

DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE PRUEBAS ESPECÍFICAS PARA LA BRUCELOSIS¹

Por la Srta. ALICE C. EVANS

*Bacterióloga del Instituto Nacional de Sanidad, Servicio de Sanidad Pública de
Estados Unidos (Washington, D. C.)*

En estas investigaciones en campaña, llevadas a cabo por el Instituto Nacional de Sanidad para determinar la frecuencia de la brucelosis crónica, se examinaron más de 1,000 enfermos, utilizando tres pruebas específicas como auxiliares diagnósticos: reacciones de aglutinación, opsonocitofágica, e intradérmica, cuyas técnicas se describen a continuación.

REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN

Los investigadores en campaña separaron el suero sanguíneo del coágulo, agregaron una cantidad igual de glicerina estéril, y enviaron las muestras al laboratorio central. Al ser recibidos los sueros se hallaban, pues, disueltos al 1:2, comprobándose en cuanto a aglutininas en series a diluciones finales de 1:10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, y 1,280. Las diluciones se preparaban en la forma siguiente: En el primer tubo de la serie colocábanse 0.4 cc de la mezcla de suero y 0.6 de solución salina. Para la próxima dilución se colocaban 0.5 cc en un tubo que contenía 0.5 cc de solución salina, continuándose así hasta llegar a una dilución de 1:640 en el último tubo. De éste se trasladaban 0.5 cc del suero diluido a un tubo de aglutinación, conservándose allí con mira a su posible uso después. La adición de 0.5 cc de antígeno a cada tubo de la serie lograba la dilución deseada en la serie.

Todos los sueros fueron comprobados en cuanto a aglutininas específicas con dos antígenos de *Brucella*: Variedad *abortus* No. 456, y variedad *melitensis* No. 428, respectivamente, los cuales han sido empleados por muchos años en éste y otros laboratorios, a fin de preparar antígenos para estudios serológicos.

Debido a las reacciones de aglutinación cruzada entre la *Brucella* y el *B. tularensis*, todos los sueros fueron también comprobados en cuanto a la aglutinación del antígeno del *B. tularensis*, y los que resultaban positivos con ambas clases de antígenos se consideraban procedentes de casos de tularemia si el título con el *tularensis* era el más elevado.

Las cepas de *Brucella* eran cultivadas en frascos de Blake, en agar-infusión de bovino que contenía 1% de glucosa. Cada frasco era inoculado con todas las colonias de una película pendiente de agar suspendidas en 1.5 cc de suero fisiológico. La incubación continuaba a 37 C por dos días. Después se agregaban a cada frasco 15 cc de suero fisiológico que contenía 0.5% de formalina, y se sacudía el frasco a mano para separar las colonias del agar. La espesa suspensión bacteriana era trasladada a tubos de centrifuga, y después de reposar en la nevera algunos días, era centrifugada, se descartaba el líquido sobrenadante límpido, y se agregaba solución salina que contenía 0.5% de formalina para que la turbidez representara 20,000 partes por millón del tipo de silicio. A medida que se necesi-

¹ Tomado de Public Health Reports, obre. 8, 1937, p. 1419.

taba, se diluía más la suspensión (39 partes de solución salina por 1 parte de antígeno) para preparar antígenos aglutinantes de una densidad equivalente a 500 p.p.m. del tipo de silicio. El antígeno *tularensis* de una densidad semejante, era preparado según el método de Francis.

Para la prueba se agregaron 0.5 cc del antígeno diluido a cada uno de los tubos de la serie que contenían una cantidad igual de suero diluido. Colocados después los tubos en un bañomaría a 37 C, se examinaron al cabo de una hora. Si se observaba aglutinación al 1:640, esto indicaba un título elevado, en cuyo caso se diluían todavía más los 0.5 cc de suero diluido que se habían echado a un lado y se agregaba antígeno, llegando la dilución máxima en esta serie a 1:20,400. Luego se reponían en el bañomaría las gradillas de tubos y se incubaban 1½ horas más, trasladándose después a la nevera donde permanecían hasta la próxima mañana, en que se hacían las lecturas. Una sedimentación total del antígeno con líquido sobrenadante limpio se indicaba con 4; con turbidez sobrenadante como en los tubos testigos que contenían 25, 50, o 75% de antígeno, con 3, 2, o 1. Las lecturas de 4 y 3 se consideraban positivas; las de 2 y 1 como levemente positivas.

En la gran mayoría de las pruebas positivas, las aglutinorreacciones con los antígenos *melitensis* y *abortus* revelaban la misma dilución o sólo discrepaban en un número de la serie. En lo tocante a 16 sueros (1.6%) hubo una diferencia más pronunciada en los títulos con los dos antígenos. Por ejemplo, un suero reaccionó al *abortus* al 1:80, pero no reaccionó al *melitensis*; otro reaccionó al *melitensis* al 1:40, pero no al *abortus*.

REACCIÓN OPSONOCITOFÁGICA

Comparada con la prueba de la bacteriotropina de Neufeld o la opsonorreacción de Wright, la técnica de la prueba opsonocitofágica es menos complicada, pues los leucocitos permanecen suspendidos en la muestra de sangre comprobada. La prueba resulta práctica en campaña, pues en conjunto los tres investigadores que la emplearon obtuvieron resultados compatibles, aunque de cuando en cuando remitieron películas que no se prestaban para lectura. Se utilizó la técnica de Huddleson con algunas modificaciones.

Toda la cristalería estaba limpia y estéril.

Los ejemplares sanguíneos eran recogidos en cantidades de 5 cc en tubos que contenían 0.2 cc de una solución al 20% de citrato de sodio estéril en suero fisiológico. La prueba se verificaba dentro de seis horas de la colecta. Los ejemplares eran bien sacudidos antes de mezclarlos con la suspensión bacteriana. Esta se preparaba cada vez de cultivos de *Brucella melitensis* variedad *abortus* No. 456 en agar-glucosa de 48 horas. Las colonias se absorbían en suero fisiológico de un pH de 7.0, y graduaban a una densidad equivalente a 600 p.p.m. del tipo de silicio.

La prueba se ejecutaba en tubos de aglutinación. A 0.1 cc de la sangre citrada se agregaba 0.1 cc de suspensión bacteriana. Después de una mezcla completa, se colocaban los tubos en el bañomaría a 37 C por espacio de 30 minutos.² Inmediatamente después de extraer los tubos del bañomaría, se extraía una pequeña cantidad de las células sedimentadas con una pipeta capilar muy fina. Se colocaba una gota grande de la suspensión celular cerca de un extremo de un portaobjetos perfectamente limpio y pulido, y se hacía la difusión en la forma acostumbrada arrastrando la gota sobre la película por medio de otra película

² Debido a falta de elementos, algunos de los investigadores en campaña modificaron la técnica utilizando una estufa en vez del bañomaría, y secando las películas sin calentador eléctrico.

mantenida en ángulo, y parando como a 12 mm del extremo de la película. Luego se arrastraba para atrás la película de encima, esta vez más floja. Los mejores frotos se obtenían cuando el movimiento era "nervioso," a fin de obtener una diseminación desigual y ondulante.

Las películas se secaban lo más pronto posible por medio de un abanico eléctrico enfrente de un calentador también eléctrico.² Luego se trataban para disolver los hematíes por sumersión durante tres o cuatro minutos en una solución que contenía 1% de ácido acético y 5% de formalina en agua destilada. Luego se enjuagaban, secaban suavemente en papel absorbente, y teñían con el azul carbol-toluidina de Bordet-Gengou.³ Las teñidas por unos 15 segundos revelan los núcleos de color intenso de los leucocitos y las bacterias intensamente teñidas sobre un fondo claro.

En la técnica descrita se modificó el método de Huddleson en lo tocante al tipo de turbidez, la preparación de los frotos, la coloración de las películas, la obtención de las lecturas, y la interpretación del resultado. A continuación discutimos estas modificaciones.

Tipo de turbidez.—El tipo de silicio para turbidez primeramente adoptado por la Oficina de Estudios Geológicos de los Estados Unidos, y luego por la Asociación Americana de Salud Pública, es recomendable por su sencillez y la velocidad con que puede prepararlo cualquier laboratorio. Su preparación aparece descrita en la obra "Standard Methods of Water Analysis." En nuestros laboratorio se utiliza un solo tipo: Una suspensión de 300 p.p.m. de silicio en un frasco homeopático de 8 cc, habiéndose escogido ese tipo porque a la densidad dada apenas permite leer letras negras de tamaño corriente, lo cual ofrece una exactitud máxima en las comparaciones. Obturado con un tapón de corcho cubierto de parafina, el tipo puede conservarse indefinidamente sin deterioro. Este tipo único sirve para preparar una suspensión de cualquier densidad deseada; por ejemplo, para una suspensión bacteriana de una densidad equivalente a 600 p.p.m. del tipo de silicio, tal como se emplea para la prueba opsonocitofágica, el procedimiento es éste:

En un frasco homeopático de 8 cc se colocan 0.2 cc de la suspensión bacteriana espesa, y se agrega agua hasta que la densidad se conforma a la del tipo. Por ejemplo, si precisan 3.8 cc de solución salina para llevar 0.2 cc de la suspensión bacteriana espesa a la densidad del tipo de 300 p.p.m., agréguense entonces 3.6 cc de solución salina a 0.4 cc de la suspensión para obtener una densidad equivalente a 600 p.p.m. del tipo de silicio. Una suspensión de esta densidad contiene unos 5,000 millones de brucelas por cc.

Preparación de los frotos.—Al comenzar la investigación, las películas recibidas de campaña a veces contenían frotos tan delgados que era imposible encontrar suficientes leucocitos para una lectura satisfactoria. Al solicitar que frotos de un espesor suficiente fueran extendidos sobre una zona mayor del portaobjetos, el Dr. Royall M. Calder, que dirigió la investigación en San Antonio, Texas, propuso la técnica descrita para preparación de las películas. En algunas de éstas había zonas en que el frote era demasiado grueso, y los leucocitos conglomeraban, mas si la película estaba debidamente preparada, era fácil encontrar zonas con leucocitos aislados apropiados para lectura.

Coloración.—El colorante de Hasting recomendado por Huddleson,

² El azul de carbol-toluidina de Bordet-Gengou se prepara disolviendo 5 gm de azul de toluidina en 100 cc de alcohol, 500 cc de agua destilada, y 500 cc de fenol al 5%. Para teñir frotos, dilúyase una parte de este colorante en dos partes de agua destilada.

resultó menos satisfactorio que el azul de carbol-toluidina de Bordet-Gengou, que ya nos había resultado sumamente satisfactorio para estudios fagocitarios hace muchos años.

Lectura e interpretación.—Para la lectura de las películas y la interpretación de los resultados, introdujimos un método más sencillo que el de Huddleson.

Sin perder exactitud, omitimos la molesta tarea de contar las bacterias ingeridas por leucocitos. Es más, el conteo de las bacterias ingeridas puede ocasionar error si hay pocas, porque no es el número de bacterias que parecen hallarse en el leucocito lo que determina la reacción positiva o negativa de la célula dada. Lo importante es determinar si las bacterias que parecen hallarse dentro del leucocito son más numerosas que en una zona equivalente del campo circundante.

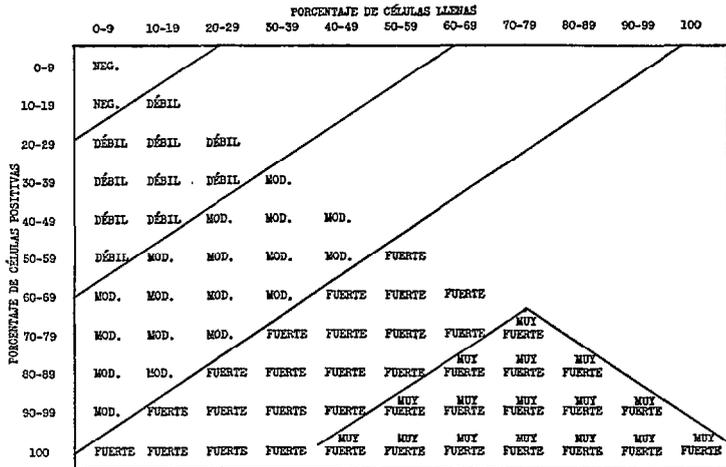
Si se comprueban dos muestras de sangre con suspensiones bacterianas precisamente de la misma densidad, y se preparan frotis precisamente del mismo grueso, el número de bacterias en un campo del tamaño de un leucocito puede variar sumamente en las dos películas, dependiendo esto de si hay o no aglutinación, pues no se presenta quimiotaxia negativa. En una película puede haber, pues, una distribución uniforme de bacterias, quedando algunas sobre los leucocitos y apareciendo ingeridas, mientras que en otra película pueden aglutinarse las bacterias, permaneciendo la mayor parte de los leucocitos inertes en un campo despejado. De ahí que si se considera como reacción positiva la aparente presencia de bacterias dentro de un leucocito, puedan erróneamente anotarse como positivas muchas células de la primera película, lo cual no es tan susceptible de suceder en la segunda, por cuya razón una decisión rápida, formada tras una ojeada al campo circundante así como al leucocito, puede resultar más exacta que la ardua enumeración de las células.

Se examinaban 25 leucocitos polimorfonucleares aislados, escogidos por lo menos de dos zonas separadas, considerándose como negativos los leucocitos que no contenían más bacterias que la zona correspondiente del campo circundante. Los que contenían más bacterias que el campo circundante se consideraron positivos, y si un leucocito dado estaba lleno de bacterias, se trazaba un círculo alrededor del signo más, considerándose como lleno todo leucocito que contuviera unas 40 bacterias o más. La siguiente lectura de una película ofrece un ejemplo de ello. Los porcentajes se obtienen multiplicando por cuatro el número de células negativas, positivas, o llenas:

⊕	+	—	⊕	—
—	⊕	⊕	+	⊕
⊕	⊕	⊕	+	⊕
⊕	+	⊕	+	—
—	—	—	+	⊕

—28%; +72%, 48% de éstos llenos (⊕)

La interpretación de las lecturas se conforma a la gráfica adjunta.



Según este sistema de interpretación, el porcentaje total de leucocitos reactivos es tasado en la escala vertical, y se aumenta la tasa en la escala horizontal, según el porcentaje de células llenas. Hay cinco grados de tasa: negativa, débil, moderada, fuerte, y muy fuerte. Por ejemplo, una lectura de 72% de células positivas con 24% de ellas llenas, se interpretaría como positiva moderada; con 48% de células llenas, como fuerte; con todos los leucocitos llenos, muy fuerte. En la lámina 1 aparecen fotografías de leucocitos que se considerarían negativos, positivos, o "lentos." (Ver p. 241.)

En general, nuestro sistema de lecturas puede compararse con el de Huddleson así: Consideraríamos con signo más leucocitos que él consideraría ligeros o moderadamente positivos, y anotaríamos con un signo más en círculo los que él consideraría marcadamente positivos. Cuando sólo tomamos en cuenta 25 leucocitos en una película, nos conformamos a la técnica de Huddleson. A nuestro parecer, otras inexactitudes inherentes a la técnica no permitirían obtener un perfeccionamiento mayor de las lecturas mediante el examen de un número mayor de células.

A pesar de las varias causas de error con que debe luchar el investigador al preparar y leer las películas, puede obtener exactitud considerable tras pruebas repetidas en el resultado final, permitiéndole interpretar la fagocitosis como negativa, débil, moderada, fuerte, o muy fuerte.

Uno de nuestros trabajadores en campaña envió de varios casos frotos repetidos con distintos números, resultando en algunos la reacción positiva y en otros negativa, pero siempre una u otra cosa, aunque varió a veces la intensidad de la positiva, por ejemplo de débil a moderada. Otra prueba de la constancia de los resultados se obtuvo repitiendo la prueba en cuatro distintas ocasiones en un voluntario que

había experimentado un ataque agudo de brucelosis en 1923. Las reacciones fueron: Octubre 28, 1936, fuerte; enero 7, 1937, fuerte; febrero 27, 1937, moderada; julio 10, 1937, moderada. La discrepancia observada puede atribuirse, bien a haber variado el estado de inmunidad del sujeto, o a error de experimentación.

Cuando se verifica la reacción con suero normal, a menudo parece que algunos leucocitos han ingerido bacterias, de modo que sería erróneo interpretar el resultado como positivo. La línea divisoria entre la lectura considerada negativa o débilmente positiva según se interpreta en la gráfica, es forzosamente arbitraria, como también lo es entre distintos grados de fagocitosis.

La autora comprobó la exactitud de sus propias lecturas reexaminando 100 películas recibidas, escogiéndolas primero de los protocolos anteriores en orden consecutivo, salvo que varias series negativas fueron omitidas, a fin de que el grupo comprendiera un buen porcentaje de positivas. Hizo luego las lecturas sin fijarse en la clasificación anterior, y en 82% de los casos la segunda lectura convino con la primera, en 15% hubo un grado de error, por ejemplo, una película fué débilmente positiva en una lectura, y moderadamente positiva en la otra. La tercera lectura confirmó una u otra de las lecturas anteriores. El error fué mayor en 3% de las películas, todas las cuales eran inaceptables. Por el resultado anterior cabe colegir que pueden leerse con considerable exactitud las películas buenas, y que es inútil tratar de hacerlo con las poco satisfactorias.

Foshay y LeBlanc han publicado recientemente un monograma para convertir las cuentas de las inclusiones en índices fagocitarios, del cual la autora no se enteró sino después que había utilizado por algún tiempo su gráfica de interpretación de las lecturas.

El Dr. Foshay accedió generosamente a una insinuación de que correlacionara los dos sistemas, para lo cual determinó el índice fagocitario en 100 películas preparadas por nuestros investigadores en campaña que había previamente leído e interpretado la autora. Esas películas comprendían aproximadamente números iguales de reacciones negativas, débiles, moderadas, fuertes, y muy fuertes, encontrándose la siguiente correlación entre ambos sistemas:

Interpretación de Evans	Índice fagocitario de Foshay
Negativa.....	1-20
Débil.....	21-30
Moderada.....	31-60
Fuerte.....	61-80
Muy fuerte.....	81-100

Intradermorreacción

Para la reacción alérgica se utilizó la solución de nucleoproteína de *Brucella* de Huddleson, llamada "brucelergina," y preparada en el laboratorio de dicho autor. La técnica para la preparación de este antígeno lavado en éter aparece descrita en el trabajo de dicho autor: "Brucella Infections in Animals and Man." La reacción se verificó inyectando 0.1 cc de la solución de nucleoproteína en la cara lateral del antebrazo.

Cada lote de brucelergina ya titulada en cuanto a nitrógeno total, fué titulado en cuanto a potencia en un sujeto hipersusceptible (siempre el mismo). Con los tres lotes comprobados con la dilución al 1:10 del material recibido de Huddleson se obtuvo una reacción que varió de moderada a intensa. Con los dos lotes comprobados con la dilución al 1:100, la reacción fué moderada, con una zona eritemática de unos 5 cm de diámetro, y una zona indurada como de 1 cm de diámetro. Se comprobó entonces a cinco voluntarios con antecedentes de brucelosis: cuatro con una dilución al 1:10, y uno al 1:100 de brucelergina. En los dos que recibieron la dilución al 1:10, fué tan intensa la reacción orgánica general que remeda los síntomas de brucelosis, que incapacitó a los sujetos por uno o dos días. El que recibió la dilución al 1:100 no reveló más que una leve reacción orgánica.

De esto se desprende que no conviene utilizar material puro en un sujeto sin haber comprobado a éste antes en cuanto a hipersensibilidad con el material diluído. Cada investigador en campaña utilizó su propio criterio en cuanto a la utilización de brucelergina pura en la primera prueba.

Las lecturas se hicieron al cabo de 24 y 48 horas, a fin de excluir las reacciones anespecíficas precoces. Las locales variaron de débiles, con una zona de eritema circundante y ligero edema de unos 1.5 cm de diámetro, a muy fuertes, abarcando una zona de 60 cm² o más. En los hipersusceptibles esa zona tendió a alargarse por vía linfática, y los ganglios cercanos se engrosaron a veces. Las reacciones locales específicas desaparecieron lentamente, dejando a menudo por meses enteros una zona oscura de 1 o 2 cm de diámetro.

Goldstein y también Heathman descubrieron que la intradermorreacción con una suspensión de *Brucella* matada al calor, estimula la producción de aglutininas en un porcentaje elevado de sujetos, pero Goldstein agrega que, cuando se empleó un antígeno desgrasado, no se elevó el título de aglutininas en la mayoría. El experimento siguiente patentiza que, cuando se utiliza la nucleoproteína de Huddleson, es importante verificar la intradermorreacción después de obtener la muestra de sangre para serorreacciones, pues la reacción puede excitar la producción de opsoninas así como aglutininas: Obtenidas muestras de sangre de 12 voluntarios adultos, se inyectó a cada uno nucleo-

proteína de Huddleson al 1:10. A las dos semanas se obtuvieron nuevas muestras de sangre, verificándose pruebas de aglutinación y de opsonocitofagia en ambas muestras de cada sujeto. En 5 de los 12 se habían formado opsoninas, y también había una producción bien definida de aglutininas en 7, con un ascenso en el título de 0 a 1:320.

BIBLIOGRAFÍA

- Evans, Alice C.: *Pub. Health Rep.*, 1072, 1937.
 Foshay, Lee, y Le Blanc, T. J.: *Jour. Lab. & Clin. Med.*, 1297, 1937.
 Francis, Edward: "Culture medium for *Bacterium tularensis*" (Este folleto puede obtenerse pidiéndolo al Instituto Nacional de Sanidad, Washington, D. C.)
 Goldstein, J. C.: *Jour. Clin. Invest.*, 200, 1934.
 Heathman, Lucy S.: *Jour. Inf. Dis.*, 243, 1934.
 Huddleson, I. F.: "Brucella Infections in Animals and Man," The Commonwealth Fund, New York.

MÍNIMAS CONDICIONES SANITARIAS PARA LA HABITACIÓN RURAL

Por el Dr. LUIS MAZZOTTI¹

Con anterioridad² el autor publicó un pequeño artículo en el cual hizo notar que, para tratar de obtener un mínimo de condiciones sanitarias para la habitación rural, es necesario conocer los diversos sistemas y tipos de construcción usados actualmente, para que sin apartarse de ellos se establezcan las modificaciones indispensables para obtener su mejoramiento, pues de no tomarlos en cuenta y tratar de cambiarlos radicalmente se tropezaría con el factor económico que impediría su realización.

En efecto, hay que considerar que las habitaciones rurales son construídas en muchos casos por las mismas personas que las van a habitar y con materiales que la naturaleza ofrece en el lugar, por lo que es de recomendar el estudio detallado de los sistemas rurales de construcción, para encontrar cuáles son las condiciones de mejoramiento factibles de llevar a cabo con un mínimo de costo para cada región.

En el mismo artículo se sugirió la elaboración de folletos sobre construcciones rurales, con la descripción de varios modelos de casas, semejantes cada uno de ellos a los tipos rurales actuales y recomendando sistemas de construcción en los que fueran utilizables los materiales que los campesinos tienen en cada una de sus regiones.

Antigüedad de los sistemas rurales de construcción.—La casa rural, cuando menos de algunas de las regiones indígenas, tiene seguramente sus orígenes en tiempos anteriores a la Colonia. En el Templo del Tigre de Chichén-Itzá, Yucatán, existen frescos murales en los que puede observarse la choza yucateca con un aspecto semejante al actual. En las ruinas de Uxmal, Yuc., en el cuadrilátero de las Monjas, los

¹ Del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, México, D.F.

² *Boletín de Salubridad*, Vol. IV, 1933; Depto. Salubridad Pública, México.