



PANAFTOSA
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
y Salud Pública Veterinaria



Agencia de Regulación y
Control Fito y Zoonosanitario



Ministerio de Salud Pública



Universidad
de Navarra

Seminario web “Abordaje Integral de la Brucelosis en el marco de Una Salud”

Brucelosis humana: fundamentos y práctica del diagnóstico

Ignacio Moriyón

imoriyon@unav.es

Depto. Microbiología y Parasitología

Facultad de Medicina

Universidad de Navarra

ANAMNESIS CORRECTA

- **Esencial:** sin sospecha, no hay diagnóstico.

CUADRO CLÍNICO

- **No patognomónico** y variable, 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 ciertas incertidumbres por algunas reacciones cruzadas en pruebas serológicas).
- **Las pruebas de laboratorio son esenciales.**
 - Directas (cultivo)
 - Indirectas (Serológicas y PCRs).

Periodo de incubación: Implicaciones para la “sospecha” (anamnesis correcta)



Periodo de incubación muy variable

Case No.	Interval between Exposure and Onset of Symptoms *
33	1 week
76	2 months
27	2 months
106	2 months
91	3 months
48	4 months
51	4 months
22	4 months
28	4 months
103	5 months
89	7 months

Spink, W.W., 1956. The natural course of brucellosis, in: The Nature of Brucellosis. pp. 145–170.

1. La **sospecha** de contagio debe **extenderse hasta muy atrás** en el tiempo.
2. Esta variabilidad debe tenerse en cuenta en todo **evento “grupal”**.
3. El **perfil de inmunoglobulinas es muy variable** en el momento del diagnóstico (→ interpretación de las pruebas serológicas).
4. Esta variabilidad contribuye a que el **cuadro clínico** (fiebre, formas focales, complicaciones, etc.) sea **poco homogéneo**.

Duración de la enfermedad antes del tratamiento: implicaciones



Nº de pacientes	Días	
	Media \pm SD	Intervalo
530 ^a	44 \pm 77	≤ 14 - ≥ 90
73 ^b	33 \pm 33	n.d.
358 ^c	53 \pm 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 Tratamiento en Material Suplementario).
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).

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.)

“Sospecha” y otros datos clínicos



Table 3 Localized disease in 418 patients with brucellosis, according to occupational exposure

Parameter	Occupational exposure (N = 251) ^a	Non-occupational exposure (N = 167) ^b
→ Osteoarticular	142 (56.6)	93 (55.7)
Hematologic	14 (5.6)	15 (9.0)
Urogenital	20 (8.0)	9 (5.4)
Respiratory system	9 (3.6)	16 (9.6)
Nervous system	7 (2.8)	8 (4.8)
Hepatic	4 (1.6)	8 (4.8)
Cardiovascular system	6 (2.4)	3 (1.8)
Cutaneous	4 (1.6)	3 (1.8)

Data are *n* (%).

^a Thirty-seven patients with two or more concomitant localized forms.

^b Thirty-three patients with two or more concomitant localized forms.



Cultivo

BSL2 con normas estrictas e información al personal del laboratorio de la sospecha.

Específico (concluyente si positivo): hacer **siempre** que sea posible. Óptimamente, **guiado por una serología** (RBT) previa/simultánea.

Muestra:

- **sangre: muestra de elección** (facilidad, volumen, repetibilidad)
- Médula: sensibilidad controvertida; difícil; no repetible; necesita evidencia previa.
- Líquido cefalorraquídeo: si hay sospecha de neurobrucelosis.
- Abscesos, biopsias, etc.

¡Atención al protocolo!

Sospechas de infección por vacunas

- Rev 1 y S19. Conveniente.
- RB51 Estrictamente necesario (¡no hay serología positiva!).

Hemocultivo: puntos críticos del protocolo



- Muestra en **fase pirética**.
- **Sin antibioterapia previa**.
- **10 mL** sangre (asépticamente) por cultivo (menor en niños).
- **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.
- Positivo en un 60% de las recaídas.

Identificación de colonias aisladas



Presuntiva

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

Confirmación

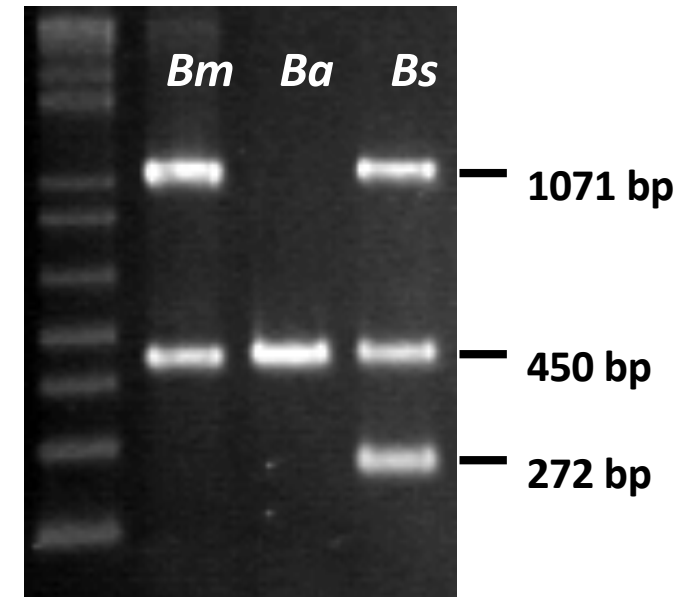
- Bruceladder (o semejante).
- Laboratorio de referencia.

Vacunas

PCR específica y/o:

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

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



Multiplex PCR with 3 pairs of primers:

BMEI0998f/0997r
BMEII0843f/0844r
BMEII0428f/0428r
BMEI0752f/0752r

BMEI0535f/0536r
BMEI1436f/1435r
BR0953f/0953r
BMEII0987f/0987rv

1. **Confusión** con *Ochrobactrum* en (al menos) sistemas **VITEK 2 y MALDI-TOFF**
2. Inclusion de *Ochrobactrum* en el género *Brucella*

Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria.

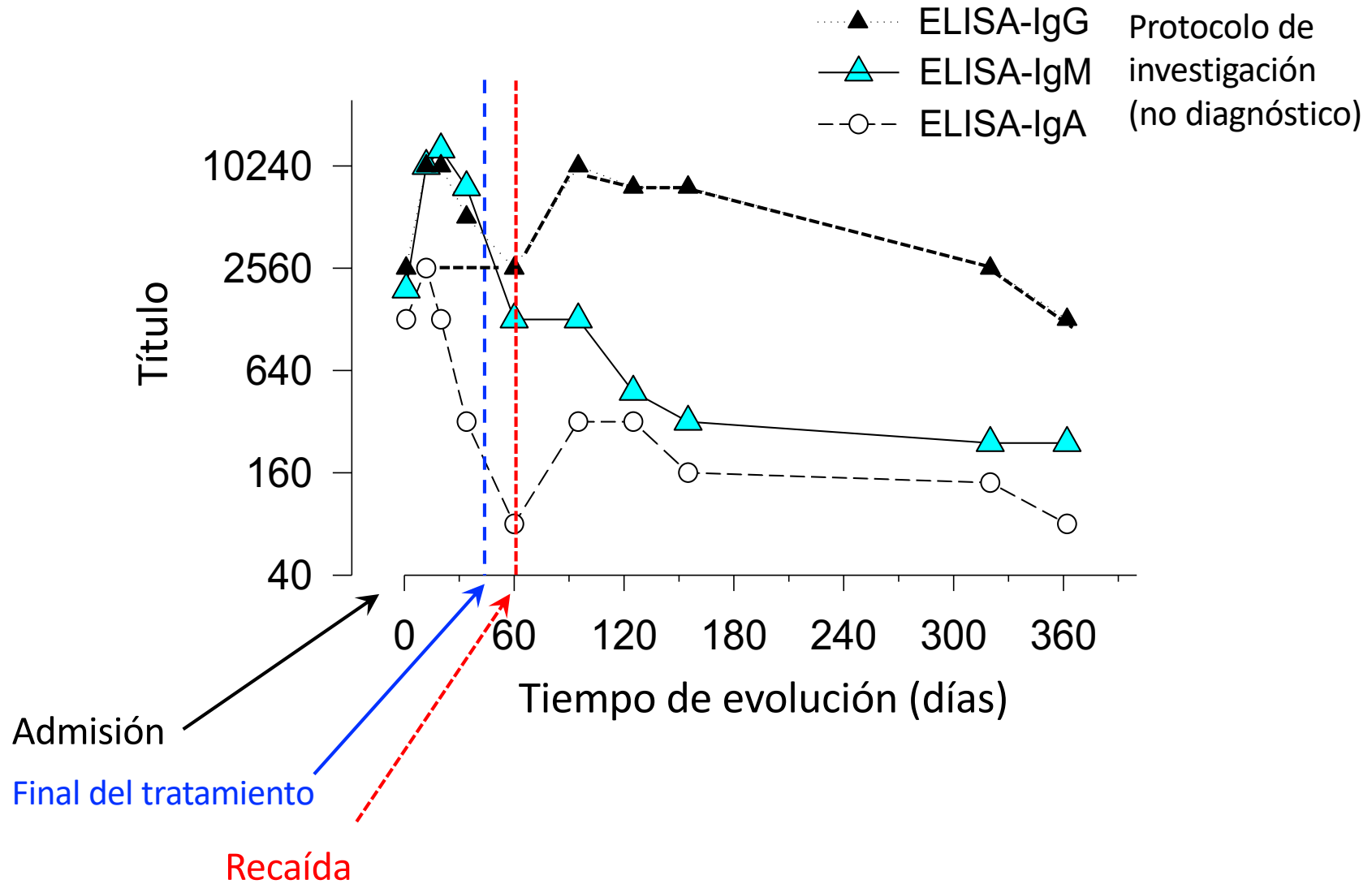
Hördt A, López MG, Meier-Kolthoff JP et al. Front Microbiol. 2020;11:468. doi:10.3389/fmicb.2020.00468.

If you're not confused, you're not paying attention: Ochrobactrum is not Brucella:

Moreno, E., E. A. Middlebrook, P. Altamirano-Silva, D. S. Al, G. F. Araj, V. Arce-Gorvel, Á. Arenas-Gamboa, J. Ariza, E. Barquero-Calvo, G. Battelli, W. J. Bertu, J. M. Blasco, M. Bosilkovski, S. Cadmus, C. C. Caswell, J. Celli, C. Chacón-Díaz, E. Chaves-Olarte, D. J. Comerc, R. Conde-Álvarez, E. Cook, S. Cravero, M. Dadar, X. De Boelle, F. De Massis, R. Díaz, G. I. Escobar, L. Fernández-Lago, T. A. Ficht, J. T. Foster, B. Garin-Bastuji, J. Godfroid, J.-P. Gorvel, L. Güler, S. Erdenlig-Gürbilek, A. M. Gusi, C. Guzmán-Verri, J. Hai, G. Hernández-Mora, M. Iriarte, N. R. Jacob, A. Keriell, M. Khames, S. Köhler, J.-J. Letesson, M. Loperena-Barber, I. López-Goñi, J. McGiven, F. Melzer, R. Mora-Cartin, J. Moran-Gilad, P. M. Muñoz, H. Neubauer, D. O'Callaghan, R. Ocholi, Á. Oñate, P. Pandey, G. Pappas, J. T. Pembroke, M. Roop, N. Ruiz-Villalón, M. P. Ryan, M. Salvador-Bescós, F. J. Sangari, R. de Lima Santos, A. Seimenis, G. Splitter, M. Suárez-Esquivel, D. Tabbaa, M. D. Trangoni, R. M. Tsoilis, N. Vizcaíno, G. Wareth, S. C. Welburn, A. Whatmore, A. Zúñiga-Ripa, and I. Moriyón, 2023, J. Clin. Microbiol., v. Jul 3;e0043823. doi: 10.1128/jcm.00438-23, p. e00438-23.

Diagnóstico serológico: perfil de anticuerpos

Paciente con corto tiempo de incubación y enfermedad con recaída



Antígeno febril



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

de Glanville, W. A., et al. 2017. Poor performance of the rapid test for human brucellosis in health facilities in Kenya. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1-15. 10.1371/journal.pntd.0005508

Table 2. Comparison of FBAT, RBT, SAT Coombs IgG and LFA in the 825 sera.

FBAT	Nº positive sera				
	RBT	SAT	Coombs IgG ^a	LFA IgM	LFA IgG
Positive: 162	8	1 ^b	2	2 ^c	0 ^c
Negative: 663	0	0	0	n.d. ^d	n.d. ^d
Total: 825		1	3	5	0

a. A titre > 2 times the SAT titre was considered as positive.

b. This serum developed an atypical agglutination and only at a 1:80–1:160 titre.

c. Out of 148 positives tested.

d. n.d., not done.

Poor or no correlation was observed between FBAT results and most established risk factors for Brucella infection.

Huddleson



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

Lucero, N. E., Bolpe, J. E. 1998. Buffered plate antigen test as a screening test for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, 1425-1427. 10.1128/JCM.36.5.1425-1427.1998.

Serum source (no.)	BPA (Buffered plate antigen)		PAT (Huddleson)			
	Negative	Positive	Negative	Positive at endpoint titer of:		
				1:25	1:50	≥1:100
Culture-positive patients (57) ^a	0	57	0	1	6	50
Suspected-brucellosis patients (142) ^b	0	142	0	1	20	121
Asymptomatic population (307) ^c	306	1	292	14	1	0

- Of the total of 57 positive isolates, 29 were *B. suis*, 15 were *B. abortus*, 6 were *B. melitensis*, and seven *Brucella* strains were not typed to the species level
- Patients with clinical evidence of brucellosis and positive by RB and CF.
- Asymptomatic population negative by RB and CF.

Lucero, N. E., Bolpe, J. E. 1998. Buffered plate antigen test as a screening test for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, 1425-1427. 10.1128/JCM.36.5.1425-1427.1998.

¡Protocolo!

1. 80, 40, 20, and 10 μ l of serum placed on 4-cm squares on a glass plate.
2. Then, 30 μ l of antigen was dropped onto each square and mixed and spread over 2 cm² or 3 cm² for the 80- μ l sample.
3. The plate was rotated to ensure mixing, allowed to stand for 4 min, rotated again and incubated 4 more minutes in a covered black box that has an oblique light onto the serum-antigen mixture.
4. The plate is tilted to allow the mixture to flow aside for the reading.

¡Falta de estandarización y poca repetibilidad!

Ruiz Castañeda (Ruiz-Castañeda M. *Brucelosis*. México, D.F., México: La Prensa Médica Mexicana S.A.; 1986).

Baldi, P. C., Wallach, J., Fossati, C. A. 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*. XXIX, 147-157.

Brucelosis: peculiaridades de la aglutinación

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

PERO:

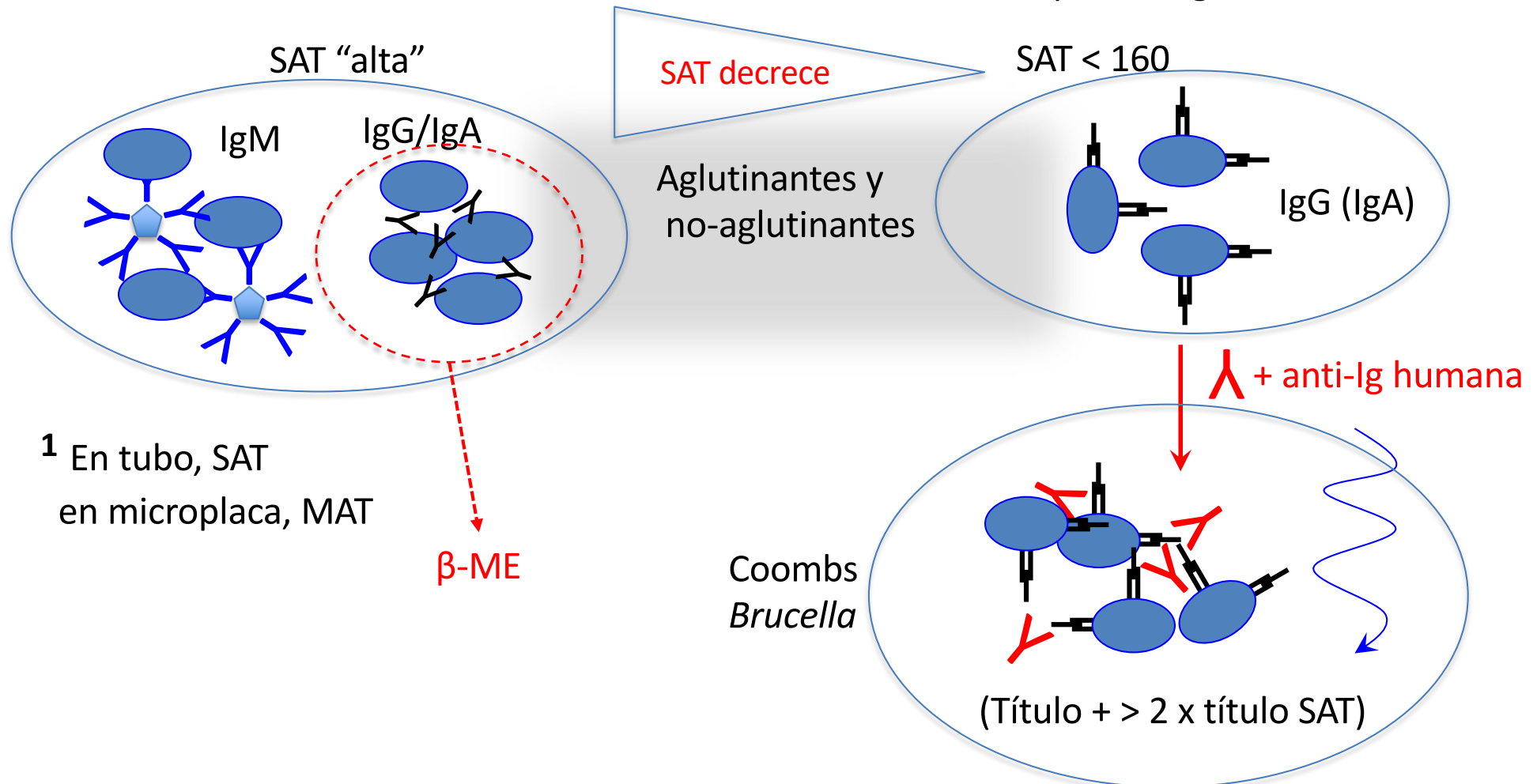
corta evolución

estadios "intermedios"

larga evolución

anticuerpos aglutinantes

anticuerpos no-aglutinantes



Seroaglutinación en tubo (o microplaca)



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

Foz, A., Arcalís, L. **1952**. Die *Komplementbindungs-Reaktion* in der Diagnose der menschlichen Brucellose. *Med. Microbiol. Immunol.* 136, 55-66

Títulos de seroaglutinación en tubo en 117 pacientes con brucelosis confirmada, todos positivos en la fijación de complemento (test IgG).

Tiempo de evolución (meses)	Nº	Nº (%) con un título:			
		≤ 1:40	<1:80	<1:160	≥ 1:160
Menos de 6	78	3 (3.8)	6 (7.6)	7 (8.9)	71 (91)
Más de 6	39	4 (10.2)	13 (33.3)	15 (38.4)	24 (61.6)
Total	117	7 (5.9)	10 (8.5)	22 (18.8)	85 (72.6)



Seroaglutinación en tubo (o microplaca)

Si existe sospecha (anamnesis y/o el cuadro clínico).

- **SAT \geq 1:160** es significativo; si es **más alto puede ser una indicación suficiente** que suele coincidir con una corta evolución.
- **Títulos de SAT límite o bajos**, procede realizar pruebas complementarias, incluida, pero no sólo, una repetición de la SAT pasados unos días por si hubiera seroconversión.
- Usada así, la SAT (o MAT) es una **prueba de cribado positivo muy valiosa y sencilla.**



La prueba de Coombs en brucelosis

Kerr, W. R., Coghlan, J. D., Payne, D. J., Robertson, L. 1966. *The laboratory diagnosis of chronic brucellosis.* Lancet. 2, 1181-1183

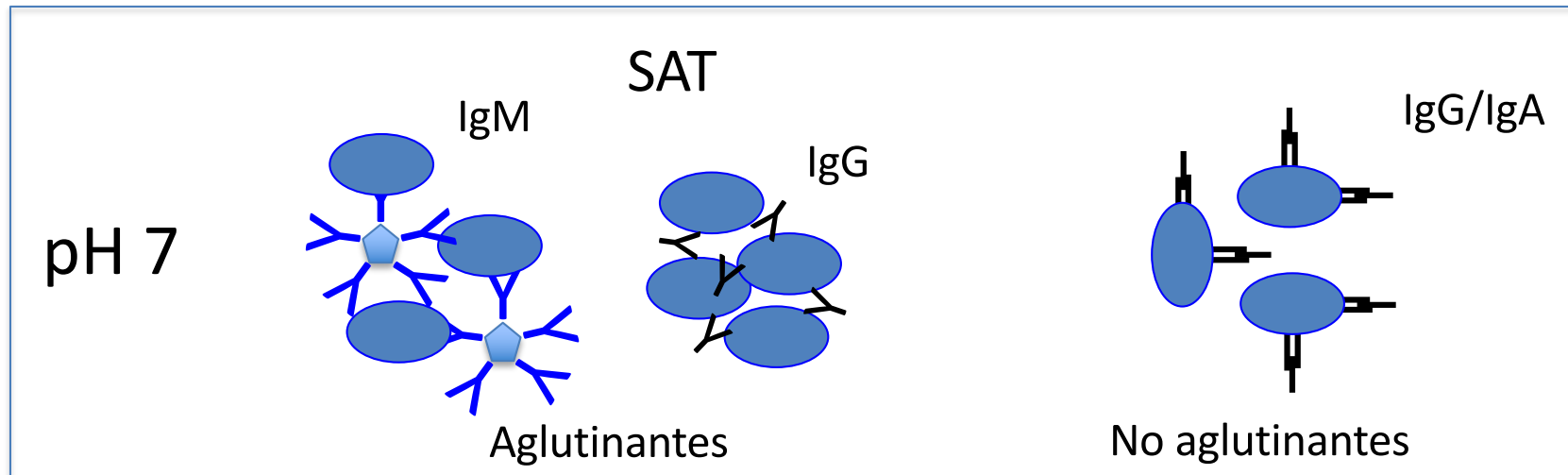
Tabla. SAT y Coombs en 16 pacientes con brucelosis de más de 6 meses de evolución ¹

SAT		Nº / título en Coombs ‡					Nº positivos
Título	Nº	80	160	320	640	≥ 1280	
≤ 20	11	2		2	2	5	11
40	2			1		1	2
80	2			1			1 *
160	2					1	1

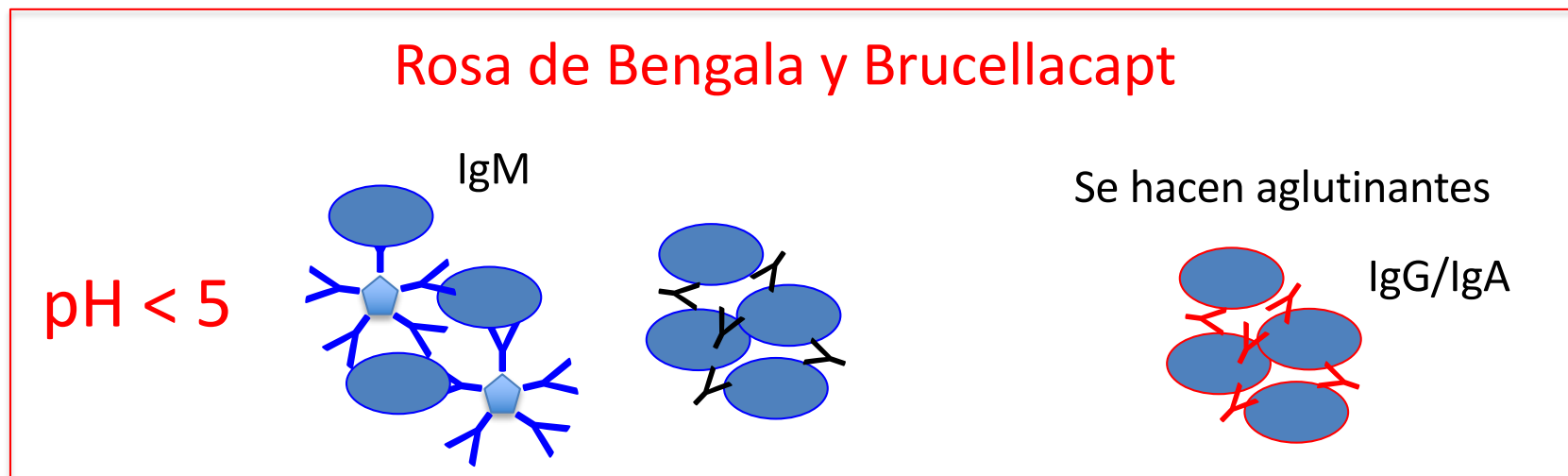
1. Brucelosis "crónica" en Kerr et al.; Spink la definía como de ≥ 6 meses de evolución
‡ "anti gamma globulin test (A.G.H.) en el artículo.

* no se hizo Coombs en un paciente de este grupo.

Cómo detectar IgG/IgA no aglutinantes



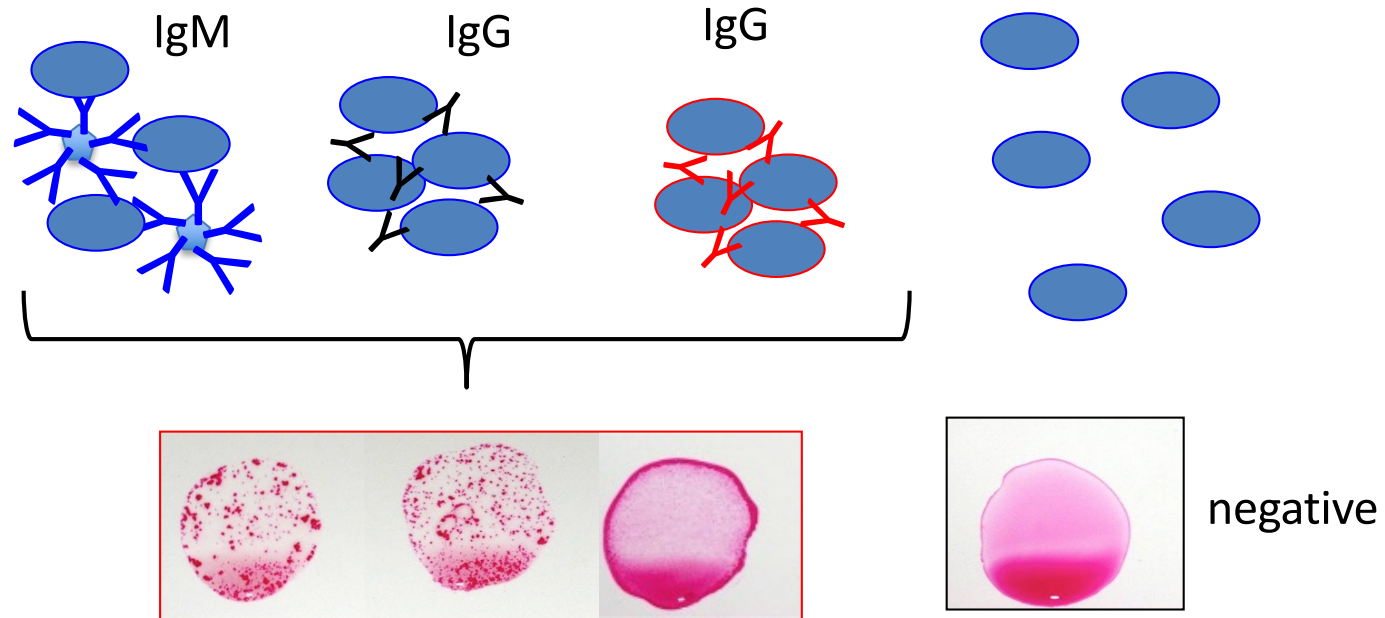
Rosa de Bengala y Brucellacapt



El Rosa de Bengala en brucelosis humana



pH 3.7

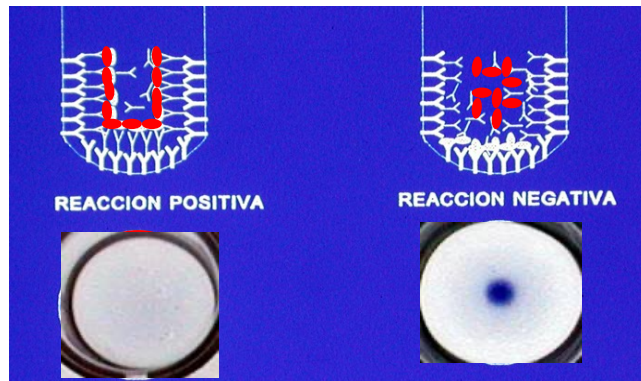


La “intensidad” (tamaño grumos) no guarda una relación unívoca con la cantidad de anticuerpos

Brucellacapt



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



Positivo

Negativo

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

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

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

Pero....

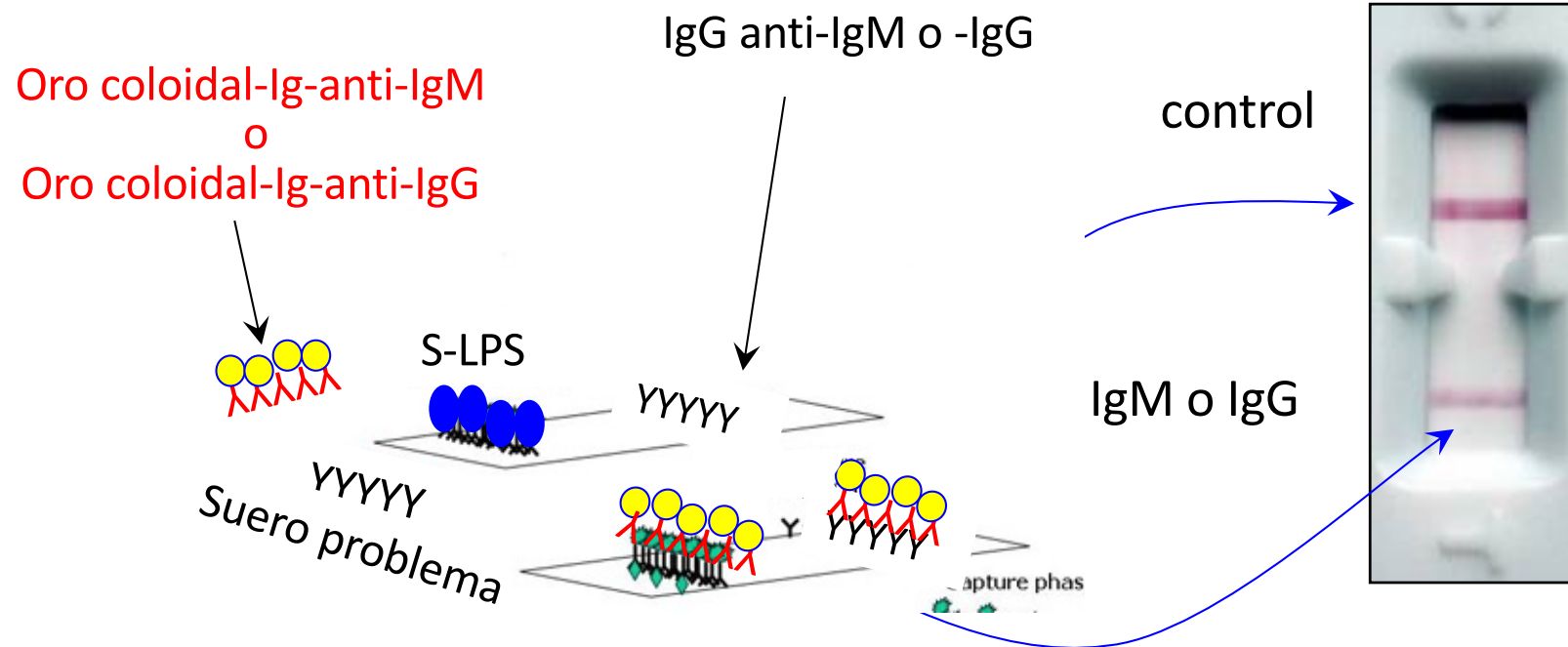
¡También funciona en placas sin anti-IgG!
(Casanova et al. *Clin. Vaccine Immunol.* **2009**, 16, 844.)

Brucelosis de corta (“aguda”) y larga (“crónica” [?]) evolución

	Enfermos (n 82)	Sanos (n 412)
SAT \geq 1:160	54	0
Brucellacapt \geq 1:160	78	1

Adaptado de Orduña-Domingo A, Almaraz A, Prado A et al. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol. 2000;38:4000-4005.

LFiC (o LFC; Inmunochromatografía de flujo lateral)



- Estandarización necesaria.*
 - ¿% de disociación S-R?
 - Heterogeneidad del O-PS.
 - Anticuerpo conjugado (**oro coloidal anti-Ig**)
- Igs: semi-cuantitativa para IgM o IgG, pero estas compiten entre sí.
- Posibles falsos IgM-positivos por presencia del factor reumatoide en el suero.
- Detecta anticuerpos anti-cadena O y **anti-LPS-R** (ej. anti-RB51), los segundos con eficiencia desconocida (se estandariza con anticuerpos anti-cadena O)..

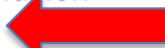
* Más parámetros para estandarizar que en RBT, SAT o BPAT

Smits HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Díaz R (2003) Immunochromatographic Brucella -specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clin Diag Lab Immunol* 10: 1141-114

Human brucellosis. Sensitivity and specificity of IgM and IgG flow assays for initial serum samples from patients with confirmed brucellosis and comparison with SAT and Coombs.¹

Assay	% Sensitivity ²	% Specificity ³
SAT >1:160	88	n.d.
Coombs >1:320	100	n.d.
IgM flow ⁴	67	98.9
IgG flow ⁴	71	99.2
IgM + IgG flow ⁴	96	98.9

¹ Adapted from Smits HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Díaz R. 2003. *Clin Diag Lab Immunol* 10: 1141-1146.

² Sera from 89 patients with brucellosis confirmed by culture (n 73) and/or by a radial immunodiffusion test with native hapten (n 49) which is highly specific for brucellosis. **All were RBT positive.** 

³ A total of 276 sera from patients with fever from an area of non-endemicity (79) or with illnesses other than brucellosis (197). **All were RBT negative.**

⁴ KIT Biomedical Research, Royal Tropical Institute (Amsterdam, The Netherlands).

Con los resultados conjuntos de IgM e IgG, esta prueba tiene DSe-DSp semejantes o ligeramente inferiores al RBT o a la combinación SAT-Coombs.

Human brucellosis: results of cELISA and other tests in 51 sera from culture-positive patients^{1, 2, 3}

No. sera	Test			
	cELISA ⁴	SAT ⁵	RBT	BPAT
1	77	6400	+	+
4	73-79	3200	+	+
9	39-89	1600	+	+
1	86	800	+	+
15	54-88	400	+	+
9	32-84	200	+	+
9	35-77	100	+	+
2	43-50	50	+	+
1	84	25	+	+

¹ Modified from Table 3 in Lucero et al. 1999. J Clin Microbiol. 37:3245-3248.

² 25 *B. abortus* (25, including 1 S19 isolate), 19, *B. suis* (19), 6 *B. melitensis* (6) and *Brucella* spp. (1).

³ cELISA, competitive ELISA; SAT, serum agglutination, RBT, rose bengal test; BPAT, buffered plate agglutination test.

⁴ Data are % inhibition (cut-off 28% adjusted by ROC analysis; Se, 98.3%; Sp, 96.5%.

⁵ Reciprocal of titer.

Realmente, demuestra que el CELISA no mejora la DSe del RBT y BPSAT en estos pacientes, incluidos los SAT < 200.



FPA (ensayo de polarización de fluorescencia)

Human brucellosis: results of FPA in comparison with other tests in the “suspected” group (84 sera from patients with compatible clinical symptoms).¹

Test ²	Nº positive (%)
FPA	80 (95.2)
BPAT	84 (100)
cELISA	84 (100)
RBT	84 (100)
SAT > 1:25	84 (100)

¹ Data are from Lucero et al. 2003. J Med Microbiol. 52:883-887.

² BPAT, buffered plate agglutination test, cELISA, competitive ELISA, RBT, rose bengal test, SAT, serum agglutination test.

All sera positive in other tests; the study confirms that FPA is inferior to other tests in DSe despite use of Youden index

Diagnóstico serológico: ejemplo



Brucelosis de corta evolución (“aguda”) (n=25) y donantes sanos (n=90)

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

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

^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

* ver Material Suplementario

Pruebas basadas en la aglutinación: RBT (o BPAT), SAT, Brucellacapt

- Sencillas, poco equipo, fáciles de estandarizar.
- Una selección juiciosa permite una excelente sensibilidad y especificidad.
- La proporción aglutinantes/no aglutinantes es indicativa del tiempo de evolución y puede ayudar al clínico.

Pruebas que miden directamente los anticuerpos: FPA cELISA, iELISAs y LFiC

- Estandarización compleja.
- Sólo el LFiC es equivalente a SAT, RBT (o BPAT) en simplicidad técnica, costo, mínima infraestructura y no equipo auxiliar (lectores, etc.).
- Sólo los iELISAs y el LFiC diferencian IgM e IgG para ayudar al clínico.
- FPA, cELISA e iELISAs necesitan validación fina y son susceptibles de desviaciones importantes en DSe/DSp
- Los “kits” de iELISA varían en componentes: por ello necesitan validaciones independientes.
- En iELISA-IgM y LFiC-IgM hay falsos positivos (factor reumatoide y otros no determinados).
- Todos los estudios demuestran que no son mejores (y que pueden ser peores) que una adecuada elección de pruebas basadas en la aglutinación.

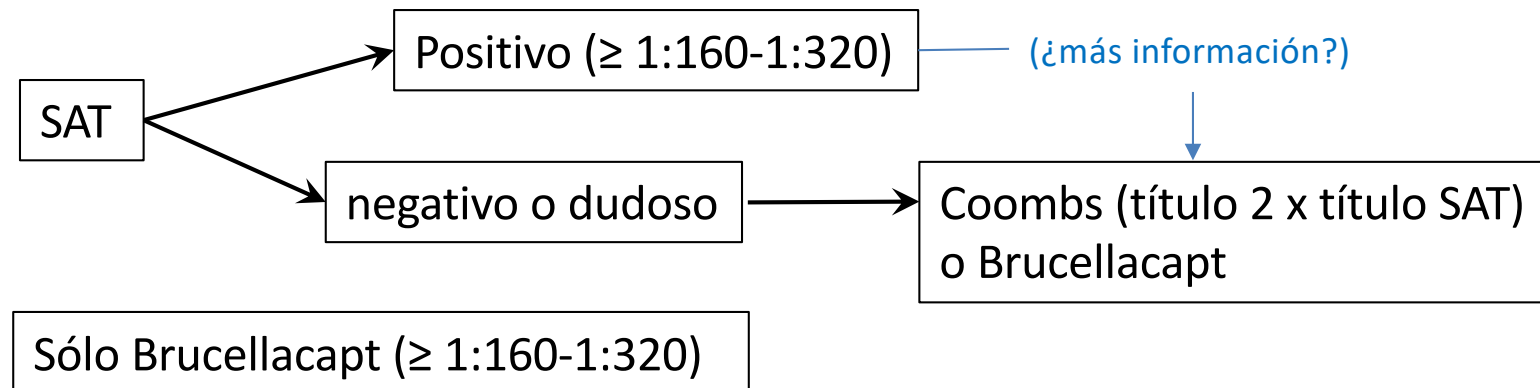
Conclusión y ejemplos



Bosilkovski, M., Krteva, L., Dimzova, M., Vidinic, I., Sopova, Z., Spasovska, K. 2010b. Human brucellosis in Macedonia - 10 years of clinical experience in endemic region. *Croatian Med. J.* 51, 327-336.

(550 casos)

- The serum agglutination test is an important diagnostic tool...
- The combination of the serum agglutination test and Coombs [...] may help to overcome the [...] false-negative results.
- [...] the Brucellacapt test has started to replace other serological tests.
- [...] at the time of admission [...] generally showed high anti-*Brucella* antibody titers, especially in the Coombs test and Brucellacapt.



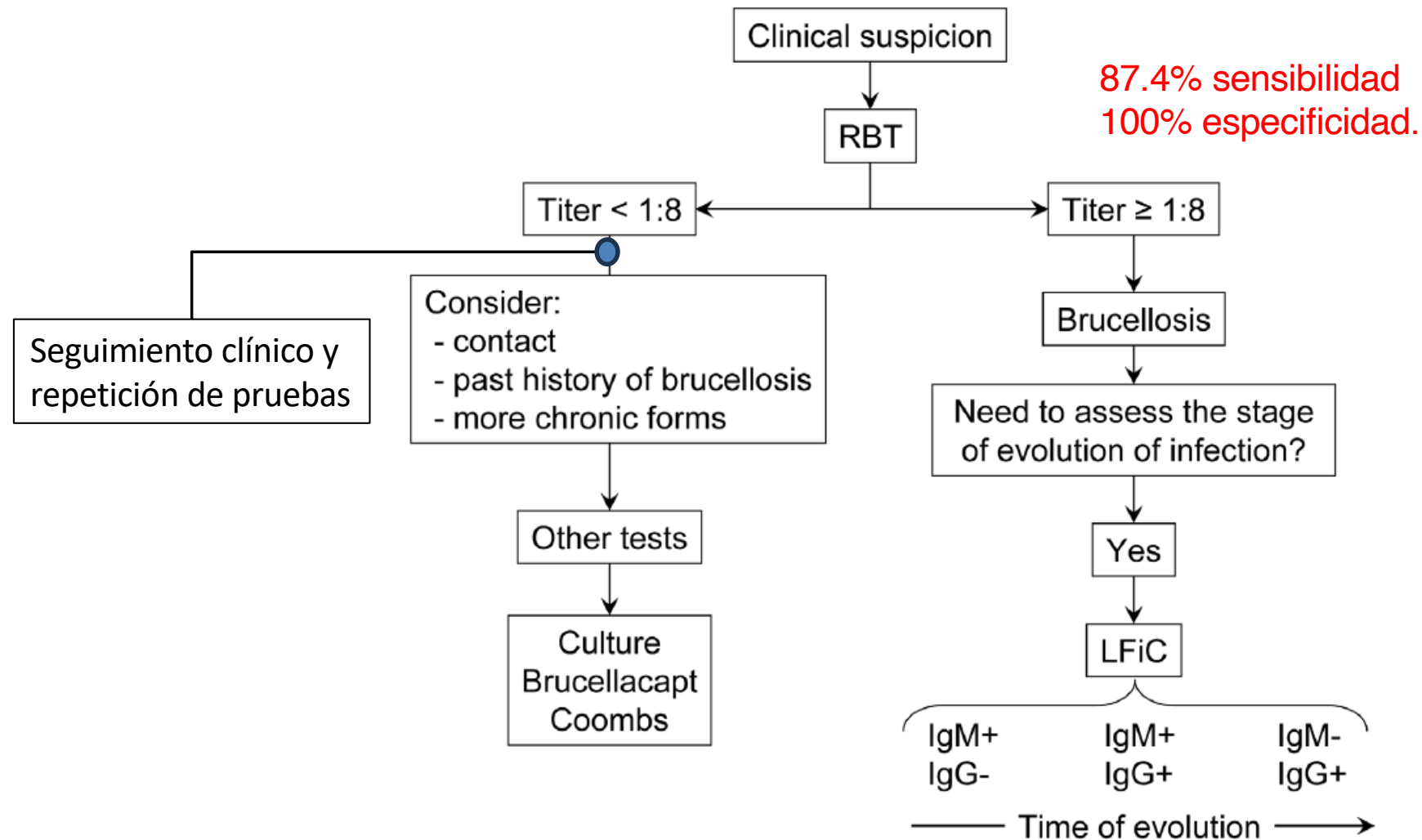
- In the case of inconclusive results but a high clinical suspicion of brucellosis, the patients were retested after 2-4 weeks to assess possible seroconversión.



Conclusión y ejemplos

Díaz, R., Casanova, A., Ariza, J., Moriyón, I. 2011. The rose bengal test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e950. 10.1371/journal.pntd.0000950.

208 cultivos positivos; 20 contactos sanos (sin clínica); 1559 sin contacto o historia de brucelosis



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

- Hay confusión de conceptos
 - Son pruebas indirectas (DNA no equivale a bacterias viables).
 - Sensibilidad y especificidad analíticas no equivalen a diagnósticas
- Variedad de protocolos: muestra, extracción, cebadores ("primers"), condiciones de amplificación, etc.
- No hay evidencia de que mejoren la sensibilidad de las pruebas serológicas bien empleadas.
- Problemas de especificidad pre- y post-tratamiento.
- Actualmente, **quizás** podrían recomendarse para casos muy específicos (abscesos hepatoesplénicos).

In-house conventional PCR



Results of conventional PCR, 1 culture, SAT and Coombs in groups of patients with confirmed brucellosis, with history of brucellosis or contact with *Brucella*, and patients with other febrile pathologies

Test	Confirmed brucellosis				Negative controls ²		
	No. Positive / Total N° investigated				Healthy	Brucellosis in previous year and contacts	Other pathologies
	Primary Infection ²	Cured ³	Relapses ^{3,4}	Complications ⁵			
PCR	47 / 47	1 / 29	2 / 2	33 / 34	0 / 20	1 / 15	0 / 15
Culture	35 / 47	0 / 1	1 / 2	10 / 34	n.a. ⁶	n.a. ⁶	n.a. ⁶
SAT \geq 1/160 / Coombs \geq 320	39 / 47	n.d. ⁷	2 / 2 ⁸	23 / 34 ⁹	0 / 20	15 / 15 ¹⁰	0 /

¹ *Brucella omp31* primers; DNA obtained directly from blood or, for tissues in some complications, from saccharose-Triton X-100 lysates by a proteinase K-SDS-ammonium acetate-ethanol protocol.

² Data from Queipo-Ortuño, et al. 1997. J. Clin. Microbiol. 35:2927–2930.

³ Data from Morata et al. 1999. J. Clin. Microbiol. 37:4163–4166. The study included 30 confirmed cases (22 culture positive [21 blood; 1 synovial fluid]), all serologically positive) of which 29 were PCR positive. Relapses SAT/Coombs titers 320-640 / 1280-5120

⁴ Culture and PCR in focal samples.

⁵ Data from Morata, et al 2001. J. Clin. Microbiol. 39:3743–3746.

⁶ n.a., not applicable.

⁷ n.d., no data.

⁸ Relapses had SAT/Coombs titers 320-640 / 1280-5120.

⁹ The RBT was positive in 30 / 33.

¹⁰ Described as having high and persistent titers but without values and tests.

- More sensitive than culture.
- Incomplete comparisons with an appropriate combination of serological tests.

Yagupsky, P., P. Morata, and J. D. Colmenero. **2019**. Laboratory diagnosis of human brucellosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 33: e00073-19.

Conclusions of the authors:

All the commercial kits currently available:

- *inactivate Brucella even at at the high concentration tested (10^6 CFU/ml).*
- *most recover brucellar DNA efficiently from clinical specimens,^{*} although depending on the study sample, there may be significant differences.*

Given the wide variety of clinical settings that can occur in human brucellosis and the potentially wide range of specimen types, further studies are needed to define the most efficient extraction protocols for each of them.

** Actually, only tested in spiked sera and spiked PBS*

Summary of RT-PCR studies (Yagupski et al. 2019 review)



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

RT-PCR and Q-RT-PCR studies in human brucellosis. ¹

Reference ²	Method	Specimen ³	No. positive /controls	No. (%) culture-confirmed cases	DSe	DSp
Queipo-Ortuño et al., 2005	RT-PCR	Serum	62/65	40 (64.5)	91.9	95.4
Debeaumont et al., 2005	RT-PCR	Serum	17/60	17 (100)	64.7	100 ⁴
Navarro et al., 2006	Q-RT-PCR	Whole blood	18/30	16 (88.9)	100	100 ⁵
Vrioni et al., 2008	Q-RT-PCR	Whole blood	39/50	13 (33.3)	100	100 ⁵
Queipo-Ortuño et al., 2008	Q-RT-PCR	Serum	46/64	32 (69.6)	95.7	92.2
Surucuoglu et al., 2009	RT-PCR	Serum	50/30	18 (36.0)	88.0	100 ⁴

¹ Adapted from Yagupsky et. al. 2019. Clin. Microbiol. Rev. 33: e00073-19.

² Queipo-Ortuño, et al. 2005. Clin. Microbiol. Infect. 11: 713-718; Debeaumont, et al. 2009. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24: 842-845; Navarro, et al. 2006. Clin. Infect. Dis. 42: 1266-1273; Vrioni, et al. 2008. Clin. Infect. Dis. 46: e131-6; Queipo-Ortuño, et al. 2008. Clin. Microbiol. Infect. 14: 1128-1134; Surucuoglu et al., 2009, Polish J Microbiol. 58:15-19.

³ When multiple targets or specimen types were tested, the data refer to the target and sample that had the best diagnostic efficiency.

⁴ Controls or cases did not include recovered or asymptomatic cases.

⁵ Value for first diagnosis but not during follow up after recovery.

RT-PCR studies: Surucuoglu et a. 2009



Evaluation of a RT-PCR method for rapid diagnosis of brucellosis ¹

	N°	N° (%) positive		
		SAT ≥1:160 ²	Blood Culture ³	RT- PCR ⁴
Brucellosis patients				
Acute brucellosis	34	33 (97.1)	13 (38.2)	31 (91.2)
Chronic brucellosis	6	6 (100)	1 (16.7)	4 (66.7)
Focal organ involvements	10	10 (100)	4 (40.0)	9 (90.0)
Meningitis	4	4 (100)	1 (16.7)	4 (100)
Epididymoorchitis	4	4 (100)	2 (50.0)	3 (75.0)
Osteomyelitis	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Spinal epidural abscess	1	1 (100)	0	1 (100)
Total	50	49 (98.0)	18 (36.0)	44 (88.0)
No brucellosis history or contact with <i>Brucella</i>	30	n.a. ⁵	n.a. ⁵	0 (0)

¹ Adapted from Surucuoglu et al. (2009). Polish J. Microbiol. 58 (1):15-19.

² All sera had a Coombs ≥1:320.

³ Semiautomatic BACTEC 9240 for up to 15 days; sample volume, no. samples/patient and pyretic status not described.

⁴ DNA in 3.5 mL of blood, QIAamp DNA Mini extraction Kit; RoboGene *Brucella* Detection Kit (TaqMan and 16SrRNA probe) and ABI Prism 7000 sequence detection system. Analytical sensitivity/specificity not determined.

⁵ Not applicable.

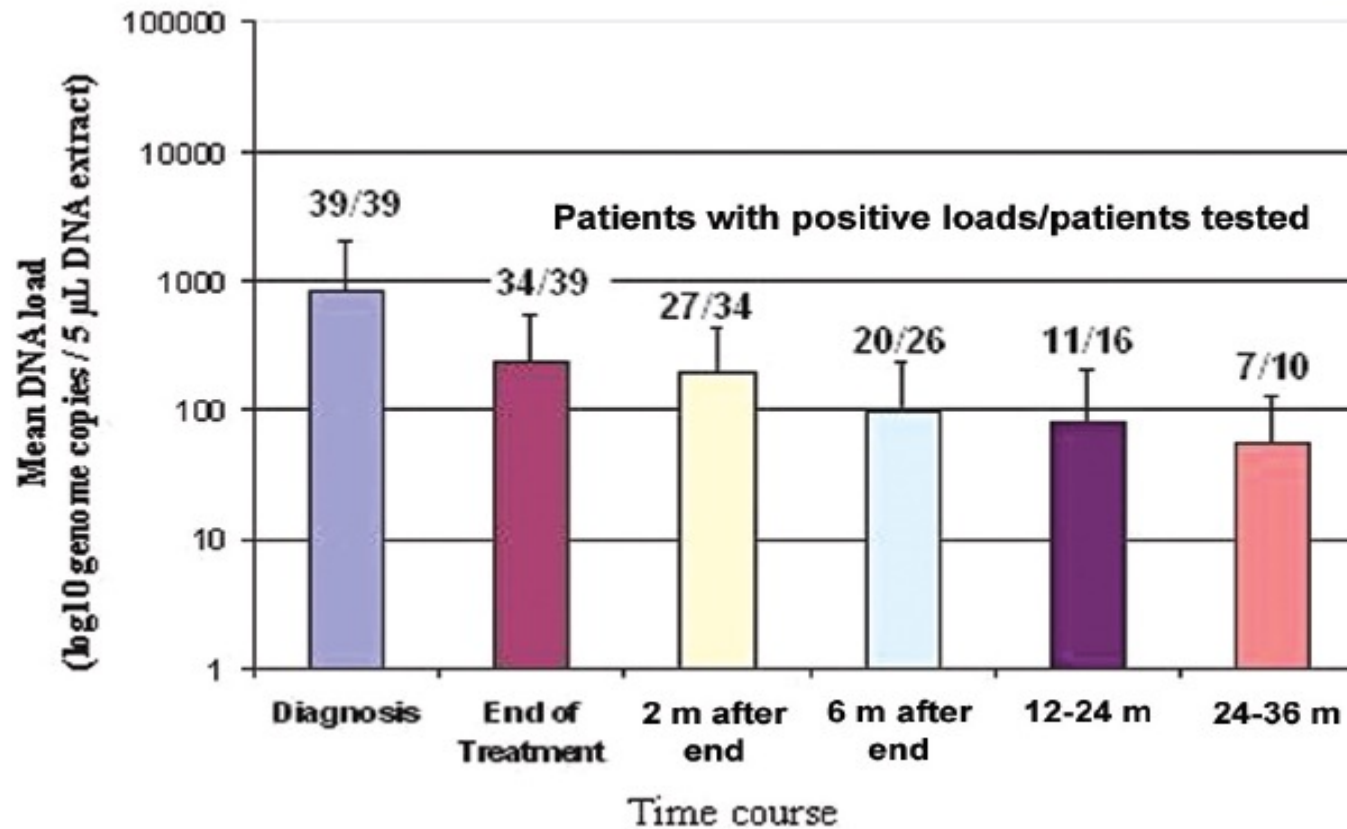


Figure 1. Evolution of *Brucella melitensis* DNA load at initial diagnosis and during the follow-up period. m, Months.

Conclusiones: valor diagnóstico frente a pruebas convencionales



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

PREGUNTAS	RESPUESTAS
Generales	
¿Estandarización?	Gran variabilidad de protocolos (tipo de muestra, extracción, cebadores, método y condiciones de amplificación y lectura). Métodos aún en evolución. Significativamente más difícil que RBT, SAT, Brucellacapt y LFiC.
¿Implementación?	Significativamente más costosa que RBT, SAT, Brucellacapt y LFiC.

Conclusiones: valor diagnóstico frente a pruebas convencionales



PREGUNTAS	RESPUESTAS
Con respecto del cultivo	
¿Más sensibles?	Sí (¿cuánto más? dudas sobre protocolos de cultivo en los estudios), pero según técnica y ajuste ROC. No hay estudios sistemáticos con RT-PCR y Q-PCR en formas focales; prometedores según datos de PCR convencional; por investigar en detalle (líquido articular, abscesos, LCR u otras muestras tisulares).
¿Misma especificidad en casos positivos?	Analítica: 100% para <i>Y. enterocolitica</i> O:9, etc.; ciertos cebadores detectan <i>O. intermedium</i> . Diagnóstica: según técnica y ajuste ROC.
¿Identifican infecciones por RB51, S19 o Rev 1?	Debería ser posible. No con los cebadores usados en estudios clínicos.
¿Detectan directamente la especie de <i>Brucella</i> ?	Debería ser posible. No hay estudios diagnósticos multiplex o identificación de género-identificación de especie en serie.

Conclusiones: valor diagnóstico frente a pruebas convencionales



PREGUNTAS	RESPUESTAS
Con respecto de la serología	
¿Más sensibles en casos “agudos” y de larga evolución (“crónicos”)?	Por investigar en detalle (los estudios son deficientes en datos/tests serológicos; muy improbable en casos agudos).
¿Más sensibles en formas focales?	Por investigar en detalle. Casos aislados prometedores, pero no hay estudios sistemáticos. Podría ser muy interesante en algunas complicaciones, como las hepato-esplénicas.
¿Negativas en ausencia de contactos con <i>Brucella</i> ?	Según técnica y ajuste ROC
¿Detectan recaídas y confirman curaciones?	No todas las recaídas, ni todas las curaciones.
¿Negativas en contactos asintomáticos?	Hay casos positivos; los estudios son incompletos o no bien documentados en cuanto a serología.



Material Suplementario

Tratamiento

Tratamiento de la brucelosis humana

La elección del régimen/duración debe basarse en la presencia de formas focales (pueden requerir tratamientos prolongados dependiendo de la evolución clínica) y condiciones que contraindiquen ciertas terapias.¹

Síndrome Clínico	Tratamiento Recomendado	Tratamiento Alternativo
Brucelosis "aguda" (adultos y niños de más de 8 años).	Doxiciclina 100 mg oral x 2 / día/45 días más estreptomina intramuscular 5 mg/kg / día/14–21 días, (o gentamicina intravenosa 3–5 mg/kg / día/7–14 días). O Doxiciclina oral 100 mg x 2 / día/45 días más rifampicina oral 600–900 mg / día/45 días.	Rifampicina oral 600 mg / día/42 días más quinolonas oral (ofloxacino 400 mg x 2 /día, o ciprofloxacino 750 mg x 2 /día) /42 días. O Doxiciclina oral 100 mg 2 /día más trimetoprim-sulfametoxazol, 1 tableta doble x 2/ día/ 60 días.
Infecciones focales (endocarditis, espondilitis, meningitis, abscesos para espinosos).	Doxiciclina oral 100 mg x 2 /día más rifampicina oral 600 mg / día/6–52 semanas más estreptomina intramuscular 1 g / día 14–21 días (o gentamicina intravenosa 3–5 mg/kg / día/14– 21 días).	Considerar sustituir la doxiciclina-rifampicina por trimetoprim-sulfametoxazol (ver arriba) más quinolonas (ofloxacino oral 400 mg x 2/día o ciprofloxacino oral 750 mg x 2/día) / 42 días. Considerar cirugía en pacientes con endocarditis, abscesos epidurales, cerebrales, hepáticos o en el bazo, u otros abscesos resistentes a la antibioterapia
Niños de menos de 8 años.	trimetoprim-sulfametoxazol 5 mg/kg (componente trimetoprim) oral x 2/, 45 días más gentamicina intravenosa 5–6 mg/kg/día/7 días	Monoterapia con doxiciclina o rifampicina oral 15mg/kg/día/21- 42 días
Embarazadas	Rifampicina oral 600 mg / día/ 42 días más una tableta doble trimetoprim-sulfametoxazol x 2 / día/45 días	Monoterapia con rifampicina oral 600–900 mg / día /45 días

¹ Las dosis de aminoglucósidos y quinolonas deben ajustarse in pacientes con función renal deficiente.

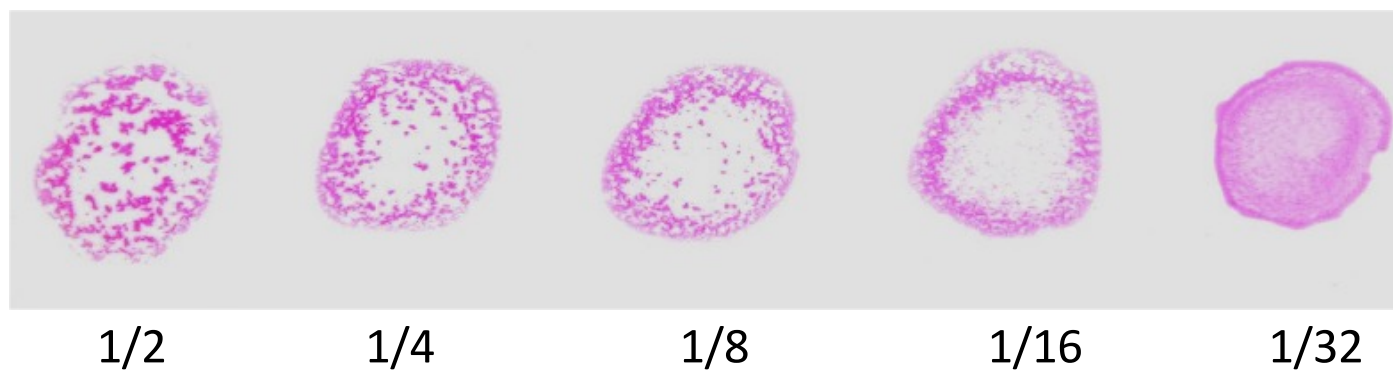
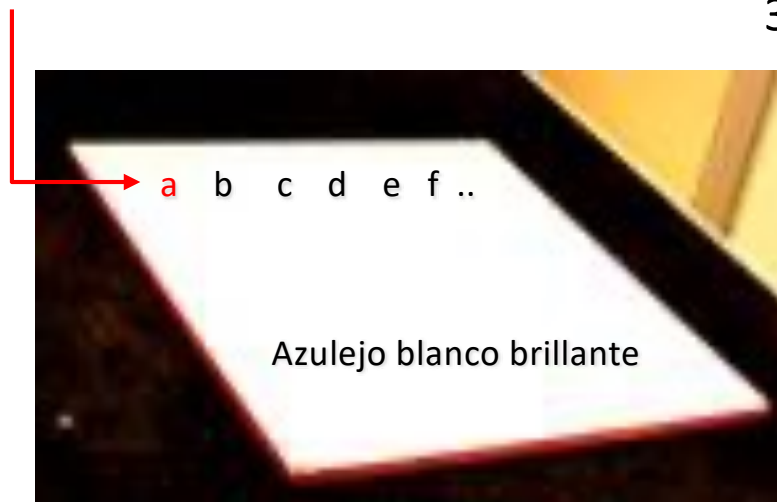
El Rosa de Bengala en brucelosis humana

Uso de diluciones de suero

1. Gotas (30 μL)
de suero salino

2. Suero: se hacen diluciones con las gotas

3. Cada dilución se testa con el reactivo





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)

FPA (ensayo de polarización de fluorescencia).



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Paulo PS, Nielsen KH. 2003. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *J Med Microbiol.* 52:883-887.

"Youden index"

- Método muy usado para ajuste de % DSe (sensibilidad diagnóstica) y % DSp (especificidad diagnóstica) de pruebas cuantitativas.
- No es necesariamente "óptimo": depende de que se quiera priorizar la DSe o la DSp.
- Técnicamente, puede ser un punto muy delicado de reproducir.

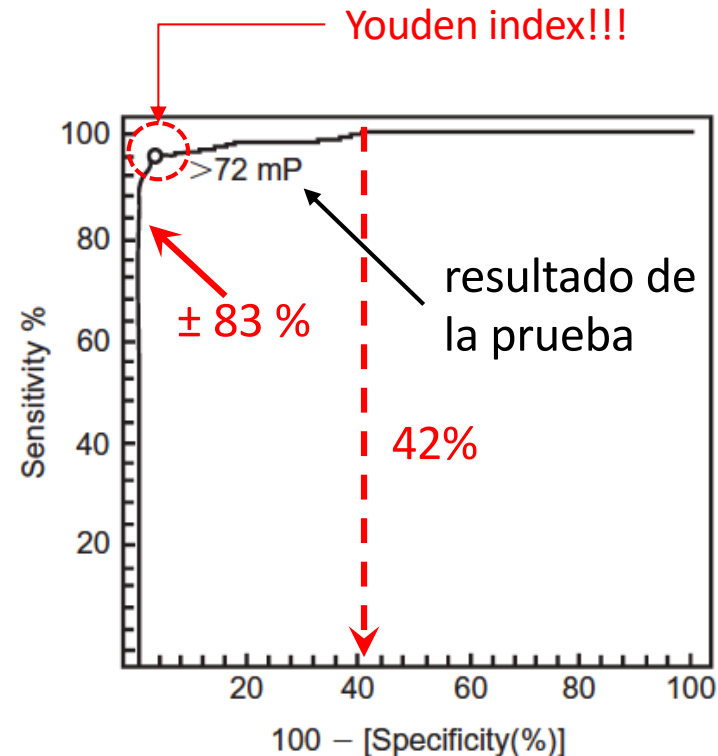


Fig. 1. ROC analysis of sensitivity (%) plotted against 100–specificity (%) for various cut-off values of the FPA for detection of antibody to *Brucella* sp. A value of 72 mP gave the maximum sum of sensitivity and specificity and was considered to be the optimum cut-off value.

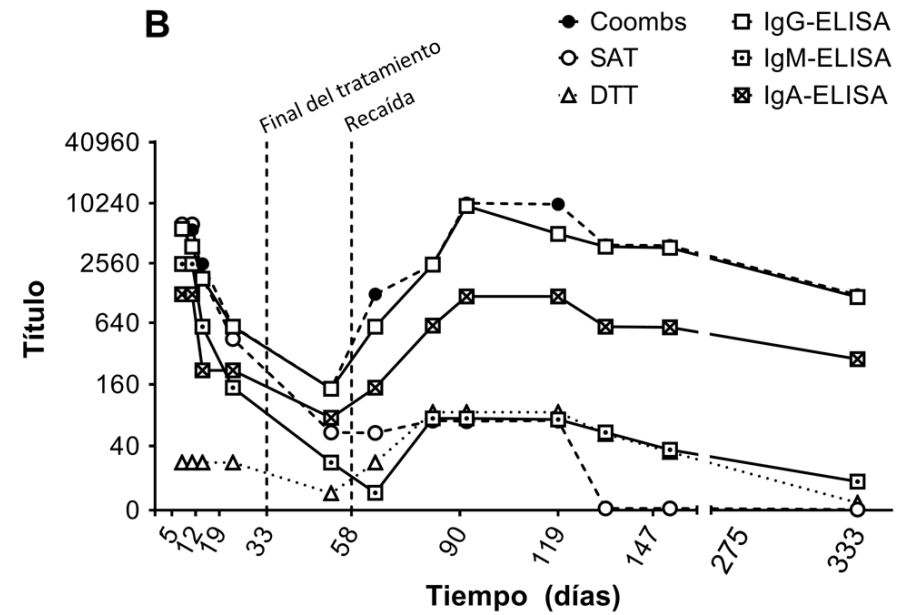
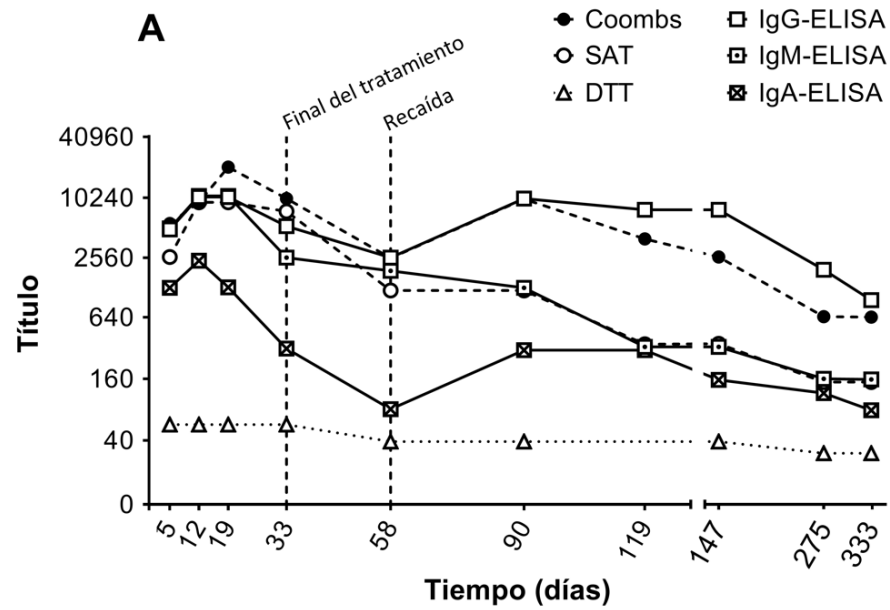
Tests diagnósticos en neurobrucelosis (\pm 5% de casos)¹

	Total	Positive	Sensitivity %
CULTIVO			
Blood culture (<i>Bactec</i> , <i>BacTAlert</i>)	154	57	37
CSF culture (<i>Bactec</i> , <i>BacTAlert</i>)	87	22	25.3
CSF culture (conventional method)	52	5	9.5
SEROLOGÍA			
Serum STA (título \geq 1:160)	172	162	94.2
CSF STA (título \geq 1:20)	144	113	78.5
Serum RBT	123	118	95.9
CSF RBT	106	75	70.8
CSF-Elisa (IgM)	10	8	80
CSF-Elisa (IgG)	10	8	80

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

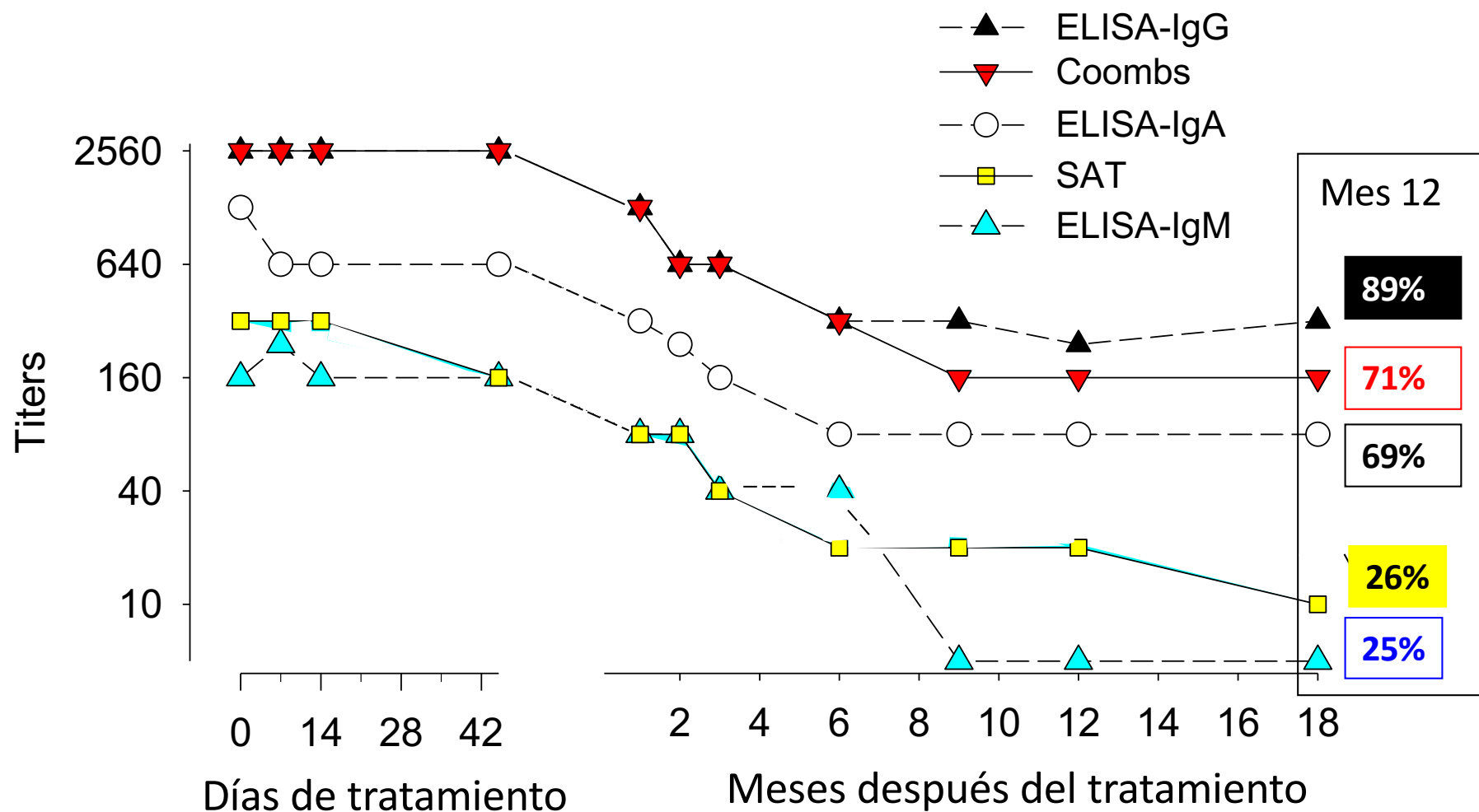
¹ Estudio retrospectivo multicéntrico (Erdem, et al. 2013. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, E80–E86.

Diagnóstico serológico: perfil de anticuerpos (1)



Diagnóstico serológico: persistencia de anticuerpos

Media de los títulos en 63 pacientes (**sin recaídas**)



Evaluación de los estudios publicados: variables a considerar

- Tipo de muestra:
 - ¿Sangre o suero? ¿Volumen?
 - En ciertas formas focales: ¿Tamaño? ¿Homogeneización?
- Protocolo de extracción del DNA ("in house"; kits y casas comerciales, automatizados).
- Secuencias diana y cebadores (incluso para la misma secuencia) (Ver Material Suplementario).
- Volumen/concentración de los oligos.
- Sensibilidad analítica y controles de especificidad analítica.
- Presencia de inhibidores en la muestra vs sensibilidad analítica.
- En RT-PCR y Q-PCR: fluoróforo (SYBR® Green; sondas tipo Taqman [casa comercial del "*master mix*"]).
- Condiciones de la amplificación (T_m , ciclos, punto de corte).
- Uso de controles positivos y negativos en cada ensayo.
- Repeticiones y tratamiento estadístico (Q-PCR).
- Definición de resultado positivo (ROC y AUC para Q-PCR).

In-house conventional PCR: hepatosplenic abscesses



Diagnostic tests in seven cases of brucellosis chronic hepatosplenic abscesses. ¹

Test	Patient N°						
	1	2	3	4	5	6	7
SAT	1/160	1/40	0	0	1/80	1/320	0
Coombs	1/2.560	1/5.120	1/160	1/40.960	1/40.960	1/1.280	1/1.280
Culture	Blood ²	-	-	-	-	-	-
	Tissue or pus ³	+	-	-	-	-	-
PCR	Blood	n.d.	+	+	+	+	n.d.
	Tissue or pus	+	+	+	+	n.d.	+

¹ Adapted from Colmenero *et al.* (2002) *Diagn Microbiol Infect Dis* 42(3):159–167.

² Ruiz-Castañeda, BACTEC 730 or 9240 for 30 days.

³ Chocolate agar, blood agar or Brucella agar for 7 days under CO².

⁴ In-house extraction protocols.

Colmenero, et al. 2002. Late reactivation of calcified granuloma in a patient with chronic suppurative brucellosis, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 21 (2002) 897–899.

Cultivo de sangre negativo; cultivo del ganuloma, negativo; SAT: 1/640; Coombs 1/82480; PCR positiva en el granuloma