

Evaluación del sistema Brucellapt[®] para el diagnóstico serológico de la brucelosis humana en Cuba

Evaluation of the system Brucellapt[®] for serological diagnosis of human brucellosis in Cuba

Eduardo Echevarría Pérez^{1*}

Ana Margarita Obregón Fuentes¹

Yaindrys Rodríguez Olivera¹

Odisney Lugo Suárez¹

¹Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia. Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras y Brucelas. Departamento Bacteriología – Micología.

*Autor de la correspondencia. Correo electrónico: echevarria@ipk.sld.cu

RESUMEN

Introducción: En el diagnóstico microbiológico de la brucelosis, los métodos serológicos son los más utilizados. Brucellapt[®] ofrece la ventaja de detectar en cualquier momento de la enfermedad anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes contra *Brucella* spp.

Objetivos: Evaluar y aplicar el sistema serológico comercial Brucellapt[®] para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp.

Métodos: Se realizó una investigación en servicios y sistemas de tipo observacional con un estudio de caso control anidado, en el periodo de enero de 2015 a junio de 2016, en el Laboratorio Nacional de Referencia de Espiroquetas y Brucelas. Se evaluaron 50 sueros de casos y 100 de controles por Brucellapt[®]. Se aplicó Brucellapt[®] en 695 sueros de casos con sospecha clínica o epidemiológica de la enfermedad, los cuales fueron confirmados por ELISA.

Resultados: Brucellacapt[®] mostró 100 % de sensibilidad, 83 % de especificidad, 54,6 % de reactividad y 16,4 % de positividad en las muestras estudiadas. Se confirmó por ELISA la presencia de anticuerpos IgM (21, 2 %), IgG (6,1 %) e IgM + IgG (7,6 %). Doscientas cuarenta y seis muestras y otras siete fueron reactivas y positivas respectivamente, solo por Brucellacapt[®].

Conclusiones: Brucellacapt[®] contribuyó a la detección de anticuerpos en los sueros de pacientes sospechosos de la enfermedad con valores aceptables de sensibilidad y especificidad diagnóstica. Este resultado sugiere su implementación en la red nacional de laboratorios cubanos para fortalecer el diagnóstico y la vigilancia de la brucelosis humana en Cuba.

Palabras clave: brucelosis humana; Brucellacapt[®].

ABSTRACT

Introduction: Serological methods are the most commonly used for the microbiological diagnosis of brucellosis. Brucellacapt[®] has the advantage of detecting agglutinating and non-agglutinating antibodies against *Brucella* spp. at any point in the evolution of the disease.

Objectives: Evaluate and apply the commercially available serological system Brucellacapt[®] for detection of antibodies against *Brucella* spp.

Methods: A nested case-control observational study was conducted of services and systems from January 2015 to June 2016 at the Spirochaete and Brucella National Reference Laboratory. Evaluation was performed of 50 serum samples from cases and 100 from controls using Brucellacapt[®]. The system was also used in 695 serum samples from clinically or epidemiologically suspected cases, which were confirmed by ELISA.

Results: Brucellacapt[®] showed 100% sensitivity, 83 % specificity, 54.6 % reactivity and 16.4% positivity in the samples studied. Presence of the following antibodies was confirmed by ELISA: IgM (21.2 %), IgG (6.1 %) and IgM + IgG (7.6 %). Two hundred forty-six samples and another seven were reactive and positive, respectively, only by Brucellacapt[®].

Conclusions: Brucellacapt[®] contributed to antibody detection in serum samples from suspected cases, with acceptable diagnostic sensitivity and specificity values. This result suggests its implementation in the Cuban national network of laboratories to strengthen the diagnosis and surveillance of human brucellosis in Cuba.

Keywords: human brucellosis; Brucellacapt[®].

Recibido: 13/03/2018.

Aceptado: 08/10/2018.

INTRODUCCIÓN

El género *Brucella* produce una enfermedad infectocontagiosa conocida como brucelosis, zoonosis transmitida entre animales, incluyendo al humano. En la actualidad existen diez especies reconocidas de brucelas. Las especies que afectan al hombre y a los animales susceptibles son: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*.⁽¹⁾ La brucelosis tiene una amplia distribución mundial, aparece en países mediterráneos de África y Europa, en el Medio Oriente, Asia Central, la India, América Central y América del Sur.⁽²⁾ En América Latina, los países con mayor prevalencia son Argentina, México y Perú.⁽³⁾

La vía principal de transmisión de la enfermedad es la ingestión de productos lácteos y cárnicos, así como de sus derivados. Los veterinarios, técnicos y obreros vinculados a la manipulación de material biológico en salas de maternidad, ordeño y sacrificio de áreas productivas, así como el personal de laboratorio, se consideran personal con riesgo ocupacional. La brucelosis humana presenta manifestaciones clínicas muy polimorfas y cursa en ocasiones de forma asintomática y crónica, lo que trae consigo las presentaciones focalizadas (complicaciones) en los diferentes sistemas de órganos de la economía humana.⁽⁴⁾ Históricamente se notifican pocos casos de brucelosis humana en el mundo. En el año 2012 se publica el primer caso de endocarditis infecciosa como complicación de la enfermedad brucelar en Cuba.⁽⁵⁾ Su diagnóstico se fundamenta en los hallazgos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio, en el que este último juega un papel primordial para su confirmación.⁽⁶⁾

En 2011, se introduce el sistema serológico comercial Febrile Antigen Brucella (FAB, Diesse, Italia)⁽⁷⁾ para la pesquisa de anticuerpos aglutinantes contra brucelas, en la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Cubana. Esto permitió el rescate de la vigilancia de laboratorio de la enfermedad a nivel nacional. Sin embargo, esta técnica solo es útil durante la forma aguda de la enfermedad, pues a ella escapan casos crónicos, recidivantes y las reinfecciones. De igual manera, se incorpora en el Laboratorio Nacional de Referencia de

Leptospiras y Brucelas (LNRLB), los sistemas ELISA IgM y ELISA IgG (Vircell Microbiologists, España)⁽⁸⁾ que posibilitan identificar si la muestra pertenece a un caso que cursa por el periodo agudo (IgM) o el de cronicidad (IgG) de la enfermedad.⁽⁶⁾

En 2015, se recibe en el LNRLB el sistema serológico comercial Brucellacapt[®] (Vircell Microbiologists, España).⁽⁸⁾ El sistema Brucellacapt[®] es una técnica de inmunocaptura-aglutinación para el diagnóstico de la brucelosis, que en un solo paso, de forma simple y cómoda, permite detectar anticuerpos aglutinantes (IgA, IgG e IgM) y no aglutinantes (IgA e IgG) contra *Brucella* spp. Este sistema fue presentado en 1997 para el diagnóstico de la brucelosis humana, especialmente en su forma crónica. Además, para el estudio serológico en sueros procedentes de animales, para diferenciar los anticuerpos vacunales de los que se producen en animales enfermos.⁽⁹⁾

El sistema Brucellacapt[®] es un ensayo homólogo a la prueba de Coombs (inmunoglobulina anti-humana). Esta técnica facilita la aglutinación de los anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes del suero con la suspensión antigénica de lipopolisacárido (LPS) de *B. abortus*. Sin embargo, resulta muy compleja y laboriosa.⁽¹⁰⁾ Por estas razones, muy pocos laboratorios la realizan de forma habitual. Esta técnica al emplear LPS como antígeno puede dar lugar a reacciones cruzadas en sueros de pacientes infestados con bacterias que presentan LPS, específicamente del epítipo O, como son *Yersinia enterocolitica* 09, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Vibrio cholerae* O:1, entre otras.⁽¹¹⁾

Dada la necesidad de continuar fortaleciendo el diagnóstico serológico de la brucelosis humana en Cuba, en la presente investigación se trazaron como objetivos evaluar y aplicar el sistema serológico comercial Brucellacapt[®] para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp.

MÉTODOS

Se realizó una investigación en servicios y sistemas de tipo observacional con un estudio de caso control anidado en el LNRLB, en el período comprendido desde enero de 2015 a junio de 2016.

Muestras clínicas

Grupo I (casos): 50 sueros de pacientes con brucelosis confirmada mediante elementos clínicos, epidemiológicos y presencia de marcadores séricos determinados por ELISA IgM y ELISA IgG (Vircell Microbiologists, España).⁽⁸⁾

Grupo II (controles): 55 sueros de "individuos sanos" donantes de sangre y 45 sueros de pacientes con otras enfermedades conocidas, miembros del grupo sindrómico, de ellos cinco con dengue, diez con Citomegalovirus (CMV), cinco con virus herpes simple (HVS), tres con Virus Epstein Bar (EBV), seis con hepatitis: cuatro de A (VHA) y dos de E (VHE), ocho con leptospirosis y toxoplasmosis respectivamente. Todos los sueros no tenían anticuerpos contra *Brucella* spp., mediante los ELISA IgM y ELISA IgG (Vircell Microbiologists, España).⁽⁸⁾

Grupo III: 695 sueros de casos sospechosos de brucelosis procedentes de zonas con alta focalidad animal y grupos de riesgo, remitidos al LNRLB desde instituciones del Sistema Nacional de Salud de Cuba.

Procedimientos

El sistema Brucellacapt[®] consta de tiras de pocillos de fondo en U que contienen inmunoglobulinas antihumanas. Tras la adición de los sueros y su dilución se añade el antígeno y se incuba 24 h. En la presente investigación se realizó el procedimiento de ensayo y la lectura e interpretación de los resultados según los criterios del fabricante. Los sueros con títulos desde 40 y hasta 160 se consideraron reactivos a brucelosis, los que mostraron títulos iguales o superiores a 320 fueron positivos con alto valor diagnóstico.⁽⁸⁾

Se aplicó las técnicas de referencia ELISA IgM y ELISA IgG para la confirmación de la infección en las muestras estudiadas.^(6,8)

Análisis estadístico

Los resultados se tabularon en una base de datos de Excel, diseñada al efecto. Se calculó las frecuencias absolutas y los porcentajes. Además, se calculó mediante Epidat 3.1, los indicadores de desempeño: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, el índice de concordancia o validez, el índice de Youden, así como la razón de verosimilitud positiva y negativa, con un intervalo de confianza (IC) del 95 % y el valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

El sistema serológico comercial Brucellapt® demostró la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp., en el 100 % (50/50) de los sueros del grupo I, de los cuales el 58 % (29/50) resultó reactivo y el 42 % (21/50) positivo.

El 17 % (17/100) de los sueros del grupo II resultó reactivo. De ellos seis correspondientes a donantes de sangre supuestamente sanos, cinco a pacientes con diagnóstico de leptospirosis, tres de toxoplasmosis y uno en cada caso de dengue, CMV y VHA. En estos casos los títulos de anticuerpos detectados fluctuaron entre 40 y 80, los que se consideran bajos.

El sistema Brucellapt® presentó sensibilidad del 100 %, especificidad del 83 %, índice de validez 88,67 %, valor predictivo positivo y negativo del 74,63 % y 100 %, respectivamente. Por otra parte, el índice de Youden fue de 0,83% y la razón de verosimilitud positiva fue de 5,88 %.

En la tabla se muestran los títulos de anticuerpos detectados por el sistema serológico comercial Brucellapt® y su confirmación por los sistemas ELISAs de referencia en los sueros del grupo III. El 54,6 % (380/695) presentó títulos de 40 y hasta 160, en tanto en el 16,4 % (114/695) los títulos fueron iguales o superiores a 320.

Tabla - Resultados de la aplicación del sistema serológico comercial Brucellapt® en las muestras de suero del grupo III

Brucellapt®		ELISA				
Título	No. muestras	IgM		IgG		IgM + IgG
		Pos	Dud	Pos	Dud	Pos
No reactivo	201	3	2	0	2	0
Reactivo 40-160	380	103	32	24	3	7
Positivo ≥ 320	114	42	7	19	2	46
Total	695	148	41	43	7	53

Pos: positivo. Dud: dudoso.

Los sistemas ELISAs confirman 35,1 % (244/695) de las muestras de suero reactivas, positivas y tres no reactivas por el sistema comercial en evaluación. En las muestras reactivas se identificó en el 14,8 %; 3,4 % y 1 % anticuerpos circulantes de la clase IgM, IgG e IgM + IgG, respectivamente. Mientras que en las muestras positivas se identificó IgM en 6 %; IgG en 2,7 % e IgM + IgG en 6,6 %. Se obtuvieron resultados dudosos en el 5,8 %

(41/695) para el ELISA IgM y en el 1% (7/695) para el ELISA IgG. Por otra parte, en el 36,4 % (253/695) de las muestras reactivas y positivas por Brucellacapt[®] no fue posible identificar el isotopo de inmunoglobulina circulante en el paciente.

DISCUSIÓN

En la práctica habitual de los laboratorios de diagnóstico serológico de brucelosis se establecen los sistemas de pesquisa de anticuerpos mediante la implementación de métodos rápidos, sencillos y sensibles como los sistemas de aglutinación. Estos sistemas son de mayor aceptación por mostrar mejores resultados durante la fase aguda de la enfermedad ya que detectan el isotopo IgM, índice de infección aguda y por resultar más económicos. Sin embargo, la detección de IgA e IgG no resulta posible debido al bajo poder aglutinante o no aglutinante de estas moléculas, lo que constituye la limitante fundamental de su uso, al no reconocer el estado de cronicidad, las recidivas ni las reinfecciones por *Brucella* spp.^(12,13)

La producción de anticuerpos incompletos, de forma no constantes y durante cualquier fase clínica de la enfermedad (aguda, subaguda y crónica), implica la necesidad de contar con sistemas de laboratorio que posibiliten su hallazgo de forma rápida y precisa.⁽¹⁴⁾ Es por eso que además del FAB, el ELISA IgM y el ELISA IgG, disponer de Brucellacapt[®] representa una oportunidad para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes cubanos.⁽¹⁵⁾

Los indicadores de desempeño alcanzados en esta investigación son aceptables y coinciden con trabajos publicados, los que oscilan entre el 74 y 100% de sensibilidad y entre el 59 % y 98 % de especificidad.^(16,17)

A nivel mundial existen bajos porcentajes de reacciones cruzadas mediante el Brucellacapt[®] con enfermedades tales como tuberculosis, salmonelosis, yersiniosis y la tularemia.⁽¹⁶⁾ En Cuba, no se vigilan serológicamente estas enfermedades, por lo que resulta difícil la comparación con ellas.

Aunque actualmente no se conoce el comportamiento de la brucelosis humana y animal en Cuba, existen notificaciones del Sistema de Información y Vigilancia Epizootiológica en el Instituto de Medicina Veterinaria que establecen el grado de afectación por brucelosis en entidades ganaderas, fundamentalmente en bovinos.⁽¹⁸⁾

Por tanto, la detección de títulos bajos de anticuerpos en las muestras de pacientes con otras enfermedades pudo ser consecuencia de una sensibilización tras el contacto con el microorganismo, además de la enfermedad actual. Por otra parte, la literatura consultada plantea que individuos que residen en zonas con alta focalidad, endémicas o que practican la crianza de determinadas especies de animales pueden presentar estos títulos.⁽¹⁶⁾

Los sistemas ELISAs para brucelas, pueden detectar inmunoglobulinas específicas con alta sensibilidad y especificidad, en estrecha relación con la naturaleza del antígeno empleado. La aplicación de ellos demuestra la posibilidad de diagnosticar la infección por *Brucella* spp., incluso en etapas muy tempranas en los que la serología convencional aún no muestra resultados positivos e incluso nunca se hace positiva.^(19,13,16)

La obtención de resultados dudosos mediante los ELISAs, puede estar ocasionada por la incapacidad del sistema inmune del huésped de expresar su respuesta a la infección. En tanto, otros individuos pueden haber recibido antibioticoterapia en una o más ocasiones, lo que afecta la producción de anticuerpos. Ante esta disyuntiva se hace necesario solicitar otra muestra al paciente y repetir el ensayo.⁽⁸⁾ La no disponibilidad de un sistema ELISA que determine IgA, hizo quizás que no se pudiese identificar este isótopo en las muestras reactivas y positivas por Brucellacapt[®].

Resulta difícil seleccionar una herramienta diagnóstica como prueba de oro para la confirmación serológica en la brucelosis. Esto hace necesario la evaluación integral de los resultados de las pruebas de laboratorio disponible (FAB, Brucellacapt[®], ELISA IgM y ELISA IgG) junto a la clínica y epidemiología del paciente a la hora de establecer un diagnóstico certero.^(17,19)

Por otra parte, las pruebas moleculares para la detección de ADN de *Brucella* spp., se desarrollan desde 1990. En 2015 se evaluó e implementó en el LNRLB una PCR sensible, específica y rápida que permite la detección de la proteína inmunogénica de membrana externa de 31 kDa que está presente en todas las especies de *Brucella* (BCSP 31) (B4B5).⁽²⁰⁾ Esta prueba molecular se emplea en el estudio de casos clínicos seronegativos como herramienta alternativa.

El cultivo y el diagnóstico convencional de *Brucella* requieren de laboratorios con nivel de contención 3. Esta limitante hace que las herramientas serológicas para la detección de anticuerpos específicos sean indispensables para la detección oportuna de la infección y evitar con esto tanto las complicaciones irreversibles como el deterioro de la calidad de vida

de los pacientes afectados. De otra parte, los resultados negativos de estas pruebas no excluyen la infección por *Brucella* spp., lo que demanda de una evaluación clínica y epidemiológica exhaustiva en cada caso.⁽¹⁶⁾

La generalidad de los sistemas serológicos tradicionales comerciales y caseros tienen la limitante de estar constituidos por antígenos genéricos y específicos, presentes en las cepas rugosas de las diferentes especies de brucelas, escapándose en este sentido *B. canis* (cepa lisa). Por ello, para el diagnóstico de esta especie, en particular, existen sistemas serológicos y moleculares.⁽¹¹⁾

La coincidencia entre los resultados obtenidos por el Brucellacapt[®] y los sistemas de referencia ELISA IgM y ELISA IgG, demuestran que el primero constituye una herramienta útil para el diagnóstico de la brucelosis tanto aguda como crónica. Estudios internacionales que incluyen un mayor número de sueros indican resultados aun superiores.^(15,17,19) La incorporación de este sistema al algoritmo de diagnóstico de la brucelosis humana en Cuba, fortalecerá la vigilancia al permitir la detección de casos que cursan por la fase de cronicidad de la enfermedad, la recaída o la reinfección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of *Brucella* species. Rev Sci Tech. 2013;32(1):149-62.
2. Elfaki MG, Alaidan AA, Al-Hokail AA. Host response to Brucella infection: review and future perspective. J Infect Dev Ctries. 2015;9(7):697-701.
3. República Argentina. Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación. Enfermedades infecciosas, Brucelosis. Guía para el equipo de salud No. 12. 2013 [consultado 20 Ene 2015]. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar>
4. Castro HA, González SR, Prat MI. Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioquím Clín Latinoam. 2005;39(2):203-16.
5. García GS, Saborido IM, Ramírez L, Ponce de León I. Primer reporte en Cuba de endocarditis infecciosa a consecuencia de brucelosis. Rev Cubana Med Trop. 2012;64(1):65-8.

6. Obregón AM, Muñoz K, Echevarría E, Rodríguez Y, Rodríguez JE, Valdés Y, et al. Evaluación del sistema serológico Febrile Antigen Brucella para la pesquisa de anticuerpos contra brucelas, en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2015;67(3).
7. DIESSE, Diagnostica Senese SpA. Italia. Febrile Antigen Brucella [consultado 20 Ene 2015]. Disponible en: <http://www.diesse.com>
8. Vircell SL. España. Brucella ELISA IgM, Brucella ELISA IgG y Brucellacapt. [consultado 20 Ene 2015]. Disponible en: <http://www.vircell.com>.
9. Duran-Ferrer M, Mendoza J, Osuna A, Caporale V, Lucas A, León L, et al. Evaluation of a new immunocapture test for the diagnosis of ovine brucellosis caused by *Brucella melitensis*. Vet Rec. 2002;151:629-35.
10. Gómez MC, Nieto JA, Rosa C, Geijo P, Escribano MA. Estudio comparativo del *test* Brucellacapt con el *test* de Coombs para Brucella. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1999;17:283-5.
11. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. Int J Antimicrob Agents. 2010;36 (1):12-7.
12. Orduña A, Almaraz A, Prado A, Gutierrez MP, Garcia-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.
13. Aranís C, Oporto J, Espinoza M, Riedel I, Pérez C, García P. Utilidad de la determinación de anticuerpos IgG e IgM por ELISA e inmunocaptura en una serie clínica de brucelosis humana. Rev Chil Infect. 2008;25(2):116-21.
14. Sánchez LM, Asmat R, Carrillo L, Guillén A, Quispe V. Valor diagnóstico de los anticuerpos incompletos en brucelosis humana. Boletín Soc Per Med Int. 1995;8:20-2.
15. Bosilkovski M, Spasovska K, Sopova Z, Vidinic I. The role of Brucellacapt test for follow-up patients with brucellosis. Comp Immun Microbiol and Infect Dis. 2010;33:435-42.
16. Arabaci F, Oldacay M. Evaluation of serological test for human brucellosis in an endemic area. J Microb Infect Dis. 2012;2(2):50-6.

17. Casanova A, Ariza J, Rubio M, Masuet C, Díaz R. Brucellacapt versus classical test in the serological diagnosis and management of human brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009;16(6):844-51.
18. Mendoza O, Ramírez W, Yera G, Rosales Y, Mora E. La Brucelosis en bovinos de una provincia oriental de Cuba, en el período 2012-2014. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 2015;16 (5):1-11.
19. Peeridogaheh H, Golmohammadi MG, Pourfarzi F. Evaluation of ELISA and Brucellacapt tests for diagnosis of human Brucellosis. *Iran J Microbiol*. 2013;5(1):14-8.
20. Thakura S, Bedia JS, Singha R, Gillb JP, Arorac AK, Kashyapda N. Quantitative polymerase chain reaction based quantification of Brucella DNA in serum of pre- and post-therapeutic occupationally exposed infected human population. *Journal of Infection and Public Health*. 2018;11:514-20.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses.