



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.

Parte III. Cultivo y PCR

- ❑ **Sensibilidad sub-óptima**, pero es **específico (brucelas lisas y *B. canis*)**.
Si es positivo:
 - sin sintomatología: infección y necesidad de seguimiento (exposición accidental profesional, casos grupales) .
 - con sintomatología: enfermedad.
- ❑ **Necesario si** ha sido posible una **infección por RB51**; **muy conveniente** si lo ha sido por Rev 1.
- ❑ **Habitualmente guiado por una "sospecha"** (óptimamente con serología [RBT] previa/simultánea) y una clínica compatible. **Pero**:
- ❑ **Puede ser la primera prueba orientadora** cuando, ante “fiebres de origen desconocido” o sospecha de enfermedades febriles con cuadros semejantes, se hacen hemocultivos “ciegos”:
 - porque la exposición ocurrió hace tiempo (el periodo de incubación puede ser muy largo) y no hay ya sospecha epidemiológica.
 - en países donde la enfermedad es rara (del viajero).
- ❑ **Permite**:
 - tipado molecular completo (incluido WGS) para aclarar la epidemiología.
 - antibiograma (aunque muy dudosamente necesario).

Conclusión: hacer siempre que sea posible.

Generalidades: extremar las precauciones de asepsia (crecimiento lento de *Brucella*); óptimamente sin antibioterapia previa.

❑ **Sangre.**

- Tomada en fase pirética si es posible.
- Óptimamente, aprox. 10 mL sangre por cultivo.
- Óptimamente, tres cultivos independientes.

❑ **Médula ósea.**

- Más dificultosa (implica biopsia): requiere considerar *a priori* la posibilidad de la infección por *Brucella*.
- Volumen más limitado (aprox. 1 mL).
- Valor comparativo con el hemocultivo: controvertido (superior o inferior según estudios).
- Podría ser rentable en formas evolucionadas, pero debe reservarse para casos especiales.

❑ **Otras:** líquido articular, pus (abscesos), LCR y muestras tisulares.

Inoculación: 1-2 horas tras la obtención (transporte más prolongado, 2 y 8°C).

Comparación de los métodos de cultivo empleados en brucelosis humana.^{1,2}

Criterios	Método		
	Bifásico (Castañeda)	Lisis - centrifugación	Bactec/BacTalert
Detección	visual	visual	producción de CO ₂
Incubación	40 días	7 días	7-14 días ³
Sensibilidad	++	++	+++
Labor	++	+++	+
Seguridad	++	+	+++
Precio	+	++	+++

¹ Cortesía del Dr. P. Yagupski (datos originales en Yagupsky, et. al. 2019. Laboratory diagnosis of human brucellosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 33: e00073-19.

² Los valores se indican como relativos desde una a tres cruces, ya que no es posible dar valores absolutos debido a la gran variedad de muestras y casos.

³ En casos de larga evolución (“crónicos”), recurrentes, focales o tratados, se recomiendan 30 días.

□ Hemocultivo

- Valores en la literatura: 10 - 90% (¿protocolo? ¿tipo de paciente? ¿duración de la enfermedad previa al cultivo?).
- Experiencia en España (Ruiz-Castañeda y Bactec o Bactalert).

En la infección por *B. melitensis*.

- Agudos con fiebre elevada: $\geq 75\%$ positivos.
- Casos solapados y de larga evolución: $< 75\%$ y disminuyendo hasta un 30% en situación de apirexia.
- Recaídas: en un 60% hay bacteriemia.

En la infección por *B. abortus*: $< 50\%$ de los casos.

- **Otros**. Líquido articular, pus (abscesos), LCR y muestras tisulares: $< 30\%$.

Brucelosis humana: porcentaje de cultivos positivos en relación con el tiempo transcurrido desde el principio de la enfermedad.

1,2

Meses de enfermedad	No. casos	No. de positivos (%)
< 2	223	397 (89.6)
2-4	171	151 (88.3)
4-6	69	51 (73.9)
6-12	59	37 (62.7)

¹ Datos tomados de Ruiz-Castañeda, M., 1986, *Brucelosis*. La Prensa Médica Mexicana S.A. México, D.F., México., p. 99.

² Método bifásico de Ruiz-Castañeda con inóculos de 5-10 mL de sangre e incubación durante 30 días (Ruiz-Castañeda, M. 1961. *Laboratory diagnosis of brucellosis in man*. Bull. World Hlth. Org. 24: 73-84.

¿En qué podría(n) mejorar o igualar a las técnicas convencionales?

❑ Cultivo

- ¿Más sensibles? ¿Especificidad?
- ¿Identifican las infecciones por vacunas?
- ¿Detectan la especie de *Brucella*?

❑ Serología

- ¿Más sensibles en en ciertas formas focales?
- ¿Detectan las recaídas?
- ¿Confirman una curación?
- ¿Son negativas en contactos asintomáticos?
- De muy poca importancia: ¿discriminan infecciones por *Y. enterocolitica* O:9; *F. tularensis*; *V. cholerae*, etc.?

Evaluación de los estudios publicados (preguntas clave)

□ “Controles” positivos.

- Clínica: ¿Sintomatología compatible bien definida? ¿Formas focales?
- ¿Tiempo de evolución estimado? (“Agudos”; “crónicos”; ¿cómo están definidos?).
- ¿Incluyen recaídas?
- Serología: ¿pruebas realizadas y punto de corte?
- Cultivo: ¿Protocolo de cultivo y toma de muestras?
 - ¿Sólo cultivo-positivos? (sesgos: sólo 70-80% positivos y 30% en larga evolución en sangre; menos en formas focales).

□ “Controles” negativos.

- ¿Sanos sin contacto con *Brucella*?
- ¿Expuestos asintomáticos?
- ¿Tratados curados?

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



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					Brucellosis in previous year and contacts	Other pathologies
	Primary Infection ²	Cured ³	Relapses ^{3,4}	Complications ⁵	Healthy		
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 3	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.

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 opositiva en el granuloma

DNA extraction kits (conventional PCR; spiked serum)



Table 2 Comparison of different DNA isolation methods from serum of healthy donors spiked with *B. melitensis* Rev 1 DNA¹

Extraction kit	Detection limit (fg) ²	DNA purity ³
Including Proteinase K		
UltraClean DNA BloodSpin	10 ² fg	1.76±0.23 (1.37–2.10)
NucleoSpin Tissue	10 ⁴ fg	1.57±0.29 (1.06–2.02)
High Pure PCR Template Preparation	10 ⁴ fg	1.52±0.14 (1.32–2.05)
QIAamp DNA Blood Mini	10 ² fg	1.30±0.22 (0.97–1.78)
No Proteinase K		
GFX™ Genomic Blood DNA Purification	10 ⁵ fg	1.32±0.26 (1.08–1.93)
Wizard Genomic DNA Purification	10 ⁵ fg	1.24±0.27 (0.92–1.69)
Puregene DNA Purification System	10 ⁶ fg	1.03±0.20 (0.84–1.58)

¹ Adapted from Queipo-Ortuño et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2008) 27:109–114.

² Femtograms producing a PCR-positive signal in at least 3 of 4 independent isolations.

³ Ratio 260/280 nm absorbance measured in a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. A 260/280 ratio of ~1.8 is generally accepted as “pure” for DNA.

- All protocols tested were simple and safe (no viable bacteria after extraction).
- The extraction methods that used proteinase K were the most efficient.
- Only the UltraClean kit provided “pure” DNA.

DNA extraction kits (*Brucellae* in PBS and RT-PCR)



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

Table 2. RT-PCR limit of detection for DNA recovered from *Brucella* spp. PBS suspensions using several DNA extraction methods.^a

Extraction method ^b	<i>B. abortus</i>			<i>B. melitensis</i>			<i>B. suis</i>		
	LOD ^b	B-PCR C _T	Ba-PCR C _T	LOD ^b	B-PCR C _T	Bm-PCR C _T	LOD ^b	B-PCR C _T	Bs-PCR C _T
Automated									
MagNA Pure Compact	10 ¹	34.1 ± 0.10	37.9 ± 1.33	10 ²	34.4 ± 0.62	36.9 ± 0.55	10 ²	27.9 ± 0.68	37.5 ± 0.69
MagNA Pure LC	10 ⁴	31.1 ± 0.92	34.2 ± 0.66	10 ³	31.2 ± 0.03	34.1 ± 0.58	10 ⁴	28.8 ± 0.75	39.0 ± 1.07
Manual									
IT 1-2-3	10 ³	31.9 ± 1.34	35.0 ± 0.97	10 ³	32.2 ± 0.81	33.9 ± 0.96	10 ³	31.0 ± 0.57	40.3 ± 0.15
MasterPure	≤10 ⁰	34.4 ± 0.15	39.5 ± 1.89	10 ¹	33.4 ± 0.21	36.8 ± 0.49	10 ¹	31.2 ± 0.25	39.7 ± 0.93
QIAamp	10 ³	35.9 ± 2.36	37.6 ± 0.88	10 ³	36.7 ± 0.55	38.8 ± 1.67	10 ³	31.4 ± 0.23	40.2 ± 0.71
UltraClean	10 ³	31.2 ± 0.72	35.8 ± 0.35	10 ²	32.2 ± 1.08	34.4 ± 1.26	10 ²	29.8 ± 0.26	40.1 ± 0.24

^a Adapted from Dauphin, et al 2009. J. Clin. Microbiol. 47:3920–3926. RT-PCR assay described by Hinic, et al. 2008. J. Microbiol. Methods 75:375–378.

^b LOD (limit of detection): lowest concentration (CFU/ml) for which three out of three replicates produced a positive result.

^c C_T values (mean ± SD) obtained with *Brucella* genus-specific (B-PCR IS711) and species-specific primers (*B. abortus*, Ba-PCR, BruAb2_0168; *B. melitensis*, Bm-PCR, BMEII0466; *B. suis*, Bs-PCR, BR0952) at the lowest concentration that produced a positive result (triplicate extractions [from 10⁶ to 10⁰ CFU/ml]).

- All protocols were safe (killed *Brucella* spp. at 10⁶ CFU/ ml).
- LODs vary depending on the extraction method.
- No uniform Ct values for the same probe (B-PCR) or different probes for different *Brucella* spp.
- DNA purity seems not critical: (no clear correlation A260/A280 ratios - Cts).
- DNA concentration may influence the results (MasterPure vs other kits).

DNA extraction kits (*Brucellae* in PBS and RT-PCR)



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

TABLE 4. Real-time PCR limit of detection of *B. melitensis* in spiked swabs made with different materials. ^a

Extraction method ^b	Limit of detection (CFU/ml [CFU/reaction]) ^c		
	Polyester	Polyurethane	Rayon
Automated			
MagNA Pure Compact	10 ⁴ (50)	10 ⁵ (500)	10 ⁴ (50)
Manual			
IT 1-2-3	10 ⁵ (500)	10 ⁵ (500)	10 ⁶ (5,000)
MasterPure	10 ⁴ (50)	10 ⁴ (50)	10 ⁵ (500)
QIAamp	10 ⁵ (500)	10 ⁶ (5,000)	10 ⁵ (500)
UltraClean	10 ⁵ (500)	10 ⁵ (500)	10 ⁴ (50)

^a Adapted from Dauphin, et al 2009. J. Clin. Microbiol. 47:3920–3926. RT-PCR assay described by Hinic, et al. 2008. J. Microbiol. Methods 75:375–378.

^b Performed on samples recovered from triplicate swabs spiked with 10-fold dilutions of *B. melitensis* at a starting concentration of 10⁷ CFU/ml.

^c Lowest CFU at which 3 out of 3 replicates produced a positive result.

- Samples taken with swabs (no matter the swab material) drastically reduce the limit of detection.

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

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

Reference ²	Method	Specimen ³	No. positive / total No.	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.

Q-PCR studies: Debeaumont et al. 2005.



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

Results of Q-PCR, serum agglutination (SAT) and *Brucella* immunofluorescence (IFA) in culture-positive brucellosis patients.¹

Patient	<i>Brucella</i> spp. isolated	RT-PCR (genome copies in 5 µl DNA extract) ^{2,3}	SAT titer	IFA titer	
				IgM	IgG
1	<i>B. melitensis</i> bv3	Positive (48)	>2560	2560	1280
2	<i>B. abortus</i> bv3	Positive (25)	ND	640	640
3	<i>B. melitensis</i> bv3	Positive (82)	80	20	20
4	<i>B. melitensis</i> bv2	Positive (183)	640	320	80
5	<i>B. melitensis</i> bv3	Positive (36)	1280	640	640
6	<i>B. melitensis</i> bv3	Positive (32)	ND	ND	ND
7	<i>B. melitensis</i> bv3	Positive (58)	160	160	640
8	<i>B. abortus</i> bv3	Positive (44)	40	20	80
9	<i>B. melitensis</i> bv2	Positive (650)	640	640	640
10	<i>B. suis</i> bv2	Positive (8)	1,280	1,280	160
11	<i>B. melitensis</i> bv1	Positive (256)	1,280	>1,280	160
12	<i>B. melitensis</i> bv3	Negative	320	160	160
13	<i>B. melitensis</i> bv3	Negative	320	160	160
14	<i>B. abortus</i> bv3	Negative	320	<20	160
15	<i>B. melitensis</i> bv3	Negative	1,280	<20	1,280
16	<i>B. melitensis</i> bv3	Negative	20	20	80
17	<i>B. melitensis</i> bv3	Negative	<20	<20	320

¹ Adapted from Debeaumont, et al 2005. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24: 842-845.

² DNA from 200 µl of serum extracted with a QIAamp DNA Mini Kit; 169 bp *bcspp31* primers; Light Cycler instrument and Fast Start Master Hybridization Probes reaction mix. Assuming a molecular mass for the *B. melitensis* genome of approximately 3 fg of DNA, the analytical sensitivity (in sterile water) was 7 genome copies. The analytical specificity was 100% (tested directly using DNA extracted from bacterial cultures, including *O. anthropi*).

³ Specificity 100% in sera from 30 blood donors, patients with lupus erythematosus, (n 5) or infections with Epstein Barr virus (n 5), cytomegalovirus, *Coxiella burnetii* infection (n 5), *Borrelia burgdorferi* (n 5) or *Bartonella henselae* (n 5).

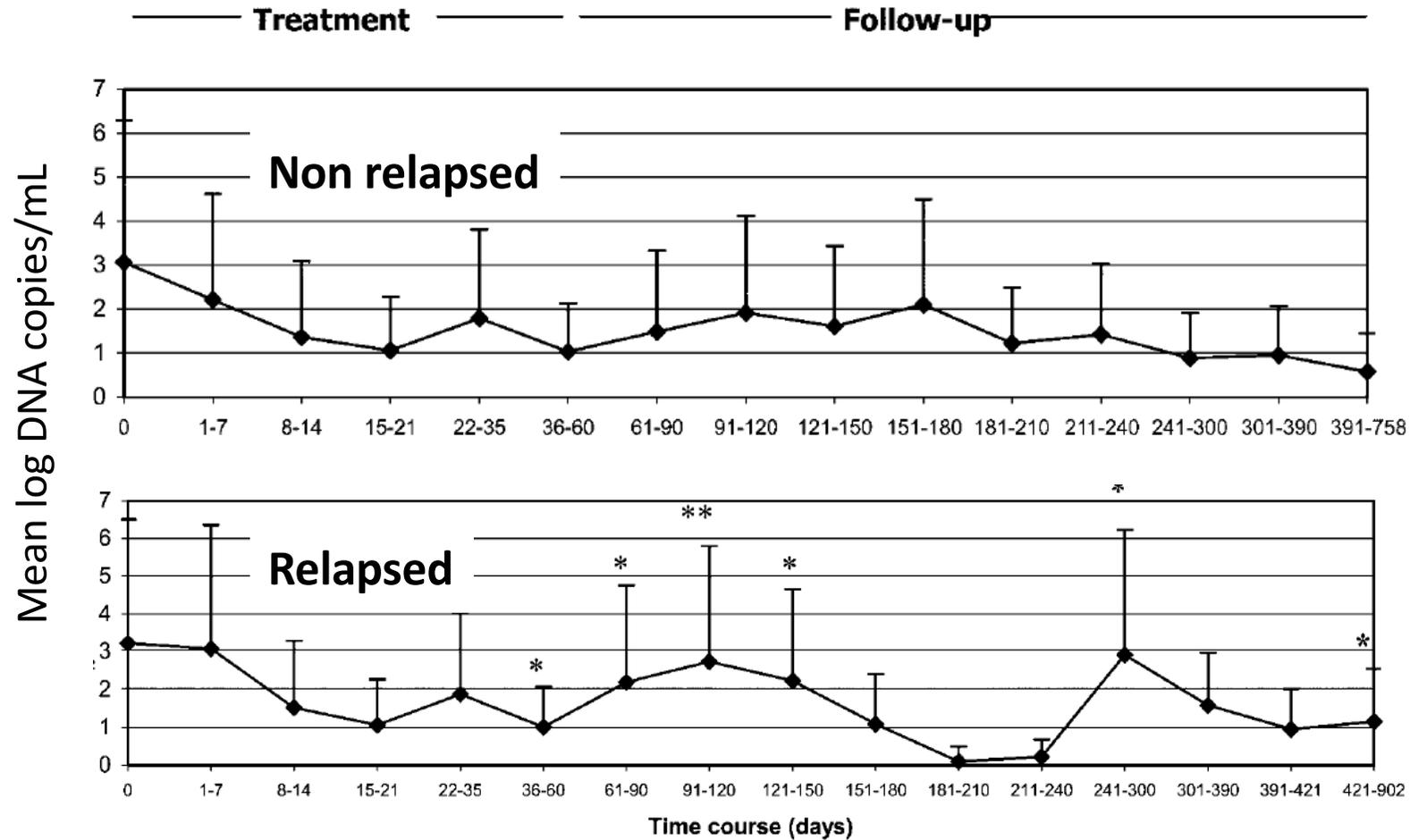
Brucella DNA load in blood of relapsed and non-relapsed patients. ¹

Treatment and outcome after therapy ²	N° of patients Q-PCR for <i>B. melitensis</i> DNA ³		
	Before therapy	After therapy	
		Positive	Negative
Monotherapy			
Relapsed	3	2	1
No relapsed	4	3	1
Combination therapy			
Relapsed	3	0	3
No relapsed	7	4	3

¹ Data are from Navarro, et al 2006. *Clin. Infect. Dis.* 42: 1266-1273.

² Monotherapy: Doxycycline; combined therapy: doxycycline plus rifampin or gentamycin or streptomycin.

³ UltraClean DNA-BloodSpin kit; 251 bp spanning *B. melitensis* genome and IS711, Light Cycler Q-PCR. Analytical sensitivity: 1 genome copy (assuming 1 genome contains 10–15 fg of DNA); analytical specificity 100% (including *O. anthropi* and *O. intermedium*); DSp: 100% (30 healthy blood donors).



Evolution of *B. melitensis* DNA load in non relapsed and relapsed patients during treatment and post-therapy (bar, standard deviation)

Test results at admission.

Test	N° positives / N° tested
Q-PCR ¹	39 / 39
Culture ²	13 / 24
SAT (cut-off?)	36 / 39
RBT ³	37 / 39
ELISA IgG + IgM ⁴	39 / 39

¹ DNA extracted from whole blood (200 µL) with the QIAamp DNA Blood Mini Kit; 207 bp *bcs*p31 probe. LightCycler Red 640 and FastStart DNA Hybridization Probes kit. Analytical sensitivity: 10 copies/5 mL (diluent?) (Ct < 37 threshold). Specificity 100% in 50 blood donors.

² BacT/Alert for up to 20 days. Sample volume, no. samples/patient and pyretic status not described.

³ Scored from 2+ to 4+.

⁴ Serion ELISA Classic Brucella IgG/IgM/IgA (cut-off recommended by manufacturer; specificity not stated)

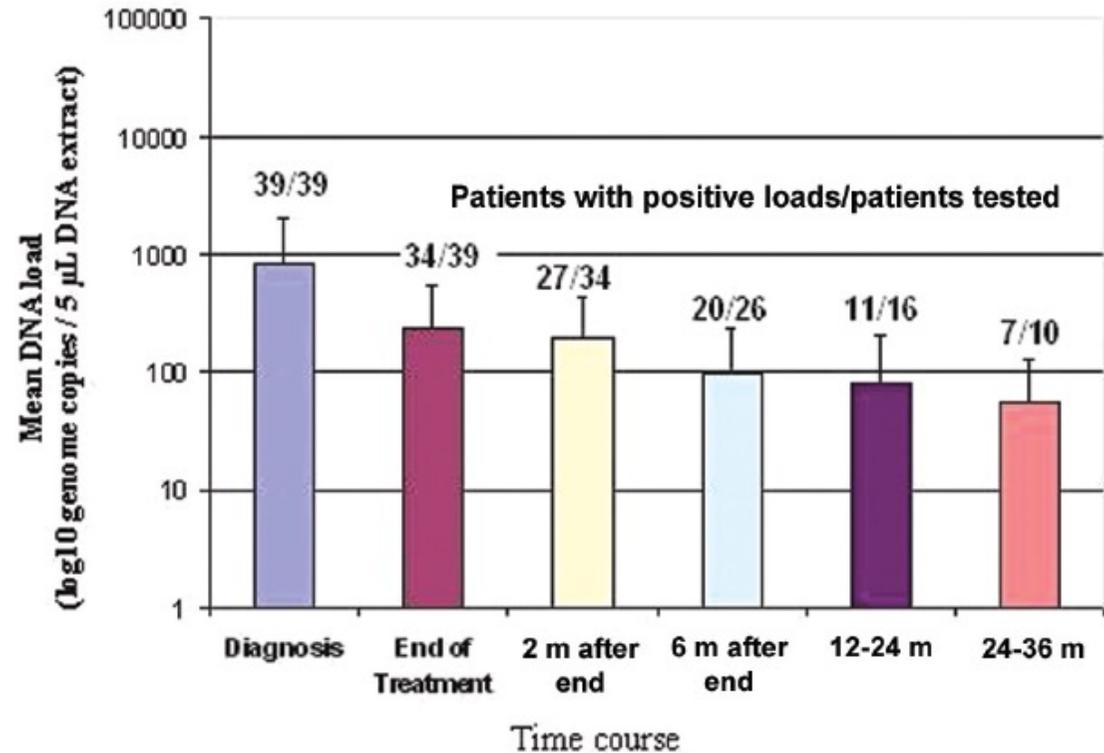


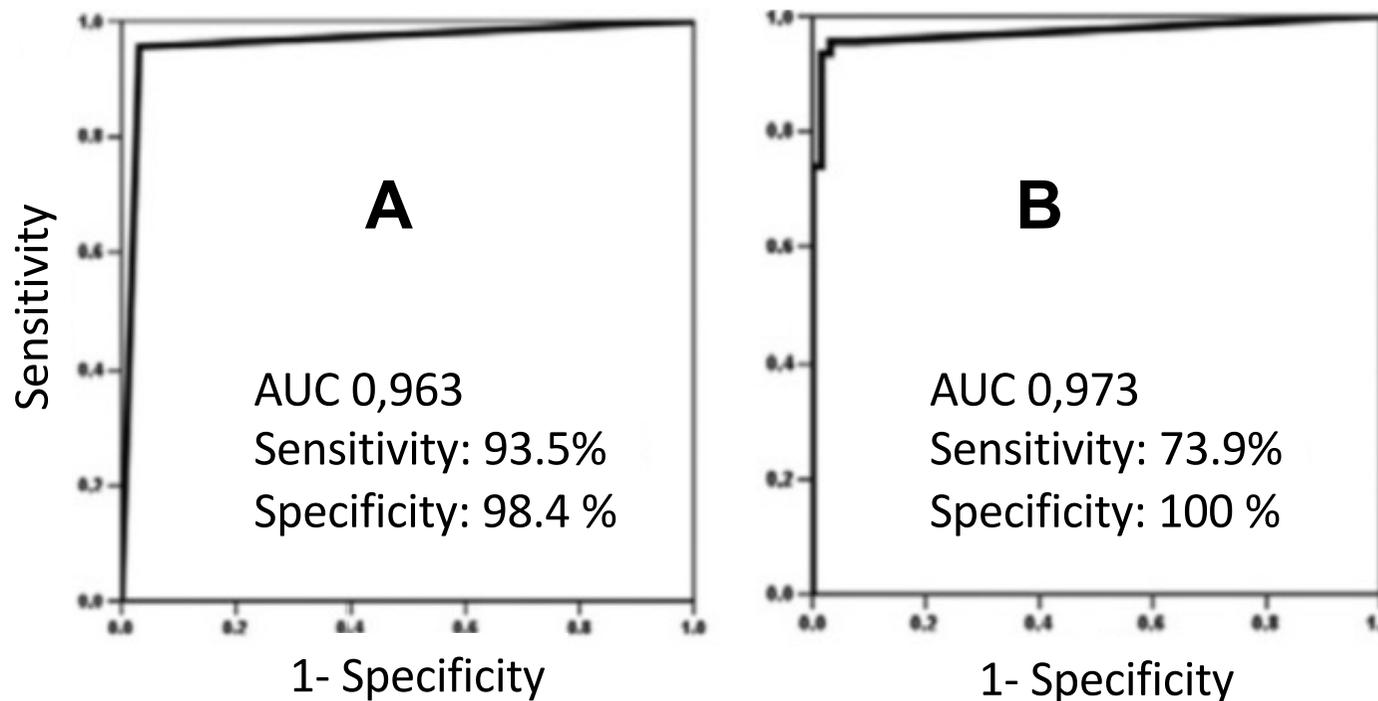
Figure 1. Evolution of *Brucella melitensis* DNA load at initial diagnosis and during the follow-up period. m, Months.

Q-PCR in serum to discriminate inactive, serologically positive and active brucellosis ¹

Group	No.	Q-PCR positives	Comments
Brucellosis patients	46	44	5 patients (10.8%) negative in both SAT and Brucellacapt. The 2 false negatives were blood culture positive; serology not described
Previous brucellosis history	36	0	Asymptomatic; serology no described
Post-treatment			
2–4 months	5	4	Serology no described
4–6 months	5	0	Serology no described
6–24 months	13	0	Serology no described
Exposed to <i>Brucella</i>			
Occasional	12	0	Asymptomatic; from families with cases after consuming unpasteurized cheese/milk; serology no described.
Veterinarians	3	1	“Persistent” (tests and titers not reported) serology; self-limiting symptoms for 10 days, blood culture negative; 2 Q-PCR during next 12 months negative.
abattoir workers	2		“Persistent” (tests and titers not reported) serology.
Other febrile conditions	11	0	Cytomegalovirus and Epstein–Barr infections, tuberculous osteomyelitis, HIV, microscopic polyangitis, giant cell arteritis, HLA B-27-positive ankylosing spondylitis.

¹ Data are from Queipo-Ortuño, et al. 2008. *Clin. Microbiol. Infect.* 14: 1128-1134.

² DNA in 200 µl (Ultra-Clean DNA-BloodSpin Kit); *bcsp31* primers. LightCycler Q-PCR (labelled TaqMan plus quencher). Analytical sensitivity $1 \cdot 10^1$ fg of *Brucella* DNA. Mean threshold Cp for brucellosis patients 31.8 ± 1.7 and controls 35.4 ± 1.1 (negative Cp > 45 cycles). ROC in next slide.



Receiver operating characteristic curves (ROC) for testing the ability of the LC Q-PCR to distinguish active from inactive brucellosis.

(A) Considering a cut-off of $5 \cdot 10^3$ copies / mL.

(B) Considering a cut-off of $2.2 \cdot 10^5$ copies /mL.

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.

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

"we agree with Bastien et al. [69], who advised that *"before following the fashionable trend of switching from conventional PCR to a quantitative real-time PCR, one should carefully consider the pros and cons of the amplification formats"*

Estudios diagnósticos de detección de ácidos nucleicos desde la revisión de Yagupski et al 2019



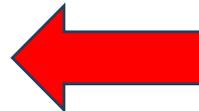
Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

No total: 8 / No. defectuosos (inconcluyentes): 8

Problema	Nº con el problema indicado ^{1, 2}
1. Material y Métodos (definición de pacientes, pruebas serológicas, etc.) y/o Resultados incompletos o confusos	6
2. Sin controles negativos adecuados o realizados con muestras aleatorias	5
3. Muestras histológicas (escasa/ninguna relevancia diagnóstica)	1
4. Serología errónea (en definición de caso y/o en diagnóstico) y/o resultados sin coherencia interna	6
5. Nueva técnica (“piwi-interacting RNAs” y “droplet digital PCR”) de complejidad y costos desmedidos (y deficientes en 1, 2 y 4)	3

¹ Lista de trabajos en Material Complementario

² Todos tienen más de un problema



Conclusión: investigaciones sin clínicos competentes en la enfermedad realizados por personas que no entienden el diagnóstico de laboratorio.

PREGUNTAS	RESPUESTAS
Generales ¿Estandarización? ¿Implementación?	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. 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 complementario

Identificación de colonias aisladas (1)

Presuntiva

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

Confirmación

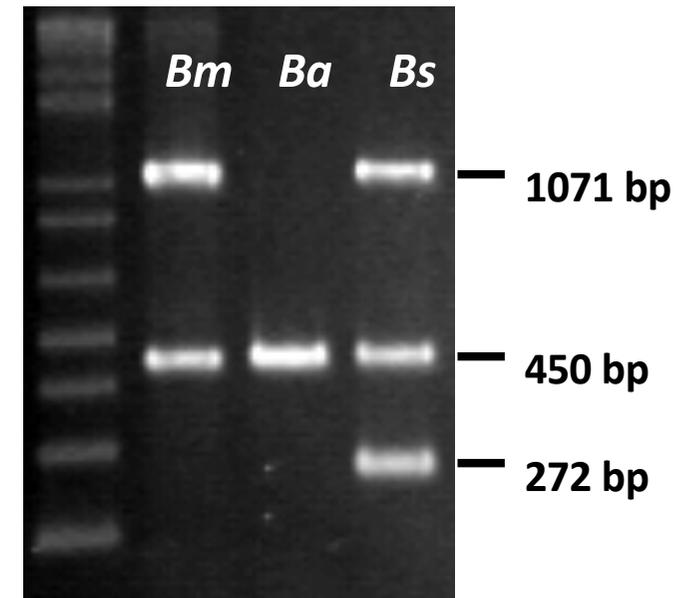
- Bruceladder (o semejante).
- Laboratorio de referencia.

Vacunas

PCR específica y/o:

- S19. Lisa (S), eritritol-sensible
- Rev 1. Lisa (S), estreptomycin-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

BMEI0535f/0536r

BMEII0843f/0844r

BMEI1436f/1435r

BMEII0428f/0428r

BR0953f/0953r

BMEI0752f/0752r

BMEII0987f/0987rv



Dos graves problemas en la nomenclatura

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. Comercí, 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. Keriél, 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-Villalónos, 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.

Estudios diagnósticos de detección de ácidos nucleicos desde la revisión de Yagupski et al 2019



Facultad de Medicina
Universidad de Navarra

Material y Métodos (definición de los pacientes, pruebas serológicas, etc.) y/o resultados incompletos o confusos

- Adabi M, Karami M, Keramat F, Alikhani MY, Bakhtiari S (2021) Serological and molecular investigation of human brucellosis in participants of famenin brucellosis cohort study, hamadan, iran. *Iran J Microbiol* 13(3):319–324.
- Wang C et al. (2022) Increased serum piwi-interacting RNAs as a novel potential diagnostic tool for brucellosis. *Front Cell Infect Microbiol* 12:992775.
- Liu X et al. (2023) Comparative application of droplet-based digital and quantitative real-time PCR for human brucellosis detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 107(4):116087.
- Liu J et al. (2023) Development and evaluation of a droplet digital PCR assay to detect *Brucella* in human whole blood. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 17(6):e0011367.
- Waringa NMA et al. (2023) Human brucellosis in Baringo County, Kenya: Evaluating the diagnostic kits used and identifying infecting *Brucella* species. *Plos One* 18(1):e0269831. doi 10.1371/journal.pone.0269831.
- Wang C et al. (2022) Increased serum piwi-interacting RNAs as a novel potential diagnostic tool for brucellosis. *Front Cell Infect Microbiol* 12:992775.

Sin controles clínicos negativos adecuados o realizados con muestras aleatorias

- Becker GN, Tuon FF (2021) Comparative study of IS711 and bcp31-based polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of human brucellosis in whole blood and serum samples. *J Microbiol Methods* 183:106182.
- Wang C et al. (2022) Increased serum piwi-interacting RNAs as a novel potential diagnostic tool for brucellosis. *Front Cell Infect Microbiol* 12:992775.
- Alqaseer K, Al-Khafajy AAM, Almkhadree EAK (2023) Serological and Molecular Detection of Human Brucellosis in Rural Areas in Wasit Province, Iraq. *Arch Razi Inst* 78(1):369–378.
- Liu J et al. (2023) Development and evaluation of a droplet digital PCR assay to detect *Brucella* in human whole blood. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 17(6):e0011367.
- Liu X et al. (2023) Comparative application of droplet-based digital and quantitative real-time PCR for human brucellosis detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 107(4):116087.

Serología errónea (en definición de caso y/o en diagnóstico) y/o resultados sin coherencia interna

- Li M et al. (2018) Real-time PCR assays for diagnosing brucellar spondylitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Medicine (Baltimore)* 97(9):e0062.
- Adabi M, Karami M, Keramat F, Alikhani MY, Bakhtiari S (2021) Serological and molecular investigation of human brucellosis in participants of famenin brucellosis cohort study, Hamadan, Iran. *Iran J Microbiol* 13(3):319–324.
- Becker GN, Tuon FF (2021) Comparative study of IS711 and bcp31-based polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of human brucellosis in whole blood and serum samples. *J Microbiol Methods* 183:106182.
- Alqaseer K, Al-Khafajy AAM, Almkhadree EAK (2023) Serological and molecular detection of human brucellosis in rural areas in Wasit Province, Iraq. *Arch Razi Inst* 78(1):369–378.
- Liu X et al. (2023) Comparative application of droplet-based digital and quantitative real-time PCR for human brucellosis detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 107(4):116087.
- Liu J et al. (2023) Development and evaluation of a droplet digital PCR assay to detect *Brucella* in human whole blood. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 17(6):e0011367.

Nueva técnica (no contrastada) con costos desmedidos (droplet digital PCR)

- Wang C et al. (2022) Increased serum piwi-interacting RNAs as a novel potential diagnostic tool for brucellosis. *Front Cell Infect Microbiol* 12:992775.
- Liu J et al. (2023) Development and evaluation of a droplet digital PCR assay to detect *Brucella* in human whole blood. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 17(6):e0011367.
- Liu X et al. (2023) Comparative application of droplet-based digital and quantitative real-time PCR for human brucellosis detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 107(4):116087.

Muestras histológicas

- Li M et al. (2018) Real-time PCR assays for diagnosing brucellar spondylitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Medicine (Baltimore)* 97(9):e0062.