

# Diagnóstico de la brucelosis humana. Influencia del pH en la prueba de seroaglutinación y sobre la actividad aglutinante de los anticuerpos IgM, IgG e IgA

Manuel Rubio Vallejo<sup>a</sup>, José Luis del Pozo León<sup>a</sup>, Juan Manuel Hernández-Molina<sup>b</sup>, Inés Dorronsoro Ibero<sup>c</sup>, Teresa Marrodán Ciordia<sup>a</sup> y Ramón Díaz García<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología. Servicio de Microbiología. Clínica Universitaria. Universidad de Navarra. Pamplona. <sup>b</sup>Servicio de Microbiología. Hospital de la Inmaculada. Huércal-Overa. Almería. <sup>c</sup>Servicio de Microbiología. Hospital de Navarra. Pamplona. España.

**OBJETIVO.** Analizar el efecto del pH en la prueba de seroaglutinación (SAT) y rosa de Bengala (RB) y su influencia sobre la capacidad aglutinante de los anticuerpos IgM, IgG e IgA.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** La SAT se realizó a pH 7,2 y a 5,0 en placas de microtiter utilizando "Ring test antigen" (RT) y la suspensión de brucelas utilizada en la prueba de Brucellacapt® (BRUCAPT). La presencia de anticuerpos frente al hapteno nativo (HN) se realizó mediante la prueba de inmunodifusión radial (IDR). Además, se estudió la capacidad aglutinante a pH 7,2 y 5,0 de las fracciones IgG, IgA e IgM de 8 sueros obtenidas mediante cromatografía de adsorción.

**RESULTADOS.** Se han empleado 72 sueros de pacientes con brucelosis, 16 de personas en contacto con animales infectados y 16 de donantes sanos. Los resultados de la SAT a pH 5,0 se correlacionaron con los de la prueba de RB. La SAT de cuatro sueros RB positivos fue negativa a pH 7,2 pero positiva a pH 5,0. Los títulos de la SAT a pH 5,0 con el antígeno BRUCAPT fueron superiores a los obtenidos con el RT ( $p < 0,001$ ) a pH 7,2 o 5,0, siendo los más elevados los correspondientes a los sueros IDR positivos. De las 8 fracciones IgG, siete aglutinaron a pH 7,2 y en cuatro sus títulos aumentaron significativamente a pH 5,0. Tres fracciones IgA fueron SAT negativas a pH 7,2 pero positivas a pH 5,0 y las otras cinco aglutinaron a pH 7,2 y a 5,0, y además, fueron sensibles al ditiotretol (DTT). El pH no modificó significativamente la actividad aglutinante de las fracciones IgM.

**CONCLUSIONES.** La prueba de SAT realizada con el tampón de dilución y la suspensión antigénica incluidas en los equipos Brucellacapt® es de gran utilidad para la demostración de la presencia de anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes a pH 7,2.

**Palabras clave:** Brucelosis. Seroaglutinación. Anticuerpos. Brucellacapt®, pH.

Diagnosis of human brucellosis. Role of pH in the seroagglutination test and influence of pH on the agglutinating activity of IgM, IgG and IgA antibodies

**OBJECTIVE.** To evaluate the role of pH in the seroagglutination test (SAT) and Rose Bengal (RB) test, and to determine the influence of pH on the agglutinating activity of IgM, IgG and IgA antibodies.

**MATERIAL AND METHODS.** The SAT was performed at pH 7.2 or pH 5.0 in standard microtiter-type polystyrene plates using Ring Test antigen or the *Brucella* suspension (BRUCAPT) provided in the Brucellacapt® kits. Specific antibodies against native hapten were determined by radial immunodiffusion. Additionally, IgG, IgA and IgM fractions were separated from 8 sera by absorption chromatography and their agglutinating capacity was studied at pH 7.2 and 5.0.

**RESULTS.** We studied 72 sera from patients with clinical brucellosis taken at the time of hospitalization, 16 from persons in contact with infected animals, and 16 from healthy donors. SAT results at pH 5.0 correlated with those obtained with the Rose Bengal test. Four Rose Bengal-positive sera were found to be SAT-negative at pH 7.2 and SAT-positive at pH 5.0. SAT performed at pH 5.0 with BRUCAPT antigen yielded higher titers than tests performed at pH 7.2 or 5.0 with Ring Test antigen ( $p < 0.001$ ), with highest titers in IDR-positive sera. Among the 8 IgG fractions, all but one agglutinated at pH 7.2, and in 4, IgG titers showed significant increases at pH 5.0. Three IgA fractions were SAT-negative at pH 7.2 and SAT-positive at pH 5.0; the other 5 agglutinated at both pH conditions and were DTT-sensitive. All IgA fractions but one were positive by Rose Bengal. Agglutinating activity of the IgM fraction was not affected by pH.

**CONCLUSION.** The SAT performed with the buffer and antigen suspension included in the Brucellacapt® kit (pH 5.0) is highly useful for detecting agglutinating and non-agglutinating antibodies at pH 7.2.

**Key words:** Brucellosis. Seroagglutination. Antibodies. Brucellacapt®, pH.

Correspondencia: Dr. R. Díaz García.  
Departamento Interfacultativo de Microbiología y Parasitología.  
Universidad de Navarra.  
Apartado 273. 31080 Pamplona.  
Correo electrónico: rdiaz@unav.es

El presente trabajo ha sido financiado por el Departamento de Salud del Gobierno de Navarra (Proyecto n.º 1813).

Manuscrito recibido el 17-04-2001; aceptado el 31-10-2001.

## Introducción

La prueba más utilizada para el diagnóstico de la brucelosis humana es la seroaglutinación (SAT) en tubo o microplaca y para el cribado la de rosa de Bengala (RB). En la primera, el pH de la suspensión bacteriana y del diluyente de los sueros es neutro, mientras que en la segunda, las bacterias están resuspendidas en un tampón ácido (pH 3,6). La SAT convencional no está exenta de problemas, entre éstos cabe señalar los resultados falso-negativos, que se producen por la intervención de anticuerpos bloqueadores IgA<sup>1,2</sup> o cuando existe un predominio de anticuerpos IgG no aglutinantes (anticuerpos incompletos).

Recientemente se ha demostrado que en ciertos casos de brucelosis humana, en los que la SAT resultó negativa, la prueba de RB fue positiva, con títulos que variaron entre 16 y 32<sup>3</sup>. Por lo tanto, era necesario estudiar si la discrepancia entre los resultados anteriormente mencionados, eran debidos a las diferencias de pH de los reactivos que se emplean en estas dos pruebas de aglutinación.

En el presente trabajo se ha analizado la influencia del pH en la SAT. Para ello, se ha realizado un estudio comparativo entre la SAT utilizando una suspensión de *Brucella abortus* en tampón fosfato (PBS) a pH 7,2 y la SAT realizada con el diluyente (pH 5,0) y la suspensión de *B. melitensis* con el mismo pH, incluidas en los equipos comerciales Brucellacapt®. En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos.

## Material y métodos

### Sueros empleados

Se han utilizado 72 muestras de sueros RB positivos obtenidos del mismo número de pacientes diagnosticados de brucelosis en la Clínica Universitaria (Pamplona), el Hospital de Navarra (Pamplona) y el Hospital Comarcal de Huércal-Overa (Almería) en los últimos 10 años. Además, se han estudiado 16 sueros control RB positivos obtenidos de personas en contacto con animales infectados y otros 16 RB negativos de donantes sanos residentes en medio urbano.

### Pruebas serológicas

Las pruebas de RB, SAT a pH 7,2 y SAT con 0,001 M de ditiotreitol (SAT-DTT) se realizaron según los procedimientos previamente descritos<sup>4,5</sup>. En la SAT a pH 7,2 y SAT-DTT se empleó como antígeno la suspensión de *B. abortus* que se utiliza para realizar la prueba del anillo (Ring Test Antigen, ART). Este antígeno, así como el utilizado

en la prueba de RB fueron suministrados por el Dr. A. MacMillan (Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, Inglaterra). El estudio de la SAT a pH 5,0 se realizó con los diluyentes (lotes 201, 202 y 204) y las suspensiones antigénicas (BRUCAPT) (lotes 103, 104, 105 y 107) incluidas en los equipos Brucellacapt® correspondientes, obtenidos de la empresa suministradora Innogenetics (Hospitalet, Barcelona). El estudio de la presencia de anticuerpos frente al hapteno nativo (HN) se realizó utilizando las placas de inmunodifusión radial (Ingezim® *Brucella* IDR) preparadas por Ingenasa (Madrid). Cuando fue necesario se realizó la técnica de contrainmunolectroforesis (CIEF) utilizando proteínas citosólicas según el método previamente descrito. Los métodos de CIEF y de obtención de las proteínas se han publicado anteriormente<sup>4</sup>.

Es necesario señalar que en ninguno de los experimentos realizados hemos empleado las placas de inmunocaptura incluidas en los equipos Brucellacapt® y las SAT se realizaron siempre en placas de poliestireno convencionales (Greiner).

### Fraccionamiento de los sueros

Se seleccionaron 8 sueros de pacientes diagnosticados de brucelosis con distintos patrones serológicos (tabla 1), y de ellos se obtuvieron las fracciones de inmunoglobulinas G, M y A mediante cromatografía de adsorción. El fraccionamiento se realizó en columnas (120 × 15 mm) que contenían 2 ml de los inunoabsorbentes específicos (anti-IgM, anti-IgG o anti-IgA, Sigma). El proceso de separación se realizó filtrando 200 µl de suero diluido al 1:20 en PBS 20 mM con azida de sodio a pH 7,2 (PBS-azida) a través de las columnas correspondientes. Éstas se lavaron dos veces con 10 ml de PBS-azida, y las inmunoglobulinas retenidas fueron eluidas con 20 ml de tampón glicina-HCl 0,1 M a pH 2,6. El producto de la elución se recogió sobre TRIS sólido para conseguir una rápida neutralización del pH, y finalmente fue dializado y concentrado utilizando dispositivos Vivapure®, hasta alcanzar el volumen original (200 µl). El análisis de la cantidad y pureza de cada una de las inmunoglobulinas se realizó utilizando placas de inmunodifusión radial anti-IgG, anti-IgA y anti-IgM (Operón, Zaragoza). Cuando fue necesario se utilizó la prueba Dipstick-IgM desarrollada por Smits et al<sup>6</sup> para la detección en las fracciones IgA, de anticuerpos contaminantes IgM frente al lipopolisacárido (LPS) de *Brucella*.

## Resultados

En la tabla 2 se expresan los resultados del análisis estadístico de las pruebas de SAT realizadas a pH 7,2 y a 5,0 con 88 sueros clasificados en cuatro grupos. El grupo A contenía 28 sueros en los que se había demostrado la presencia de anticuerpos frente al HN mediante IDR siendo además resistentes al DTT; en el grupo B se incluyeron 16 sueros con anticuerpos resistentes al DTT y negativos en las pruebas de Dipstick-IgM e IDR; en el grupo C se incluyeron 28 sueros ricos en anticuerpos IgM,

TABLA 1. Resultados de las pruebas serológicas de los sueros seleccionados para su fraccionamiento

Suero	Título de RB	CIEF (proteínas citosólicas)		Dipstick IgM	Título de SAT		
		Nº de líneas	Título		pH 7,2 (RT)	DTT	pH 5,0 (BRUCAPT)
1	16	6	32	—	< 20	< 20	10.240
2	32	8	64	—	< 20	< 20	20.480
3	32	6	128	—	1.280	1.280	40.960
4	8	5	16	—	320	320	320
5	64	2	4	—	5.120	160	5.120
6	128	1	1	+	5.120	320	10.240
7	4	2	4	—	160	< 20	320
8	256	10	128	+	20.480	20.480	40.960

CIEF: contrainmunolectroforesis; DTT: ditiotreitol; RB: rosa de Bengala; RT: Ring Test Antigen; SAT: seroaglutinación.

TABLA 2. Análisis estadístico (test de Wilcoxon) de los resultados de las SAT a pH 5,0 con el antígeno BRUCAPT y a pH 7,2 con el antígeno RT

	A (HN +) SAT		B (HN -/IgM -)* SAT		C (IgM +) SAT		D (control) SAT	
	pH 7,2	pH 5,0	pH 7,2	pH 5,0	pH 7,2	pH 5,0	pH 7,2	pH 5,0
Mediana	640	10.240	160	960	1.280	1.280	60	240
Percentiles 25-75	320-2.560	2.560-20.480	160-320	320-2.560	1.280-8.960	1.280-1.0240	< 20-160	70-320
p	< 0,0001		< 0,001		0,092		< 0,001	
N	28		16		28		16	

\*En todos los pacientes de este grupo se había confirmado el diagnóstico mediante el aislamiento del agente etiológico.  
HN: hapteno nativo; SAT: seroaglutinación.

TABLA 3. Resultados de las SAT realizadas con los antígenos BRUCAPT y RT en diferentes condiciones

Diluyente de los sueros Antígeno Diluyente del antígeno	A		B		C	
	Brucapt pH 5,0 RT Brucapt pH 5,0	Brucapt pH 5,0 BRUCAPT Brucapt pH 5,0	PBS pH 7,2 RT PBS pH 7,2	Brucapt pH 5,0 RT Brucapt pH 5,0	PBS pH 7,2 RT PBS pH 7,2	PBS pH 7,2 BRUCAPT PBS pH 7,2
Mediana	640	5.120	640	640	900	1.280
Percentiles 25-75	640-2.560	2.560-10.240	320-2.560	640-2.560	35-5.120	40-5.120
p	< 0,0001		0,115		0,128	
N	45		45		16	

RT: Ring Test Antigen.

TABLA 4. Resultados de las pruebas de RB y de SAT obtenidos con los sueros negativos en la SAT a pH 7,2 y realizadas a pH 5,0 con los antígenos RT y BRUCAPT

Suero	RB	SAT		Hemocultivo
		pH 5,0/RT	pH 5,0/BRUCAPT	
1*	16	640	5.120	+
2*	32	1.280	10.240	+
3	8	160	1.280	+
4	8	160	1.280	NR

\*Los resultados de otras pruebas serológicas de los sueros 1 y 2 se indican en la tabla 5.

RB: rosa de Bengala; RT: Ring Test Antigen; SAT: seroaglutinación; NR: no realizado.

demostrado mediante la prueba Dipstick-IgM; y, finalmente, en el grupo D se incluyeron los 16 sueros control de personas que habían estado en contacto con animales infectados. No se incluyeron en esta tabla los resultados obtenidos con los 16 sueros de las personas procedentes de núcleos urbanos, porque los títulos de la SAT a pH 5,0 y 7,2 fueron inferiores a 20.

Los resultados obtenidos han demostrado que las diferencias entre las medianas de los títulos correspondientes a las SAT realizadas con el diluyente y con el antígeno BRUCAPT (pH 5,0) y las de la SAT realizadas con el antígeno RT en PBS (pH 7,2), fueron estadísticamente significativas en los grupos A ( $p < 0,0001$ ), B ( $p < 0,001$ ) y D ( $p < 0,001$ ). En contraste, este hecho no ocurrió con los sueros del grupo C ( $p = 0,092$ ), que contenía los sueros ricos en anticuerpos IgM. Finalmente, hay que señalar, que las medianas de los títulos de la SAT de los sueros de las personas en contacto con animales infectados, a pH 5,0 fue de 240 y a pH 7,2 de 60.

Con el fin de conocer si las diferencias encontradas entre los títulos de la SAT a pH 7,2 y a pH 5,0 en el experimento anterior se debían únicamente a la influencia del pH, se realizó un nuevo estudio en el que se compararon las SAT empleando el antígeno RT y el antígeno BRUCAPT en diferentes condiciones. En este experimento se utilizaron 45 sueros en los que el título de la SAT convencional era igual o superior a 160 (columnas A y B), y 16 sueros (columna C) que presentaban propiedades especiales (v. más adelante). En la tabla 3 se indican los resultados de este estudio, que demuestran dos hechos importantes. Primero, que se mantenía una diferencia significativa ( $p < 0,0001$ ) entre la SAT realizada a pH 5,0 utilizando los antígenos BRUCAPT y RT (columna A) y, segundo, que no se observaron diferencias significativas entre las pruebas de SAT realizadas con el antígeno RT a pH 5,0 y a pH 7,2 (columna B), ni entre las pruebas de SAT realizadas con el antígeno RT diluido en PBS (pH 7,2) y el antígeno BRUCAPT lavado y resuspendido a su concentración original en PBS a pH 7,2 (columna C).

En los 16 sueros de la columna C se incluyeron cuatro con títulos de SAT inferiores a 20 y 12 con diferencias significativas entre los títulos de las SAT a pH 5,0 y a pH 7,2. Los resultados obtenidos con los cuatro sueros SAT negativos se expresan en la tabla 4. Se observa que los cuatro sueros fueron positivos en las pruebas de RB y SAT a pH 5,0 con los antígenos RT y BRUCAPT; sin embargo, se observa que los títulos obtenidos con el antígeno BRUCAPT fueron netamente superiores.

Aunque los resultados del estudio estadístico son significativos, el análisis individual de los resultados obtenidos con cada uno de los sueros, permitió distinguir cuatro patrones de SAT según el antígeno y el diluyente empleado. En la tabla 5 se exponen los resultados obtenidos con un suero representativo de cada patrón y con un suero control de uno de los equipos Brucellacapt®.

**Suero 1.** Obtenido de un paciente con una brucelosis con más de 4 meses de evolución con diagnóstico confirmado mediante el aislamiento de *B. melitensis* de un absceso pancreático. Los títulos de SAT fueron inferiores a 20 con los antígenos RT y BRUCAPT diluidos en PBS a pH 7,2; sin embargo, cuando el antígeno RT se diluyó en el tampón a pH 5,0, el título de la SAT fue de 640, y el antígeno BRUCAPT de 10.240.

**Suero 2.** Los títulos de este suero, rico en anticuerpos IgM, y que pertenecía a un paciente con una brucelosis de 5 días de evolución (hemocultivo positivo), fueron similares en las cuatro condiciones.

**Suero 3.** Este suero contenía anticuerpos frente al HN, y pertenecía a un paciente con una brucelosis de más de un año de evolución y presentó un título de SAT con el antígeno BRUCAPT de 40.960 y de 2.560 en las condiciones restantes.

**Suero 4.** Correspondiente a un paciente en el que se había confirmado el diagnóstico mediante el aislamiento de *B. melitensis* en un absceso vertebral. En este suero no se observaron variaciones significativas en las SAT realizadas en las cuatro condiciones. Los títulos de la SAT de este suero fueron similares a los del suero control.

Una vez conocido el hecho de que el pH desempeña un papel importante en los resultados de la SAT, era necesario conocer su influencia sobre los anticuerpos IgM, IgG e IgA. Para la realización de este experimento se seleccionaron 8 sueros con distintos patrones serológicos (v. tabla 1) que se fraccionaron como se indica en material y métodos. En la tabla 6 se exponen los resultados obtenidos con las fracciones IgG, IgA e IgM en las pruebas RB, SAT a pH 7,2 y de la SAT-DTT realizadas con el antígeno RT; y de la SAT con el antígeno BRUCAPT a pH 5,0. Se observa que las fracciones IgG de los sueros 1 y 2, que eran negativos en la SAT a pH 7,2, aglutinaron a éste pH cuando estaban libres de anticuerpos IgA, y además, su actividad aglutinante aumentó significativamente a pH 5,0. Las fracciones IgG de los sueros 3, 4, 5, 6 y 8 también aglutinaron a pH 7,2, pero únicamente las fracciones IgG de los sueros 3 y 7 mostraron un aumento significativo a pH 5,0. Finalmente hay que señalar, que la prueba de RB fue positiva con todas las fracciones IgG.

En relación con las fracciones IgA, los resultados obtenidos han demostrado que las fracciones correspondientes a los sueros 1, 2 y 3 carecían de propiedades aglutinantes a pH 7,2, pero la SAT a pH 5,0 fue positiva, con títulos que variaron entre 160 y 1.280. En contraste, la SAT a pH 7,2 de las fracciones IgA de todos los sueros restantes fue positiva, con títulos que variaron entre 80 y 1.280. Por otra parte, éstos aumentaron en un título a pH 5,0, y además, los títulos disminuyeron de manera significativa en presencia de DTT. En ninguna de las fracciones IgA se demostró la presencia de anticuerpos IgM mediante la prueba Dipstick-IgM. Respecto a los resultados obtenidos en la prueba de RB, hay que indicar que todas las fracciones IgA, excepto la correspondiente al suero 3, fueron positivas.

Finalmente hay que señalar, que únicamente las fracciones IgM de los sueros 5, 6 y 8 mostraron capacidad aglutinante a pH 7,2 y 5,0. Todas fueron RB positivas,

**TABLA 5. Resultados de las pruebas de RB y de SAT con los antígenos RT y BRUCAPT a pH 5 realizadas con los sueros representativos de los cuatro patrones serológicos**

Diluyente Antígeno Diluyente suero	RB pH 7,2 BRUCAPT RB pH 7,2	RB pH 7,2 RT RB pH 7,2	BRUCAPT pH 5,0 RT BRUCAPT pH 5,0	BRUCAPT pH 5,0 BRUCAPT BRUCAPT pH 5,0
1	< 20	< 20	1.280	10.240
2	1.280	2.560	1.280	1.280
3	5.120	2.560	2.560	40.960
4	160	160	320	160
Control	160	160	160	320

RB: rosa de Bengala; RT: Ring Test Antigen; SAT: seroaglutinación.

**TABLA 6. Resultado de las pruebas serológicas realizadas con las fracciones IgG, IgA e IgM**

Fracciones	Suero	RB	SAT			mg/100
			pH 7,2*	DTT*	pH 5,0**	
IgG	1	+	80	80	5.120	510
	2	+	80	80	2.560	360
	3	+	640	640	20.480	620
	4	+	160	160	320	260
	5	+	40	40	40	285
	6	+	80	80	80	380
	7	+	< 20	< 20	320	350
	8	+	1.280	1.280	5.120	400
IgA	1	+	< 20	< 20	1.280	350
	2	+	< 20	< 20	1.280	300
	3	—	< 20	< 20	160	350
	4	+	80	40	160	135
	5	+	640	20	640	150
	6	+	320	40	640	130
	7	+	80	< 20	160	130
	8	+	1.280	160	2.560	400
IgM	5	+	160	< 20	160	54
	6	+	1.280	40	2.560	50
	8	+	320	< 20	640	45

\*realizadas con el antígeno RT; \*\*pH 5,0: realizada con el antígeno BRUCAPT.

DTT: ditiotreitol; RB: rosa de Bengala; RT: Ring Test Antigen; SAT: seroaglutinación.

pero sólo las correspondientes a los sueros 6 y 8 fueron Dipstick IgM positivas. No se observaron diferencias importantes entre los títulos de las SAT realizadas con los antígenos TR a pH 7,2 y BRUCAPT a pH 5,0. Con objeto de confirmar estos resultados, de otros 7 sueros Dipstick-IgM positivos se separaron las fracciones IgM. Los resultados obtenidos demostraron que las 7 fracciones fueron sensibles al DTT y positivas a RB y Dipstick-IgM, y que los títulos de las SAT a pH 7,2 y 5,0 fueron similares.

## Discusión

De todos los componentes antigénicos de la membrana externa de las bacterias pertenecientes al género *Brucella*, dos de ellos están situados en su superficie, y por lo tanto, expuestos al medio ambiente. El primero es el lipopolisacárido que es el antígeno que tiene la función más importante en las pruebas de RB y SAT<sup>7</sup>, y el segundo es el HN. El HN se ha denominado previamente como antígeno 1<sup>8</sup> segundo polisacárido<sup>9</sup> y polisacárido B<sup>7</sup>, y hoy



día sabemos que es un homopolímero de formilperosamina, con la misma densidad epitópica y estructura que la cadena O, que se obtiene mediante hidrólisis ácida del lipopolisacárido, y con la que da una reacción de total identidad en las pruebas de precipitación en gel<sup>10</sup>.

Los resultados descritos en el presente trabajo han confirmado que los anticuerpos IgM, IgG e IgA son activos en la prueba de RB y SAT; sin embargo, el hecho más importante ha sido la confirmación de que en determinados sueros de pacientes con brucelosis, existen anticuerpos IgG e IgA con propiedades aglutinantes y no aglutinantes. Los primeros aglutinan a pH 7,2 y a pH 5,0 y los segundos solamente a pH ácido. Este hecho se puso de manifiesto cuando se examinaron las respectivas fracciones IgG de los sueros 1 y 2 (v. tabla 1). Estos sueros eran negativos en la SAT a pH 7,2, y únicamente se puso en evidencia que contenían anticuerpos IgG aglutinantes cuando estaban libres de anticuerpos IgA no aglutinantes a pH 7,2 (tabla 6). Este resultado se explica si se tienen en cuenta los resultados publicados por Serre et al<sup>1</sup> y Zinneman<sup>2</sup>. Estos autores demostraron que en los casos crónicos de brucelosis humana, los anticuerpos IgA se comportan como bloqueadores. La dificultad estriba en saber cómo se produce el fenómeno de bloqueo y por qué desaparece a pH ácido. Una de las posibilidades es que las IgA bloqueadoras formen polímeros a pH ácido. Deutsch<sup>11</sup>, en el año 1963, demostró que las inmunoglobulinas  $\gamma_1$  (IgA) y sus formas monoméricas se agregan a pH ácido, por lo que es posible que ocurra el mismo fenómeno en estos sueros. Sin embargo, no existen datos que demuestren que dicha agregación lleve consigo la capacidad de aglutinar una suspensión bacteriana. Finalmente hay que señalar que la demostración de la capacidad aglutinante de anticuerpos IgA a pH 7,2 y su sensibilidad a la acción reductora del DTT confirma los hallazgos publicados por otros autores<sup>5,12-14</sup>.

En un trabajo publicado en el año 1976 se demostró la estrecha correlación ( $r = 0,96$ ;  $p < 0,001$ ) entre los títulos de la SAT y los de la prueba de RB<sup>5</sup>. Sin embargo, en el presente trabajo cuatro sueros SAT negativos a pH 7,2 fueron positivos en la prueba de RB (v. tabla 5). Es más, durante la realización de este trabajo se ha podido analizar una muestra de suero del caso publicado por Ortega et al<sup>15</sup>. Este suero fue negativo en la prueba de RB pero sus títulos de SAT a pH 3,6 y 5,0 con el antígeno RT fueron de 40 y 640, respectivamente. Este resultado de la SAT obtenido a pH 3,6 puede explicar la negatividad de la prueba de RB, e indica que es necesario determinar el pH más adecuado de la prueba de RB, ya que no existen datos en la bibliografía que demuestren que el pH 3,6 sea el más apropiado para el diagnóstico de brucelosis humana.

Aunque se desconocen las razones de la falta de correlación observada en los cuatro sueros anteriormente mencionados, entre los títulos de las pruebas de SAT a pH 7,2 con los de la RB, es posible que se deba a que en estas reacciones intervengan subclases distintas de IgG. En el caso de la brucelosis animal los anticuerpos IgM y los pertenecientes a la subclase IgG<sub>1</sub> son activos en la prueba de RB, pero los IgG<sub>1</sub> únicamente aglutinan a pH ácido. En contraste, los pertenecientes a la subclase IgG<sub>2</sub> pierden su capacidad aglutinante a pH ácido y no intervienen en la

prueba de RB<sup>16</sup>. Además, este fenómeno debe depender también de la afinidad de los anticuerpos IgG. Se sabe que ésta varía con el pH<sup>17</sup>, y los resultados del presente trabajo han demostrado que los títulos más altos de la SAT a pH 5,0 se observaron en los sueros en los que se demostró la presencia de anticuerpos frente al HN mediante IDR. Ahora bien, como en la brucelosis animal se ha demostrado que los anticuerpos frente al HN se caracterizan por su alta afinidad<sup>18</sup>, hay que pensar que los resultados obtenidos en la SAT a pH ácido dependen del mayor o menor grado de la afinidad de los anticuerpos IgG. La hipótesis de Levieux<sup>16</sup>, que propone que el pH ácido modifica la flexibilidad de la bisagra (*hinge region*) de los anticuerpos no aglutinantes, permitiéndoles pasar de una forma Y no aglutinante a una forma T aglutinante, podría explicar el problema.

A pesar de haberse demostrado diferencias significativas entre los resultados de la SAT a pH 5,0 con el antígeno BRUCAPT y los de la SAT a pH 7,2 o a pH 5,0 con el antígeno RT, estas diferencias no se encontraron entre los títulos de la SAT realizada con el antígeno RT a pH 7,2 y a pH 5,0 ni con los de la SAT realizada con el antígeno BRUCAPT a pH 7,2, por lo que se puede concluir que el tampón en el que están resuspendidas las brucelas de los equipos Brucellacapt<sup>®</sup> también influye en los resultados de la SAT realizada a pH 5,0 con el antígeno BRUCAPT.

Cuando se considera el tiempo en que la reacción de SAT se puede dar por finalizada, se observa que con el antígeno RT diluido a pH 5,0 o a 7,2 y con el antígeno BRUCAPT a pH 7,2, los resultados de la lectura de la SAT no cambian después de 12 h de incubación, es decir, que a las 12 h puede considerarse que la reacción de SAT ha finalizado. En contraste, este fenómeno no ocurre cuando la SAT se realiza con el antígeno BRUCAPT a pH 5,0. En este último caso las bacterias permanecen en suspensión más de 12 h, y la lectura no puede darse como definitiva antes de las 24 h. Del mismo modo, cuando se realiza la prueba de RB con las inmunoglobulinas purificadas, se observa que con las fracciones ricas en anticuerpos IgM, IgG aglutinantes o IgA sensibles al DTT, la aglutinación de las células ocurre de manera instantánea, sin embargo, con las fracciones ricas en anticuerpos IgG e IgA no aglutinantes, la prueba de RB comienza a ser positiva después de 2 o 3 minutos de agitación. Estas observaciones indican que parece que es necesario que las células permanezcan en suspensión durante un cierto tiempo, durante el cual ocurren las modificaciones estructurales necesarias en las moléculas de los anticuerpos no aglutinantes para poder convertirse en aglutinantes.

En nuestro trabajo no hemos empleado las placas de inmunocaptura, pero puede afirmarse que el valor del pH influye en los resultados de la SAT al modificar positivamente la capacidad aglutinante de los anticuerpos denominados incompletos (IgG e IgA no aglutinantes), que están presentes en los sueros de pacientes con brucelosis. Ahora bien, este hecho se ha observado con más nitidez cuando se emplea la suspensión antigénica de los equipos Brucellacapt<sup>®</sup>, y por lo tanto, se puede recomendar su utilización con placas de poliestireno convencionales, pero teniendo en cuenta que en estas condiciones, los títulos de la SAT obtenidos con el suero de algunos pacientes son de

la misma magnitud que los de las personas sanas que han estado en contacto con animales infectados. En estos casos es necesario emplear, además, otras pruebas serológicas. En nuestra experiencia las más recomendables son las que detectan anticuerpos frente a proteínas citosólicas, pero sin olvidar que en todos los casos, y sobre todo en los dudosos, es necesario analizar cuidadosamente, además de los antecedentes epidemiológicos, los síntomas y signos clínicos de los pacientes.

Finalmente hay que señalar que en ninguno de los trabajos publicados sobre la utilidad de la prueba Brucellacapt<sup>®</sup><sup>19-21</sup>, los autores de los trabajos han presentado datos que indiquen que los títulos de la SAT obtenidos en las placas de inmunocaptura son superiores a los que se obtienen en placas de poliestireno convencionales. Este estudio es necesario hacerlo para poder definir con precisión, no sólo la influencia del pH en las SAT realizadas con los reactivos (diluyente y suspensión antigénica) de los equipos Brucellacapt<sup>®</sup>, sino también si los anticuerpos antiinmunoglobulinas humanas que tapizan las placas de inmunocaptura influyen en los títulos de la SAT.

## Bibliografía

- Serre A, Dana M, Roux J. Nature des anticorps bloquants dans la Brucellose humaine. *Path Biol* 1970;18:367-74.
- Zinneman HH. Some molecular characteristics of blocking antibodies in human brucellosis. Soluble antigen-antibody complexes. *J Immunol* 1964;93:993-1000.
- Rubio M, Barrio B, Díaz R. Valor de las pruebas de Rosa de Bengala, Coombs y Contrainmunolectroforesis para diagnosticar los casos de brucelosis humana en los que la seroaglutinación es negativa. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001;19:406-7.
- Díaz R, Maraví-Poma E, Rivero A. Comparison of counter-immuno-electrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis. *Bull World Health Organ* 1976;53:417-24.
- Marrodán T, Nenova-Poliakova, Rubio M, Ariza J, Clavijo E, Smits H L, et al. Evaluation of three methods to measure anti-*Brucella* IgM antibodies and interference of IgA in the interpretation of mercaptan based tests. *J Med Microbiol* 2001;50:663-6.
- Smits HL, Basahi MA, Díaz R, Marrodan T, Douglas JT, Rocha A, et al. Development and evaluation of a rapid stripstick assay for serodiagnosis of acute brucellosis. *J Clin Microbiol* 1999;37:4179-82.
- Díaz R, Levieux D. Rôle respectif en sérologie de la brucellose bovine des antigènes et des immunoglobulines G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> dans les tests d'agglutination, de Coombs et au Rose Bengale ainsi que dans le phénomène de zone. *C R Acad Sc Paris* 1972;274:1593-6.
- Díaz R, Jones LM, Leong D, Wilson JB. Surface antigens of smooth brucellae. *J Bacteriol* 1968;96:893-901.
- Díaz R, Dorronsoro I. Contribución al diagnóstico serológico de la brucelosis y yersiniosis. I. Utilidad de la reacción de precipitación en gel. *Rev Clin Esp* 1971;121:367-72.
- Aragón V, Díaz R, Moreno E, Moriyón I. Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from smooth lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 1996;178: 1070-9.
- Deutsch HF. Molecular transformations of a  $\gamma_1$ -globulin of human serum. *J Mol Biol* 1963;7:662-71.
- Ariza J, Pellicer R, Pallarés R, Foz A, Gudíol F. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992;14:131-40.
- Heremans JF, Vaerman JP, Vaerman C. Studies on the immunoglobulins of human serum. II. A study of the distribution of anti-brucella and anti-diphtheria antibody activities among gamma<sub>s</sub>, gamma<sub>1m</sub>- and gamma<sub>1A</sub>-globulin fractions. *J Immunol* 1963;91:11-7.
- Wilkinson PC. Immunoglobulin patterns of antibodies against brucella in man and animals. *J Immunol* 1996;96:457-71.
- Ortega M, Lara A, Pérez MJ, Díaz V, Ruiz A, Rodríguez M. Bacteriemia por *Brucella* sp. con serología convencional negativa. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001;19:34.
- Levieux D. Immunoglobulines bovines et brucellose. II. Activité des IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> et IgM du sérum dans les réactions d'agglutination, de Coombs, de fixation du complément et dans le test au Rose Bengale. *Ann Rech Vétér* 1974;5:343-53.
- Paul WE. *Fundamental Immunology*. New York: Raven Press, 1993:423-4.
- Marín C, Moreno E, Moriyón I, Díaz R, Blasco JM. Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:269-72.
- Gómez MC, Rosa R, Geijó P, Escribano MA. Estudio comparativo del test Brucellacapt con el test de Coombs para *Brucella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999;17:283-5.
- Orduña A, Almaraz A, Prado A, Gutiérrez MP, García-Pascual A, Dueñas A, et al. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 2000;38:4000-5.
- Serra J, Velasco J, Godoy P, Mendoza J. ¿Puede sustituir la prueba de Brucellacapt a la prueba de Coombs en el diagnóstico de la brucelosis humana? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001;19:202-5.