala evolución si $Z > 10,91$, y al grupo de probable buena evolución si $Z_o' < 10,91$.

Con esta regla (línea continua en la figura) y para proporciones análogas de individuos en cada grupo (fig 10), se obtendría un porcentaje teórico de predicciónes erróneas (area bajo la curva normal para $z>\Delta/2$) del 21,7%.

La proporción real obtenida de clasificaciones erróneas, al aplicar el discriminante a nuestra población (corrigiendo para una proporción teórica análoga de los grupos buena y mala evolución) es del 22%, en buena concordancia con el valor teórico calculado.

Si corregimos para una proporción teórica del grupo de mala evolución del 18% (proporción encontrada en nuestra población) (fig 9) el valor de Z que minimiza teóricamente las clasificaciones erróneas se obtiene en el punto de corte de ambas curvas de distribuciones que es $Z'_o = 13,4$ con una proporción teórica de malas clasificaciones (proporcion del área total bajo las curvas, área rayada en la figura 10) del 16%.

Aplicando este valor de Z ($Z>13,4$ para malas evoluciones y $Z<13,4$ para buenas) a la población real estudiada obtenemos un porcentaje de error del 9%, mejor que el teórico.

Debe tenerse en cuenta que este incremento de la capacidad predictiva se logra a costa de aumentar la proporción de falsos negativos (porcentaje de enfermos del grupo de mala evolución que serían clasificados erróneamente desde el 11% (que se obtiene utilizando el valor $Z=10,91$) al 39%.

* Esta transformación nos da un valor de F=0 para título negativo (menor de 1/8= que se asume 1/4), F=1 para título de 1/8, F=2 para título de 1/16, etc

Fig.9.- Análisis de regresión lineal: Representación de resultados obtenidos al analizar en conjunto las pruebas de Reacción de Fijación de Complemento postratamiento y Proteina C-Reactiva postratamiento

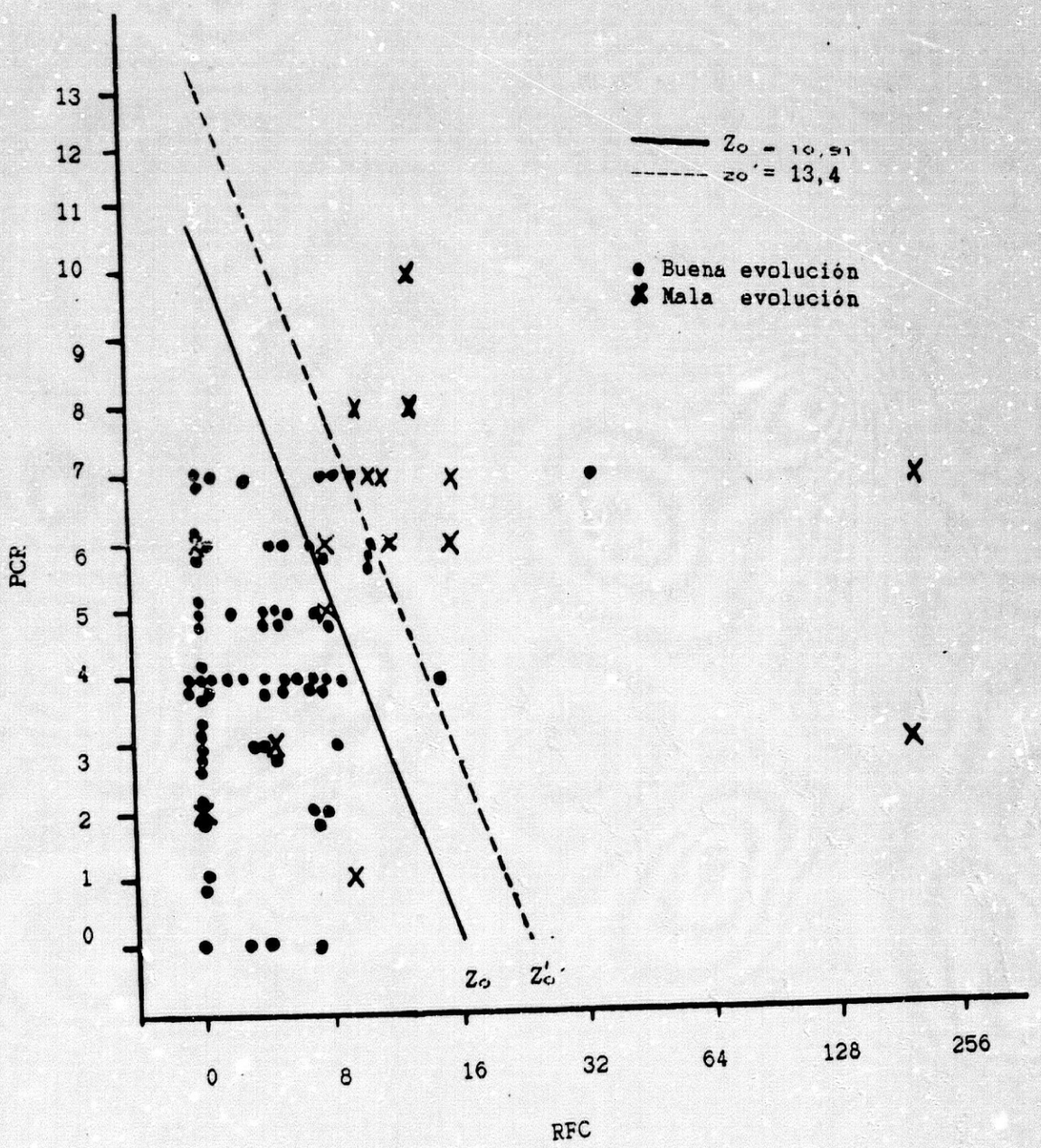
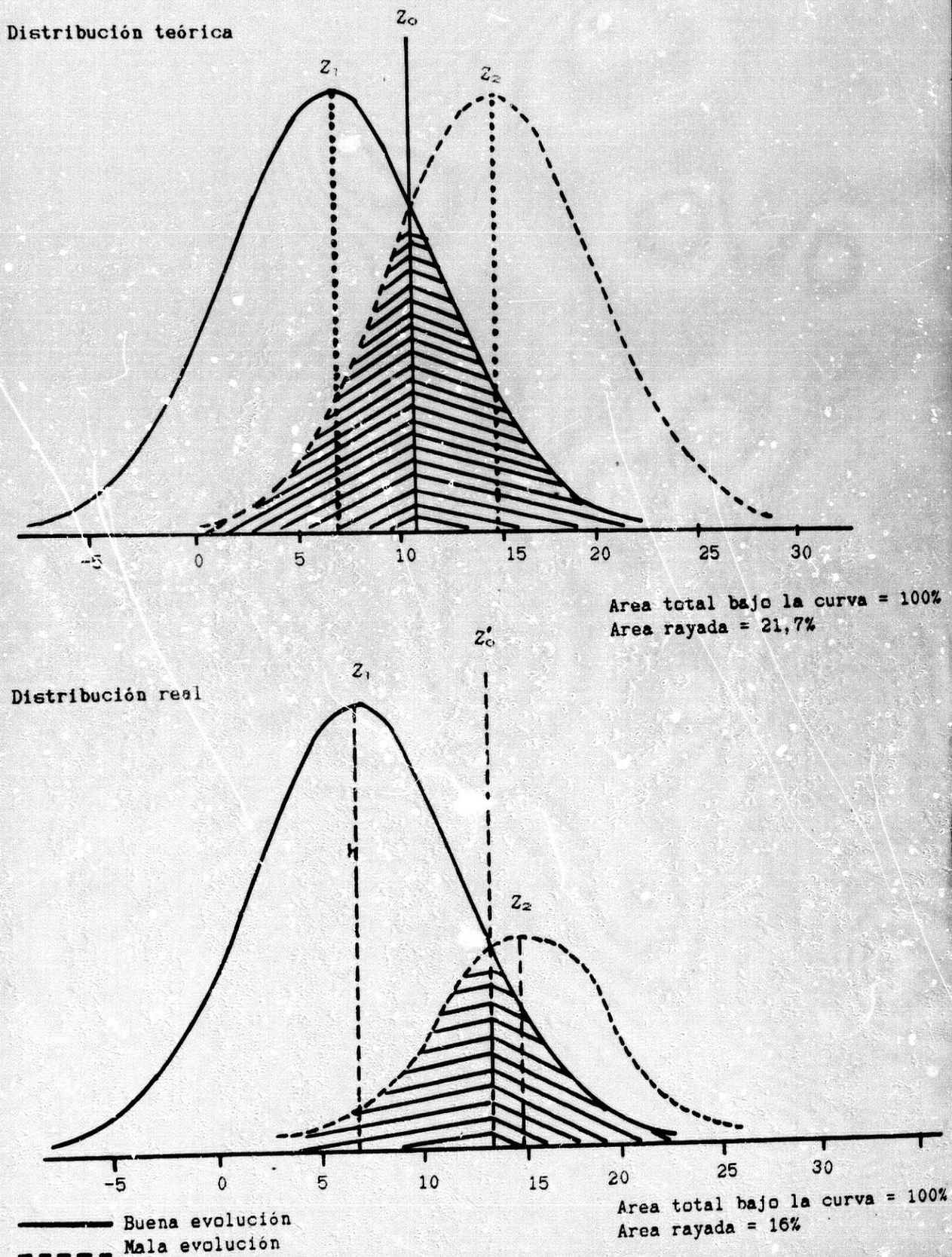


Fig.10.- Análisis de regresión lineal: Distribución de grupos de buena y mala evolución atendiendo a los resultados de Reacción de Fijación de Complemento y Proteina C-Reactiva postratamiento.



VI-IV REGRESION LOGISTICA

El objetivo de este análisis es predecir usando los resultados de las pruebas de laboratorio la probabilidad de que un paciente determinado evolucione o no favorablemente de su brucelosis aguda.

La ecuación del modelo para el enfoque logístico es :

$$\text{Logit } P(BE) = \beta_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\ldots.+\beta_iX_i \quad (1)$$

$$P(BE) = \frac{1}{1-e^{-(\beta_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\ldots\ldots+\beta_iX_i)}}$$

P (BE) es la probabilidad de que la futura evolución de un paciente individual sea buena (es decir, no se cronifique ni recidive), X_1, X_2,.. X_i, son las variables o factores de predicción (resultado de las pruebas de laboratorio) y β_0, β_1, β_2,...,β_i, son los coeficientes calculados por el análisis de regresión.

Se han sometido al análisis las variables : valor de la PCR posttratamiento (P), Reacción de Fijación de Complemento pretratamiento* (FPr), y Reacción de Fijación de Complemento postratamiento* (F), que fueron las únicas que se mostraron significativas en el análisis previo.

A los datos experimentales, utilizando el paquete estadístico BMDP (programa LR), se ajustó un modelo logístico donde sólo se encontraron significativas las variables P (p=0,02) y F (p=0,0475).

$$P(BE) = \frac{1}{1-e^{-3,7 + 0,826P + 0,33F}}$$

Con un magnífico ajuste de los datos reales al modelo calculado $X^2 = 59,3$ (df=69), p = 0,789.

En la figura 11 se muestra el histograma de probabilidades de buena evolución predichas por el modelo de regresión para los pacientes de ambos grupos (buena y mala evolución).

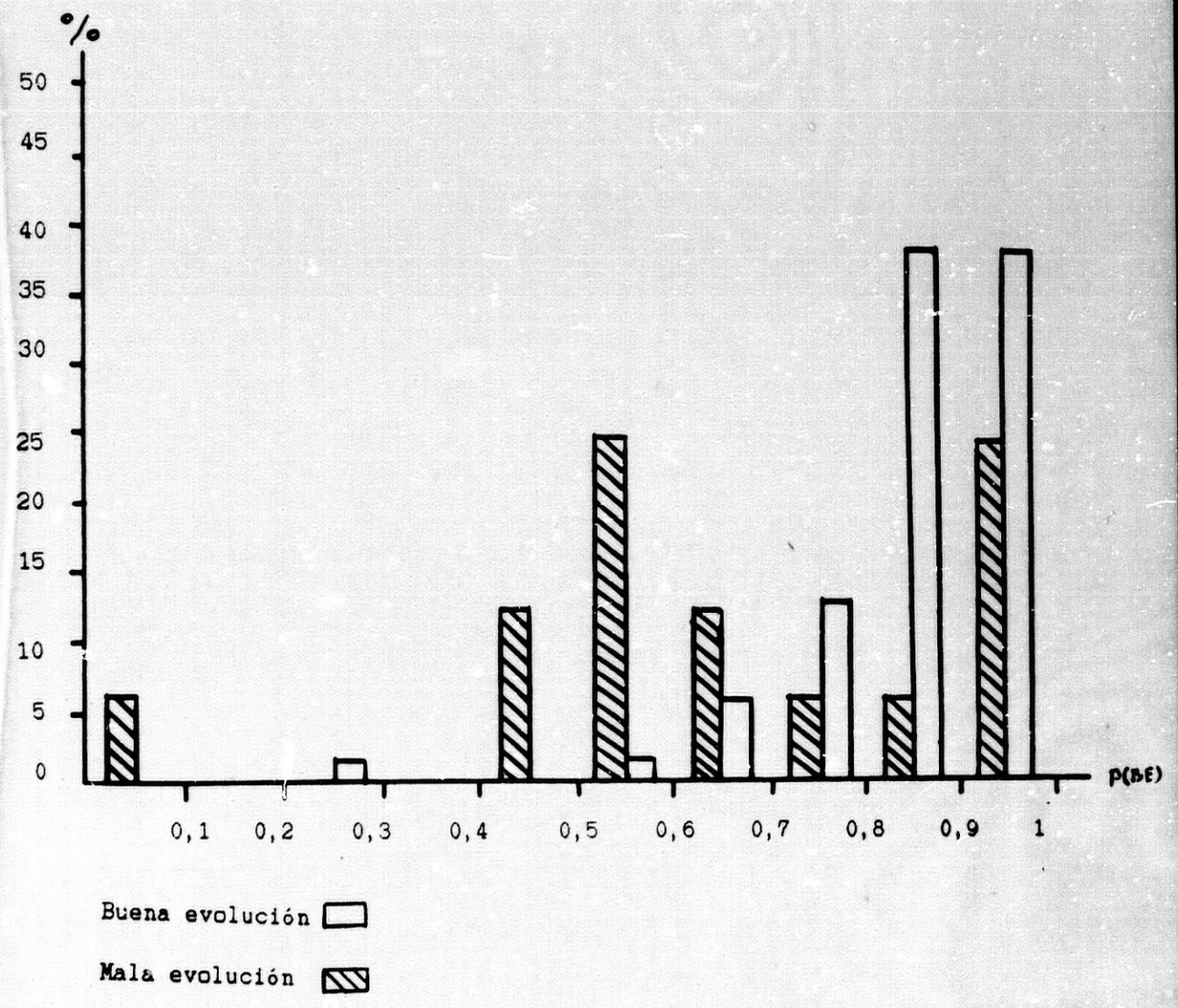
El punto de corte que maximiza la eficacia de discriminación (resultando en un mínimo de clasificaciones erróneas) se obtiene para la población estudiada para una P(BE)=0,608, que resulta en un 10,5% de clasificaciones erróneas.

Esta cifra está en estrecha coincidencia con el encontrado en la ecuación discriminante lineal (9% de errores).

De acuerdo con esta regla debe esperarse buena evolución en los enfermos de brucelosis aguda en que el valor calculado por medio de la ecuación de regresión logística para la P(BE) sea superior a 0,608.

* F= 3,2log recíproco del título - 2. Esta transformación nos da un valor de F=0 para título negativo (menor de 1/8= que se asume 1/4), F=1 para título de 1/8, F=2 para título de 1/16, etc.

Fig.11.- Regresión logística: histograma de probabilidad de buena y mala evolución en las dos poblaciones estudiadas, atendiendo a los resultados obtenidos en conjunto con Reacción de Fijación de Complemento y Proteina C-Reactiva postratamiento.



VII.- VALORACION DE LA RESPUESTA SEROLOGICA EN FASES AVANZADAS DE LA ENFERMEDAD.

En este estudio evaluamos la proporción de positivos obtenidos con cada una de las técnicas, en sueros obtenidos a los 12 meses, para observar si existían diferencias según que el enfermo evolucionara bien o mal.

No realizamos el estudio en fases posteriores, dado que muchos de los enfermos que evolucionaron mal se trataba de recaidas, de las cuales la mayoría se dieron dentro de los primeros 9 meses, por lo que tras correcto tratamiento los consideramos para sueros posteriores al año como curados, salvo que surgieran nuevas complicaciones, con lo que el número de enfermos con mala evolución se reduce considerablemente a partir del año , no permitiendo realizar estudios estadísticos significativos.

Consideramos resultados positivos: 1/80 o mayor para MA y 2-ME; 1/4 o mayor para RB; 1/32 o mayor para RFC; 1/320 o mayor para TC; y 1 o mayor para PCR.

El estudio se realizó utilizando sueros de 61 enfermos (14 de ellos en los que previamente se había detectado mala evolución) y los resultados se muestran en tabla 38.

Con todas las técnicas se observó diferencia significativa en los resultados obtenidos con los sueros de enfermos con mala evolución, y los resultados de enfermos con buena evolución a los 12 meses.

Por otro lado comparamos los resultados obtenidos a los 12 meses con los aparecidos en sueros tras 45 días de tratamiento con el fin de observar si la evolución serológica era marcadamente diferente en enfermos según el tipo de evolución.

Los resultados se muestran en tablas 39 y 40.

Como puede observarse en los enfermos con buena evolución con todas las pruebas los resultados obtenidos a los 12 meses son significativamente menores que los obtenidos en sueros postratamiento. En el caso de la PCR no se aprecia diferencia, ya que su concentración en suero es muy baja en sueros postratamiento en estos enfermos con buena evolución.

En resultados obtenidos con sueros de enfermos que evolucionaron mal, no se observan diferencias significativas, permaneciendo los títulos elevados por encima de los límites de positividad con todas las pruebas.

Tab 38.- Resultados de las diversas pruebas serológicas a los 12 meses de evolución en brucelosis aguda, según el tipo de evolución

	Nº de positivos (%)					
Evolución	Aglutinación	R. Bengala	T. Coombs	RFC	2-ME	PCR
Buena n=47	7 (14,8)	2 (4,2)	22 (46,8)	10 (21,2)	5 (10,6)	5 (11)
Mala n=14	6 (42,8)	7 (50)	14 (100)	11 (78,5)	9 (64,2)	8 (57)
Total	13 (21,3)	9 (14,7)	36 (59)	21 (34,4)	14 (23)	13 (21)
X^2=	5,02	8	12,6	15,6	5,02	13,9
p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Tab 39.- RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS POSTRATAMIENTO Y TRAS 12 MESES, ENFERMOS CON BUENA EVOLUCION

Técnica	Media de títulos +/- 2SE		Comparación de medias	
	Suero postrat.	Suero 12 mes	Globales	Datos Pareados
Aglutinación	80-160	<40-40	$p<0,05$	$p<0,05$
Test de Coombs	640-1280	160-320	$p<0,05$	$p<0,05$
Rosa de Bengala	2-4	Neg-1	$p<0,05$	$p<0,05$
R.F.C.	64-128	8-16	$p<0,05$	$p<0,05$
2-Mercaptoetanol	80	<40-40	$p<0,05$	$p<0,05$
PCR (µg/dl)	0,51±0,14	0,49±0,16	$p>0,05$	$p>0,05$

Tab 40.- RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS POSTRATAMIENTO Y TRAS 12 MESES, ENFERMOS CON MALA EVOLUCION

Técnica	Media de títulos +/- 2SE		Comparación de medias	
	Suero postrat.	Suero 12 mes	Globales	Datos Pareados
Aglutinación	80-160	80-160	$p>0,05$	$p>0,05$
Test de Coombs	640-2560	1280-2560	$p>0,05$	$p>0,05$
Rosa de Bengala	4-8	2-4	$p>0,05$	$p>0,05$
R.F.C.	128-256	64-128	$p>0,05$	$p>0,05$
2-Mercaptoetanol	40-160	40-80	$p>0,05$	$p>0,05$
PCR (µg/dl)	1,74±0,82	1,6±0,75	$p>0,05$	$p>0,05$

DISCUSION

Si bien para el diagnóstico serológico inicial de brucelosis aguda existen criterios aceptados en cuanto al valor de las pruebas serológicas: aglutinación, prueba de Coombs indirecta, Reacción de fijación de Complemento, utilizando suspensiones antigénicas estandarizadas, tomando como referencia el "patrón internacional anti *Brucella abortus*" (II PISAb); no existen criterios establecidos sobre que valores de dichas pruebas son indicativos de brucelosis crónica, reinfección en zonas de alta prevalencia de enfermedad, recaidas, o del tipo de respuesta al tratamiento.(33, 65,74,98)

Por otro lado el valor de la prueba "Rosa de Bengala" , en el diagnóstico inicial de la enfermedad, está por establecer,(173) así como la posible utilidad de otras determinaciones analíticas del tipo de la PCR en el diagnóstico y seguimiento de los enfermos de brucelosis.

En un intento de acercamiento a estos interrogantes, y apoyandonos en los resultados obtenidos con 85 enfermos, a los que se les ha realizado un seguimiento de su enfermedad durante un mínimo de seis meses con controles serológicos periódicos, hemos efectuado un análisis de dichos resultados , siguiendo distintas orientaciones para intentar extraer conclusiones sobre los aspectos anteriormente señalados.

I.- CORRELACION ENTRE PRUEBAS SEROLOGICAS.

En primer lugar se evaluó la correlación existente entre "Rosa de Bengala cuantificado" y "aglutinación", con el fin de establecer que valores con la primera técnica pueden ser utilizados como indicadores de brucelosis aguda, en zonas como la nuestra en que realizando la técnica de RB con sueros sin diluir, aparecen con alta frecuencia resultados positivos sin existencia real de enfermedad en ese momento.

La correlación entre los títulos de ambas técnicas fue relativamente baja (r=0,74195), como cabía esperar, ya que mientras la técnica de aglutinación detecta tanto inmunoglobulinas de la clase IgG, como IgM, con Rosa de Bengala se detectan básicamente IgG (28); no obtante con sueros en el momento del diagnóstico de la enfermedad, se pudo establecer que no había diferencia significativa en cuanto al número de enfermos diagnósticados utilizando una u otra técnica, en nuestro caso, con un punto de corte de un título de 1/80 para aglutinación, y de 1/4 para Rosa de Bengala.

Si bien estos resultados son indicativos de la utilidad del test RB en brucelosis aguda, hay que tener en cuenta que no es fácil disponer de antígenos con suficiente garantía como para extrapolar los resultados de la prueba con confianza, por lo que en cada nuevo lote de antígenos sería necesario establecer el punto de corte para los valores positivos con sueros controles, y dado que la técnica está diseñada para ser realizada con suero sin diluir, serían necesarios mas estudios en este sentido, con diferentes

series de enfermos, antes de pasar a su empleo de forma rutinaria en el laboratorio.

En segundo lugar establecimos en la población estudiada la correlación entre las pruebas de 2-Mercaptoetanol y aglutinación con Ditiotreitol, técnicas utilizadas básicamente con el mismo propósito diagnóstico de discernir si la respuesta de anticuerpos medida con aglutinación normal se debe sobre todo a la presencia de IgM, o bien predominan las IgG..

La correlación entre ambas técnicas fue buena (0,91), con una proporción de resultados coincidentes del 94%, lo que se acerca en buena medida a lo expresado por otros autores (128, 21, 101).

En cuanto a la inducción de un descenso significativo de títulos con respecto a los obtenidos con aglutinación normal para los mismos sueros, el comportamiento de ambas técnicas fué superponible (Indice de concordancia = 0,92; Kappa=0,87±0,008; χ^2=149,2, p<0,001).

Indicando los resultados que es indiferente la utilización de una u otra técnica, cuando se pretenda inactivar la fracción IgM en la respuesta serológica detectada con aglutinación normal, si queremos evaluar cuales son los inmunoglobulinas que intervienen en un momento dado en la respuesta serologica frente a *Brucella*.

II.-INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EVOLUCION PREVIO EN LA SEROLOGIA INICIAL DE PACIENTES CON BRUCELOSIS.

Nuestros datos muestran que en el enfermo sin tratamiento no se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos con ninguna de las pruebas realizadas en los diferentes grupos de enfermos evaluados según tiempo de evolución previo. No obtante si nos ceñimos a los resultados obtenidos con aglutinación normal y aglutinación con 2-Mercaptoetanol, se evidencia con la primera una tendencia a la disminución de los títulos conforme el tiempo de evolución es mayor; mientras que con 2-Mercaptoetanol, la tendencia de los títulos es a aumentar conforme aumenta el tiempo de evolución previo al diagnóstico.

Si comparamos los resultados obtenidos con ambas pruebas para un mismo grupo de enfermos, se aprecia que no existen diferencias significativas entre las dos pruebas en enfermos con más de 30 días de evolución previa al tratamiento, mientras que sí es significativa esta diferencia con enfermos de 15 a 30 días de evolución, acrecentándose sobre todo si los enfermos tienen una evolución de la enfermedad inferior a 15 días.

Estos datos apuntan hacia una tendencia a la disminución de modo natural, independiente del tratamiento, de la respuesta de inmunoglobulinas M, hecho este reseñado por otros autores (Ariza J. Tesis Doctoral, Barcelona, 1988), que predominan en enfermos con pocos días de evolución, disminuyendo progresivamente conforme el tiempo de evolución aumenta.

Este hecho se pone de manifiesto más claramente si evaluamos la caida de título de la prueba de 2-Mercaptoetanol con respecto a aglutinación, en los diferentes grupos de enfermos, observándose una diferencia muy significativa ($p<0,001$) si comparamos los resultados del grupo de enfermos con menos de 15 días de evolución con el grupo de más de 30 días; altamente significativa ($p<0,01$) al comparar el grupo de menos de 15 días con el de enfermos con evolución de la enfermedad entre 15 y 30 días; y significativa ($p<0,05$) entre los enfermos con evolución de 15 a 30 días y los de más de 30 días. Lo que equivaldría a decir que la caida de títulos (Diferencia de título entre aglutinación y 2-Mercaptoetanol) es menor conforme el tiempo de evolución previo al tratamiento es mayor. Dado que esta caida está en razón directa a la presencia de IgM, estos resultados indicarían que en evoluciones superiores a 30 días la respuesta detectada con aglutinación se debe fundamentalmente a IgG, y en evoluciones inferiores a 15 días interviene significativamente la IgM.

III.-INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EVOLUCION PREVIO AL TRATAMIENTO Y DEL TIPO DE TRATAMIENTO EN LA EVOLUCION POSTERIOR DE LA ENFERMEDAD.

En el grupo de enfermos estudiados se aprecia que el tiempo de padecimiento de la enfermedad previo al tratamiento puede incidir de modo notable en la evolución posterior de la enfermedad, ya que se evidenció un aumento de malas evoluciones (recaidas o evoluciones tórpidas) en enfermos que llevaban un periodo de evolución superior a 30 días, con respecto a los de evolución inferior a 30 días.

Una vez comparados los resultados obtenidos en la evolución de la enfermedad según la pauta terapeutica impuesta (Doxiciclina-45 días- + estreptomicina -21 días-, o, Doxiciclina-45 días- + Rifampicina-45 días-), concluimos que no hay razón suficiente para considerar que el resultado de los tratamientos sea distinto en cuanto a la probabilidad de mala evolución (α=0,05).

No obtante, aunque no se observan diferencias estadísticamente significativas entre utilizar uno u otro tratamiento, los resultados sugieren (p=0,153) una mejor respuesta frente al tratamiento con Doxiciclina + Estreptomicina, lo que está acorde con otros autores que han ensayado pautas terapéuticas similares. (8, 23, 107)

IV -RESPUESTA SEROLOGICA TRAS TRATAMIENTO INICIAL.

Se observó caida significativa del título de Aglutinación entre sueros pre y posttratamiento independientemente de que el enfermo evolucionara bien o mal, mientra que con el resto de pruebas serológicas los títulos practicamente no se modificaban entre sueros pre y posttratamiento independiente de la evolución.

Este hecho puede deberse a que con aglutinación detectamos IgM en sueros iniciales, ausentes (niveles no detectables) en gran parte de forma natural tras 45 dias de tratamiento, (Ariza, J. Tésis Doctoral, Barcelona, 1988) mientras que con el resto de las pruebas detectamos inmunoglobulinas de

clases distintas a IgM, que pueden no modificar sustancialmente su concentración en este periodo de tiempo con independencia del tratamiento y evolución posterior.

Se apreció una disminución evidente de la concentración de PCR en sueros postratamiento, pero si bien la tendencia fué hacia la negativización en enfermos con posterior buena evolución, en sueros de enfermos que siguieron mala evolución, aunque disminuyó la concentración, las cifras en la mayoría de los casos se mantuvieron dentro de los valores considerados como positivos para dicha prueba (más de 1 µg/dl).

V.-CAPACIDAD DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS PRE Y POSTRATAMIENTO PARA PREDECIR LA EVOLUCION.

El valor de PCR postratamiento, tanto desde el punto de vista cualitativo (positivo o negativo), como cuantitativo (valores reales de PCR en µg/dl), fué el parametro que mejor permitió de manera aislada predecir la evolución ulterior de la enfermedad, mostrando los mejores resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, eficiencia, e índice de Youden.

Con menor poder predictivo, se mostraron la RFC pre y postratamiento, con las que también se observaron diferencias significativas con los resultados obtenidos para cada grupo de sueros (pre o postratamiento, según que el enfermo evolucionara bien o mal, mostrando una tendencia a presentar

títulos mayores los enfermos que evolucionaron mal, tanto en sueros pre como postratamiento.

Con el resto de pruebas no se obtuvieron resultados que permitieran aproximarnos a la predicción evolutiva de la enfermedad.

Al estudiar de forma conjunta las pruebas PCR, RFC pre y postratamiento, para evaluar el poder predictivo respecto a mala evolución atendiendo a los parámetros de: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, eficiencia e indice de Youden, pudimos concluir que la asociación de pruebas no mejoraba los resultados obtenidos con PCR postratamiento de forma aislada si nos atenemos al "índice de Youden", (cuyos resultados son independientes de la prevalencia de la población estudiada), es decir, que el valor de la PCR postratamiento sóla con independencia del número de elementos de las poblaciones comparadas, es el resultado que mejor nos puede orientar en cuanto a la posible evolución ulterior de la enfermedad.

En sueros pretratamiento el único resultado de cierta utilidad es el valor de RFC, en el sentido de que un resultado por debajo del punto de corte establecido (en nuestro caso un título de 1/256) debe hacernos pensar que el enfermo no evolucionará mal (Valor predictivo negativo de $0,89 \pm 0,08$). No existiendo en las pruebas efectuadas, ninguna cuyos resultados en sueros pretratamiento nos orienten hacia la posible mala evolución del cuadro.

Practicamente ningún enfermo que evolucione bien presentará positivos a la vez el valor de la PCR y RFC, ya que la especificidad para la positividad simultánea de ambas pruebas es de 0,94±0,05.; mientras que la probabilidad de que un valor positivo de ambas pruebas se traduzca en mala evolución de la enfermedad (Valor predictivo positivo) es de 0,69±0,25; a pesar de ser esta la asociación de pruebas que ofrece un mayor VPP.

Con la presencia PCR postratamiento positiva y/o RFC postratamiento positivas, se obtiene la máxima sensibilidad (0,87±0,16), es decir, van a ser pocos los enfermos con mala evolución que no tengan positivo uno u otro valor, a pesar de que un relativamente alto número de pacientes que evolucionen bien también presenten resultados positivos. (Especificidad =0,63)

Un valor de PCR postratamiento negativa indica una alta probabilidad de que el enfermo no evolucionará mal (Valor predictivo negativo de 0,95±0,05,

En conjunto la máxima probabilidad de acertar en la predicción teniendo en cuenta el número de elementos de la población estudiada se obtiene asociando los resultados de PCR y RFC postratamiento (ambas pruebas positivas o negativas), con la que se obtuvo una eficiencia (% global de aciertos en la población estudiada) de 0,87.

Al aplicar a los valores de las pruebas PCR postratamiento, y RFC pre y postratamiento un análisis de regresión lineal y de regresión logística obtuvimos resultados en consonancia con los descritos previamente, ya que en ambos casos los valores de las variables PCR y RFC postratamiento, re-

sultaban significativos a la hora de clasificar a los enfermos en el grupo de buena o mala evolución; siendo la asociación de ambas variables la que mejor permitía asignar a cada paciente a un grupo; ya que calculando el punto de corte adecuado, (con el que se obtienen un mínimo de clasificaciones erróneas, es decir, que a un sujeto al que tras el análisis de sus resultados se le asigne buena evolución tenga efectivamente buena evolución, y viceversa), la proporción de errores se sitúa en alrededor del 10% en ambos análisis (9% con el análisis discriminante lineal , 10,5% con el análisis por regresión logística).

VI -SEROLOGIA EN FASES AVANZADAS DE LA ENFERMEDAD SEGUN EVOLUCIÓN.

Nuestros resultados muestran que con todas la pruebas realizadas existió diferencia significativa en cuanto al porcentaje de positivos con las mismas al comparar los grupos de buena y mala evolución tras 12 meses de diagnosticado el cuadro, si bien estas diferencias fueron más acentuadas con Test de Coombs y RFC.

No existió diferencia significativa al comparar los resultados obtenidos con aglutinación normal y con 2-Mercaptoetanol, lo que apunta hacia un predominio de inmunoglobulinas distintas de IgM en la respuesta humoral de enfermos con mala evolución de la enfermedad, en consonancia por lo descrito por diferentes autores, (135; 175; 33; Pellicer T. Tesis Doctoral, Barcelona, 1987; Ariza J. Tesis doctoral , Barcelona, 1988) y en contraposición a lo reflejado por aquellos que pretenden dar un papel preponderante

a la IgM en la respuesta serológica frente a *Brucella* en recaidas o evoluciones tórpidas (154).

Este hecho podría explicar el que sea con aglutinación normal con la prueba en la que la diferencia es menos significativa.

En este sentido se observa que los títulos de las diferentes pruebas serológicas tienden a mentenerse si el enfermo evoluciona mal, mientras que decrecen de modo sustancial si existe buena evolución.

De todo lo anterior podría establecerse que la respuesta serológica va a diferir en el transcurso del tiempo según que el enfermo evolucione bien o mal, pero que este hecho tiene poco valor practico desde el punto de vista clínico, en cuanto a predicción de evolución, ya que son resultados constatados a posteriori.

CONCLUSIONES

1.- El estudio de la concentración de Proteina C reactiva en sueros tras tratamiento inicial es un parámetro que puede ser de gran ayuda en la predicción evolutiva de la enfermedad. Un valor negativo se corresponde con buena evolución, mientras que valores positivos no definen la evolución posterior.

2.- De todas las pruebas serológicas realizadas (Aglutinación, Test de Coombs, 2-Mercaptoetanol, Rosa de Bengala cuantitativo y Reacción de Fijación de Complemento), sólo la Reacción de Fijación de Complemento mostró en nuestro estudio valor en la predicción de la evolución buena o mala de brucelosis. No obtante su utilización de forma aislada es poco útil.

3.-El estudio conjunto del valor de la PCR postratamiento y RFC pretratamiento nos da el mejor valor predictivo positivo (0,69) y la mayor especificidad (0,94), de cara a la predicción evolutiva de enfermos con brucelosis aguda.

4.-Los enfermos de mala evolución mantienen largo tiempo los títulos de las pruebas serológicas realizadas, mientras que en los de buena disminuyen marcadamente en los primeros meses.

5.-La prueba Rosa de Bengala cuantitativa, bien estandarizada, tendría un valor similar a la aglutinación en el diagnóstico de brucelosis aguda.

6.-El tiempo de enfermedad previo al tratamiento influye en la evolución del cuadro. A mayor tiempo la posibilidad de mala evolución crece.

7.-No encontramos diferencias significativas en evolución del cuadro clínico en razón del tipo de tratamiento.

8.-La respuesta inmunitaria basada en la IgM tiene poco valor en recaidas o evoluciones tórpidas, incluso en brucelosis aguda sus títulos tienden a decaer de forma natural independientemente de que se instaure o no terapeutica.

9.- No existen diferencias entre utilizar para destruir IgM en la técnica de aglutinación entre el 2-Mercaptoetanol y el Ditiotreitol.

BIBLIOGRAFIA

1.- ADDRIENNE, L; TIMOTHY, BA; ARTHUR, MD. Multiple testing of hypotheses in comparing two groups. Ann. Int. Med. 100: 122-129. 1984

2.- AFZAL, M; TENGERDY, RP; SQUIRE, PJ; ELLIS, RP. Characterization of *Brucella ovis* lipopolysaccharide and its use for diagnosis of ram epididymitis by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 20(6): 1159-1164. 1984.

3.- ALLAN, GS; CHAPPELL, RJ; WILLIANSON, P; Mc NAUGTH, DJ. A quantitative comparison of the sensitivity of serologycal test for bovine brucellosis to different antibody classes. J. Hyg. Camb. 76: 287-289. 1976.

4.- ALTON, GG; JONES, LM; PIETZ, DI. Laboratory techniques in brucellosis. 2nd ed. World Health Organitation . Geneva. 1975.

5.- ANDERSON, NK. Protamine- sulphate solutions for the detection of brucella antibodies. Lancet. 2:1081-1082. 1970.

6.- ANDERSON, NK; JENNESS, R; BRUNFIELD, H; GOUGH, P. Brucella-agglutinating antibodies: relation of mercaptoethanol stability to complement fixation. Science.143:1334-1335. 1964.

7.- ARIZA, J; GUDIOL, F; PALLARES, R; RUFI, G; FERNANDEZ, F. Comparative trial of cotrimoxazole versus tetracycline-streptomycin in treating human brucellosis. J. Inf. Dis. 152(6): 1358. 1985.

8.- ARIZA, J; GUDIOL, F; PALLARES, R; RUFI, G; FERNANDEZ, F. Comparative trial of rifampin-doxicicline versus tetracycline-streptomycin in the therapy of human brucellosis. Antimicrob. Agents. Chemother. 28(4): 548-551. 1985.

9.- ARMENGOL, J; ESPI, C. Diagnóstico de brucelosis. Med. Clin. 77(2):86. 1981.

10.- ARMITAGE, P. Stadistical methods in medical research. Blackwell. Oxford. 1977.

11.- BAQUERO GIL, G. Causas del frecuente error serodiagnóstico de la fiebre de Malta. Rev.Diag. Biol. 20:189-196. 1971.

12.- BEHAN, KA; KLEIN, GC. Reduction of *Brucella* species and *Franciscella tularensis* cross-reacting agglutinins by dithiotreitol. J. Clin Microbiol. 16: 756-757. 1982.

13.- BELANGER, L. Alternative approacher to enzyme immunoassay. Scand. J. Immunol. 8 (suppl. 7): 33-41. 1978.

14.- BENNSH, M; BEEM, MO; ORMISTE, V. C-reactive protein and zeta sedimentation ratio as indicators of bacteriemia in pediatric patients. J. Pediatr. 5(104): 729-732. 1984.

15.- BERMAN, DT; KURTZ, RS. Relationship of biological activities to structures of *Brucella abortus* endotoxin and LPS. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138: 98-101. 1987.

16.- BERMAN, DT; WILSON, BL; MORENO, E; ANGUS, RD; JONES, LM. Characterization of *Brucella abortus* soluble antigen employed in immunoassay. J. Clin. Microbiol. 11(4): 355-362.1980.

17.- BHONGBHIBHAT, N; ELBERG, SS; CHEN, TH. Characterization of Brucella skin-test antigens. J. Infect. Dis. 122(1):70-82. 1970

18.- BOLETIN MICROBIOLOGICO SEMANAL. Edit. Subdirección Gral. de Información Sanitaria y Epidemiología. MSC. nº 44/87. Madrid. 1987.

19.- BRINLEY, WJ; MACKINNON, DJ; CULLEN, GA. The Rose Bengal plate agglutina-tion test in the diagnosis of brucellosis. Vet. Rec. 85: 636-641. 1969.

20.- BUCHANAM, TM; PETERSDOF RG. Brucellosis, pp. 974-976. En : Petersdof RG, Adama RD, Braunwald E, Isselbaches KJ, Martin JB, Wilson JD, ed. Harrison. Principles of internal medicine. 10ª ed. New York. Mc Graw-Hill book Co. 1983

21.- BUCHANAN, TM; FABER, LC. "2-Mercaptoethanol brucella agglutination test: Usefulness for predicting recovery from brucellosis. J. Clin. Microbiol. 11(6). 1980.

22.- BUNDLE, DR; CHERWONOGRODZKY, JW; CAROFF, M; PERRY MB. The lypopolysaccha-rides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138:92-98. 1987.

23.- BUZON, L; BOUZA ,E; RODRIGUEZ, M; Y COLS. Treatmen of brucellosis with rifampicin+tetraciclyne versus trimetoprim sulfametoxazole. Chemotherapia, 1 (Suppl. 4): 107-102. 1982.

24.- BYRD, JW; HECK, FC; HIDALGO, RJ. Evaluation of the enzyme-linked immuno-sorbent assay for detecting *Brucella abortus* antibodies. Am. J. Vet. Res. 40(6): 896-898. 1979.

25.- CAROFF, M; BUNDLE, DR; PERRY, MB. Structure of the O-chain of the phenol phase soluble cellular lipopolysaccharide of *yersinia enterocolitica* serotype 0:9. Europ. J. Biochem. 139:195-200. 1984.

26.- CAROFF, M; BUNDLE, DR; PERRY, MB; ET AL. Antigenic S-type lipopolysaccha-ride of *Brucella abortus* 1119-3. Infect Immun. 46:384-388. 1984.

27.- CARPENTER, SL; TRAMONT, EC; BRAUCHE, W. Failure of routine methods in the diagnosis of chronic brucellosis. South. Med. J. 72(1): 90-91. 1979.

28.- CERNYSEVA, MI; KNJAZEVA, EN; EGOROVA, LS. Study of the plate agglutina-tion test with Rose Bengal antigen for the diagnosis of human brucellosis.Bull. World Health Organ. 55(6): 669-674. 1977.

29.- CHAPPELL, RJ; WILLIANSON, P; McNAUGHT, DJ; ET AL. RIA for antibodies against *Brucella abortus*: a new serological test for bovine brucellosis. J. Hyg. Camb. 77 : 369-372. 1976.

30.- CHAPPELL, RJ; McNAUGHT, DJ; BOURKE, JA; ALLAN, GS. Comparison of the results of some serological test for bovine brucellosis. J. Hyg. Camb. 80: 365.1978.

31.- CHAPPELL, RJ; McNAUGTH, DJ; BOURKE, JA; ALLAN, GS. The diagnostic efficiency of some serological test for bovine brucellosis. J. Hyg. Camb. 80: 373-375. 1978.

32.- CHIN, JC. Comparison of different antigenic preparations for the detection of avine serum antibodies against *Brucella ovis* by ELISA. Aust. Vet. J. Sep. 60(99): 261-264. 1983.

33.- CHRISTIE, AB. Brucellosis (undulant fever, Malta or Mediterranean fever) in Christie AB (ed) : Infectious Diseases: Epidemiology and Clinical Practice. 4th ed. Churchill Livingstone, New York. pp:1130-1158.(1987)

34.- CLARKE, D; COST, K. Use of serum C-reactive protein in differentiating septic from aseptic meningitis in children. J. Pediatr. 5 (102):718-120. 1983.

35.- CLAUS, DR; SIEGEL,J; PETRAS, K; ET AL. Interactions of C-reactive protein with the first component of human complement. Immunol. 119: 187-192. 1977.

36.- COGHLAN JOYCE, D; WEIR, DH. Antibodies in human brucellosis. Br. Med. J. 2: 269. 1967.

37.- COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. Educ. Psychol. Meastment. 20:37-46. 1960.

38.- CONOVBER,WJ. Practical nonparametric statistics. John Wilkey and Son, New York. 1980.

39.- CORBEL, MJ; BRINLEY-MORGAN WJ. Genus *Brucella* in NR krieg (ed):"Bergey´s manual of systematic bacteriology", vol. 1. Willians and Wilkins. Baltimore. pp:377-388. 1984.

40.- CROSBY, E; LLOSA,L; MIRO, M; CARRILLO,C; GOTUZZO, E. Hematologic changes in brucellosis. J. Infect. Dis. 150(3): 419-424. 1984.

41.- DAIKOS, GK; PAPAPOLYZOS, N; MARKETOS, N; ET AL. Trimethoprim-sulfametho-xazole in brucellosis. J. Infect. Dis. 128(supl)S7: 31-33. 1973.

42.- DAVIDSON, S. CRP and ZSR as indicators of bacteriemia in pediatric patients. J. Pediatric. 4 (106): 695. 1985.

43.- DAVIDSON, I; HEBERT, N. International standard for anti-*Brucella abortus* serum: comparison of the complement fixing activity of the first and second international standards and the EEC standard. Bulletin of the World Health Organization. 56(1):123-127. 1978.

44.- DAZA, RN; DAMASO, D; MORENO, M. Estudio comparativo de diversas pruebas en el diagnóstico serológico de la brucelosis. Med. Clin (Barc) 76(2):57-60. 1981

45.- DAVIES, G. The Rose Bengal test. Vet. Rec. 88: 447-449. 1971.

46.- DE KLERK, E; ANDERSON, R. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in the laboratory diagnosis of brucellosis. J. Clin. Microbiol. 21(3): 381-386. 1985.

47.- DE LA REVILLA, L; GARCIA TORRES, JA; MARTIN, R; HERNANDEZ, L; FERNANDEZ, A. Manifestaciones osteoarticulares en la brucelosis. Act. Med. Granada. 57: 779-781. 1971.

48.- DIAZ, R. Valor de la prueba Rosa de Bengala y la demostración de anticuerpos anti-proteina de *brucella* en el diagnóstico serológico de brucelosis y yersiniosis.

49.- DIAZ, R; BOSSERAY, N. Identification d'un compose antigenique specifique de la phase ruguense (R) des *Brucella*. Ann. Rech. Vet. 4:283-292. 1973.

50.- DIAZ, R; DORRONSORO, I. Contribucion al diagnóstico serológico de brucelosis y yersiniosis. I Utilidad de la reacción de precipitación en gel. Rev. Clin. Española. 121:37-372. 1971

51.- DIAZ, R; GARATEA, P; JONES, LM; MORIYON, I. Radial inmunodiffusion test with a brucella polisacharide antigen for diferentiating infected from vaccinated cattle. J. Clin Microbiol. 10(1): 37-41. 1979.

52.- DIAZ, R; JONES, LM; LEONG, D; WILSON, JB. Surface antigens of smooth Bru-cellae. J. Bacteriol. 96(4): 893-901. 1968.

53.- DIAZ R; JONES, LM; WILSON, JB. Antigenic relationship of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. J. Bacteriol. 93: 1262-1268. 1967.

54.- DIAZ, R; LEVIENX, D. Role respectif en serologie de la brucellose bovine des antigens et des inmunoglobulines G1 et G2 dans le test d'agglutination de Coombs et au Rose Bengale ainsi que dans le phenomene de zone. CR. Acad. Sc. Paris. 274: 1593-1596. 1972.

55.- DIAZ, R; MARAVI-POMA, E; DELGADO, G; RIVERO, A. Rose Bengal plate agglutination and CIE test on spinal fluid in the diagnosis of Brucella meningitis. J. Clin. Microbiol. 7(2): 236-237. 1978.

56.- DIAZ,R; MARIVI-POMA, E; FERNANDEZ, JL; GARCIA-MERLO, S; RIVERO-PUENTE, A. Brucelosis: Estudio de 222 casos. Parte IV: Diagnostico de la brucelosis humana. Rev. Clin. Esp. 166(3-4): 107-110. 1982.

57.- DIAZ, R; MARAVI-POMA, E; RIVERO, A. Comparison of CIE with other serologycal test in the diagnosis of human brucellosis. Bull. Wld. Hlth. Orgn. 53: 417-424. 1976.

58.- DIAZ, R; TOYOS, J; SALVO, MD; ET AL. Studies on the polysaccharide B and native haptene of *brucella* and *Yersinia enterocolitica* serotype 9. Develop. Biol. Standard. 56: 213-220. 1984.

59.- DIAZ, R; TOYOS, J; SALVO, MD; PARDO, ML. A simple method for extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis. Ann Rech. Vet. 12:35-39. 1981.

60.- DUBRAY, G; LIMET,J. Evidence of heterogeneity of lipopolysaccharides among brucella biovars in relation to A and M specificities. Ann. Inst. Pas-teur/Microbiol. 138: 27-37. 1987.

61.- EDWARDS, JMB; TANNAHILL, AJ; BRADSTREET, CMP. Comparison of indirect fluorescent antibody test with agglutination complement- fixation and Coombs test for Brucella antibody. J. Clin. Path. 23:161-165. 1970.

62.- FEELEY JC. Somatic O antigens relations of *Brucella* and *Vibrio cholerae*. Bacteriol 99: 645-649. 1969.

63.- FARRELL, ID; HINCHLIFFE, PM; ROBERTSON, L. The use of coaglutinating complement fixation test in the diagnosis of human brucellosis. J. Hyg. Camb. 74: 29-31. 1975

64.- FARRELL, ID; HINCHLIFFE, PM; ROBERTSON, L. Sensitivity of *Brucella* spp to tetracycline and its analogues. J. Clin. Pathol. 29: 1097-1100. 1976.

65.- FARRELL, ID; ROBERTSON, L; HINCHLIFFE, PM. Serum antibody response in acute brucellosis. J. Hyg. Camb. 74: 23-28. 1975.

66.- FEIZ, JM; SABBAGHIAN, H; SOHRABI, F. A comparative study of therapeutic agents used for treatment of acute brucellosis. Br.J. Clin. Pract. 27:410-413. 1969.

67.- FERNANDEZ-LAGO, L; DIAZ, R. Demonstration of antibodies against *Brucella melitensis* 16M lipopolysaccharide and native hapten in human sera by enzyme linked inmunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 24(1): 76-80. 1986.

68.- FLEISS, JL.Measuring agreemant between two judges on the presence or ab-sence of a trait. Biometrics 31:651-659. 1975.

69.- FOUNTAIN, NW; WEISS, SJ; FOUNTAIN, AG; SHEN, A; LENK, RP. Treatment of *Brucella canis* and *Brucella abortus* in vitro and in vivo by stable plurilamellar vesicle- encapsulated aminoglycosides. J. Infect. Dis. 152(3): 1985.

70.- FOZ, A. Brucellosis. Medicine ed. esp. 11: 971-984. 1975.

71.-FOZ, A.Técnica para la demostración de anticuerpos incompletos anti-brucella (Prueba de Coombs). Rev. Diag. Biol. 18:208-217. 1969.

72.- FOZ, A. Estudio sobre la estandarización de las reacciones serológicas utilizadas para el diagnóstico de la brucelosis. Microbiol. Españ. 23: 159-177. 1971.

73.- FOZ,A. Brucellosis. Actas del IV Congreso Internacional de Higiene y Medicina Mediterranea. Barcelona; pp: 173. 1953.

74.- FOZ, A; DIAZ, R. Brucelosis. En Enfermedades Infecciosas: Patogénesis y diagnóstico. E. J. Perea (Dir). Salvat Editores, Barcelona. pp 705-726 (1983).

75.- FREEMAN, BA; McNEE JR; BAUGH, RE. Some physical, chemical, and taxonomic features of the soluble antigens of the *Brucellae*. J. Inf. Dis. 121:522-527. 1970.

76.- FRIBOURG-BLANC, A. Diagnostic serologique de la brucellose par la technique d'immuno-fluorescence. Presse Med. 78(6): 271-272. 1970.

77.- GALEN, RS. Statistics. In Gradwohl's. Clinical laboratory methods and diagnosis. 8th Ed. Sonnenwirth A.C., Jarret LJ eds. pp.61-68. The C.V. Mosby Co. St. Louis. 1980.

78.- GAMAZO, C; MORIYON, I. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. Infection and immunity. 55(3): 609-615. 1987.

79.- GAULTNEY, JB; WENDE, RD; WILLIANS, RP. Microagglutination procedures for febrile agglutination test. Appl. Microbiol. 22: 635-640. 1971.

80.- GARCIA, P; DIAZ, J; MATEOS, R. Brucelosis en la provincia de Cuenca.Diag. Biol. 28: 485-490. 1979.

81.- GHONEIM, ATM; McGOLDRICK, J; IONESCU, MI. Serial C-reactive protein measurements in infective complications following cardiac operation: evaluation and use in monitoring response to therapy. Ann. Thor. Surg 34(2):166-175. 1982.

82.- GIUNCHI, G; deROSA, F; FABIANI,F. Trimethoprim-sulfamethoxazole combination in the treatment of acute human brucellosis. Chemotherapy 16:332-335. 1971.

83.- GOTUZZO, E; CARRILLO, C; GUERRA, J; LLOSA, L. An evaluation of diagnostic methods for brucellosis, the value of bone marrow culture. J. Infect. Dis. 153(1): 122-125. 1986.

84.- GRANADO, W. Human brucellosis some clinical observation. Scott. Med. J. 10: 451. 1965.

84(bis).-GRIST, NR; ELEANOR, JB; URQUHART, GED. Complement fixation test, in "Diagnostic methods in clinical virology", 3erd. ed; Grist LR ed. pp95-115. Billing and Son lim. London. 1979.

85.- HALL, SM; CONFER, AW; TABATABAI, LB; DEYOE, BL. Detection of serum antibody to *Brucella abortus* in cattle by use of a quantitative fluorometric immunoassay. J. Clin. Microbiol. 20(6): 1023-1027. 1984.

86.- HARMONIER, A; BURTHET, B. Serological diagnosis of human brucellosis by means an ELISA. Stimente of some parameters of the reaction and practical applicaton. Pathol. Biol. 29(2): 77-81. 1981.

87.- HARMONIER, A; STAHL, JP; METZ, D; MICOUD, M. Interest et valeur de la technique ELISA apliqueé an diagnostic serologique des brucelloses humaines. Med. et Malad. Infect. 30:664-669. 1979.

88.- HARMONIER, A; STAHL, JP; NICOVAL, M; LENOC, P. Serological diagnosis of human brucellosis by means of an ELISA. Comparison with four other usual sero-logical test. Pathol. Biol. 29(2): 83-87. 1981.

89.- HARRIS, RI; STONE, PCW; HUDSON, AG; STUART, J. C reactive protein rapid assay techniques for monitoring resolution of infection in immunosuppreses patients. J. Clin. Pathol. 37: 821-825.

90.- HASSAN, A; ERIAN, MM; FARID, Z; ET AL. Trimethprim-sulfamethoxazole in acute brucellosis. Br. Med. J. 3: 159-160. 1971.

91.- HAUSLER, WJ; MOYER, NP; HOLCOMB, LA. *Brucella*. In EH Lennette (ed): Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. ASM, Washington DC. pp:382-386. 1985

92.- HAYES, J; CHAPPEL, RJ. A comparison of the results of the brucellosis radioimmunoassay and other serological test in experimentally infected cattle. J. Hyg. Camb. 88: 21-28. 1982.

93.- HEITZMANN, W; BOTZENHART, K; DOLLER, G; SCHANZ, D; HERMANN, G; FLEISCHMANN, K. Brucellosis: serological methods compared. J. Hyg. Camb. 95: 639-653. 1985.

94.- HERSCHBERG, S; SPRING, WW. Immunoglobulins in brucellosis. JAMA. i:218 741. 1971.

95.- HEWITT, WG; PAYNE, DJH. Estimatation of IgG and IgM brucella antibodies in infected and non infected persons by a radioimmune technique. J. Clin. Pathol. 37: 692-696. 1984.

96.- JONES, LM; DIAZ, R; TAYLOR AC. Characterization of allargens prepared from Smooth and Rough strains of *Brucella mellitensis*.. Br. J. Exp. Path. 54: 492-503. 1973

97.- KERR, WR; COGHLAM, JD; PAYNE, JH; ROBERTSON , L. The laboratory diagnosis of chronic brucellosis. Lancet. 2: 1181-1183. 1966.

98.- KERR, WR; McCANGHEY, WJ; COGHLAND, JD; PAYME, DJH; ONAIFE, RA; ROBERSTSON, L; FARRELL, ID. Techniques and interpretations in the serological diagnosis of brucellosis in man. J. Med Microbiol. 1: 181-193. 1968

99.- KERR, WR; PAYNE, DJ; ROBERTSON, L; COOMBS. RRA. Immunoglobulin class of *Brucella* antibodies in human sera. Immunology, 13 223-225. 1967.

100.- KLEIN GC; BEHAN, KA. Determination of brucella immunoglobulin G agglutinating antibody titer with dithiothreitol. J. Clin. Microbiol. 14(1): 24-25. 1981.

101.- KNIGHT, RC. Measuring IgG anti-A/B titres using dithiothreitiol (DTT). J. Clin. Pathol. 31: 283-[illegible] 1978

102.- LACHENBRUCH, PA. Discriminant analysis. Hafner Press. 1975.

103.- LAL, S; MODAWAL, KK; FOWLE, ASE; ET AL. Acute brucellosis treated with trimethoprim and sulfamethoxazole. Br. Med. J. 3: 256-257. 1970.

104.- LAMB, VL; JONES, LM; SCHURIG, GG; BERMAN, DT. ELISA from bovine immunoglobulin subcass- specific response to *Brucella abortus* lipopolysaccharide. Infect. Immun. 26: 240-247. 1979.

105.- LEONG, D; DIAZ, R; MILNER, K; ET AL. Some structural and biological properties of *Brucella* endotoxin. Infect Immunol. 1: 174-182. 1970.

106 - LOWBEER, L. Granulomatous hepatitis. N. Eng. J. Med.309(18): 1127-1128. 1983.

107 - LLORENS-TEROL, J; BUSQUETS, RM. Brucellosis treated with rifampicin. Arch Dis. Child. 55:186-488. 1980.

108.- MAGILL, GB; KILLOUGH, JH. Oxitetracycline-streptomicycin therapy in brucellosis due to *Brucella melitensis* Arch Intern. Med. 91: 204-211. 1953.

109.- MACKIE, PH; CROCKSON RA; STUART, J. C-reactive protein for rapid diagnosis of infection in leukaemia. J. Clin. Pathol. 32: 1253-1256. 1979.

110.- MAGEE, JT. An enzyme-labelled immunosorbent assay for *Brucella abortus* antibodies. J. Med. Microbiol. 13: 167-172. 1980.

111.- MARCOS SANCHEZ, F; TURABIAN, JL; GORGOLOAS, P; Y COLS. Endocarditis bacteriana brucelar. Rev. Clin. Esp. 175(1): 41-42. 1984.

112.- MARIVI-POMA, E; GARCIA-CARASUSAN, M; GAMBOA, J; Y COLS. Brucelosis: Estudio sobre 222 casos. Parte I: Epidemiología. Rev. Clin. Esp. 166(1-2): 55-58. 1982.

113.- MARIVI-POMA, E; MURIE, M; GAMBOA, J; DIAZ, R; RIVERO-PUENTE, A. Brucelosis: estudio sobre 222 casos. Parte III: Brucelosis crónica. Estudio clínico prospectivo de 36 casos. Rev. Clin. Esp.166(3-4):101-105. 1982.

114.- McCABE, RE; REMINGTON, JS. C-reactive protein in patients with bacteremia. J. Clin. Microbiol. 20 (3): 317-319. 1973.

115.- McCARTHY, PL; FRANK, AL; ABLOW, RC; MASTERS, SJ; DOLAN, TF. Value of the C-reactive protein test in the differentiation of bacterial and viral pneumonia. J. Pediatr. 92: 454-456. 1978.

116.- McCULLOUGH, ND. Immune response to *Brucella*, pp 304-311. In Manual of Clinical Immunology. NR Rose and Friedman eds. AMS. Washington DC. 1976.

117.- McDEVITT, DG. The relevance of anti-human globulin Coombs test and the complement fixation test in the diagnosis of brucellosis. J. Hyg. Camb. 68: 173. 1970

118.- McMAHON, KJ. Comparison of the 2- mercapto ethanol and dithiothreitiol test for determining Brucella immunoglobulina G agglutinating antibody in bovine serum. Can J. Comp. Med. Jul 47(3): 370-372. 1983.

119.- MEYER, ME. Immune response to Brucellae. In NR Rose, Friedman H, and Fahey JL(eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology. ASM, Washington, DC. pp:385-387. 1986.

120.- MITTAL, KR; TIZARD, IR. Serological cross-reactions between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* serotipe 09. Vet. Bull. 51: 501-505. 1981

121.- MORENO, E; BERMAN, DT; BOETTCHER, LA. Biologycal activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides Infect. Immun. 31: 362-370. 1981.

122.- MORENO, E; BOROWIAK, D; MAYER, H. Brucella lipopolysaccharides and polysaccharides. Ann. Inst. Pasteur/ Microbiol. 138: 102-105. 1987.

123.- MORENO, E; PITT, MV; JONES, LM; ET AL. Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from *Brucella abortus*. J. Bact. 138:361-369. 1979.

124.- MORENO, E; SPETH, SL; JONES, LM; BERNAN, DT. Immunochemicals characterization of brucella lipopolysaccharides and polisaccharides. Infect. Immun. 31(1): 214-222. 1981.

125.- MORIYON, I; GAMAZO, C; DIAZ, R. Aplicación de nuevas técnicas en la brucelosis Encuentro Internacional sobre Brucelosis Madrid-85. pp:39-42. Garsi SA ED. Madrid 1986.

126.- NAVARRO RODRIGUEZ, A; PACHON, J; TORRONTERAS, JA; Y COLS. Utilidad del test de inmunofluorescencia indirecta y la prueba del Rosa de Bengala en el diagnóstico de brucelosis. Rev. Clin. Esp. 175(1): 27-31. 1984.

127.- NICHOLS, WS; NAKAMURA, RM. Agglutination and agglutination inhibition assays. In NR Rose, Friedman H, and Fahey JL(eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology. ASM, Washington, DC. pp:49-56. 1986.

128.- OKUNO,T; KONDELIS, N. Evaluation of dithiothreitol (DTT) for inactivation of IgM antibodies. J. Clin. Pathol. 31: 1152-1155. 1978.

129.- OOMENLJA, R ; WASHELAS,A. The Rose Bengal plate test in human brucellosis. Trop. Geogr. Med. 26: 300-302. 1974.

130.- OSMAND, AP; MORTENSEN RF; SIEGEL, J; GEWURZ, H. Interactions of C-reactive protein with the Complement system. J. Exp. Med. 142: 1065-1077. 1975.

131.- OVERALL, JE; KLETT,CJ. Applied multivariate analysis. McGraw-Hill Book Co. New York. 1972.

132.- PALMER, DF; WHALEY, SD. Complement Fixation Test. In NR Rose, Friedman H, and Fahey JL(eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology. ASM, Washington, DC. pp:57-66. 1986.

133.- PARRATT, D; NIELSEN, KH; WHITE, RG. Radioimmunoassay of IgM, IgG, and IgA brucella antibodies. Lancet (i) 21: 1075-1078.. 1977.

134.- PELLERIN, JL; SEVAL, MF; LANTIER, R . The immunoenzymatic ELISA test in the human brucellosis serologic diagnosis. Comparative study with a classical techniques. Rev. Med. Vet. 131(11): 741-766. 1980.

135.- PELLICER, T; ARIZA, J; FOZ, A; PALLARES, R; GUDIOL, F. Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. J. Infect. Dis. 157(5): 918-924. 1988

136.- PEPYS, MB. C-reactive protein fifty years on. Lancet. March 21:653-657. 1981

137.- PHILIP, AGS; HEWITT, JR. Early diagnosis of neonatal sepsis. Pediatrics. 65 (5): 1036-1041. 1980.

138.- PIEDROLA, G; GALVEZ, R; MAROTO, MC. Brucelosis. Epidemiologia y Medicina Preventiva. Importancia actual del problema en España. lucha antibrucelósica. En A. Pumarola y Cols. (eds): "Medicina Preventiva y Social, Higiene y Sanidad ambiental. Amaro ed. Madrid. pp:773-778. 1980.

139.- PILLOT, J; KOUYOUMDJIAN, S; GRANGEOT, L. Serodiagnostic de la brucellose humaine.Nouv. Press. Med. 2:105-108. 1975.

140.- RAYBOULD, TJG; BEESLEY, JE; CHANTLER, S. Ultraestructural localization of characterized antigens of *Brucella abortus* and distribution among different biotipes. Infect. Immun. 32: 318-322. 1981.

141.- RAYBOULD, TJG; CHANTLER, S. Serological differentiation between infected and vaccinated cattle by using purificied soluble antigens from *Brucella abortus* in a hemaglutination system. Infect. Immun. 29: 435-441. 1980.

142.- REDDIN, JL: ANDERSON, RK; JENNERS, R; SPINK, WW. Significance of 7s and macroglobulin agglutinins in human brucellosis. New. Engl. J. Med. 272: 1263. 1965.

143.- RENNER, ED. Brucellosis. Clin. Microbiol. New. 1(19): 1-4.1979.

144.- RICHARDS, NF; ELLIOTT, TS; POWELL, RJ; O'CALLAGHAN, C; FRANKLIN, P. Can the rapid semiquantitative estimation of serum C-reactive protein be adapted for the management of bacterial infection?. J. Clin. Pathol. 38: 464-467. 1985.

145.- RIEZU-BOJ, JI; MORIYON, I; BLASCO, JM; MARIN, CM; DIAZ, R. Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Brucella ovis* infection. J. Clin. Microbiol. 23(5): 938-942. 1986.

146.- RIVERO, A; MARIVI, E; GARCIA, M; Y COLS. Brucelosis: Estudio de 222 casos. Parte II: Clinica de la brucelosis aguda. Rev. Clin. Esp. 166(1-2): 59-63. 1982.

147.- RIVERO, A; MARIVI, E; GARCIA, M; Y COLS. Brucelosis: Estudio de 222 casos. Parte V: tratamiento. Rev. Clin. Esp. 166(3-4): 111-114. 1982.

148.- ROBERTSON, L; FARRELL, ID; HINCHLIFFE, PM. The sensitivity of *Brucella abortus* to chemotherapeutic agents. J. Med. Microbiol. 6: 549-557. 1973

149.- RODRIGUEZ CUARTERO, A; DURAN CARA, E. La brucelosis osteoarticular en la provincia de Granada. Rev. Clin. Esp. 133:57-64. 1974.

150.- ROSE, PE; JOHNSON, SA; MEAKIN, M; MACKIE, PH; STUART, J Serial study of C-reactive protein during infection in leukaemia. J. Clin. Pathol. 34: 263-266. 1981.

151.- RUBIO, MF; DIAZ, R; GUISANTE, JA. Brucelosis bovina, diagnostico serologico mediante la tecnica ELISA. Laboratorio (Granada). 73(437): 415-428. 1982.

152.- RUPPANNER, R; MEYER, ME; WILLEBERG, P; BEHYMER, DE. Comparison of the enzyme linked immunoassorbent assay with other test for brucellosis using sera from experimentally infected heifers. Am. J. Vet. Res. 41: 1329-1332. 1980.

153.- SABEL, KG; WADSWORTH, CH. C-reactive protein (CRP) in early diagnosis of neonatal septicemia Acta Pediatr. Scand. 68: 825-831. 1979.

154.- SALATA, RA; RAVDIN, JI. Brucella species (Brucellosis). In GL Mandell, RG Douglas, and JE Bennett (eds):Principles and practice of infectious diseases. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York. pp:1283-1290. 1985

155.- SANZ SALA, L; BARCELO, P. Localizaciones de la brucelosis en el aparato locomotor. Rev. Esp. Reumat. 11:256. 1965.

156.- SCHOUTENS, E; HOENS, JP; YOURASSOW, K. Hararas in the serological diagnosis of human brucellosis. Ann. Soc. Belga. Med. Trop. 58(2): 111-117. 1978.

157.- SCHURIG, GG; JONES, LM; SPETH, SL; BERMAN, DT. Antibody response to antigens distinct from smooth lipopolisacharide complex in brucella infection. Infect. Immum. 21: 994-1002. 1978.

158.- SIPPEL, JE; EL-HASRY, NA; FURID, Z. Diagnosis of human brucellosis with ELISA. Lancet.2: 19-21. 1982.

159.- STROHL, A. Despistage de la Brucellose L'antigen Rose Bengales, un progress pour l'avenir. Rev. Med. Vet. 37: 1453-1467. 1974.

160.- SUTHERLAND, SS. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for the detection of specific antibody in cattle vaccinated and challenged with *Brucella abortus*. J. Clin. Microbiol. 22(1): 44-47. 1985.

161.- TABATABAI, LB; DEYOE, BL. Specific enzyme linked inmunosorbent assay for detection of bovine antibody to *Brucella abortus*. J. Clin. Microbiol. 20(2): 209-213. 1984.

162.- TAYLOR, RN; HOUNG, AY; FULFORD, KM; PRZYBYSZEWSKI, VA. Quality control for immunologic test. U.S. Departament of health, Education and Welfare. Public Health Service. Atlanta. GE. 1979.

163.- TELEGDY.L. Tratamiento de la brucelosis crónica . IX Congreso Internacional de Quimioterapia. Londres (ed. esp). pag 16. 1975.

164.- THOEN, CO; ARMBRUST, AL; EACRET, R; HARRINGTON, R; BROWN, GM. Use of an enzyme immunoassay test for characterizing the A and M antigens of brucella. J. Clin. Microbiol. 9(4): 485-487. 1979.

165.-THOEN, CO; PIETZ, DE; ARMBRUST, AL; HARRINGTON, R. Enzyme immunoassay for detecting brucella antibodies in Cow's milk. J. Clin. Microbiol. 10(2). 222-225. 1979.

166.- TILLET, WS; FRANCIS, T. Serologicals reactions in pneumonia with a nonprotein somatic fraction of pneumococcus. J. Exp. Med. 52:561-571. 1930.

167.- WAITZ, JA; WEINSTEIN, MJ. Recents microbiologicals studies with gentamicin. J. Infect. Dis. 119: 355-360. 1969.

168.- WHITE, RG. Immunoglobulin profiles of the chronic antibody response: discussion in relation to brucellosis infections. Postgrad. Med. J. 54: 595-602. 1978.

169.- WICHER, K. C-reactive protein. In NR rose and H Friedman ed:"Manual of Clinical Laboratory Immunology". 2ª ed. ASM. Washington DC. pp:679-685. 1980.

170.- WILKINSON, PC. Immunoglobulin patterns of antibodies against Brrucella in man and animals. J. Immun. 96(3): 457-463. 1966.

171.- WILSON, MM; MERRIFIEDD, EVO. The antiglobulin (Coombs) test in brucellosis. Lancet. 2: 913-914. 1951.

172.- WOODARD, LF; TOONE, N. Allergenic activity and biochemical analisis of three soluble antigen preparations from *Brucella abortus* strain 45/20. Am. J. Vet. Res. 41 (1): 114-116. 1980.

173.- WORLD HEART ORGANIZATION. Joint FAO/WHO expert committee on Brucellosis. Sixth report. Tech Rep. Ser. WHO, nº 740. 1986.

174.- WORLD HEART ORGANIZATION. A guide to the diagnosis, treatment end prevention of human brucellosis. SS Elberg(ed). 1981.

175.- YOUNG, EJ. Human brucellosis. Rev. Infect. Dis. 5(5): 821-842. 1983.

176.- YOUNG, EJ; BORCHERT, M; KRETZER, FL; MUSHER, DM. Phagocytosis and killing of brucella by human polymorphonuclear leukocytes. J. Infect. Dis. 151(4): 682-690. 1985.

177.- ZHELNDKOR, MM. Use of the Coombs test and the inmunofluorescent method for the detection of incomplete antibodies in cases of brucellosis in human. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Inmunobiol. 57(2): 45-49. 1980.

178.- ZOHA, SJ; CARMICHAEL, LE. Properties of *Brucella canis* surface antigens associated with colonial mucoidiness. Cornell. Vet. 71: 428-438. 1981.