



**ABORDAJE INTEGRAL DE LA BRUCELOISIS EN EL
MARCO DE UNA SALUD**

Brucelosis Humana: Generalidades

Ignacio Moriyón



Instituto de Salud Tropical
Universidad de Navarra



REVISAR

1. La **relevancia en el diagnóstico** de la epidemiología, contagio, tiempo de incubación y de enfermedad pre-tratamiento.¹
2. Los puntos críticos del **diagnóstico directo** (i.e., bacteriológico).
3. Qué **información proporcionan las pruebas indirectas** (i.e., serológicas).
4. Qué **pruebas serológicas son recomendables**.
5. Las pautas de **tratamiento antibiótico**.

¹ Ver detalles en Material Complementario



1. Anamnesis correcta (**enfocada**).
2. Clínica (**compatible**).
3. Pruebas de laboratorio (**específicas o con necesidad de interpretación**).
4. Seguimiento del paciente (“**confirmación**”).



Contagio: Implicaciones para la “sospecha” (anamnesis correcta)

1. Los grupos/personas potencialmente infectadas son **muy variables**, pero **siempre en relación con animales infectados o sus productos**.
2. Afecta a **individuos de cualquier edad y sexo, según actividad**.
3. Se da **en cualquier época del año**, con mayor número de casos durante los periodos estacionales, si existen, de partos de los animales.
4. Los **casos grupales** (p.ej. en “familia”) son comunes. **Pero** no todos enferman, incluso con serología positiva, ni todos enferman al mismo tiempo (ver Material Complementario).

Duración de la enfermedad antes del tratamiento: implicaciones

Nº de pacientes	Días	
	Media ± SD	Intervalo
530 ^a	44 ± 77	≤14 - ≥ 90
73 ^b	33 ± 33	n.d.
358 ^c	53 ± 65	3 - 360

^a Colmenero et al. 1996. Medicine, 75, 195-211.

^b Solera et al. 2004. Clin. Infect. Dis., 39:1776-82

^c Bosilkovski et al. 2007. Int.J Infect.Dis., 11, 342-347

Retraso en el diagnóstico¹

1. mayor probabilidad de **formas focales/complicaciones** (y de cirugía) (ver Material Complementario).
2. mayor probabilidad de **evolución poco favorable** (fallo terapéutico, recaídas y mortalidad).²
3. acentúa la evolución peculiar del **perfil/propiedades de las inmunoglobulinas** (ver también Tiempo de Incubación en Material Complementario).

¹ > 30 días en Colmenero et al. 1966.

² 10.6% y 3.6% en pacientes con y sin complicaciones, respectivamente (Colmenero et al. 1966.)



Diagnóstico

CUADRO CLÍNICO

- **No patognomónico** y variable (ver Material Complementario), incluso según ambiente (p.ej., urbano o rural).
- Se solapa con el de malaria, tuberculosis, fiebres tifoideas, sarcoidosis, Zika, dengue y Chiconguya, linfoma, lupus eritematoso, artritis reumatoide y otros.
- Pero debe ser **compatible con brucelosis** (elimina muchas incertidumbres por ciertas reacciones cruzadas en pruebas serológicas).
- Las **pruebas de laboratorio son esenciales**.
 - Directas
 - Indirectas



Diagnóstico directo

Cultivo

- **Específico (concluyente si positivo)**: hacer **siempre** que sea posible.
- Óptimamente, **guiado por una serología** (RB) previa/simultánea.
- Muestra: **sangre** (¿medula?) y casos particulares (abcesos, biopsias, etc.).
- **¡Atención al protocolo!**
- **MUY** (estrictamente) necesario si se sospecha infección por **Rev1 o RB51**
- Si es posible, tipado molecular para aclarar la epidemiología.

PCR, RT-PCR (o semejantes) directamente de muestras

- Controvertidos y no estandarizados (variedad de protocolos y problemas de especificidad pre- y post-tratamiento).

Hemocultivo: puntos críticos del protocolo

- Muestra en **fase pirética**.
- **Sin antibioterapia previa**.
- **10 mL** sangre (asépticamente) por cultivo.
- **Tres cultivos** independientes en 10% CO₂ hasta:

45 días: método bifásico de Ruiz-Castañeda



21 días: sistemas de detección o seguimiento automático Bactec (IR, colorimétrico, fluorescente); Difco-ESP (manométrico).

Resultados

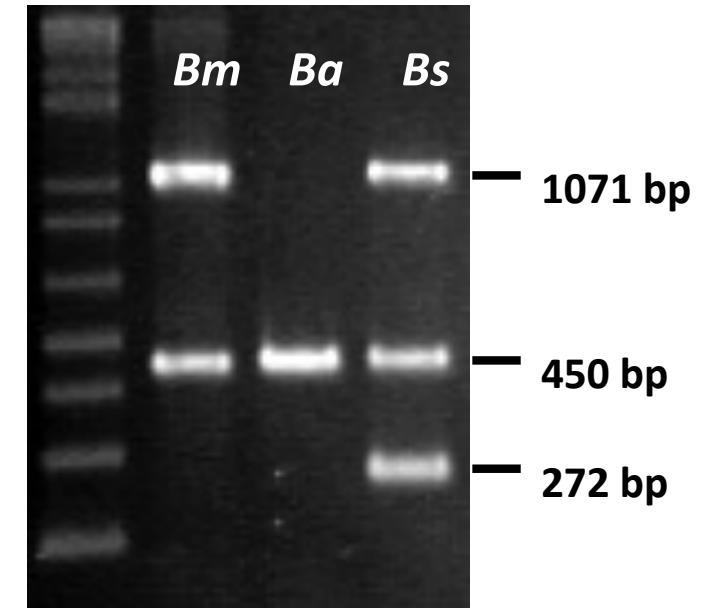
- Hasta 85% de éxito en formas “agudas” febriles.
- Mucho menor (65% o menos) en formas de larga evolución.

Identificación de colonias aisladas

Presuntiva

- Morfología colonial (experiencia).
- Gram (Stamp).
- Oxidasa.
- Ureasa.
- En todo caso, clínica compatible y (con muy raras excepciones) serología positiva.

B. melitensis vs. *B. abortus* vs. *B. suis*



Confirmación

- Bruceladder (o semejante).
- Laboratorio de referencia.

Vacunas

PCR específica y/o:

- S19. Lisa (S), eritritol-sensible
- Rev 1. Lisa (S), estreptomicina-resistente y penicilina-sensible.
- RB51. Rugosa (R), rifampicina-resistente

Multiplex PCR with 3 pairs of primers:

BMEI0998f/0997r

BMEII0843f/0844r

BMEII0428f/0428r

BMEI0752f/0752r

BMEI0535f/0536r

BMEI1436f/1435r

BR0953f/0953r

BMEII0987f/0987rv

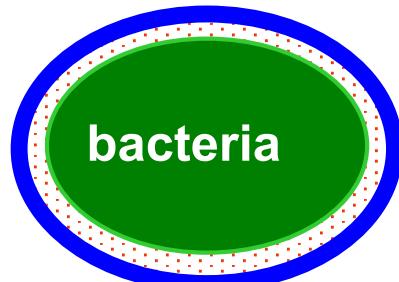
Otros

¡Confusión con *Ochrobactrum* en (al menos) sistemas VITEK 2 y MALDI-TOFF!

Diagnóstico serológico: antígenos

B. abortus, B. melitensis, B. suis

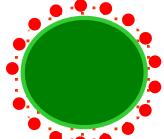
Lisas (“smooth” o S)



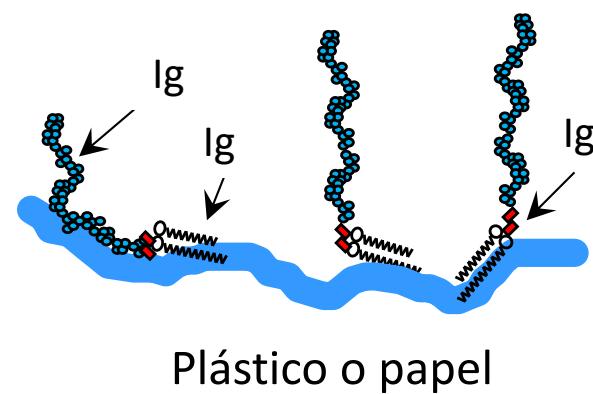
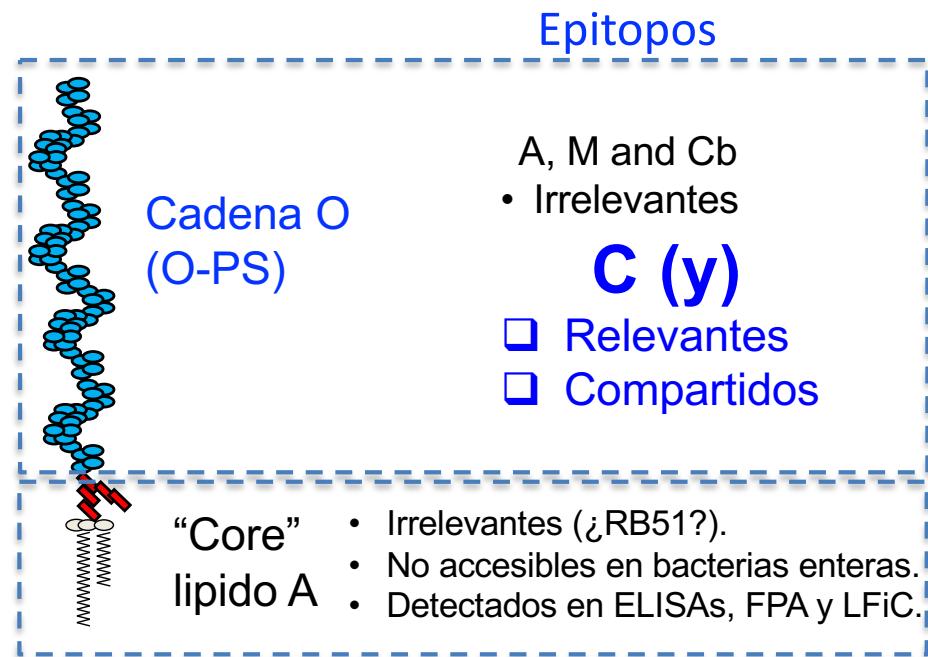
Antígeno principal
de superficie: S-LPS

Un problema común: disociación S-R
(pérdida del O-PS por mutación)

Mutantes rugosos (R)
(vacuna RB51 incluida)

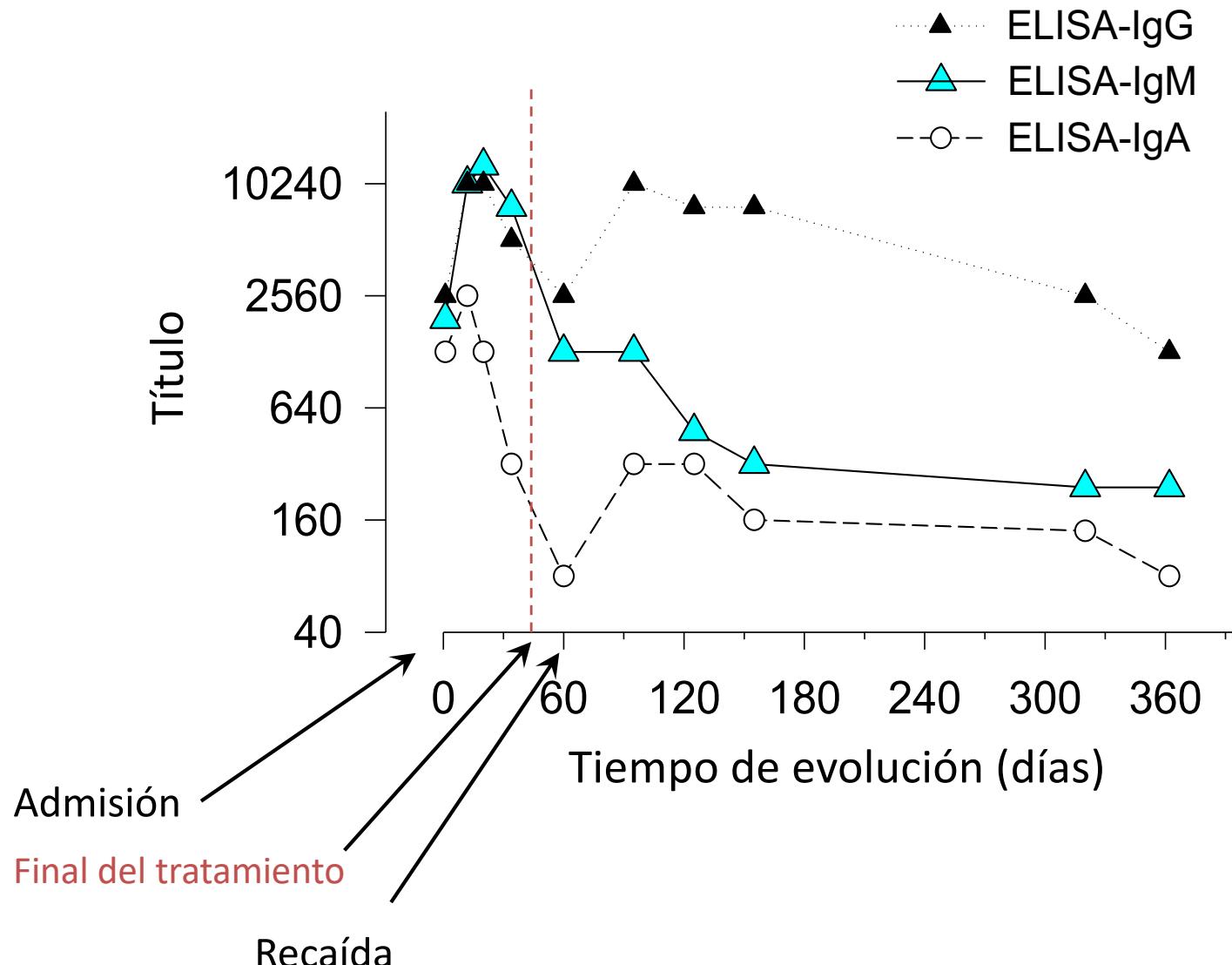


Indeseables en pruebas que emplean bacterias enteras
• Auto-aglutinan (y activan el complemento) → falsos positivos.
• Carecen de epitopos A, M, Cb y C(y) relevantes.



Diagnóstico serológico: perfil de anticuerpos (1)

Paciente con corto tiempo de incubación y enfermedad y con recaída

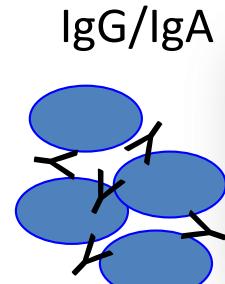
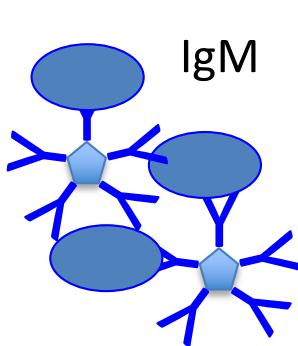


Brucelosis: peculiaridades de la aglutinación

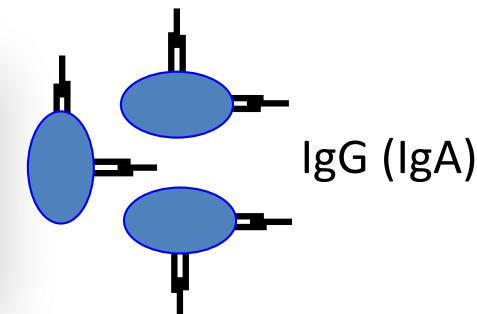
Seroaglutinación (SAT o MAT):¹ título diagnóstico $\geq 160-320$

PERO:

corta evolución	estadios “intermedios”	larga evolución
SAT “alta”	SAT decreciendo	SAT < 160
anticuerpos aglutinantes		anticuerpos no-aglutinantes



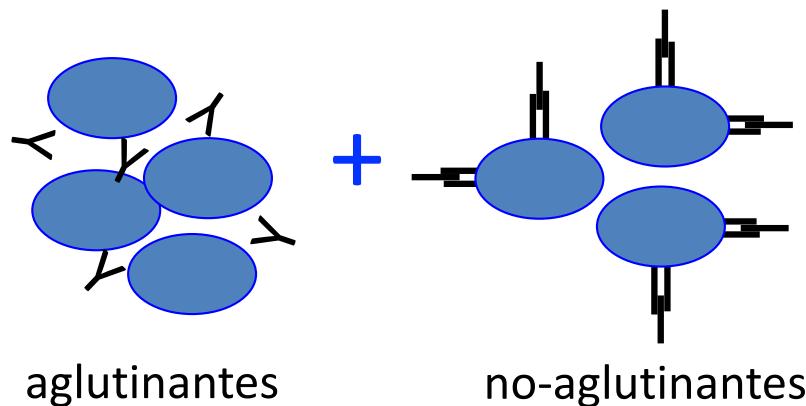
Aglutinantes y
no-aglutinantes



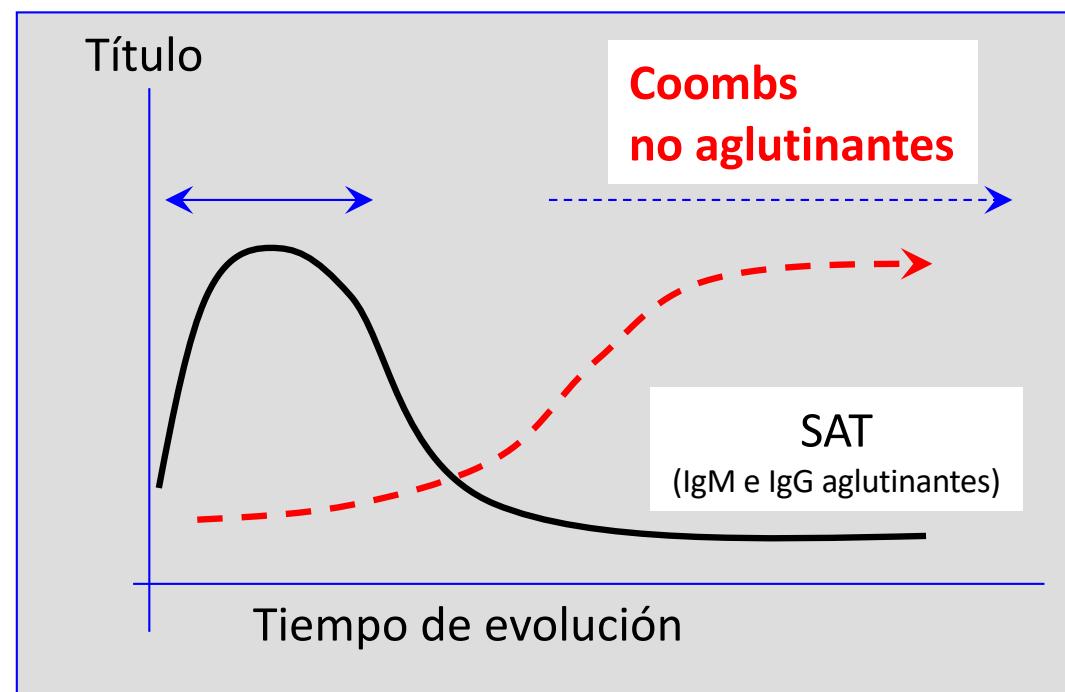
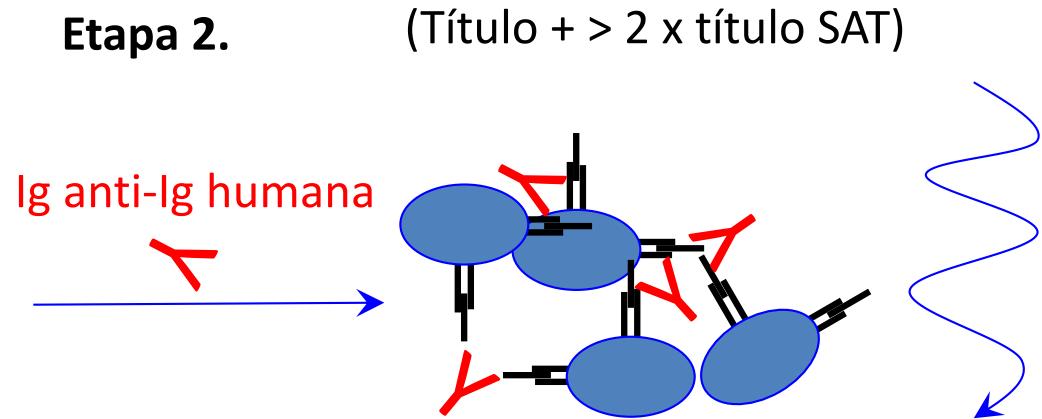
¹ En tubo, SAT; en microplaca, MAT

Diagnóstico serológico: Coombs

Etapa 1. SAT



Etapa 2.





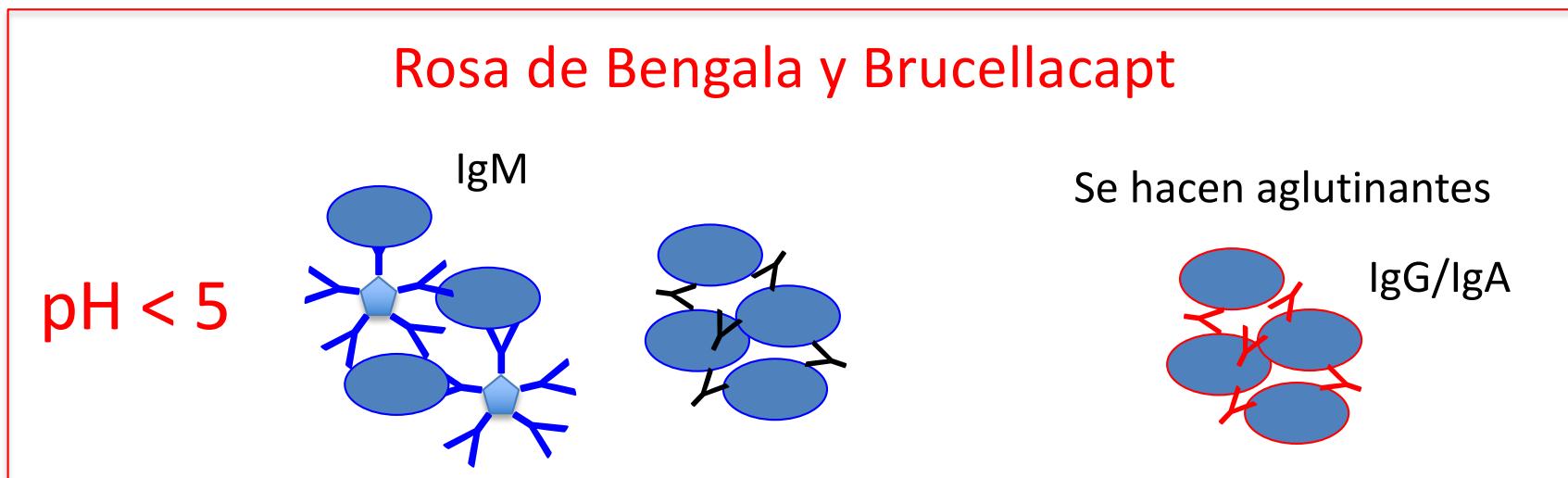
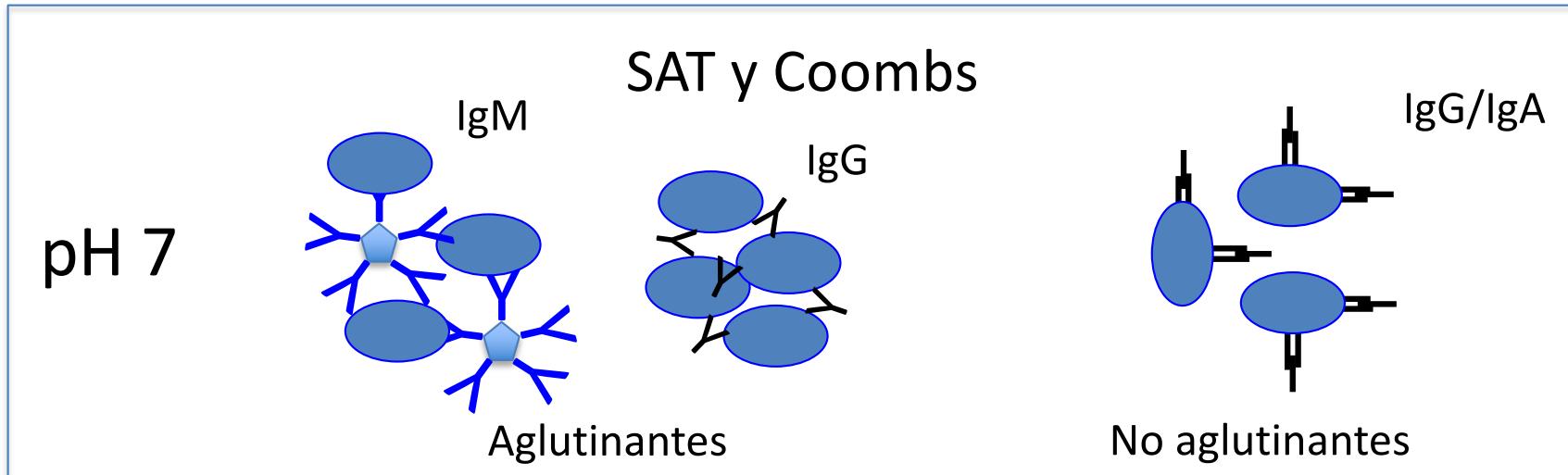
Diagnóstico serológico: SAT y Coombs

Ratios of titers of Coombs and SAT and evolution of human brucellosis¹

Time of evolution (months)	Nº of patients studied	Coombs / SAT ratio
< 4	98	11.7
4 to 10	45	50.4
> 10	67	86.2

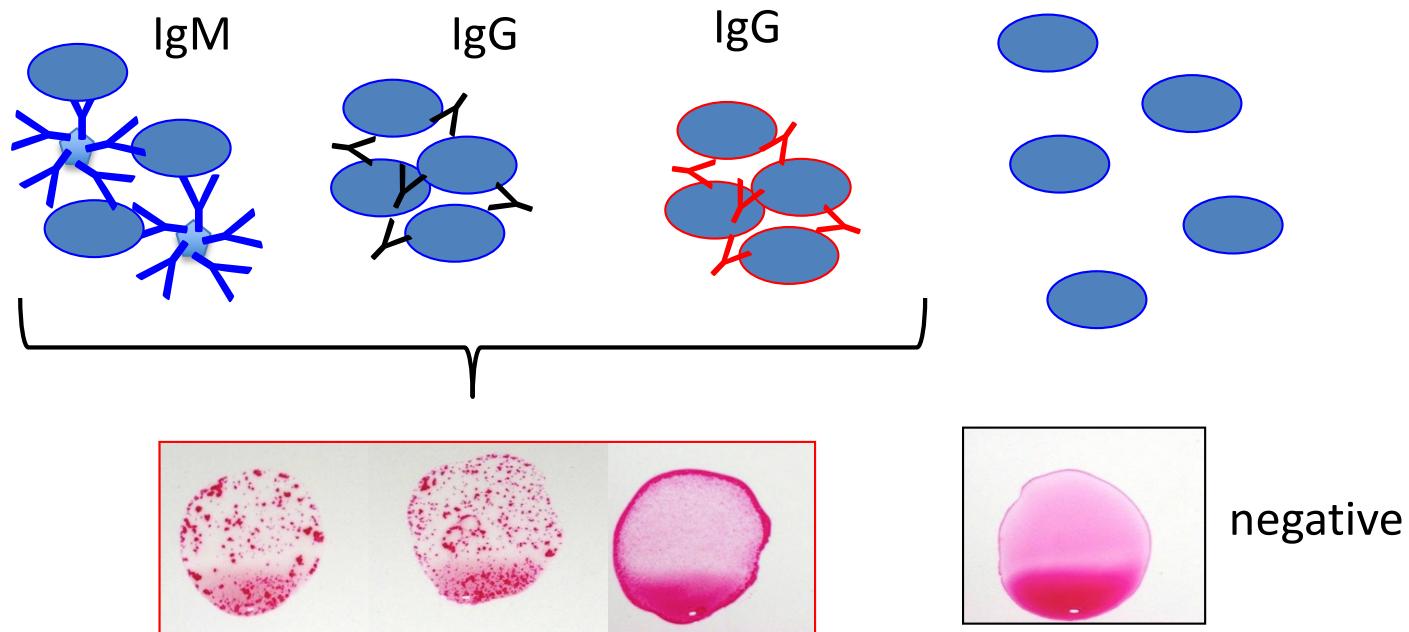
¹ Data from Foz, A. 1983. Brucellosis. In: E. J. Perea. Enfermedades infecciosas. Salvat Ed., Barcelona, Spain

Diagnóstico serológico: Cómo evitar el Coombs



El Rosa de Bengala en brucelosis humana

pH 3.7



La “intensidad” (tamaño grumos) no guarda una relación unívoca con la cantidad de anticuerpos

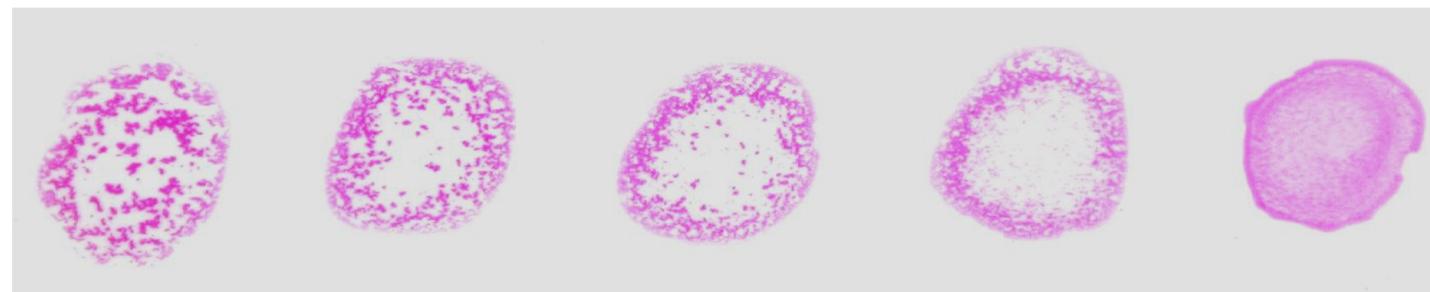
El Rosa de Bengala en brucelosis humana

Uso de diluciones de suero

1. Gotas (30 μ L)
de suero salino

2. Suero: se hacen diluciones con las gotas

3. Cada dilución se testa con el reactivo



1/2

1/4

1/8

1/16

1/32

El Rosa de Bengala en brucelosis humana

RBT results with sera samples from brucellosis patients and persons in contact with *Brucella* infected animals.¹

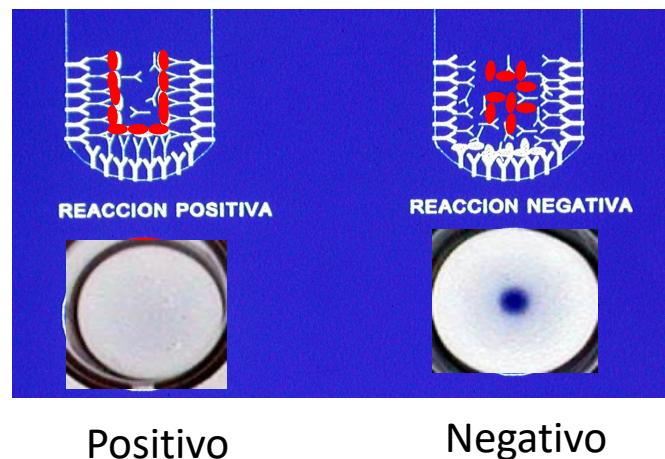
	Total Nº of sera	Nº (%) positive at dilution	
		≤ 1/4	≥ 1/8
Infected	210	209 (99,5)	195 (93,3)
Contact (asymptomatic)	105	21 (20,0)	1 (0,9)

¹ Medicine. 2002; 8(61):3289-3296 (Spanish edition)

Brucellacapt



- Placas de 96 pocillos cubiertos con **anti-Ig humana**
- Solución amortiguadora **a pH 5**
- **Suspensión antigénica “especial” (?)**



- Teóricamente “capturan” las Ig aglutinantes y no aglutinantes
- Se correlaciona (aprox.) con el Coombs)

Pero....

¡También funciona en placas sin anti-IgG!
(Casanova et al. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009, 16, 844.)

Título diagnóstico ≥ 320
(Se, 90; Sp 99)

Orduña-Domingo, et al. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 4000–4005.

“Acute” cases (n=25) and healthy donors (n=90; endemic area)

TABLE 2. Accuracy indices of the tests^a

Test	Sensitivity	Specificity	PPV ^b	NPV ^c
RB ^d	1.00	0.97	0.89	1.00
MAT (microSAT)	0.92 ^e	1.00	1.00	0.98
Brucellacapt	1.00	1.00	1.00	1.00
IgG ELISA ^f	0.84	1.00	1.00	0.96
IgM ELISA ^f	0.60	1.00	1.00	0.90
IgA ELISA ^f	0.96	0.98	0.92	0.99

^a Cutoff points for positive tests were as follows: RB, $\geq 1:1$; MAT and Brucellacapt, $\geq 1:160$.
($1:1 = 1/2$)

^b PPV, positive predictive value.

^c NPV, negative predictive value.

^d RB, Rose Bengal test.

^e Two patients had MAT titers of 1:80.

^f Serion/virion ELISA kit

TABLE 1. Distribution of results from sera of brucellosis patients and controls in serological tests

Titers ^a	No. of initial sera (n = 82)			No. of follow-up sera (n = 233)			No. of control sera (n = 412)		
	Brucellacapt	Coombs	SAT	Brucellacapt	Coombs	SAT	Brucellacapt	Coombs	SAT
0			7	8	20	48	397	407	410
20	1		2	0	0	22			2
40		3	8	0	8	30			3
80	3	4	11	8	28	41	11	1	
160	3	7	17	21	53	53	1	1	
320	2	8	20	47	49	20	2		
640	15	24	11	37	40	14			
1,280	9	24	5	45	33	4	1		
2,560	16	7	1	34	1	1			
5,120	13	5		24	1				
10,240	11			8					
20,480	2								
40,960	4			1					
81,920	3								

^a Inverse titer.

Imnunochromatografía de flujo lateral (LFA)

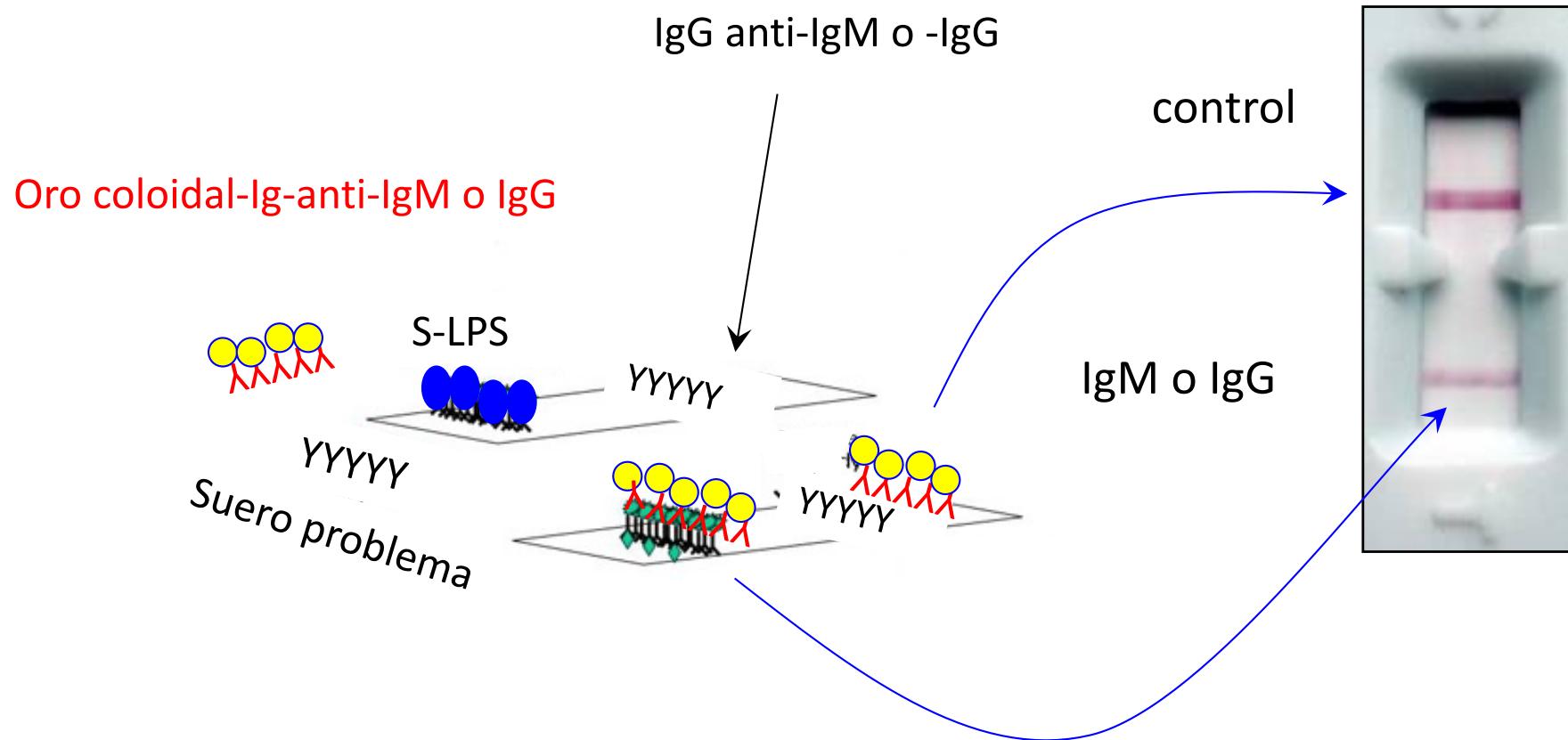


TABLE 2. Sensitivity of *Brucella* IgM and IgG flow assays for initial serum samples from patients with confirmed brucellosis and comparison with other serological tests

Assay	No. of positive samples (n = 89)	% Sensitivity (95% CI)
SAT, $\geq 1:320$	69	78 (67–85)
SAT, $\geq 1:160$	77	88 (78–93)
SAT-DTT, $\geq 1:160$	55	62 (51–72)
SAT-DTT, $\geq 1:80$	64	70 (61–81)
Coombs, $\geq 1:320$	89	100 (95–100)
IgM flow	60	67 (57–77)
IgG flow	70	71 (61–79)
IgM + IgG flow	85	96 (88–99)

Tests diagnósticos en neurobrucelosis ($\pm 5\%$ de casos)^{1,2}

Seropositividad en líquido cefalo-raquídeo (CFS)

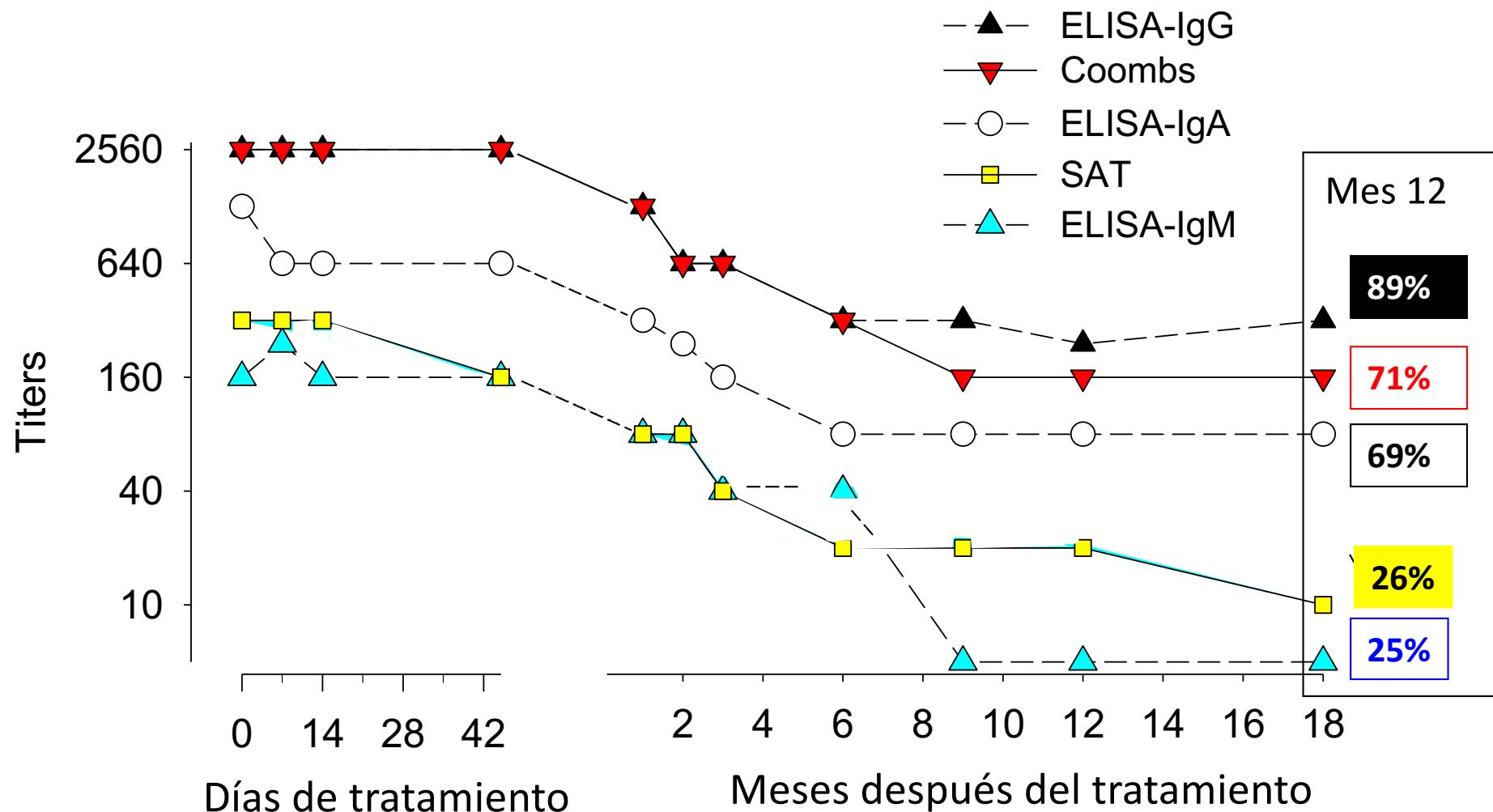
	Total	Positive	Sensitivity %
Serum STA	172	162	94.2
CSF STA	144	113	78.5
Serum RBT	123	118	95.9
CSF RBT	106	75	70.8
Blood culture (Bactec, BacTAlert)	154	57	37
CSF culture (Bactec, BacTAlert)	87	22	25.3

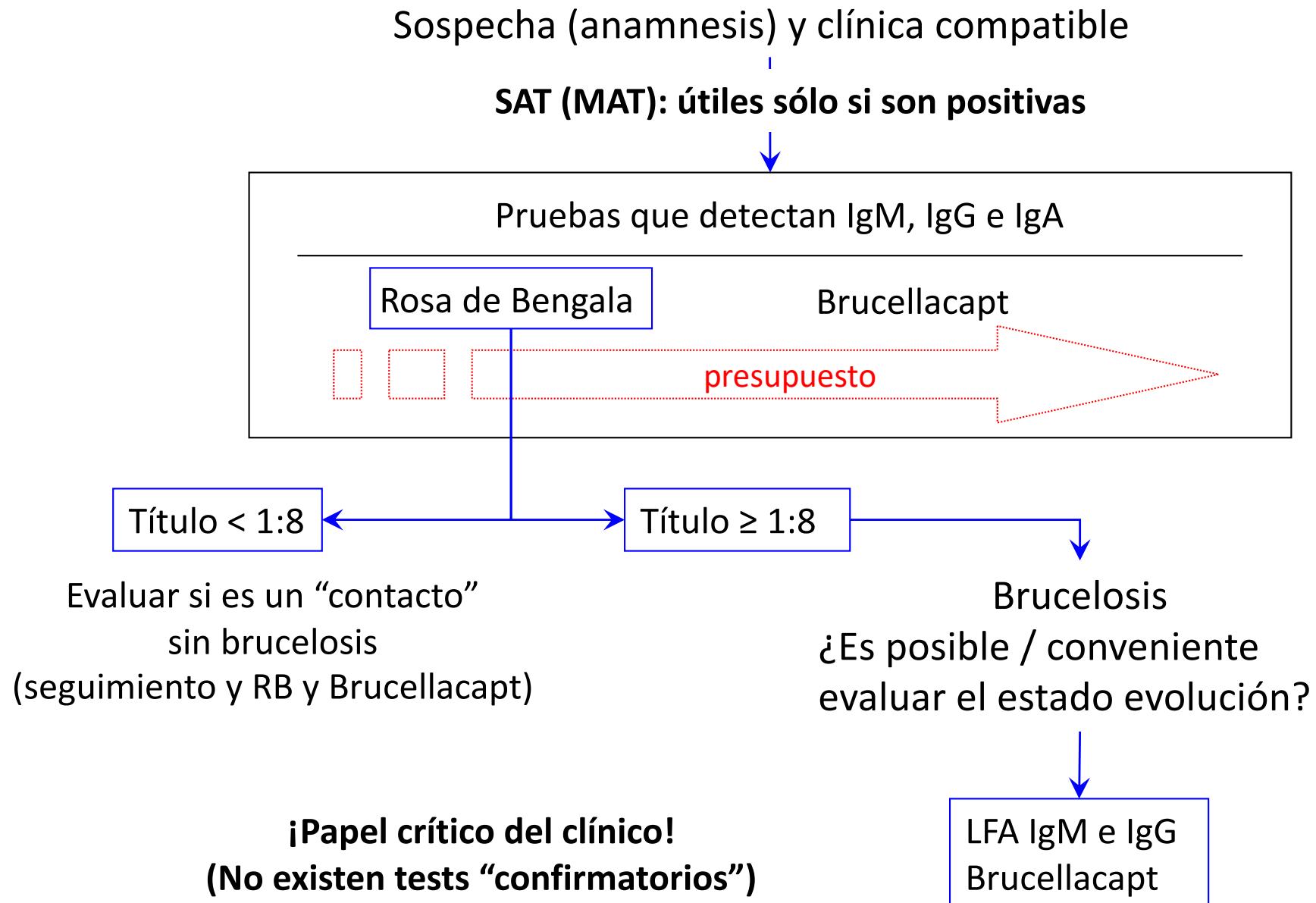
CSF, cerebrospinal fluid; RBT, Rose-Bengal test; STA, standard tube agglutination test; BM, bone marrow.

¹ Típicamente, son casos de corta evolución.

² Estudio retrospectivo multicéntrico (Erdem, et al. 2013. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, E80–E86.

Media de los títulos en 63 pacientes (sin recaídas)





- **Si la serología persiste** y no hay signos/síntomas, considerar curación, pero hacer seguimiento para prever recaídas.
- En las áreas endémicas, todas las pruebas serológicas pueden **perder algo de especificidad** y la evaluación clínica es fundamental.
- Las **infecciones por la vacuna RB51** no pueden diagnosticarse por serología.
- Con serología débil (y cultivo negativo) y sin formas focales, no existe un criterio para determinar si un síndrome de **fatiga crónica y/o neurastenia** es brucelosis

Tratamiento

Antibiotic therapy in human brucellosis: relapse rates

Antibiotic	Therapy Duration (days)	Relapse rate (%)
Tetracycline	21	30
	42	15
Cotrimoxazol	45	40
Ciprofloxacin	(various)	33
Tetracycline + streptomycin	21 and 14	15
	30 and 14	7-8
Doxycycline + <u>streptomycin</u>	45 and 14	3-5
Doxycycline + gentamicin	45 and 7	3-14
Doxycycline + <u>rifampicin</u>	30 and 30	38
	45 both	5-15
Azithromycin + gentamicin	21 and 7	30
Ciprofloxacin + rifampicin	30 and 45	16

Ariza, 1999. Rev. Med. Microb. 10:125-135

Agalar et al. 1999. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 18:535-538.

Solera et al. 2001. Clin.Infect.Dis. 32:506-509

Pappas et al. 2006. Clin Microbiol. Infect. 12:823-825.

Rev 1: streptomycin-resistant !!!
RB51: rifampicin-resistant!!!

Tratamiento

Table 3. Treatment of human brucellosis ¹

Clinical syndromes	Recommended	Alternative
Acute brucellosis (adults and children above 8 years of age).	Doxycycline 100 mg orally twice a day for 45 days plus either streptomycin 15 mg/kg intramuscularly daily for 14–21 days, or gentamicin 3–5 mg/kg intravenously daily for 7–14 days. Or Doxycycline 100 mg orally twice a day for 45 days plus rifampin 600–900 mg orally daily for 45 days.	Rifampin 600 mg orally daily for 42 days plus quinolone (ofloxacin 400 mg orally twice a day or ciprofloxacin 750 mg orally twice a day) for 42 days. Or Doxycycline 100 mg orally twice a day plus trimethoprim-sulfamethoxazole, one double strength tablet twice a day for 2 months. Monotherapy with doxycycline or rifampin 15mg/kg orally daily for 3- 6 weeks.
Children less than 8 years old.	trimethoprim-sulfamethoxazole 5 mg/kg (of trimethoprim component) orally twice a day for 45 days plus gentamicin 5–6 mg/kg intravenously daily for 7 days. Rifampin 15 mg/ kg orally daily 45 days plus gentamicin 5–6 mg/kg intravenously daily for 7 days.	
Brucellosis during pregnancy.	Rifampin 600 mg orally daily for 45 days plus trimethoprim-sulfamethoxazole one double strength tablet twice a day for 45 days.	Rifampin 600–900 mg orally daily for 45 days.
Focal infections (endocarditis, spondylitis, meningitis, paraspinous abscesses). ²	Doxycycline 100 mg orally twice a day and rifampin 600 mg orally daily for 6–52 weeks plus either streptomycin 1 g intramuscular daily or gentamicin 3–5 mg/kg intravenously daily for 14–21 days.	Consider trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin 750 mg orally twice a day or ofloxacin 400 mg orally twice a day as substitute for doxycycline or rifampin. Surgery should be considered for patients with endocarditis, cerebral or epidural abscess, spleen or hepatic abscess, or other abscesses that are antibiotic resistant.

¹ The choice of regimen/duration should be based on the presence of focal disease and underlying conditions that may contraindicate certain antibiotic therapy.

² Patients with focal disease (such as spondylitis or endocarditis) may require long courses of therapy depending on the clinical evolution. Aminoglycoside and quinolone dosage should be adjusted in patients with poor renal function.