

HOSPITAL MILITAR DOCENTE "CARLOS J. FINLAY"

## *Inmunofluorescencia en el diagnóstico de la brucelosis método directo*

Por los Dres.:

JOSÉ E. FERNÁNDEZ BRITTO-RODRÍGUEZ,(14) Isabel

DUBEEZ,(15) HUGO FERNÁNDEZ,(• 16) TOMÁS

VERDURA,(17)

ROBERTO WONG JONES, (\*\*\*) SONIA SOLLET, (\*\*♦) r

JOSÉ HURTADO DE MENDOZA Y AMAT(\*\*\*\*.\*)

Para dar la gran importancia diagnóstica de la inmunofluorescencia como método rápido y seguro de poder verificar la presencia de un determinado agente etiológico y las respuestas inmunológicas producidas por éste en el organismo, es que decidimos a ensayar este método.<sup>2</sup> Se utilizó para ello una de las enfermedades en que podríamos tener el control exacto de su existencia, mediante distintas pruebas diagnósticas como son: examen microbiológico directo, cultivos bacteriológicos, pruebas serológicas y diagnóstico anatomopatológico.<sup>1</sup>

Se entendió que la brucelosis producida por *Brucella abortus*, en el ganado bovino reunía todas las condiciones antes mencionadas y por lo tanto se seleccionó esta enfermedad para ensayar el método.

Este trabajo recoge los pasos seguidos y sus resultados por el método directo de *inmunofluorescencia*, dejando para publicaciones posteriores los resultados obtenidos por el método *indirecto*.

### MATERIAL Y METODO

#### D) Selección del animal y obtención de la muestra. (Antisuero).

- a) En el Dpto de serología del Laboratorio Nacional de Investigaciones y Diagnóstico Veterinario, fueron seleccionadas 2 muestras de sueros de bovino positivas serológicamente, mediante los métodos de aglutinación lenta (método de *Wright*) y fijación del complemento. Los

---

14 Instructor de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de La Habana, Jefe del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Militar Docente "Dr. Carlos J. Finlay", Ciudad Libertad, Marianao, Habana, Cuba.

15 Profesora de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de La Habana. Jefe del Laboratorio de Fisiopatología del Hospital Militar Docente "Dr. Carlos J. Finlay", Ciudad Libertad, Marianao, Habana, Cuba.

16 Jefe del Departamento de Anatomía Patológica del Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario de La Habana, Arroyo Arenas, Habana, Cuba.

17 Anatomopatólogos del Laboratorio de Investigaciones y diagnóstico Veterinario de La Habana, Arroyo Arenas, Habana, Cuba.

(\*\*♦) Del Laboratorio de Fisiopatología del Hospital Militar Docente "Dr. Carlos J. Finlay", Ciudad Libertad, Marianao, Habana, Cuba.

(\*\*\*\*.\*) Residente, Teniente de la Sanidad Militar de las Fuerzas Armadas Revolucionarias, en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Militar Docente "Dr. Carlos J. Finlay", Ciudad Libertad, Marianao, Habana, Cuba.

títulos obtenidos corresponden a:			
	Vaca 1	No.Vaca 2	No.Vaca No. 3
Aglutinación			
lenta . . . .	1:640	1:160	1:160
Fijación del complemento	1:640	1:40	1:40

a) En frascos estériles de 250 ml, dotados de un equipo de *veno-clisis* se obtuvieron las 3 muestras, por punción de la yugular con trocar No. 16. Se evitó la hemólisis del choque de la sangre con las paredes del frasco y no se usó anticoagulantes. La sangre extraída se mantuvo en refrigeración 4°C durante 24 hrs, produciéndose en este tiempo la retracción del coágulo y la liberación parcial del suero. Después se centrifugó el suero liberado (para obtener la mayor cantidad posible de suero) envasándolo en cuarto estéril en frascos de 125 ml.

b) Se repitieron en el suero así obtenido las pruebas serológicas por los métodos anteriormente señalados, obteniéndose iguales títulos.

Nota: Este suero contiene anticuerpos específicos desarrollados, como respuesta inmunológica por cada uno de estos animales contra el germen *Brucella abortus*, lográndose así el objetivo perseguido.

I) *Fraccionamiento (separación y purificación) de las inmunoglobulinas del suero.*

a) Se utilizó el método de la precipitación por Sulfato de Amonio, situado en temperaturas frías.

b) Se realizó diálisis intensa para eliminar el  $\text{SCMNH}_2$ , combinado con las globulinas. Utilizándose el Buffer Fosfato Salino.

II) *Conjugación o mareaje de la inmunoglobulina con el Isotiocianato de Fluoresceína.*

a) Se determinó la concentración de proteínas mediante la reacción de *Biuret* y el uso del espectofotómetro.

b) Se conjugan las inmunoglobulinas obtenidas con el *Isotiocianato de Fluoresceína* de forma que por ml. de solución se añada 1 mg de colorante.

c) Extracción por diálisis del Isotiocianato de Fluoresceína no conjugado.

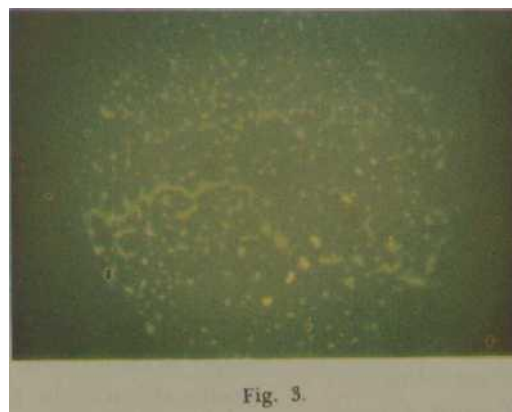
d) Se produjo la absorción del conjugado que es capaz de producir fluorescencia parásita o no específica, mediante la aplicación de la técnica de polvo de tejido disecado en acetona. En este caso se utilizó el polvo de bigado de ganado bovino, fabricado en el Dpto. de Fisiopatología del Hospital Militar. "Dr. Carlos J. Finlay".

e) Se utilizó el conjugado a distintas diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 y 1/64 determinándose que éste podía ser utilizado hasta títulos de 1/64.

III) *Preparación de los frotis y coloración :*

Se utilizan frotis de cultivos puros de *Brucella abortus* de cepas aisladas en el (L.N.I.D.V.), así como cultivos de Sal-

*INMUNOFLORESCENCIA EN EL DIAGNOSTICO DE LA  
BRUCELOSIS. METODO DIRECTO.*



*Figs. 1, 2 y 3. Obsérvese la intensa fluorescencia específica de los gérmenes, caracterizada por un área central opaca de cada microorganismo, rodeado de un halo brillante de color verde intenso. Isotiocianato de fluorescencia (1500x)*

monella y Escherichia Coli, obtenidas del (LN1DV) y del Dpto. de Microbiología del (HMD.CJF), Estafilococos, Salmonella, Coli y Estreptococos.

Los frotis fueron coloreados por el conjugado marcado a la disolución de trabajo, en este caso 1/16.

Estas muestras fueron observadas en un microscopio soviético ML-2 de Fluorescencia con una lámpara de 250 watts de vacío de alta presión de mercurio, utilizándose los filtros adecuados.

#### DISCUSION Y RESULTADOS

- a) Se procedió a la coloración de un frotis de Brucella abortus con el conjugado. Observándose una intensa fluorescencia específica de los gérmenes dado por un área central opaca de cada germen, rodeado de un halo brillante de color verde intenso. (Prueba de especificidad positiva). Figs. 1, 2 y 3.
- b) Se procedió a la coloración de diversos frotis de:
  1. Salmonella.
  2. Escherichia coli, con el mismo conjugado anterior.
  3. Estreptococos y
  4. Estafilococos.

No observándose fluorescencia específica o primaria en ninguno de ellos: (Prueba de inespecificidad positiva).

- c) Se procedió a mezclar en un mismo frotis gérmenes de género Brucella con gérmenes de los géneros (1) Salmonella, (2) Escherichia Coli.

Se colorean los 3 frotis con el mismo conjugado anterior, observándose en los 3 la fluorescencia específica selectiva de la Brucella idéntica al experimento No.

1, los otros gérmenes se computan como en el experimento No. 2 (pruebas de

especificidad a la Brucellas, positiva, y de la inespecificidad a los otros gérmenes, positiva)

- d) Se procedió a colorear un frotis de Brucella abortus por el método de Gram y se observó que no había fluorescencia específica ninguna. (Prueba de especificidad negativa).

Por este mismo frotis se observó en inmersión al microscopio de luz corriente, observándose los caracteres típicos morfológicos y tintoriales de la Brucella.

- e) Se procedió a observar al *microscopio fluorescente* un frotis de Brucella abortus sin colorear. No se observó fluorescencia específica alguna. (Prueba de especificidad negativa).
- f) se procedió a añadir a un frotis de Brucella el propio antisuero, no marcado, (no conjugado) y se observó al microscopio fluorescente no observándose fluorescencia específica alguna. (Prueba de especificidad negativa).
- g) Se procedió a añadir a un frotis de Brucella abortus el propio antisuero no marcado, utilizado en la producción del conjugado. Añadiéndole posteriormente el conjugado, no observándose fluorescencia específica. Esto se interpretó como una prueba de inhibición de la fluorescencia específica.
- h) Se procedió a realizar en un tubo de ensayo la unión de antígeno no coloreado de Brucella abortus, obtenido de la fabricación de los laboratorios de producción veterinaria con el antisuero no marcado utilizado en la producción del conjugado, manteniéndose en este estado durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo se le añadió el conjugado con el siguiente resultado. No se

observó fluorescencia específica. (Prueba de agotamiento positiva).

#### CONCLUSIONES

1. Se procedió a seleccionar, purificar y aislar la inmunoglobulinas o anticuerpos específicos producidos por vacas portadoras de *Brucella abortus*.
2. Se marcó estas inmunoglobulinas con isotiocianato de fluoresceína, produciéndose el conjugado correspondiente.
3. Se tituló el conjugado para determinar su óptima dilución de trabajo.
4. Se procedió a colorear frotis de *Brucella abortus* y otros gérmenes para observar al microscopio de fluorescencia la especificidad e inespecificidad de este método.
5. Se realizan numerosas pruebas de control, inhibición y agotamiento para demostrar la positividad de este método.

#### SUMMARY

1. It was proceeded to select, purify and isolate the immunoglobulines or specific antibodies produced by cows bearers of *Brucella abortus*.
2. These immunoglobulines were marked with fluorescein isothiocyanate, producing the corresponding conjugate.

3. The conjugate was titled to determine the optimum dilution of work.
4. It was proceeded to stain the smear of *Brucella abortus* and other germs to observe with the fluorescence microscope the specificity and inespecificity of this method.
5. Several control, inhibition and exhausting tests were made to show the positivity of this method.

#### RESUME

1. On procède á choisir, purifier et isoler les immunoglobulines ou anticorps spécifiques produits par des vaches porteurs de *Brucella abortus*.
2. On marqué ces immunoglobulines avec isothiocyanate de fluoresceine, en produisant le conjugué correspondant.
3. Le conjugué est titulé pour déterminer la meilleure dilution du travail.
4. On procède á colorer le frottis de *Brucella abortus* et d'autres germes pour observer avec le microscope de fluorescence l'especificité et l'inespecificité de cette méthode.
5. On réalisent nombreuses preuves de contrôle, inhibition et épuisement pour démontrer la positivité de cette méthode.

#### BIBLIOGRAFIA

1. —*Simintzis, G.*: Técnicas de Laboratorio aplicables al diagnóstico de la Brucelosis Bovina, Centro Nacional de Información de Ciencias Veterinarias. Boletín No. 25.
2. —*Simintzis, G. y Thivolet, J.*: Diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina mediante el método de los anticuerpos fluorescentes. Comparación con el serodiagnóstico de Wright. *Reo Med Vet.*, 1965. CXXI. p. 3543.

R

ev. Cub. Med. 8: 611-622, Nov.-

Dic. 1969 HOSPITAL MILITAR

DOCENTE "CARLOS J. FINLAY"