



OPS



**INSTITUTO
NACIONAL DE
SALUD**



Universidad de
Navarra

**Mesa de trabajo para la revisión y ajuste de la Guía para
la Vigilancia de Brucelas Lisas**

**Diagnóstico de laboratorio de la brucelosis humana II.
FPA, cELISA, iELISA y LFiC**

11-03-2024

Algunas conclusiones de la Parte I

- En el suero aparece, **primero, IgM** y, a continuación, solapándose con ella, **IgG/IgA**. **Sus niveles son variables** según individuos y tiempo tras la infección. **La IgM** decrece sostenidamente y **puede ser negativa**.
- Las IgM, e inicialmente, las IgG/IgA **son aglutinantes**. Progresivamente, **las IgG/IgA se hacen no aglutinantes** a pH 7 (a pH 3.7-5.0 todas aglutinan).
- Una selección juiciosa de pruebas de aglutinación permite una excelente DSe/DSp. La proporción aglutinantes/no aglutinantes es indicativa del tiempo de evolución y puede ayudar al clínico.

¿Por qué buscar pruebas alternativas?

- Las pruebas que miden directamente la unión de las Ig al antígeno no están afectadas por los anticuerpos no-aglutinantes.
- Algunas de estas pruebas tienen excelente sensibilidad analítica, lo que podría posibilitar la detección de los (muy raros) casos negativos en las pruebas de la Parte I.

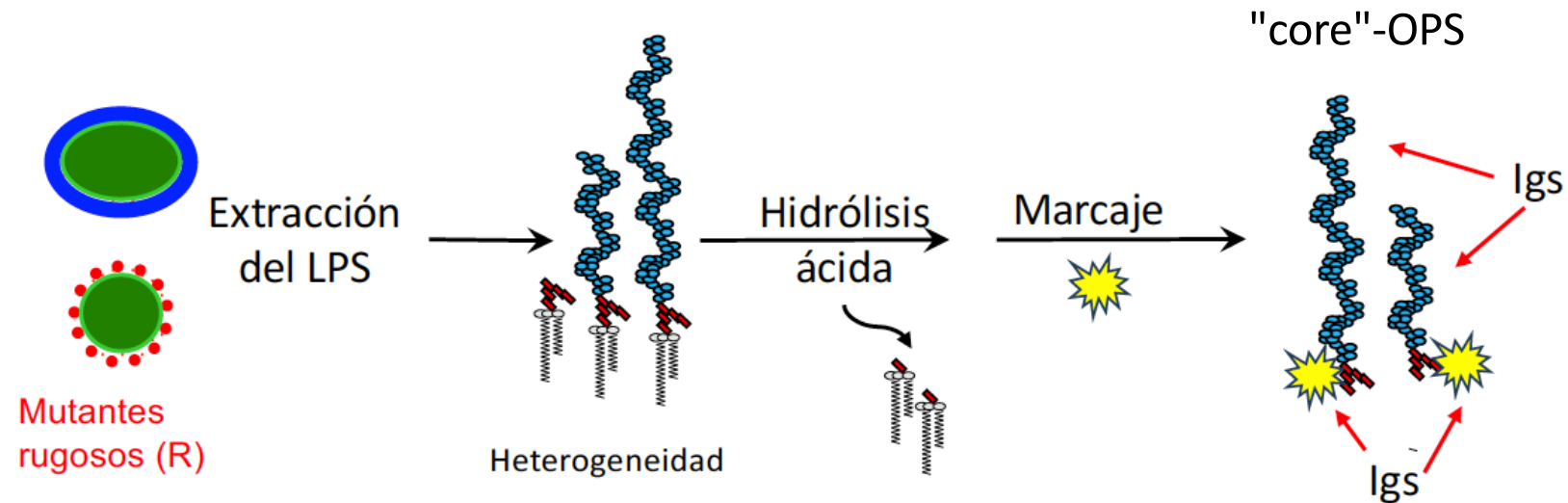
Pero:

- tal sensibilidad analítica conlleva el riesgo de comprometer la especificidad.
- deben diferenciar IgM e IgG para estimar el tiempo de evolución y ayudar al clínico.

Fluorescence Polarization Assay (FPA)



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra



- Estandarización del antígeno necesaria.*
 - ¿% de disociación S-R?
 - Heterogeneidad del PS.
 - Heterogeneidad del marcaje.
- Igs: no diferencia IgM, IgG e IgA, que compiten entre sí.
- Detecta anticuerpos anti-cadena O y **anti-"core"** (ej. anti-RB51) con eficiencia desconocida.

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

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.

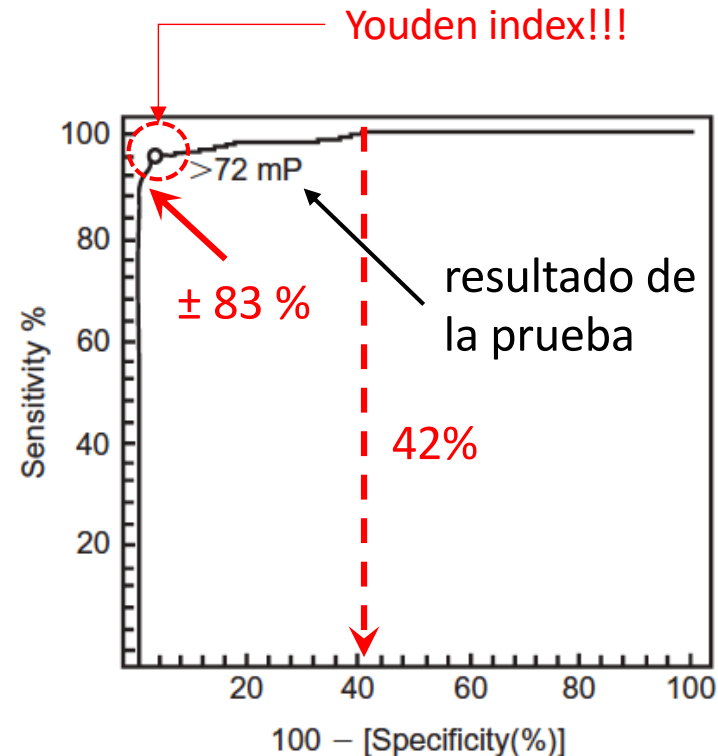


Fig. 1. ROC analysis of sensitivity (%) plotted against 100–specificity (%) for various cut-off values of the FPA for detection of antibody to *Brucella* sp. A value of 72 mP gave the maximum sum of sensitivity and specificity and was considered to be the optimum cut-off value.

FPA (ensayo de polarización de fluorescencia)



Human brucellosis: FPA results in control sera.¹

Group	Characteristics	N°	FPA (cut off 72 mP) ²	
			Negative	Positive
Positive	- Clinically compatible. - Positive: culture, <u>SAT, CF and cELISA.</u> ^{3,4}	76	7 ⁵	73
Negative	- No symptoms. - Negative: SAT, CF, cELISA, RBT and BPAT. ⁴	340	333	3

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

² Cut -off optimized by ROC analysis.

³ Results of RBT and BAPT not reported.

⁴ SAT, serum agglutination test; CF, complement fixation, cELISA, competitive ELISA, RBT, rose bengal test, BPAT, buffered plate agglutination test.

⁵ Of these 7 FPA-negative sera, 3 had SAT = 1:800 (results nor reported for the remaining 4).



Biased positive control: all sera positive in other tests; actually, the study proves that FPA is inferior to other tests in DSe despite use of Youden index

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

Human brucellosis: results of Fluorescence Polarization Assay (FPA) in comparison with other tests in the “probably infected” group (87 sera from persons without clinical symptoms)¹



Test ²	Nº positive (%)
FPA	19 (21.8)
BPAT	76 (87.3)
cELISA	18 (20.7)
RBT	12 (13.8)
SAT 1:25	66 (75.9)
1:50	20 (22.9)
1:100	1 (1.1)

¹ Slaughterhouse workers and blood donors; 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.

- Possible conceptual mistake (probably infected without symptoms?).
- Strongly suggests low DSp when compared with RBT (which could have some false positives in endemic areas)



FPA (ensayo de polarización de fluorescencia)

Konstantinidis A, Minas A, Pournaras S et al. 2007. Evaluation and comparison of fluorescence polarization assay with three of the currently used serological tests in diagnosis of human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 26:715-721.

- 230 sera: patients with clinical signs and **positive in at least two** tests: RBT, SAT, iELISA.
- 318 healthy with no clinical/epidemiological evidence. Of these, **13 were serologically positive and were not used in the evaluation.**
- ROC análisis: cut-off 99 mP (**Youden index**)

Table 1 2×2 table of FPA vs. brucellosis status

		Brucellosis		Total
		BP ^a	BN ^b	
FPA	Positive	215	12	227
	Negative	15	293	308
	Total	230	305	
	Sensitivity	215/230=93.4%		
	Specificity	293/305=96.1%		

^a Brucellosis positive

^b Brucellosis negative

Biased study: (1) definition of positive control by two serological tests; (2) removing 13 patients that could compromise specificity



FPA (ensayo de polarización de fluorescencia) 2.

Konstantinidis A, Minas A, Pournaras S et al. 2007. Evaluation and comparison of fluorescence polarization assay with three of the currently used serological tests in diagnosis of human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 26:715-721.

Table 2 Sensitivity, specificity and AUC of ROC analysis of all the tests performed

Tests	Se ^a (95% CI)	Sp ^b (95% CI)	AUC ^c (95% CI)
FPA	93.5 (89.5–96.3)	96.1 (93.2–97.9)	98.1 (96.6–99.1)
ELISA	90.8 (86.3–94.2)	100 (98.8–100)	95.4 (93.3–97)
RBT	88.7 (83.9–92.5)	100 (98.8–100)	94.3 (92–96.1)
SAT	81.7 (76.1–86.5)	100 (98.8–100)	90.9 (88.1–93.2)

ROC? ←

^a Sensitivity

^b Specificity

^c Area under the curve

According to the ROC plot, if DSp is 100% (like that of other tests) the DSe FPA is < 75%.

Example of problems with the Youden index and...

how can the ROC analysis be done with a qualitative test like RBT?

FPA (ensayo de polarización de fluorescencia)



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

Dong SB, Xiao D, Liu JY et al. Fluorescence polarization assay improves the rapid detection of human brucellosis in China. *Infect Dis Poverty*. 2021;10:1-6.

Cases

320 cases of suspected brucellosis showing both clinical symptoms and epidemiological risk factors.

- Positive group (200): both RBT and SAT positive ($\geq 1:100$)*
- Negative group: the remaining 120 patients (negative in both the RBT and SAT).

FPA.

ROC analysis: optimum cut-off 88.5 mP units

Se 94.5%

Sp. 100.0%

The coincidence rate with SAT was 96.6%.

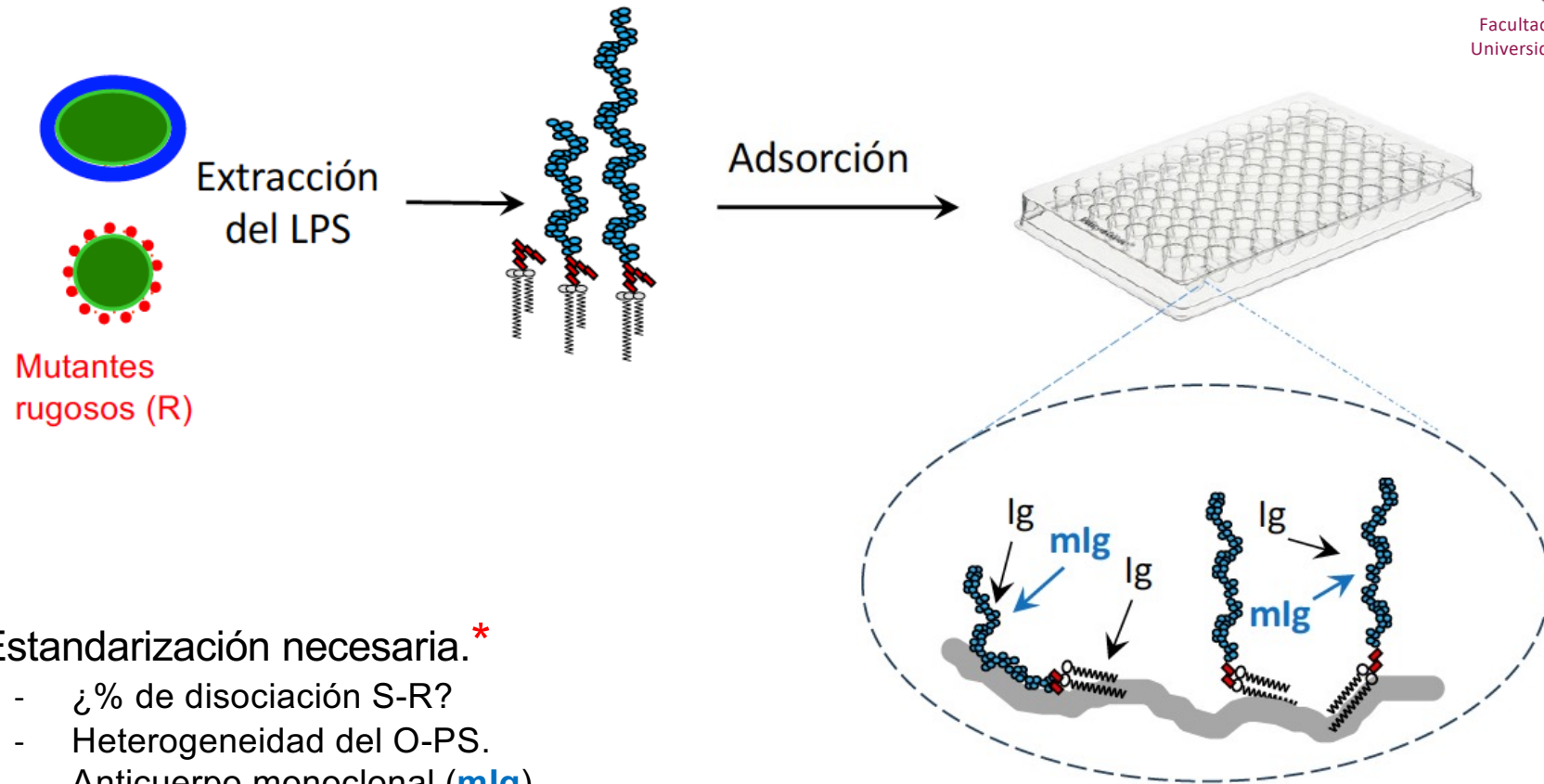
* Es la definición de caso de brucelosis según los criterios diagnósticos oficiales en China (WS269-2019)

Otra definición sesgada de controles positivos y negativos
Realmente, demuestra que el FPA es peor que RBT y SAT combinadas

cELISA



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra



- Estandarización necesaria.*
 - ¿% de disociación S-R?
 - Heterogeneidad del O-PS.
 - Anticuerpo monoclonal (**mlg**).
- Igs: no diferencia IgM, IgG e IgA, que compiten entre sí.
- Detecta anticuerpos anti-cadena O **y anti-LPS-R** (ej. anti-RB51) con eficiencia desconocida.

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

Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D, Nielsen KH. 1999. Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3245-3248.

TABLE 1. Number of true-positives, false-positives, true-negatives, and false-negatives for the CELISA with a cutoff of 28%I

CELISA	No. of sera with the following reference method result:	
	Positive ^a	Negative ^b
Positive	114	1
Negative	2	340

^a Sera were from patients with suspected brucellosis (65 sera from patients with clinical symptoms compatible with brucellosis and positive PAT, RBT, BPAT, TAT, and CFT results at any titer) and *Brucella*-infected patients (51 sera from patients with positive cultures).

^b Sera were from an asymptomatic population of blood donors (341 sera from people with no clinical or epidemiological evidence of brucellosis, 18 to 62 years old, and with negative PAT, RBT, BPAT, TAT, and CFT results).

Authors conclusion: "The cELISA is a suitable test for human brucellosis and could be adopted as the confirmatory test" (!!!)

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.

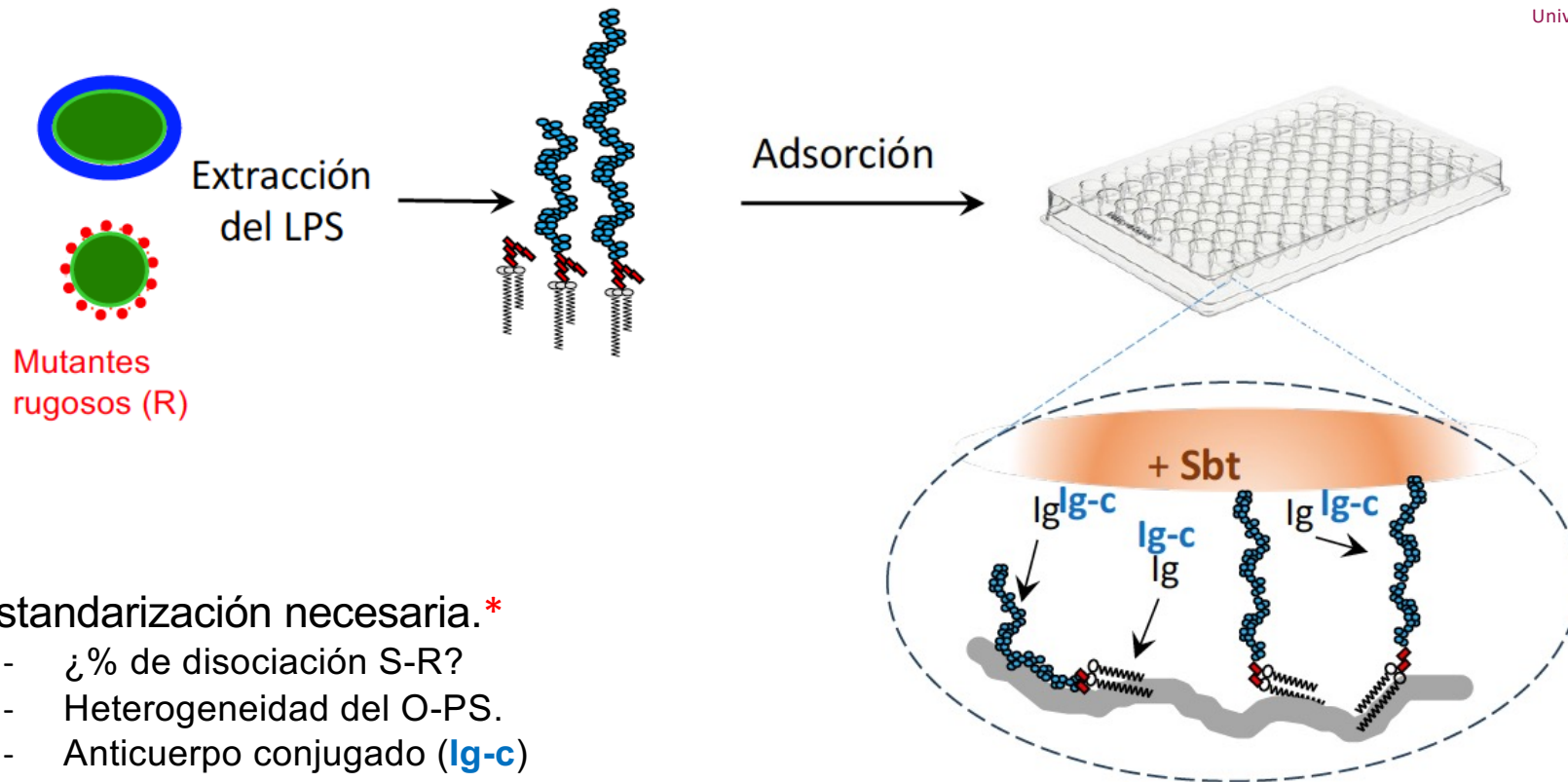
² 25 *B. abortus* (25, including 1 S19 isolate), 19, *B. suis* (19), 6 *B. melitensis* (6) and *Brucella* spp. (1).

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.



- Estandarización necesaria.*
 - ¿% de disociación S-R?
 - Heterogeneidad del O-PS.
 - Anticuerpo conjugado (**Ig-c**)
 - Reacción de revelado (**Sbt**).
- Igs: cuantifica IgM, IgG e IgA, pero estas compiten entre sí.
- 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

Brucelosis humana. Comparación de Brucellapcat y ELISA IgM e IgG (Vircell) ^{1, 2}

	Sensibilidad ³	Especificidad ³
Brucellapcat ⁴	90,6	76,3
ELISA IgM ⁵	72,2	67,8
ELISA IgG ⁵	73,7	58,9
ELISA IgM + ELISA IgG	100	100

¹ Datos de Ozdemir et al. 2011. *Int J Med Science*. 2011;8:428-432.

² Sueros de 200 pacientes sospechosos (“**presumptive**”) de brucelosis; no se estudiaron sueros de una población “sana”

³ **Calculados empleando como controles positivos y negativos los resultados conjuntos de ELISA IgM+ ELISA IgG (n 159 y 41, respectivamente)**

⁴ Brucellapcat positivos $\geq 1:320$.

⁵ **Cut-off según recomendaciones del fabricante (Vircell, S.L., Spain).**

Ejemplo de conclusiones erróneas:

1. definición clínica imprecisa de los sujetos.
2. ajuste no comprobado del ELISA.
3. definición de los controles positivos y negativos según los resultados de uno de los tests (ELISA) que se valora.

Human brucellosis. Sensitivity and specificity of combined IgM and IgG for four commercial ELISAs and microplate agglutination test (MAT) in an endemic and a brucellosis free area ^{1,2}

	% sensitivity ²	95 % CI	% specificity ³	95 % CI
Egypt				
MAT ⁴	98.5	92.0–100.0	100.0	97.5–100.0
Bio-Quant ⁵	100.0	94.6–100.0	34.5	26.8–42.8
IBL ⁵	100.0	94.6–100.0	98.6	95.1–99.8
Vircell ⁵	95.5	87.5–99.1	98.6	95.1–99.8
Euroimmun ⁵	100.0	94.6–100.0	89.7	83.5–94.1
USA				
MAT ⁴	100.0	97.0–100.0	68.4	51.4–82.5
Bio-Quant ⁵	100.0	97.0–100.0	10.5	2.9–24.8
IBL ⁵	99.2	95.4–100.0	97.4	86.2–99.9
Vircell ⁵	72.3	63.3–80.1	97.4	86.2–99.9
Euroimmun ⁵	99.2	95.4–100.0	81.6	65.7–92.3

¹ Data from Table 1 in Fadeel et al. 2011. *J Med Microbiol*;60:1767-1773.

² % sensitivity calculated with n = 67 (acute presentation, Egypt) or n = 119 (meatpacking outbreak, USA). For any assay, a case was considered positive if the acute and/or the convalescent specimen(s) tested positive.

³ % specificity calculated with n = 145 (Egypt) or n = 38 (USA).

⁴ Diagnostic titers were different in Egypt ($\geq 1:320$) and the USA (≥ 160).

⁵ Cut-off recommended by the manufacturer

Ejemplo de problemas de (1) estandarización y validación según zonas; (2) de definición de casos (nota al pie 2); y de estudio sesgado: (3) casos de corta evolución en Egipto (MAT mejor o igual en DSe/DSp); (4) definición CDC-USA implica peor especificidad.

Memish ZA, Almuneef M, Mah MW, Qassem LA, Osoba AO. **2002** Comparison of the Brucella Standard Agglutination Test with the ELISA IgG and IgM in patients with Brucella bacteremia. *Diag Microbiol Infect Dis.* 44:129-132

68 blood culture-positive; 70 healthy.

ELISA IgG and IgM; manufacturer recommended cut-off (Genzyme Virotech GmbH)

%DSe-%DSp: **SAT ($\geq 1:320$): 95%-100%.**

ELISA IgM: 79.1%- 100%

ELISA IgG: 45.6%-97.1%

ELISA IgM + ELISA IgG: 94.1%-97.1% .

Estudio sesgado.

- Casos de corta evolución: todos son SAT $\geq 1:320$ (posiblemente con sintomatología aguda).
- Demuestra que, en estos casos, el ELISA IgG+IgM no mejora SAT.

Serological results of 43 sera from patients culture positive for *S-Brucella* spp.^{1,2}

Nº patients	Test ³				
	SAT ⁴	BPAT	cELISA ⁵	u-IELISA ⁶	R-u-IELISA ⁷
1	12800	+	85	100	100
3	6400	+	76-96	95-100	83-105
4	3200	+	72-90	86-100	61-100
7	1600	+	32-95	39-100	14-100
8	800	+	47-90	67-100	38-103
10	400	+	35-90	59-100	36-100
4	200	+	32-80	42-89	42-83
2	100	+	28-74	14-100	4-97
2	50	+	46-67	58-99	33-80
1	40	+	63	99	100
1	25	+	88	100	111
1	NS ⁸	+	64	94	100

¹ Data taken from Table 3 of Ayala et. al. 2014. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. DOI 10.1007/s10096-014-2066-2

² *B. suis* (16), *B. melitensis* (11) and *B. abortus* (14, including 2 S19 isolates).

³ SAT, serum agglutination; BPAT, buffered plate agglutination test; cELISA, competitive ELISA; u-IELISA, Universal indirect enzyme immunoassay; R-u-IELISA, Rapid indirect enzyme immunoassay (both from Harbin Peace River Biotechnology Company Limited, Harbin, Heilongjiang, China; conjugate not specified).

⁴ Reciprocal of titre.

⁵ cELISA cut-off %I>28 (adjusted by ROC analysis in Lucero et al Lucero et al. 1999. *J Clin Microbiol*. 37:3245-3248; Se, 98.3%; Sp, 96.5%).

⁶ u-IELISA cut-off %P>24. Adjusted to 100 Sp with 77 sera asymptomatic, seronegative (all tests) sera.

⁷ R-u-IELISA cut-off %P>18. Adjusted to 100 Sp with 77 sera asymptomatic, seronegative (all tests) sera.

⁸ No serum sample available

Muestra que, además de no diferenciar IgM e IgG (supuesta ventaja del ELISA) ambos ELISA son peores que el BPAT en DSe.

Gómez MC, Nieto JA, Rosa C et al. **2008**. Evaluation of seven tests for the diagnosis of human brucellosis in an endemic area. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15:1031-1033.

Human brucellosis. Accuracy indexes of the tests.^{1,2}

Test ³	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
RBT	1.00	0.97	0.89	1.00
MAT	0.92 ⁴	1.00	1.00	0.98
Brucellacapt	1.00	1.00	1.00	1.00
IgM ELISA ⁵	0.60	1.00	1.00	0.90
IgG ELISA ⁵	0.84	1.00	1.00	0.96

¹ Taken from Gómez et al. 2008. *Clin Vaccine Immunol*. 15:1031-1033.

² Calculated with sera from **25 patients and 90 healthy individuals**.

³ RBT, Rose Bengal test; MAT, serum agglutination in microplates; cutoff: RBT, >1:1; MAT and Brucellacapt, >1:160.

⁴ **Two patients had MAT = 1:80 but Brucellapcat ≥ 1:640 and Coombs ≥ 10,240.**

⁵ **Cut-off recommended by maker** (Serion/Virion kit, Würzburg, Germany).

Un kit ELISA aparentemente ajustado a 100% DSp en IgM e IgG (no IgA).

- 23 pacientes de corta-media evolución (MAT y Brucellacapt > 1:160) y dos de media-larga evolución (nota al pie 4).
- Individualmente, la DSe/DSP del ELISA IgM o IgG es inferior a la de las pruebas convencionales (no se describen valores combinados IgM e IgG).

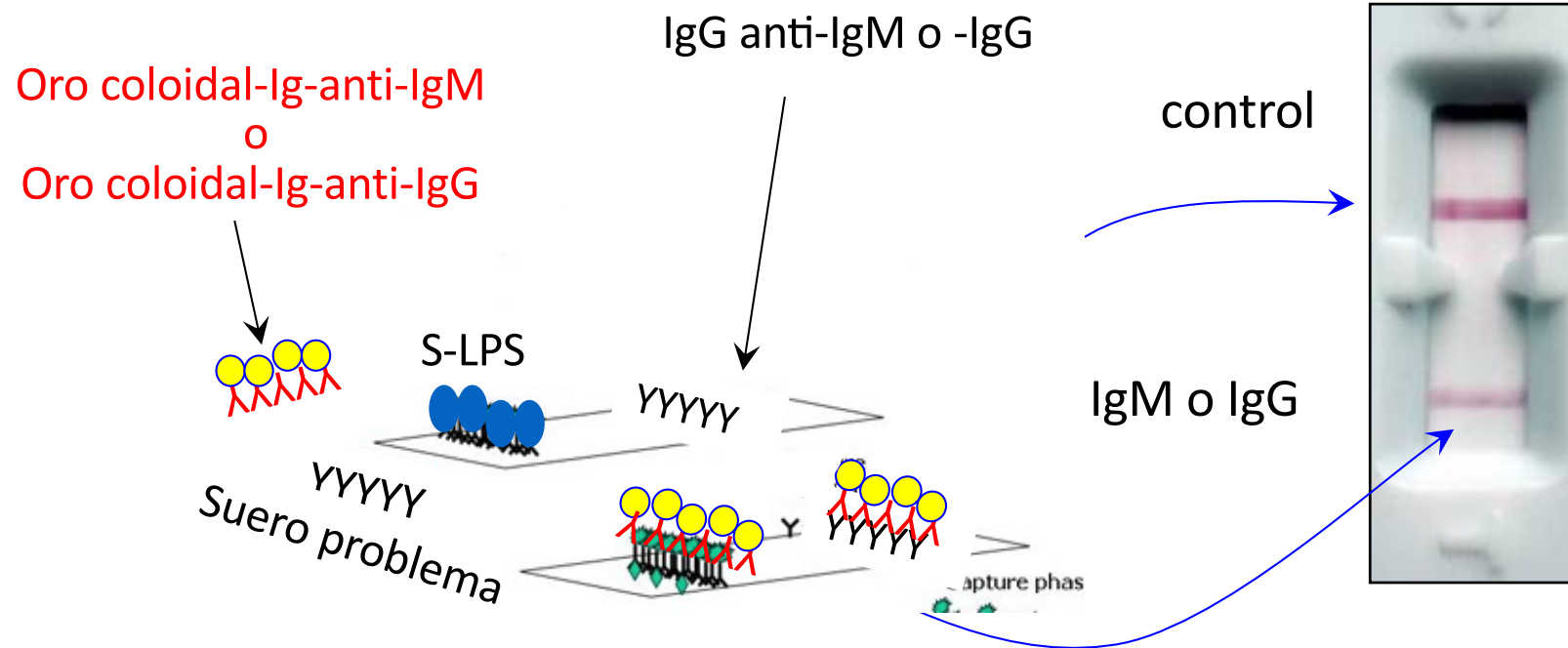
Solís García del Pozo, J., S. Lorente Ortuño, E. Navarro, and J. Solera. **2014**. Detection of IgM antibrucella antibody in the absence of IgGs: A challenge for the clinical interpretation of Brucella serology. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8: e3390.

Patients with symptoms compatible with brucellosis.

Hospital performing only ELISA IgM/IgG (Virion/Serion, Würzburg, Germany) for diagnosis of brucellosis.

- 17 cases (5 with past history of brucellosis; 12 that were negative in conventional tests and had had never brucellosis).
- **All were** (repeated sampling: 49 samples):
 - **ELISA IgM-positive (even after absorption of rheumatoid factor).**
 - **ELISA IgG-negative.**
- **None were finally diagnosed with brucellosis** (parvovirus, fiebre Q, varios tipos de artritis, choque séptico de origen desconocido, otros...) .
- iELISA IgM positive serology, per se, is not enough to diagnose acute brucellosis.
 - ¿Especificidad del ELISA-IgM usado?
 - ¿Interfieren otros factores diferentes del reumatismo en otras patologías con cuadros clínicos semejantes a la brucelosis?

LFiC (o LFC; Inmunochromatografía de flujo lateral)



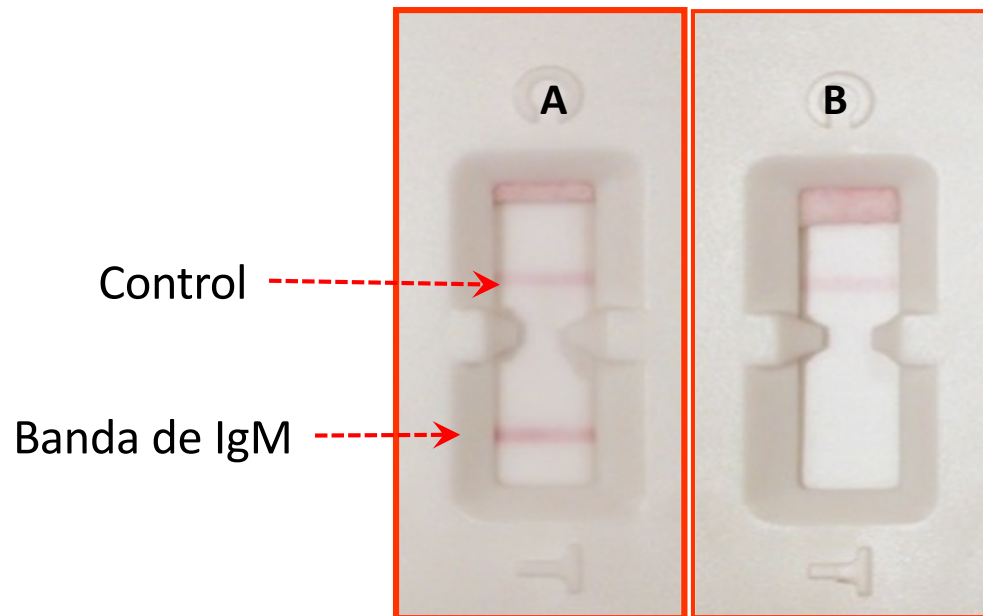
- Estandarización necesaria.*
 - ¿% de disociación S-R?
 - Heterogeneidad del O-PS.
 - Anticuerpo conjugado (**oro coloidal anti-Ig**)
- Igs: semi-cuantitativa para IgM o IgG, pero estas compiten entre sí.
- Posibles falsos IgM-positivos por presencia del factor reumatoide en el suero.
- Detecta anticuerpos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

Factor reumatoide (RF)

- El RF es un auto-anticuerpo IgM que reacciona con la Fc de la IgG (rara vez con otros isotipos).
- Presente en 5-10% de personas sanas y en un 80% de afectados por artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes.
- Interfiere en inmunoensayos que detectan IgG o participan IgGs (humana o animal).
- En brucelosis, esto ocurre en, al menos, LFIc; pero posiblemente también en i-ELISA-IgM.

LFIc- IgM



A- Suero FR positivo.

B- Mismo suero tratado con absorbente de RF.

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 RBT, SAT and LFiC IgM and IgG for different patient groups ¹

	N° sera	N° positives (%)					
		LFiC				SAT	
		RBT	IgM + IgG	IgM ≥1+	IgG ≥1+	≥1:160	≥1:320
Confirmed brucellosis							
Adults							
Admission	54	53	49	35	44	53	49
< 2 months ³	24	24	22	20	18	24	23
2-12 months ³	17	16	17	9	16	16	16
>12 months ³	9	9	7	3	7	9	6
Relapses	4	4	3	3	3	4	4
Total ⁴	63	62	58	45	55	62	59
Pediatric	33	32	32	25	30	33	33
Unconfirmed	85	14	14	12	8	7	5
Non-brucellosis	24	6	1	0	1	0	0

¹ Adapted from Irmak et al. 2004. *Am J Trop Med Hyg* 70: 688-694.

² RBT, rose bengal test ((Biotech Laboratories, Barcelona, Spain), SAT, serum agglutination test (Linear Chemicals, Barcelona, Spain), LFiC, lateral flow immunochromatography (KIT Biomedical Research, Royal Tropical Institute (Amsterdam, The Netherlands).

³ For these patients, there was information on the time of symptoms/signs before diagnosis. The authors classified them as "acute" (< 2 months), "sub-acute" (2-12 months) and "chronic" (> 12 months).

⁴ Test results given for the group of 63 adult are for any sample, admission (n 54) and or follow-up (9).

En el grupo con brucelosis confirmada, LFiC IgM + IgG no es mejor que SAT o RBT, pero informa de IgM e IgG.

Human brucellosis. Comparison of RBT, SAT and LFiC IgM and LFiC in the sera of 63 culture-positive patients from an endemic country. ^{1,2}

Group ³	N° sera	N° positives					
		RBT	SAT		LFiC		
			≥ 1:100	≥ 1:200	IgM	IgG	IgM+ IgG
"Acute and subacute"	52	49	38	26	47	39	52
"Chronic"	11	6	8	6	8	11	11
Total	63	57	46	32	55	50	63

¹ Data are from Mizanbayeva et al. (2009. *Diag Microbiol Infect Dis* 65: 14-20)

² RBT and SAT antigen origin not stated; LFiC kits provided by KIT Biomedical Research, Royal Tropical Institute (Amsterdam, The Netherlands).

³ Criteria for classification not defined.

¿Mejora realmente la LFiC-IgM-IgG el RBT en los pacientes "crónicos"?
(Ver Barroso García et al. en Material Complementario, o Díaz et al. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e950.)

▪ Estandarización

Significativamente más **compleja** que SAT, RBT (o BPAT) o Brucellacapt.

▪ Validación

- FPA, cELISA e iELISAs necesitan **validación más fina** que otros tests. Si se usa el índice de Youden, son **susceptibles de desviaciones importantes en DSe/DSp** para pequeñas variaciones de unidades mP o densidad óptica.
- Los iELISA son una familia que varía en reactivos biológicos; por ello, diferentes “kits” necesitan **validaciones independientes**.
- En iELISA-IgM y LFiC-IgM hay falsos positivos (factor reumatoide y otros no determinados). No se sabe si esto afecta también a cELISA y FPA.

▪ Diferenciación de IgM e IgG

Sólo los iELISAs y el LFiC diferencian IgM e IgG.

▪ Infraestructura y equipo auxiliar

Sólo el LFiC es equivalente a SAT, RBT (o BPAT) en simplicidad técnica, costo, y necesidad mínima de infraestructura y no de equipo auxiliar (lectores, etc.).

▪ Valor diagnóstico

Independientemente de su (mejor o no) sensibilidad analítica, todos los estudios demuestran que **estas pruebas no son mejores (y que pueden ser incluso peores)** en DSe/DSp que una adecuada elección de pruebas basadas en la aglutinación.



Neurobrucelosis: serología en LCR (líquido cefalorraquídeo)

Solís García del Pozo, J, Solera, J, Moriyón, I. 2024. Brain infections, encephalitis, and meningitis: Neurobrucellosis. Chapter 14., p. In Barichello, T, F., I, F., D-P (ed), Neurobiology of Infectious Diseases, Elsevier, Amsterdam.

Puntos claves:

- Son serología de suero sanguíneo positivos (muy dudosos los pocos negativos descritos).
- Hay anticuerpos en LCR, pero a menores niveles, incluso si el cultivo de LCR es positivo.
- **SAT**. Cualquier título (siempre realizada en paralelo con un LCR negativo) es indicativo, pero hay falsos negativos. Los títulos bajos o negativos deben complementarse con:
 - **Coombs**. A un título $\geq 1:8$ tiene una DSe de aprox. 98%.
 - **Brucellcapt**. Sólo un estudio (hasta 2023): 3 casos, los tres con título $\geq 1:80$.
- **RBT**. Siempre aconsejable.
 - Según estudios, 71% o 21% DSe (¿problemas de "lectura y antígeno" como en "crónicos?")
 - ¿Mejoraría el resultado el protocolo 25:75 μ L antígeno:suero (pequeños rumiantes)?
- **ELISA**. No hay bases para aceptar la habitual recomendación de su uso:
 - no hay estudios sistemáticos
 - hay casos aislados, tanto positivos como negativos, pero:
 - la mayoría no informa del kit empleado.
 - si lo hacen, aplican el cut-off recomendado sin base documental por los fabricantes.

Material complementario

Rosa de Bengala y Seroaglutinación en tubo (o microplaca) sin mercaptanos



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

Barroso García P, Rodríguez-Contreras P, Gil-Extremera B et al. Estudio de 1.595 casos de brucelosis en la provincia de Almería (1972-1998) según datos epidemiológicos de declaración de la enfermedad. Rev Clin Esp. 2002;202:577-582.

Brucelosis humana. Datos registrados en una zona endémica con accesos a servicios de salud y conciencia de la importancia de la brucelosis ¹

Prueba	Nº casos	Nº positivos (%)
SAT ²	1284	1137 (88.5%)
RBT	369	366 (99,2%)
Hemocultivo	68	62 (91,2%)

¹ Barroso García et al. 2002. Estudio de 1.595 casos de brucelosis en la provincia de Almería (1972-1998) según datos epidemiológicos de declaración de la enfermedad. Rev Clin Esp. 202:577-582.

² Título \geq 1:160.