



Pruebas diagnósticas indirectas: pruebas serológicas.

Antígenos de *Brucella*

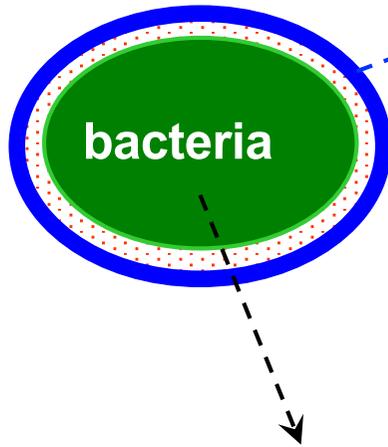
- Tipos y relevancia diagnóstica.
- Criterios en estandarización: el problema S-R y el de la heterogeneidad de cepas y su conservación.
- Sueros de referencia.

Estandarización y validación

Antígenos de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*

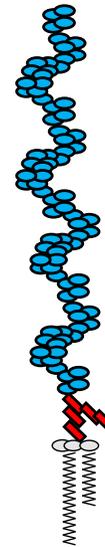


Lisas (“smooth” o S)



Variedad de proteínas
(citósólicas; “solubles”)

Antígeno principal
de superficie: S-LPS



Cadena O
(O-PS)

“Core”
lipido A

Epitopos

A, M and Cb
• Irrelevantes

C (y)

Relevantes

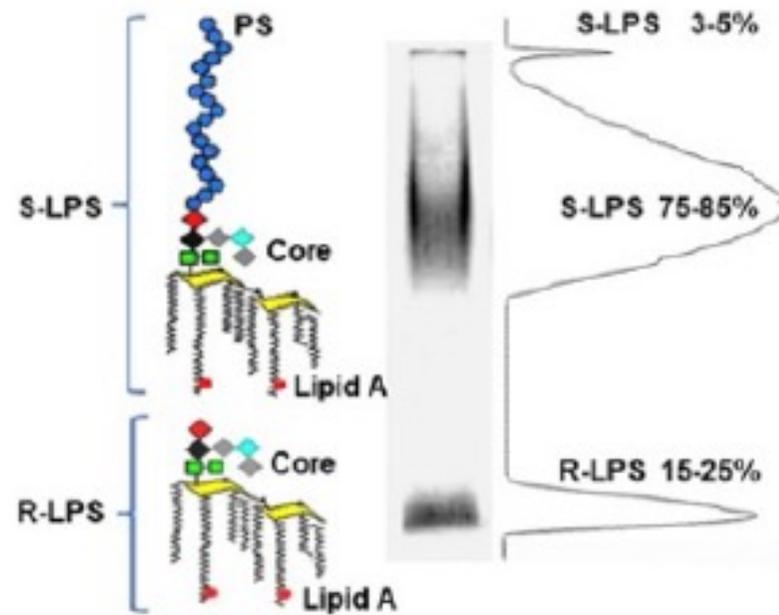
Compartidos

- Irrelevantes (¿RB51?).
- No accesibles en bacterias enteras.

Antígenos de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*



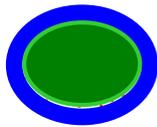
LPS: heterogeneidad intrínseca al sistema de biosíntesis



Especificidades de los anticuerpos según pruebas

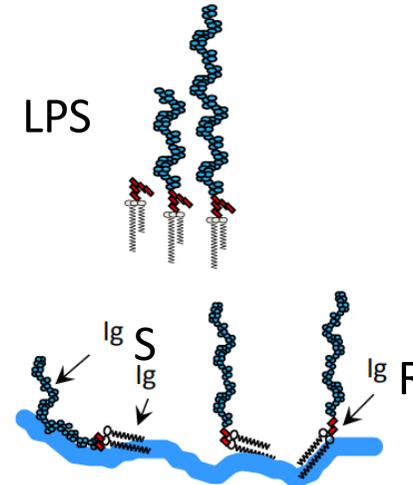


- Ag Febril, Huddleson
- SAT, SAT-2ME
- Coombs
- RBT, BPAT, Brucellacapt



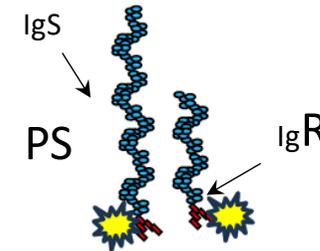
Anticuerpos de especificidad S

- iELISA, cELISA
- LFiC

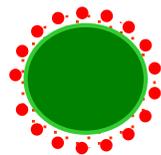


Anticuerpos de especificidad S y R

- FPA



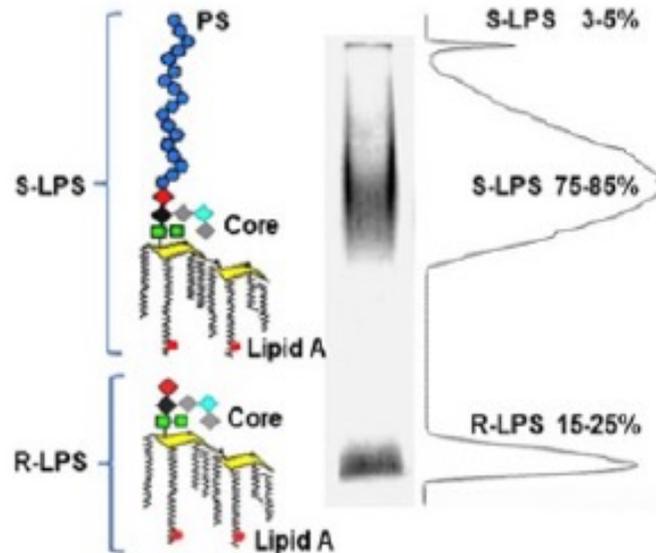
Un problema común: disociación S-R (pérdida del O-PS por mutación)



Mutantes rugosos (R)
(vacuna RB51 incluida)

- Auto-aglutinan (y activan el complemento) → falsos positivos.
- Carecen de epitopos A, M, Cb y C(y) relevantes.
- Aumentan la exposición y proporción de epítomos R

LPS: otras causas de heterogeneidad



Las proporciones dependen de:

1. Método de cultivo (¡O₂! Nutrientes).
2. Cepa (OIE: 16M, 1119 y ***).
3. Mantenimiento de la cepa (liofilización, congelación, nº de pases in vitro: estrategia “master seed/seed lot”).
4. Método de extracción del LPS.

En brucelosis es crítica la estandarización/control de:

- los métodos de producción de antígenos (y vacunas) (**1+2+3+4**).
- el contenido de epítopos O-PS de cada preparación de suspensiones de bacterias enteras, extractos de S-LPS o PS.

El único procedimiento para medir el contenido de epítopos O-PS es emplear un suero de referencia.

Wallach, J. 1995. Serodiagnóstico de la brucelosis humana por aglutinación directa: problemas de interpretación causados por discrepancias entre resultados obtenidos con diferentes antígenos comerciales. Acta Bioquim Clin Latinoam. 147-157.

Estandarización: control de todos los componentes de una prueba analítica que la hacen repetible (en uno o diferentes laboratorios).

Un aspecto técnico que requiere el uso de uno (o pocos) sueros patrón.

Joint-FAO/WHO-Expert-Committee-on-Brucellosis., 1953, Second report. Florence 13-18 October 1952. World Health Organization.

- El comité de expertos del OMS recomienda el uso del **suero patrón internacional de la OIE** - hoy en día **OIEISS** – para estandarizar la SAT.
- Este suero no es para uso rutinario como control positivo, sólo para estandarizar el antígeno anualmente en cada país.
- Para uso rutinario, hay que establecer un suero patrón nacional.

Validación: el proceso de determinar la sensibilidad y especificidad diagnósticas de una prueba estandarizada (i.e., su valor diagnóstico).

- Requiere colecciones de sueros control bien definidos representativos de las poblaciones positiva y negativa del área/situación donde se aplica la prueba.
- Óptimamente, llevada a cabo por un laboratorio de referencia.

Verificación: distintos lotes de un mismo test (ej. un kit) deben mantener la sensibilidad y especificidad diagnósticas.

- Requiere colecciones de sueros control bien definidos representativos de las poblaciones positiva y negativa del área/situación donde se aplica la prueba.
- Óptimamente, llevada a cabo por un laboratorio de referencia.

Ruiz-Mesa, et al. 2005. Rose Bengal test: *diagnostic yield* and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments *in endemic areas*. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 221-225. 10.1111/j.1469-0691.2004.01063.x.

Table 2. Results obtained with the rose Bengal test for different groups of patients with and without brucellosis

	Rose Bengal-positive <i>n</i> (%)
Patients with brucellosis	
Group I (<i>n</i> = 307)	288 (93.8)
Group II (<i>n</i> = 339)	311 (91.7)
Group III (<i>n</i> = 51)	49 (96.1)
Patients without brucellosis	
Group A (<i>n</i> = 176)	10 (0.6)
Group B (<i>n</i> = 68)	6 (8.8)
Group C (<i>n</i> = 26)	6 (23.1)

Group I, patients with no previous history of brucellosis or exposure to *Brucella* spp.; group II, patients exposed repeatedly to *Brucella*; group III, patients with a previous history of brucellosis; group A, patients with different infectious, autoimmune or neoplastic diseases; group B, asymptomatic individuals with occupational exposure to *Brucella* infection; group C, asymptomatic patients with a history of brucellosis.

Abo-Shehada, et al. 1996. *Seroprevalence of brucellosis among high risk people in Northern Jordan. Int J Epidemiol.* 25, 450-454. 10.1093/ije/25.2.450.

... sera was separated from clotted blood by centrifugation and stored at -20°C until tested for the presence of *Brucella* antibodies using **RBPT** (bioMerieux, France).

Samples seropositive with RBPT were **confirmed** by the ELISA method according to Magee to determine *Brucella*-IgG antibodies at a dilution of 1:100.

An absorbance of $5=0.35$ was considered positive. **The cutoff value was determined by the mean absorbance value of four standard negative sera (+3SD).**