

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE
LA BRUCELOSIS HUMANA EN EL
ESTADO DE NUEVO LEÓN**

POR

MAGDA CELINA NAVARRO SOTO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

MAYO, 2017

ESTUDIO DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO
DE LA BRUCELOSIS HUMANA EN EL
ESTADO DE NUEVO LEÓN

Comité de Tesis



Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Presidente

Dr Moisés Franco Molina
Secretario

Dra Patricia Tamez Guerra
Vocal

Dr. Edgar Mendoza
Vocal

ESTUDIO DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO
DE LA BRUCELOSIS HUMANA EN EL
ESTADO DE NUEVO LEÓN

Dirección de Tesis



Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Director



Carlos Ramírez Pfeiffer
Director externo

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, el **Dr. Ricardo A. Gómez Flores** y el **Dr. Carlos Ramírez Pfeiffer**, quienes me brindaron su confianza al poner en mis manos la elaboración de este proyecto.

A la **Facultad de Ciencias Biológicas** de la UANL, especialmente a los docentes del Departamento de Inmunología y Virología quienes acrecentaron con sus cátedras mi interés por la Ciencia.

A mi **Comité de Tesis**, quienes con sus acertados comentarios me ayudaron a llevar a buen término esta investigación.

Al personal del **Laboratorio de Inmunología y Acarreadores de Drogas y de la Unidad de Formulación de Biológicos** y a sus tesis de posgrado quienes, a pesar de las dificultades, dieron el toque alegre y de compañerismo a lo largo de este período.

Al **Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León** y al personal encargado del Laboratorio de Brucelosis, en especial a la Química Gaby López, por su asesoría e incondicional colaboración en este proyecto.

Al **Dr. José Ramírez Aranda**, Coordinador de Investigación Operativa SSNL, por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A **VIGASA S.A. de C.V.** empresa comprometida con la sociedad y la ciencia, por el apoyo financiero otorgado, sin cual no hubiera hecho posible este sueño.

A **CONACYT** por haberme otorgado la beca que financió los estudios que me llevaron a la obtención del grado de Doctora en Ciencias con acentuación en Inmunobiología.

DEDICATORIAS

A MI ESPOSO

Que con su amor incondicional fue mi balance y apoyo en todos los retos que se presentaron durante este proyecto.

A MIS PADRES

Por sus sabias enseñanzas de vida que me llevaron a continuar superándome para lograr ser una persona cada día mejor y útil a la sociedad.

A MIS HERMANOS Y HERMANAS

Que con su ejemplo han sabido demostrar que en esta vida con esfuerzo y dedicación todo se puede lograr.

A MI NÉMESIS

Buena batalla, pero aún no acabamos...

También esto viene de Yahvé Sebaot: un plan admirable, magnífico, con éxito. (Is 28,29).

ÍNDICE

Sección	Pág.
PÁGINA DE TÍTULO.....	i
APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE TESIS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Historia de la brucelosis.....	3
2.2. Importancia de la brucelosis.....	3
2.3. Etiología.....	4
2.4. Transmisión.....	5
2.5. Cuadro clínico.....	6
2.6. Respuesta inmune a brucelosis.....	6
2.7. Diagnóstico de brucelosis.....	7
2.7.1. Métodos clínico y epidemiológico.....	8
2.7.2. Métodos de laboratorio.....	8
2.7.2.1. Diagnóstico bacteriológico.....	8
2.7.2.2. Diagnóstico inmunológico.....	9
2.7.2.2.1. La prueba lenta en tubo o de Wright (SAT).....	9
2.7.2.2.2. La prueba Rosa de Bengala (RB).....	10

2.7.2.2.3.	La prueba 2-Mercaptoetanol (2ME).....	10
2.7.2.2.4.	Prueba de Coombs.....	11
2.7.2.3.	Pruebas modernas.....	11
2.7.2.3.1.	Prueba de fluorescencia polarizada (FPA).....	11
2.7.2.3.2.	Inmunocaptura (IC).....	12
2.7.2.4.	Pruebas moleculares.....	12
2.7.2.4.1.	PCR múltiplex.....	12
2.7.2.5.	Desventajas de las pruebas convencionales.....	13
3.	JUSTIFICACIÓN.....	14
4.	HIPÓTESIS.....	15
5.	OBJETIVOS.....	16
5.1.	Objetivos	16
particulares.....		
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
6.1.	Material biológico.....	17
6.2.	Realización de las pruebas serológicas modernas.....	18
6.2.1.	Prueba de fluorescencia	18
polarizada.....		19
6.2.2.	Inmunocaptura.....	
7.	RESULTADOS.....	20
7.1.	Capacidad de las pruebas modernas (FPA e IC) para detectar la presencia de anticuerpos indicadores de brucelosis en muestras de suero sanguíneo de humanos.....	20
7.1.1.	FPA en grupos control.....	20
7.1.2.	FPA con grupos NOM.....	21

7.1.3. FPA con grupos de enfermedad inicial y con grupos de enfermedad crónica.....	22 24
7.1.4. Inmunocaptura con grupos NOM.....	
7.1.5. Inmunocaptura con grupos de enfermedad inicial y con grupos de enfermedad crónica.....	25
8. DISCUSION.....	28
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Análisis ROC mostrando el AUC de 0.960 (95% IC 0.923-0.983). El punto de corte se localizó en 88.8 mP.....	21
2. Análisis ROC mostrando el 0.897 (95% CI 0.864- 0.924; SE 0.0174). El punto de corte se localizó en 90.9 mP.....	22
3. Análisis ROC del grupo de enfermedad crónica mostrando el 0.897 (95% CI 0.864- 0.924; SE 0.0174).....	23
4. Análisis ROC del grupo de enfermedad aguda mostrando el 0.789 (95% CI 0.747-827; SE 0.0461).....	24
5. Análisis ROC mostrando el AUC de 0.582 (95% CI 0.492- 0.669; SE 0.103). El punto de corte se localizó en >360 de titulación.....	25
6. Análisis ROC de inmunocaptura con grupo de enfermedad crónica, mostrando el 0.549 (95% CI 0.488- 0.610; SE 0.0899).....	26
7. Análisis ROC de la prueba de inmunocaptura con grupo de enfermedad aguda mostrando el 0.555 (95% CI 0.493-0.615; SE 0.403).....	27

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

μL	Microlitros
2-ME	2-mercaptoetanol
AUC	Área bajo la curva
CDC	Control Disease Center
CETS	Centro Estatal de Transfusión Sanguínea
CO ₂	Dióxido de Carbono
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Inmunoensayo enzimático
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPA	Fluorescence polarization assay
IC	Inmunocaptura
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
LESPNL	Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León

LPS	Lipopolisacárido
mP	milipolarizaciones
NOM	Norma Oficial Mexicana
OIE	World Organization for Animal Health
O-LPS	Cadena O del lipopolisacárido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
RB	Rosa de Bengala
ROC	Receiver Operating Characteristics
SAT	Aglutinación estándar en microplaca
Sn	Sensibilidad
Sp	Especificidad
SSA	Secretaría de Salud
T CD4+	Linfocitos T CD4+
T CD8+	Linfocitos T CD8+
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Linfocitos T con subtipo Th1
Th2	Linfocitos T con subtipo Th2

RESUMEN

La brucelosis es la zoonosis bacteriana que comúnmente afecta al ser humano y es endémica en muchos países en desarrollo, entre ellos México. Sin embargo, el mecanismo de patogénesis de esta enfermedad es complejo y no del todo comprendido; *Brucella* sp. no sólo resiste la destrucción por los macrófagos, sino que también prolifera en su interior. A pesar de la producción significativa de las citocinas Th1 protectoras, IL-12, IFN- γ y TNF- α , el mecanismo de los macrófagos para eliminar a la *Brucella* parece ser defectuoso, dado que este efecto podría ser anulado por la acción de las citocinas IL-6, IL-10 y TGF- β , lo que podría conducir a la infección persistente de los casos crónicos. El objetivo del presente estudio se centró en la evaluación diagnóstica de la brucelosis humana en Nuevo León, mediante la detección de anticuerpos anti-brucela con las pruebas de diagnóstico de fluorescencia polarizada (FPA), inmunocaptura (IC) y la comparación de sus resultados con las pruebas convencionales autorizadas por la Norma Oficial. Las pruebas diagnósticas De los resultados, la FPA obtuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 88.24% a un punto de corte de 88.4, aunado al AUC de 0.960 que demuestra la pertinencia de este ensayo para distinguir pacientes sanos de enfermos. Sin embargo, no se lograron resultados satisfactorios para la prueba de Inmunocaptura que mostró un AUC de 0.582 (95% CI 0.492- 0.669; SE 0.103). El punto de corte se seleccionó en un título mayor o igual a 320. En este valor de corte, la sensibilidad se sitúa baja en 20% (95% CI 2.5-55.6) y la especificidad alcanza el 100% (95% CI 96.9-100.0). Con ello, se hace necesario dilucidar los factores que pudieron influir en el desempeño de cada una de las pruebas con el fin de mejorar su eficacia.

ABSTRACT

Brucellosis is the bacterial zoonosis that commonly affects humans and is endemic in many developing countries, including Mexico. However, the mechanism of pathogenesis of this disease is complex and not entirely understood; *Brucella* sp. not only resists the destruction by the macrophages, but also proliferates in its interior. Despite the significant production of the protective Th1 cytokines, IL-12, IFN- γ and TNF- α , the mechanism of macrophages to remove *Brucella* appears to be defective, since this effect could be negated by the action of cytokines (IL-6, IL-10 and TGF- β), which could lead to persistent infection of chronic cases. The objective of the present study was to evaluate the diagnosis of human brucellosis in Nuevo Leon by detecting anti-brucella antibodies with polarized fluorescence (FPA), immunocapture (IC) diagnostic tests and comparing their results with the conventional tests authorized by the NOM. Of the results, obtained, FPA had a sensitivity of 100% and a specificity of 88.24% to a cutoff point of 88.4, coupled with the AUC of 0.960 which demonstrates the relevance of this assay to distinguish healthy patients from sick. However, satisfactory results were not obtained for the Immunocapture test which showed an AUC of 0.582 (95% CI 0.492- 0.669; SE 0.103). The cut-off point was selected in a titre greater than or equal to 320. At this cut-off value, the sensitivity was set to 20% (95% CI 2.5-55.6) and the specificity reached 100% (95% CI 96.9- 100.0). With this, it is necessary to elucidate the factors that could influence the performance of each of the tests in order to improve their effectiveness.

1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es la zoonosis bacteriana que afecta con más frecuencia al humano, causando serios problemas de salud y grandes pérdidas económicas tanto a nivel de salud pública como pecuaria. Se encuentra ampliamente distribuida en casi todo el mundo y México se considera uno de los países con mayor prevalencia de América Latina. La enfermedad es producida por diversas especies del género *Brucella*, las consideradas clásicas son *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae*. De éstas, todas excepto *B. ovis* y *B. neotomae* afectan al hombre siendo la más virulenta y la que más frecuentemente se encuentra en casos clínicos en México la especie *B. melitensis*.

A pesar de que el género *Brucella* ha sido bastante estudiado desde que se descubrió como agente causal de enfermedad multisistémica, la patogenia es aún poco entendida debido a su complejidad derivada de la habilidad del microorganismo de sobrevivir intracelularmente en el sistema retículoendotelial. Se sabe que la brucelosis causa una respuesta inmune de tipo Th1 en su fase aguda, pero a pesar de ello, este efecto protector puede ser anulado por la acción de citocinas como la IL-6, IL-10 y TGF- β lo que podría evitar su eliminación del organismo y conducirla hacia una fase crónica, dificultando así también la capacidad de la terapia antibiótica para erradicarla completamente y manteniéndola como una infección persistente por años, deteriorando de manera importante la calidad de vida de las personas que la padecen.

La naturaleza de ésta enfermedad complica incluso su adecuado diagnóstico mediante los métodos serológicos convencionales, pues los resultados de estas pruebas son en general cuestionables debido a la variación en la sensibilidad y especificidad en pacientes con primoinfección y en aquellos con infecciones crónicas, recurrentes o asintomáticas, lo que mantiene como factor de riesgo el uso de sangre de donadores provenientes de zonas endémicas, como lo es el Estado de Nuevo León, del cual a ciencia cierta no se conoce su estatus epidemiológico actual. Entonces, se considera de gran importancia evaluar la capacidad de las pruebas diagnósticas aprobadas por la NOM-022-SSA2-1994, así como las de fluorescencia polarizada (FPA) e inmunocaptura (IC) para detectar eficientemente a los pacientes que cursen con esta

enfermedad en cualquiera de sus etapas y darle así al médico una adecuada herramienta que le permita lograr un óptimo seguimiento de la terapia antibiótica necesaria para la resolución del padecimiento de manera eficiente.

En este trabajo, mediante el análisis de los resultados de las pruebas convencionales aprobadas por la NOM que realiza el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Nuevo León y el análisis de los mismos sueros mediante FPA e IC se obtuvieron las sensibilidad, especificidad y pertinencia diagnóstica de cada una de las pruebas serológicas con el fin de conocer las mejores para detectar anticuerpos antibrucela en las diferentes etapas de la enfermedad.

2. ANTECEDENTES

2.1. Historia de la brucelosis

La brucelosis es una enfermedad que se conoce en el mediterráneo desde épocas antiguas (Godfroid *et al.*, 2005); en la Biblia existen referencias de abortos en cabras y ovejas (Kolar, 1987). Sir David Bruce, en 1887 aisló el bacilo a partir del hígado de un soldado británico muerto por la enfermedad en la isla de Malta, por lo que lo nombró *Micrococcus melitensis* como reconocimiento al nombre de la isla; después, Zammit (1905) descubrió la naturaleza zoonótica de la enfermedad al aislar la bacteria, que se renombró como *Brucella melitensis* de leche de cabras en la misma isla. La enfermedad en el humano, se conoce como fiebre de Malta o fiebre del Mediterráneo, cuando es causada por *B. melitensis* y como fiebre ondulante o fiebre de Bang (Acha y Szyfres, 1980), al ser causada por *B. abortus*; dichos nombres hacen énfasis a la fiebre, principal signo clínico de la enfermedad.

2.2. Importancia de la brucelosis

En la ganadería, el género *Brucella* tiene importancia mundial debido a las pérdidas elevadas que ocasiona por abortos, infertilidad, baja de la producción láctea e interrupción de los programas genéticos, entre otros (Alton *et al.*, 1988; Crawford *et al.*, 1990; OIE 2000 a, b; OIE 2004 a, b). De todas las especies, *B. melitensis* se considera la más invasiva y patógena de las especies (Kolar, 1987) y el de mayor distribución en el mundo (Álvarez, 2001), seguido por *Brucella abortus* y *Brucella suis*. Los reportes de casos en especies marinas han abierto el panorama del ciclo de vida de *Brucella* (Godfroid *et al.*, 2005), de su importancia como zoonosis, en la que anteriormente se había considerado ya a la fauna silvestre terrestre (Godfroid, 2002). Estas especies de *Brucella* se han denominado provisionalmente en base a la preferencia de hospederos como *B. pinnipediae* (que afecta preferentemente a pinípedos) y *B. cetaceae* (que afecta principalmente a cetáceos) (Godfroid *et al.*, 2005).

Debido a que los métodos de producción de armas biológicas y los métodos de dispersión comerciales pueden ser adaptados a estas bacterias (Kaupfmann, 1997), el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) las considera en la categoría “B” (*Center for Disease Control*, 2002), la segunda más alta de agentes utilizables en bioterrorismo; también el Acta de Protección al Bioterrorismo en la Agricultura de los Estados Unidos los considera como agentes restringidos (*Animal and Plant Inspection Health Services*, 2002). Se ha considerado que en un modelo teórico de ataque con bioterrorismo y la ausencia de un programa de intervención para 100,000 personas expuestas, una nube de *B. melitensis* podría causar 82,500 casos de brucelosis que requerirían de terapia extensa, con 413 muertes, con un costo de 477 millones de dólares (Kaupfmann, 1997).

La Organización Mundial de la Salud (Godfroid *et al.*, 2005) ha establecido que “*la brucelosis es la zoonosis más diseminada, y que aparte de su cuota en las personas, tiene un impacto económico enorme en la industria animal*”. La brucelosis es una zoonosis bacteriana que afecta con más frecuencia al ser humano, con aproximadamente 500,000 casos anuales en el mundo. México, Argentina y Perú se consideran los países con mayor prevalencia de América Latina. Aunque es una enfermedad de reporte obligatorio, se estima que la incidencia real puede ser hasta 26 veces mayor que la reportada oficialmente (Sbrilgio *et al.*, 2007).

En México, la brucelosis es una enfermedad de reporte obligatorio. En 2011, las Secretaría de Salud reportó que los estados que presentaron la mayor incidencia de casos son: Sinaloa con 21.0 casos por 100 000 habitantes, seguido por Tlaxcala con 14.3, San Luis Potosí 12.6, Guanajuato 8.2, Zacatecas 7.0, Nuevo León 5.5, Michoacán 5.1, Puebla 4.6, Chihuahua 4.5 y Coahuila 4.4 casos por 100 000 habitantes. En 2014, la misma institución reportó 2534 casos nuevos a nivel nacional.

2.3. Etiología

Las bacterias del género *Brucella* pertenecen al grupo de α -proteobacterias, como muchas otras bacterias que viven en asociación cercana con hospederos eucarióticos. La subdivisión alfa de Protobacterias (bacterias color púrpura) (Moreno *et al.*, 1990), tiene

relevancia biológica fundamental debido a que no sólo contiene bacterias de vida libre (*Rhodobacter* y *Caulobacter*), sino que otros miembros muestran diversas asociaciones con organismos eucarióticos. Considerando la tendencia de este grupo a formar asociaciones cercanas e intracelulares, no es sorprendente que sean capaces de haber desarrollado un sistema que les permita manipular a los procesos celulares de sus hospederos (Dricot *et al.*, 2004).

El género *Brucella* está compuesto por seis especies que infectan a diversas especies animales; su clasificación actual se basa principalmente en diferencias en la patogenicidad y preferencias de hospedero (Corbel y Brinley-Morgan, 1976; Clokaert, 2001). *B. abortus* afecta principalmente a bovinos; *B. melitensis* a cabras y ovinos; *B. suis* afecta a cerdos, *B. canis* afecta a perros, *B. ovis* afecta a ovinos y *B. neotomae* afecta a ratas del desierto. En 1994 se publicaron los primeros reportes de casos de brucelosis en focas (*Phocoenavitulina*), marsopa común (*Phocoenaphocoena*) y delfines comunes (*Delphinus delphis*) en la costa de Escocia (Ross *et al.*, 1994), así como en fetos abortados de delfín nariz de botella (*Tursiopstruncatus*) en California (Ewalt *et al.*, 1994); lo que ha abierto el panorama del ciclo de vida de *Brucella*, así como de su importancia como zoonosis (Godfroid *et al.*, 2005). Estas especies de *Brucella* se han denominado provisionalmente en base a la preferencia de hospederos como *B. pinnipediae* (que afecta preferentemente a pinípedos) y *B. cetaceae* (que afecta principalmente a cetáceos) (Godfroid *et al.*, 2005).

2.4. Transmisión

Los hospederos animales, excretan bacterias junto con los tejidos y otros productos del aborto, así como excreciones genitales que contaminan los sitios donde se encuentran, pernoctan o abrevan, contaminando el suelo, los traspatios, corrales, la paja de las camas, el agua de arroyos, canales y pozos y también la excretan en la leche, por lo que se consideran cuatro formas de transmisión de la brucelosis de la bacteria al humano: a) exposición ocupacional, b) contacto con ambientes y consumo de alimentos contaminados, c) exposición en laboratorios (Luigi *et al.*, 2000) y d) menos

frecuentemente la transmisión de persona a persona, ya que aunque se considera un huésped terminal, hay casos reportados de infección por transfusiones de sangre o de un trasplante de tejido y el que representa un riesgo mayor es el de médula ósea. (Gotuza *et al.*, 2000).

2.5. Cuadro clínico

La enfermedad tiene un modo de presentación aguda en la mitad de los casos, mientras que en la otra mitad de los pacientes infectados el cuadro clínico es insidioso con signos y síntomas inespecíficos. Así mismo, la gravedad con que se presenta la infección va a depender del hospedero, del tipo de *Brucella* infectante y de la cantidad del inóculo (Castro *et al.*, 2005). Estos signos agudos se presentan después de un período de incubación comprendido entre uno a cinco semanas (Mandell *et al.*, 2000), en la que fiebre se presenta en el 95 a 98% de los casos, escalofríos (69-85%), diaforesis nocturna (85-88%) y en menor porcentaje: cefalea, anorexia, fatiga, mialgias, artralgias, y pérdida de peso. En algunos casos se presenta hepatomegalia (20-40%) (López-Merino, 1989). La brucelosis crónica es una entidad mal definida, se diagnostica al conjuntar resultados del laboratorio con manifestaciones clínicas que se prolongan un mínimo de un año, con comienzo insidioso y predominio de formas viscerales, osteoarticulares y neurológicas, entre otras. La recaída o recidiva, se presenta entre los 2 a 3 meses después de haber concluido el tratamiento instituido en un porcentaje de alrededor del 15% de los casos. Existe también la forma subclínica, producida por cepas de baja virulencia, que cursa con síntomas poco aparentes o muy leves acompañados de fatiga, en general se resuelven sin ningún tratamiento.

2.6. Respuesta inmune a brucelosis

La respuesta inmune a brucelosis es compleja e involucra tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa y su estudio se ha realizado en diferentes modelos animales, incluido el humano. La célula blanco de la infección por *Brucella* es el macrófago y de

ello depende gran parte de la patogénesis de la enfermedad debido a la capacidad de este microorganismo de replicarse dentro de él (Moreno *et al*, 2004). En el caso de la inmunidad adaptativa, se ha demostrado que la respuesta dirigida a eliminar a *Brucella* involucra la activación T-dependiente de los macrófagos y que tanto los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+ actúan en la protección contra la infección de este patógeno intracelular.

En la respuesta inmune primaria a brucelosis, la respuesta inmune está principalmente dirigida al LPS, los primeros anticuerpos en aparecer son el isotipo IgM. Con el tiempo, este isotipo disminuye y debido al mecanismo denominado *cambio de clase*, la inmunoglobulina predominante es la IgG, aunque también IgA e IgE podrían estar presentes. En algunos estudios, se ha mencionado que después del tratamiento, los niveles de IgG declinan más rápidamente que los IgM y por ello, remanentes de este tipo de aglutininas pueden permanecer en el paciente aún años después de la resolución de la enfermedad. Sin embargo, en pacientes crónicos y con recidivas, los niveles de IgG continúan elevados y los de IgM disminuyen rápidamente. En una infección por *Brucella*, se pueden encontrar una marcada secreción de los isotipos de IgA, IgE, IgM e IgG (subclases IgG1, IgG 2, IgG 3 y IgG4) que es dependiente del tipo de respuesta desencadenada en el individuo (Th1/Th2) y correlacionada con la fase clínica de la enfermedad.

2.7. Diagnóstico de brucelosis.

El diagnóstico preciso y rápido de la brucelosis humana es muy importante ya que el retraso o el mal diagnóstico por lo general da lugar a fracasos del tratamiento, recaídas, los cursos, las complicaciones crónicas de coordinación, y una alta tasa de letalidad (Dahouk *et al.*, 2007), sin embargo, la enfermedad presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas por lo que es difícil de diagnosticar clínicamente. En algunas zonas endémicas todos los casos de fiebre humana de origen desconocido pueden suponerse que son debido a la brucelosis, por lo tanto, los casos sospechosos deben ser confirmados por pruebas de laboratorio.

Para el diagnóstico de la brucelosis en humanos, se pueden emplear el método clínico, el epidemiológico y el de laboratorio y dentro de éste se encuentran: a) el bacteriológico, con el aislamiento e identificación bacteriana, b) el inmunológico, mediante la interacción inmunológica, ya sea de células expuestas al antígeno o por la demostración de anticuerpos en fluidos del cuerpo. (Nielsen y Gall, 1994).

2.7.1. Métodos clínico y epidemiológico.

Aunque la historia clínica del paciente provee indicios para un diagnóstico inicial, la enfermedad debe ser confirmada por técnicas de laboratorio. Asimismo, los estudios epidemiológicos incluyen principalmente, el contacto con animales, ingesta de leche bronca o quesos frescos elaborados artesanalmente, que ocurre sobre todo en zonas consideradas endémicas y de igual manera que el diagnóstico clínico, sus conclusiones deben ser confirmadas por medios de laboratorio.

2.7.2. Métodos de laboratorio

2.7.2.1. Diagnóstico bacteriológico

Este método es reconocido como el más certero para el diagnóstico de brucelosis; sin embargo, implica riesgos para los laboratoristas y debe realizarse en laboratorios bajo condiciones de contención de residuos biopeligrosos (OIE, 2004); además tiene baja sensibilidad, es costoso, difícil y lento y por esto, en forma rutinaria se aplican diversas pruebas serológicas.

Dado que en la fase aguda la bacteriemia suele ser continua, se recomienda realizar el hemocultivo cuando los síntomas indican la posibilidad de la enfermedad; o bien intentarlo a partir del cultivo de medula ósea que incrementa la posibilidad del aislamiento. El uso del medio Ruiz-Castañeda con 10% de CO₂ o bien el medio Ferrel suplementado con antibióticos es preferente; asimismo, los métodos automatizados (BACTEC 9204, BACT/ALERT), presentan ventajas como reducción del periodo de incubación.

La identificación de *Brucella* a nivel especie, biotipo y serotipo se debe hacer en centros de referencia, aunque la identificación a nivel género se puede realizar mediante tinción Gram y Stamp y mediante pruebas bioquímicas como oxidasa, ureasa y aglutinación en suero específico.

2.7.2.2. Diagnóstico inmunológico.

Debido a los riesgos que implica la manipulación de material biológico en laboratorios, y a que es más rápido, menos laborioso y menos peligroso el diagnóstico inmunológico es el más empleado; se realiza por medio de diversas pruebas con muestras de sangre o leche para determinar el contenido de células reactivas o de anticuerpos hacia antígenos de *Brucella* sp. (Nielsen, 2002). En la brucelosis, los anticuerpos no sólo están presentes en el suero de enfermos agudos, crónicos o convalecientes, sino que también se pueden encontrar en individuos aparentemente sanos que han cursado infecciones subclínicas o inaparentes (Torres-Padilla, et al., 2004) en zonas endémicas.

Dentro de las pruebas convencionales empleadas para el diagnóstico rutinario se encuentran las siguientes: prueba lenta en tubo o de Wright, la prueba de tarjeta o de rosa de Bengala, la prueba de 2-ME que son aceptadas por la NOM (2000), y además la Prueba de Coombs. Para cada prueba se emplean antígenos preparados generalmente a partir de la cepa *B. abortus* 1119-3 y que son modificados para llevar a cabo las diferentes variantes de pruebas.

2.7.2.2.1. La prueba lenta en tubo o de Wright (SAT)

Fue la primera prueba serológica en desarrollarse y desde 1897 es empleada principalmente para el diagnóstico en el mundo. Utiliza como antígeno una suspensión celular fenolada en un pH neutro. Detecta anticuerpos tipo IgG, IgM e IgA, y se considera que es útil para diagnosticar infecciones agudas al detectar anticuerpos clase IgM que ocurren a partir de la primera semana de la enfermedad aguda, aunque se han descrito de

reacciones cruzadas con otras bacterias y por ende tener una especificidad baja. En México la NOM (SSA, 2000) señala que un título igual o mayor a 1:80 en sueros positivos a RB tiene valor diagnóstico, mientras que la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2000) señala que una dilución de 1:160 como positiva.

2.7.2.2.2. La prueba de tarjeta (PT) o Rosa de Bengala (RB)

Es una prueba cualitativa, simple, estandarizada y no costosa, por lo que es empleada generalmente como prueba de escrutinio y cuyos resultados positivos se comprueban con otras pruebas más específicas (Nicoletti, 1967). Utiliza como antígeno una suspensión celular con una concentración celular de 9 a 10% teñida con Rosa de Bengala y con pH 4.5, con la que anticuerpos IgM se inactivan. Determina anticuerpos de la clase IgM, IgG e IgA aglutinantes en pacientes con infección aguda o crónica. Permanece positiva después del tratamiento o recuperación, hasta por años, por lo que en forma aislada no es de valor diagnóstico. Se ha visto que esta prueba puede ser modificada para incrementar su sensibilidad y utilizada para anticuerpos.

2.7.2.2.3. La prueba de 2-Mercaptoetanol (2ME).

Utiliza una solución de 2-mercaptoetanol, sustancia que reduce los puentes disulfuro de la IgM presentes en muestras de pacientes con infección aguda, en moléculas monoméricas inactivas y permite que se detecten las IgG de alta especificidad presentes en infecciones crónicas y además, incrementa la especificidad de la prueba (Rose y Roepke, 1964). Se usa como prueba confirmatoria (Nicoletti, 1969) pero huele mal y requiere lugares ventilados ya que es tóxica, por esto, la prueba no es recomendada por la OMS desde los años 1990s. Se considera útil en infecciones crónicas debido que detecta anticuerpos clase IgG e IgA, Títulos mayores a 1:20 se consideran indicativos de brucelosis. Tiene valor como indicativa de infecciones activas que requieren tratamiento, así como en el seguimiento de tratamiento, ya que al concluir la terapia y en ausencia de síntomas, se esperarían se torne negativa.

2.7.2.2.4. Prueba de Coombs

Ha mostrado confiabilidad para detectar anticuerpos no aglutinantes de los isotipos IgG e IgA, sobre todo en la fase crónica de la enfermedad; que sin embargo, sus resultados son lentos (48 horas) y su metodología algo complicada, por lo que muchos laboratorios no la emplean rutinariamente. Aunque en la actualidad se ha visto sustituida por la ELISA IgG, la prueba de Coombs es aceptada por la NOM para la confirmación de brucelosis.

2.7.2.3. Pruebas modernas

Para reducir los inconvenientes de las pruebas convencionales y mejorar el diagnóstico se han desarrollado y evaluado variantes de pruebas serológicas y moleculares, como son las pruebas de Enzimoimmunoanálisis (ELISA), fluorescencia polarizada (FPA), inmunocaptura y variantes de moleculares (PCR) que ofrecen mejores resultados que los convencionales y aunque no hayan completamente evaluadas, y reconocidas por la OMS para el diagnóstico de brucelosis en humanos, se considera que tienen un mejor desempeño.

2.7.2.3.1. Prueba de Fluorescencia polarizada (FPA)

La prueba de fluorescencia polarizada (FPA) fue descrita inicialmente por Perrin en 1926, es una técnica muy sólida que se emplea para el análisis homogéneo de interacciones moleculares (Nasir y Jolley, 1999). Se utiliza con éxito en forma rutinaria para monitorear niveles de drogas terapéuticas y para detección de sustancias de abuso en fluidos humanos por los Laboratorios Abbot (Nasir y Jolley, 1999), así como para detección de diferentes hormonas y su uso ha ido creciendo debido a la disponibilidad de instrumentos capaces de realizar la FPA (Nasir y Jolley, 1999). La prueba tiene una sensibilidad 97.9% y una especificidad de 96.1% (Lucero, 2003); además, tiene la ventaja de poder desarrollarse en minutos (contra horas o días de otras pruebas) y no requiere de una preparación extensa de la muestra ya que la prueba se realiza en fase líquida en un tubo o pozo de placa, en los que se mezcla la muestra en un amortiguador diluyente y

después de una lectura de blanqueo, se añade el antígeno-marcador y se hace la lectura final. Esta prueba no es aceptada por la OMS para el diagnóstico de brucelosis.

2.7.2.3.2. **Inmunocaptura**

Esta prueba tiene resultados comparables los de la prueba de Coombs y SAT (Mantecon *et al.*, 2006) que son las más utilizadas para el diagnóstico de brucelosis y ha probado ser útil para el seguimiento de personas tratadas (Bosilkovski *et al.* 2009). Este sistema permite la detección de la unión de anticuerpos de la muestra a antígenos adheridos a una fase sólida en placas o tiras de prueba. Es una prueba sencilla y fácil de realizar, por lo que puede ser accesible a la mayoría de los laboratorios de bajos recursos. Actualmente no es aceptada por la OMS para el diagnóstico de brucelosis, aunque sus resultados parecen ser muy alentadores.

2.7.2.4. **Pruebas moleculares**

Diversas variantes de la reacción de cadena de polimerasa (PCR) se han evaluado en el diagnóstico de brucelosis y se considera un método más rápido, conveniente y sensible que el cultivo o la serología. Se ha visto que un método de hidrocloreuro de guanidina es útil para la amplificación de DNA a partir de suero (Queipo-Ortuño *et al.*, 2008), así como, que un método de PCR tiempo real puede ser usado en el diagnóstico de infección por brucelas (Surucuoglu *et al.*, 2009); asimismo como un PCR simple-ELISA. Actualmente no es aceptada por la OMS para el diagnóstico de brucelosis, ya que, aunque sus resultados parecen ser muy prometedores, requieren ser estandarizados y validados.

2.7.2.4.1. **PCR múltiplex**

Se han utilizado diferentes combinaciones de iniciadores para la identificación de especies de *Brucella*. El llamado AMOS-PCR es un PCR múltiplex que puede detectar las especies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, y *B. suis*, pero no diferencia todas las biovariedades entre especies. Además, a este análisis se le han añadido el uso de

iniciadores que permiten distinguir cepas vacunales de las de una infección de campo en animales (Ling y Nielsen, 2010).

2.7.2.5. Desventajas de las pruebas convencionales aprobadas por la NOM

Actualmente la NOM (2000) acepta a las pruebas convencionales SAT, PT, 2ME para la confirmación de los casos sospechosos de brucelosis. Éstas pruebas se emplean aunque muestran ser útiles en el diagnóstico, sus resultados son en general cuestionables debido que los antígenos de brucela utilizados para el diagnóstico son preparados con cultivos completos que comparten el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular con otras bacterias como *Yersinia enterocolitica* O:9 (Bundle *et al.*, 1984, Kittelberger *et al.*, 1995), que posee una cadena-O más parecida a la de *B. abortus*, cuya reacción cruzada es más intensa que la de *Salmonella* grupo N (O:30), *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157, *Francisella tularensis* (Moriyón y López-Goñi, 2001), *Salmonella urbana* O:30, y otras.

Además, las pruebas son influenciadas tanto por la capacidad aglutinante de los anticuerpos, ya sea en pacientes con primoinfección, en los que predominan los anticuerpos IgM, como en aquellos con infecciones crónicas, en los que predominan anticuerpos IgG. Además, estas pruebas son afectadas Estos inconvenientes, impiden un diagnóstico acertado y en consecuencia si no se administra tratamiento oportuno, se pueden presentar complicaciones, o por el contrario administrar el tratamiento a personas con resultados falsos positivos.

3. JUSTIFICACIÓN

Nuevo León ha ocupado uno de los primeros cuatro lugares de la incidencia anual nacional de brucelosis humana desde hace 10 años, con pérdidas económicas y socioeconómicas derivadas de gastos médicos, tratamientos costosos y prolongados, hospitalización, pérdida de trabajo en horas hombre, entre otros. El diagnóstico de brucelosis en personas sospechosas se lleva a cabo mediante las pruebas reconocidas por la NOM-022-SSA2-1994, *Para la prevención y control de la brucelosis en el hombre*. (D.O.F., 2 Febrero, 2001); sin embargo, es sabido que estas pruebas convencionales pueden ser afectadas por las condiciones de la muestra, como por ejemplo, la presencia excesiva de lípidos en sangre, y sus resultados pueden no ser satisfactorios para lograr un diagnóstico acertado, con los riesgos inherentes a la salud del paciente. Para evitar lo anterior, se realizó la evaluación de pruebas modernas que de acuerdo a publicaciones científicas tienen mejor desempeño diagnóstico que las convencionales, con el fin de sustentar su uso rutinario en el diagnóstico de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

Mediante el análisis de sueros de pacientes sospechosos de brucelosis es posible evaluar las pruebas diagnósticas más eficientes que en conjunto, permitan diferenciar de manera eficaz a los pacientes con infección aguda, crónica, recurrente o asintomáticos.

5. OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio diagnóstico de la brucelosis humana que dilucide las pruebas de diagnóstico más eficientes, que permitan obtener un diagnóstico oportuno de cada una de las fases de la infección (aguda, crónica, recurrente, asintomática) en el paciente.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la capacidad de las pruebas serológicas convencionales (prueba de tarjeta, 2-mercaptoetanol y microaglutinación en placa) para detectar la presencia de anticuerpos indicadores de brucelosis en muestras de suero sanguíneo de humanos.
2. Evaluar la capacidad de las pruebas serológicas modernas (FPA e Inmunocaptura), para detectar la presencia de anticuerpos indicadores de brucelosis en muestras de suero sanguíneo de humanos.
3. Determinar mediante una comparativa de resultados de las pruebas modernas con las convencionales, la o las que mejor eficiencia diagnóstica presenten.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material Biológico.

Un total de 486 sueros sanguíneos humanos remitidos por diversas instituciones de salud, tanto públicas como privadas, del Estado de Nuevo León para confirmación de brucelosis al Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Nuevo León (LESPNL) fueron donados por la misma dependencia para la realización de este trabajo. Las muestras se proporcionaron ya categorizadas como positivas o negativas a brucelosis mediante las pruebas serológicas aprobadas por la NOM-022-SSA2-2012 *Para la prevención y control de la brucelosis en el ser humano*, la cual establece que los test diagnósticos deben realizarse de acuerdo al Manual de Procedimientos de Laboratorio INDRE/SAGAR (Hernández *et al*, 1996) utilizando reactivos elaborados y suministrados por el Instituto Nacional de Referencia Diagnóstica que contengan antígenos de *B. abortus*. También contaban con diagnóstico molecular mediante PCR, el cual se realiza de manera rutinaria en esa institución y con datos de pacientes tales como edad, sexo, sintomatología y jurisdicción. Las muestras correspondían al período 2013-2014 y se conservaron a -20 °C hasta su uso. Con los resultados proporcionados se realizó una base de datos Microsoft Excel® (2010) para su posterior análisis.

El criterio de la NOM para categorización de los sueros como positivos que fue utilizada en este estudio es el siguiente:

- a) **Sueros positivos:** se consideran los que son positivos a Rosa de Bengala y además:
 - a. Obtienen títulos iguales o mayores a 160 en la prueba SAT (infección aguda).
 - b. Obtienen títulos iguales o mayores a 160 en la prueba SAT y títulos iguales o mayores a 20 para 2ME (infección crónica).

- b) **Sueros negativos:** Un total de 80 sueros de pacientes sanos fueron donados por el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea (CETS) del Estado de Nuevo León.

6.2. Realización de las pruebas serológicas modernas.

6.2.1. Prueba de Fluorescencia Polarizada.

Para el desarrollo de la técnica de fluorescencia polarizada se utilizó el kit comercial Brucella FPA (Diachemix®, Serial No. 133) según las instrucciones del fabricante (ver anexo). Antes de la prueba, los sueros problema y los reactivos se colocaban a temperatura ambiente. Posteriormente se sometían a agitación en vórtex durante 5 segundos para homogeneizar las muestras. El ensayo se realizó en tubos de borosilicato de 10 x 75 mm (Corning®, Lot No. 22014437) los cuales previamente se marcaron como un control positivo, tres negativos y los posteriores con el número de identificación de cada una de las muestras. Se le añadieron a cada uno de los tubos 1 mL de buffer FPA (Diachemix®) y en los tubos correspondientes a controles se colocaron 20 µL de Control Positive y Control Negative (Diachemix®). Estos controles están diseñados para su uso en diagnóstico de brucelosis en bovinos y ya que esta prueba de FPA aún no se homologa para uso en humanos en este estudio se utilizaron, en conjunto con los correspondientes calibradores, sólo como controles para monitorear el desempeño del lector de FPA utilizado. A los tubos restantes, se le colocaron a cada uno 20 µL de suero problema. Se sometieron a agitación en vórtex para homogeneizar la muestra y pasado este proceso se realizó la primera lectura en el lector Sentry 201 (Ellie®). Esta primera lectura nos proporcionó la fluorescencia que por sí misma puede tener la muestra. Posteriormente, a cada uno de los tubos, incluidos los controles, se les añadieron 20 µL de marcador FPA (Diachemix®), el cual está compuesto por el antígeno de la cadena O del lipopolisacárido (O-LPS) de *B. abortus* conjugado con fluoresceína. Se homogeneizaron por 5 segundos en vórtex y se incubaron durante 10 a 30 minutos antes de realizar la lectura final. Esta última lectura involucra en caso de haberla, la interacción antígeno-anticuerpo, lo que hace que la fluorescencia de la muestra sea mayor. El resultado de tal lectura se muestra en unidades de milipolarización (mP). El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante curvas ROC mediante el programa estadístico MedCalc® v17.5.3.

6.2.2. Inmunocaptura

Se realizó utilizando el kit comercial Brucellacapt® siguiendo las instrucciones del fabricante (Ver anexo). Primeramente, los sueros y los reactivos se llevaron a temperatura ambiente.

En una placa de 96 pozos con fondo en U recubiertos de inmunoglobulina anti-humana, se añadió 50 µL de suero problema. Tras la dilución seriada de los sueros desde 1/40 hasta 1/5120 se añade el antígeno, el cual consiste de una suspensión de *B. abortus* coloreada y muerta por calor y tratamiento con formaldehído al 0,5%. Las placas se sellan con papel adhesivo y se incuban durante 24 h a 37° C en una cámara húmeda y oscuridad. La lectura se realizó de forma visual y los resultados positivos se expresaron en forma de títulos, considerando la reacción positiva hasta la dilución anterior a aquella en que apareció un botón de células sedimentadas en el fondo del pocillo, indicativo de que no se produjo reacción de aglutinación.

7. RESULTADOS

7.1. Capacidad de las pruebas modernas (FPA e inmunocaptura), para detectar la presencia de anticuerpos indicadores de brucelosis en muestras de suero sanguíneo de humanos.

La prueba de FPA es ampliamente utilizada en el diagnóstico de brucelosis en bovinos con resultados confirmatorios bastante confiables aún en zonas endémicas. Es por eso que se busca la optimización de la misma para su uso en sueros sanguíneos humanos. Los sueros sanguíneos provenientes de pacientes con sospecha de brucelosis se sometieron a esta prueba y a la de inmunocaptura. Sus resultados se sometieron a análisis ROC individual y comparación de las curvas ROC entre las diferentes pruebas mediante el programa estadístico MedCalc® v17.5.3.

7.1.1. Prueba de Fluorescencia Polarizada con grupos control.

La prueba de FPA utiliza el principio de que las moléculas pequeñas en solución rotan a una velocidad mayor y despolarizan más luz que las moléculas más grandes. Ante este hecho, se hace factible medir esa velocidad y polarización antes y después de la unión antígeno-anticuerpo. Una ventaja es que este cambio se puede medir y así se obtienen resultados cuantitativos (Nielsen, 1996). El resultado de tal lectura se muestra en unidades de milipolarización (mP).

Para determinar la capacidad de la FPA para detectar anticuerpos antibrucela en sueros sanguíneos humanos se seleccionaron 30 sueros positivos a la NOM y PCR; así como 170 sueros negativos a NOM, PCR y provenientes de donadores sanos. El análisis ROC realizado mostró una AUC de 0.960 (95% CI 0.923- 0.983; SE 0.0127) como se puede ver en la Figura 1, lo que demuestra la capacidad de esta prueba para distinguir entre un paciente enfermo y uno sano. El punto de corte se seleccionó en 88.8 mP como el que representaba el máximo valor de la suma de la sensibilidad (Sn) y la especificidad

(Sp). En este valor de corte, la sensibilidad se sitúa en 100% (95% CI 88.4-100) y la especificidad en 88.24% (95% CI 82.4-92.7).

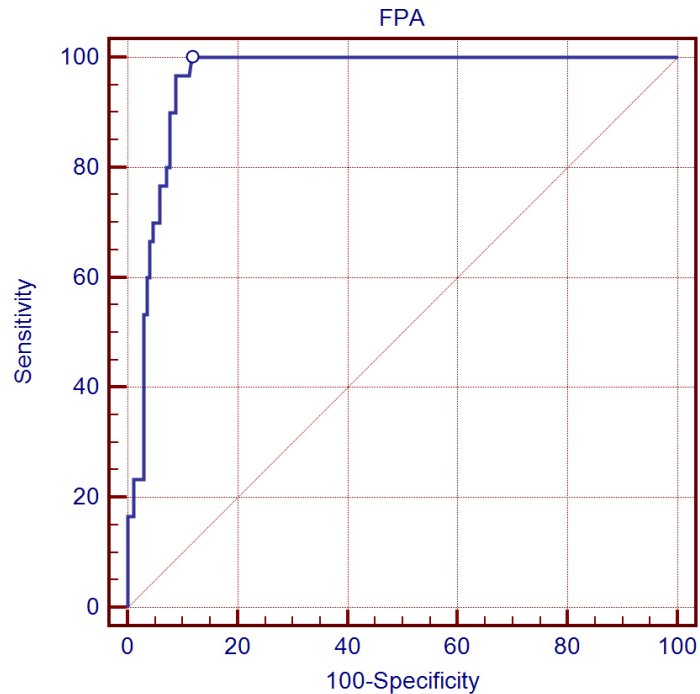


Fig. 1. Análisis ROC mostrando el AUC de 0.960 (95% IC0.923-0.983). El punto de corte se localizó en 88.8 mP.

7.1.2. Prueba de Fluorescencia Polarizada con grupos NOM.

A los sueros catalogados por la NOM como positivos o negativos se le realizó la FPA para observar el comportamiento de la prueba en sueros de campo. Se analizaron un total de 425 sueros, 50 de ellos negativos y 375 positivos. La figura 2 muestra el desempeño con un AUC de 0.897 (95% CI 0.864- 0.924; SE 0.0174). El punto de corte se estableció en 90.9 representando éste el máximo valor de la suma de la sensibilidad y la especificidad. En este valor de corte, la sensibilidad se sitúa en 90.9% (95% CI 73.3-94) y la especificidad en 85.07% (95% CI 81.1-88.5).

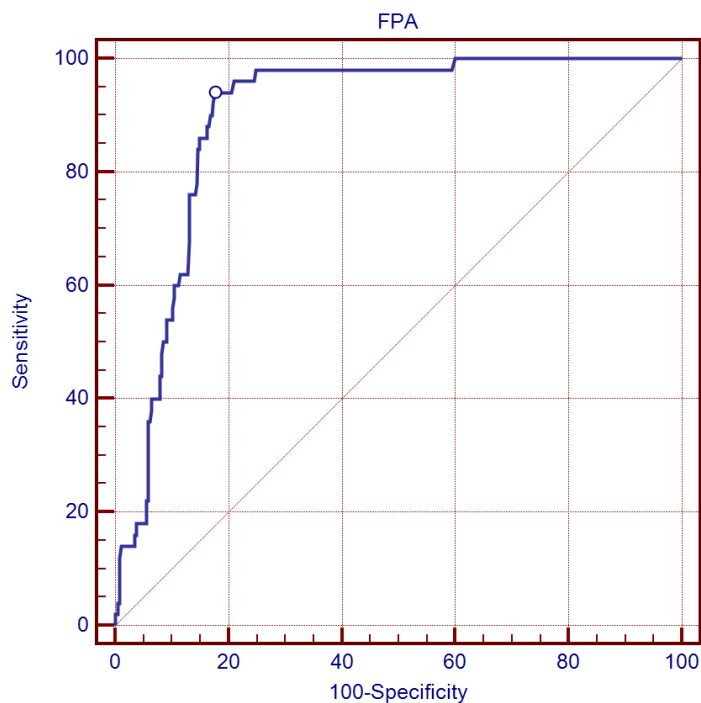


Fig 2. Análisis ROC mostrando el 0.897 (95% CI 0.864- 0.924; SE 0.0174). El punto de corte se localizó en 90.9 mP.

7.1.3. Prueba de FPA con grupos de enfermedad inicial y con grupos de enfermedad crónica.

Se seleccionaron los sueros positivos y se catalogaron como pacientes que presentaban una enfermedad de curso corto aquellos cuya serología correspondía con una prueba de Rosa de Bengala y SAT con título mayor o igual a 160. Los sueros que presentaban un título superior a 20 en la prueba de 2-mercaptoetanol se clasificaron con enfermedad de curso largo. Esto se realizó para determinar la pertinencia del uso de esta prueba en las diferentes categorías de pacientes. Se observó un mejor desempeño de la prueba en el grupo de pacientes con enfermedad crónica AUC de 0.897 (95% CI 0.864- 0.924; SE 0.0174) en comparación con el grupo con enfermedad aguda la cual presentó un AUC de

0.789 (95% CI 0.747-827; SE 0.0461) como lo muestran las figuras 3 y 4, respectivamente.

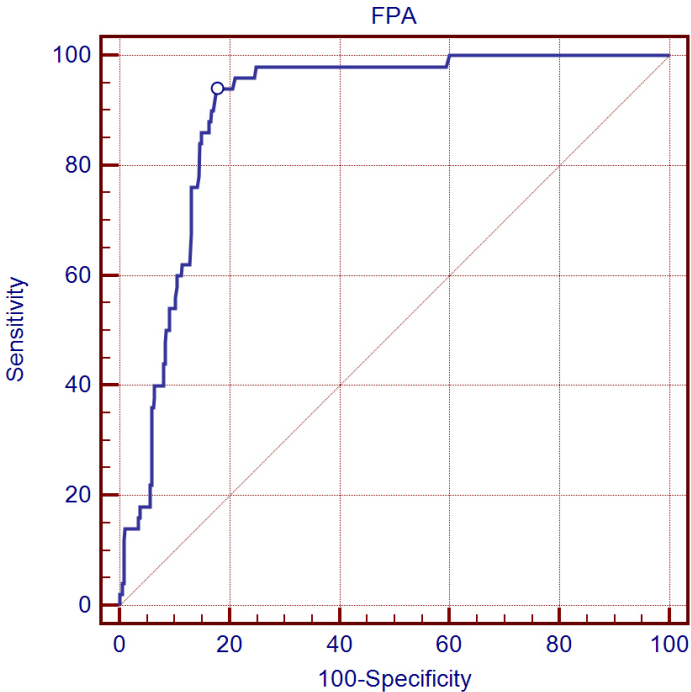


Fig 3. Análisis ROC del grupo de enfermedad crónica mostrando el 0.897 (95% CI 0.864- 0.924; SE 0.0174).

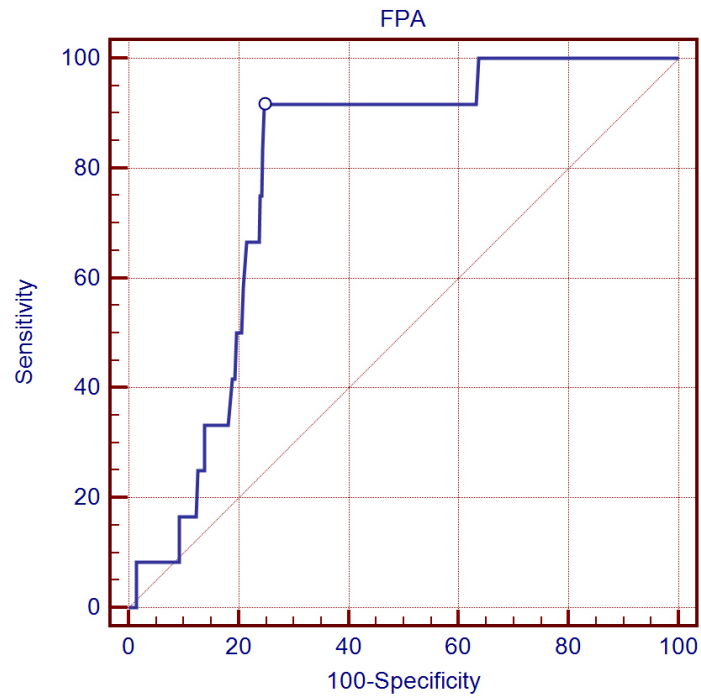


Fig. 4. Análisis ROC del grupo de enfermedad aguda mostrando el 0.789 (95% CI 0.747-827; SE 0.0461)

7.1.4. Inmunocaptura

La lectura se realizó de forma visual y los resultados positivos se expresaron en forma de títulos, considerando la reacción positiva hasta la dilución anterior a aquella en la que apareció un botón de células sedimentadas en el fondo del pocillo, indicativo de que no se produjo reacción de aglutinación.

Para determinar la capacidad de la prueba para detectar anticuerpos antibrucela en sueros sanguíneos humanos se seleccionaron 10 sueros positivos a la NOM y PCR; así como 118 sueros negativos a NOM, PCR y provenientes de donadores sanos. El análisis ROC realizado mostró una AUC de 0.582 (95% CI 0.492- 0.669; SE 0.103) como se puede ver en la Figura 5. El punto de corte se seleccionó en un título mayor o igual a 320 como el que representaba el máximo valor de la suma de la sensibilidad (Sn) y la especificidad (Sp). En este valor de corte, la sensibilidad se sitúa en 20% (95% CI 2.5-55.6) y la especificidad en 100% (95% CI 96.9-100.0).

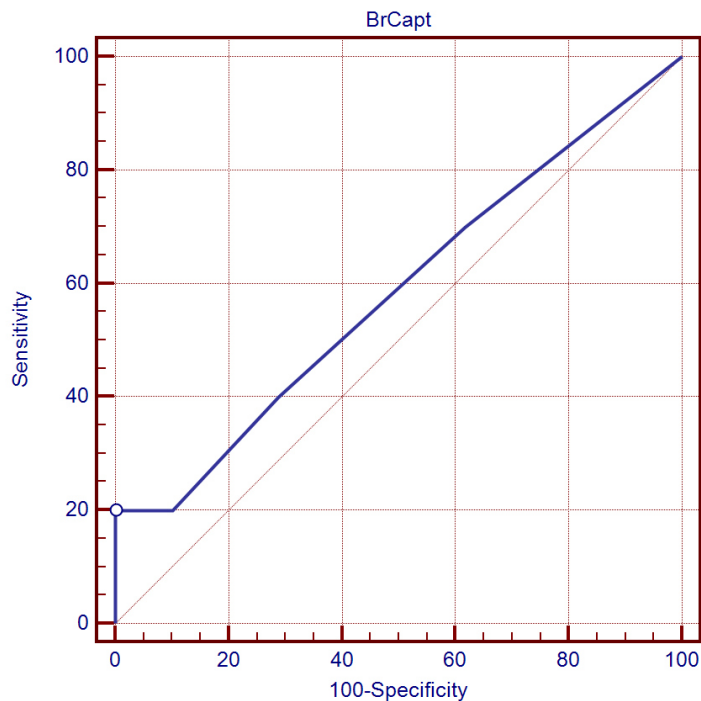


Fig. 5. Análisis ROC mostrando el AUC de 0.582 (95% CI 0.492- 0.669; SE 0.103). El punto de corte se localizó en ≥ 360 de titulación.

7.1.5. Prueba de Inmuncaptura con grupos de enfermedad inicial y con grupos de enfermedad crónica.

Se seleccionaron los sueros positivos y se catalogaron como pacientes que presentaban una enfermedad de curso corto aquellos cuya serología correspondía con una

prueba de Rosa de Bengala y SAT con título mayor o igual a 160, haciendo un total de 270 negativos y 2 positivos para este grupo. Los sueros que presentaban un título superior a 20 en la prueba de 2-mercaptoetanol se clasificaron con enfermedad de curso largo, agrupando un total de 15 positivos y 257 negativos. Esto se realizó para determinar la pertinencia del uso de esta prueba en las diferentes categorías de pacientes. En los sueros de pacientes con enfermedad crónica e observó un AUC de 0.549 (95% CI 0.488- 0.610; SE 0.0899) en comparación con el grupo con enfermedad aguda la cual presentó un AUC de 0.555 (95% CI 0.493-0.615; SE 0.403) como lo muestran las figuras 6 y 7, respectivamente.

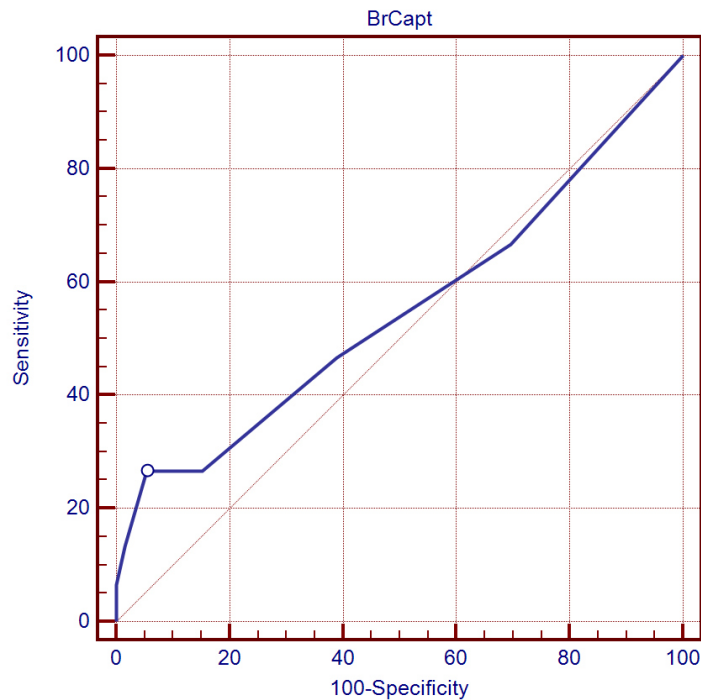


Fig 6. Análisis ROC de inmunocaptura con grupo de enfermedad crónica, mostrando el 0.549 (95% CI 0.488- 0.610; SE 0.0899).

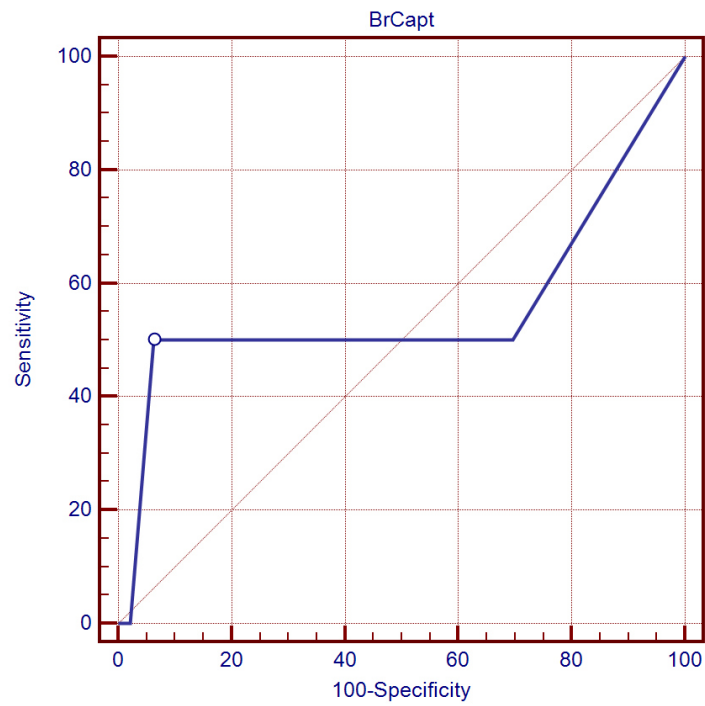


Fig. 7. Análisis ROC de la prueba de inmunocaptura con grupo de enfermedad aguda mostrando el 0.555 (95% CI 0.493-0.615; SE 0.403).

8. DISCUSIÓN

La brucelosis es una zoonosis bacteriana que continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial. El mapa global de la distribución de casos de brucelosis alrededor del mundo situaba a México con una incidencia de 10 a 50 casos/1 000 000 de habitantes encontrándose la mayoría en el norte y sureste del país (Pappas et al, 2006). Sin embargo, gracias a la mejora en las carreteras y la globalización se considera que México y otros países pueden estar sufriendo un repunte de casos. De ahí la prioridad de considerar a esta enfermedad como reemergente. Uno de los principales problemas para combatir la brucelosis tanto animal como humana es entre otras cosas, el cuestionable desempeño diagnóstico de las pruebas serológicas utilizadas para tal fin. Muchos lugares donde se considera endémica se complica aún más debido a que las personas presentan una amplia gama de sintomatología aunado a un complicado resultado de laboratorio que involucra el hallazgo de diversos títulos de anticuerpos que pueden confundir al técnico para su interpretación.

En este estudio, se pretendió determinar si la FPA es una prueba capaz de detectar de manera eficiente anticuerpos en suero sanguíneo humano utilizando un marcador que contiene la cadena O-LPS de *B. abortus* conjugado con FITC. De los resultados se obtuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 88.24% a un punto de corte de 88.4, aunado al AUC de 0.960 que demuestra la pertinencia de este ensayo para distinguir pacientes sanos de enfermos, hecho que se confirmó al someter la FPA a sueros de campo (AUC 0.897; Sn 90.9%, Sp 85.07%, punto de corte: 90.9) aunque no concuerdan con los reportados por otros autores donde obtienen una Sn del 93.5% y una Sp del 96.1% a un punto de corte de 99 mP (Konstandinidis *et al*, 2007); o un punto de corte de 72 mP (Lucero *et al*, 2003). Estas diferencias obtenidas pueden radicar en que el estado de la muestra pudo no haber sido el óptimo en función del tiempo de almacenaje de los sueros hasta que se realizó en ensayo. Aunque con estos resultados la especificidad es relativamente baja en comparación con las pruebas de RB, SAT y 2ME, cabe mencionar que la ventaja de la FPA es su capacidad de dar un resultado cuantitativo y que éste puede ser manipulado en función del interés epidemiológico para ser usado como prueba de

escrutinio o como confirmatoria, ya que el punto de corte puede ser establecido según las necesidades de la región.

Se evaluó también si la FPA detectaba los diferentes tipos de anticuerpos relacionados a la fase aguda y crónica de la enfermedad, mostrando un comportamiento muy similar ante ambos grupos, aunque ligeramente mejor en el grupo de pacientes con enfermedad crónica AUC de 0.897 (95% CI 0.864- 0.924; SE 0.0174) en comparación con el grupo con enfermedad aguda la cual presentó un AUC de 0.789 (95% CI 0.747-827; SE 0.0461).

Otra prueba prometedora sobre todo en lo correspondiente al seguimiento del paciente es el ensayo de Inmunocaptura, el cual detecta anticuerpos IgG e IgA que se han desarrollado en posteriores semanas al inicio de la infección y que de ser detectados títulos elevados se considera al paciente con infección crónica activa (Araj, 2010). Se sometieron diversas clasificaciones de sueros a esta prueba obteniendo un AUC de 0.582 (95% CI 0.492- 0.669; SE 0.103). El punto de corte se seleccionó en un título mayor o igual a 320. En este valor de corte, la sensibilidad se sitúa baja en 20% (95% CI 2.5-55.6) y la especificidad alcanza el 100% (95% CI 96.9-100.0). Estos valores distan mucho de los reportados por Peridogaheh *et al*, en 2013 donde reportan una Sn de 80.4% y una Sp de 96.8%.

En ambas pruebas, las discrepancias entre los resultados reportados por otros autores y los obtenidos en este trabajo pueden tener múltiples razones, entre las que se encuentran el deterioro de la muestra por el resguardo, exceso de lípidos, sangre u otros contaminantes en el suero. Pero lo que más puede influir es la falta de disponibilidad del Gold Standard apropiado para someter una prueba a evaluación, que en el caso de diagnóstico de brucelosis se trata de la categorización como verdaderos positivos a aquellos sueros con aislamiento microbiológico de la bacteria. Debido a la complejidad que representa este proceso, en el tiempo en que se realizaron los análisis de las muestras no se lograron obtener aislados de la bacteria.

En general, la capacidad de las pruebas modernas de inmunocaptura y FPA fueron sometidas a análisis para determinar su eficacia diagnóstica en grupos de pacientes con enfermedad aguda y crónica. Sus resultados muestran una eficiencia pertinente pero mejorable para la fluorescencia polarizada y un desempeño pobre para la inmunocaptura. Sin embargo, se hace necesario comentar que deben realizarse más estudios que conlleven

el uso de muestras sanguíneas de recién extracción, acompañadas de muestras pareadas para cultivo microbiológico con el fin de tener el punto de comparación más confiable que sólo resultados serológicos y de PCR.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se puso de manifiesto la complejidad intrínseca de la enfermedad al notar que la respuesta inmunológica que desarrolla el individuo expuesto a las bacterias del género *Brucella* se ve reflejada directamente en la necesidad de utilizar un grupo de pruebas complejas para lograr catalogar a un paciente como sano o enfermo de brucelosis.
2. Se demostró que la FPA es una prueba capaz de detectar de manera eficiente anticuerpos antibrucela en sueros sanguíneos humanos y, por lo tanto, es una herramienta prometedora de avance diagnóstico.
3. En este trabajo, la prueba de inmunocaptura no reflejó lo publicado por otros autores y no se considera una prueba confiable para la detección de anticuerpos antibrucela en sueros sanguíneos humanos.
4. Es necesario realizar otros ensayos que involucren muestras catalogadas por aislamiento microbiano, ya que este es el Gold Standard del diagnóstico de brucelosis, lo que permitirá someter a las pruebas de la NOM a comparativas con las pruebas modernas.
5. Para mejorar el comportamiento de la FPA en sueros sanguíneos humanos se debe explorar la búsqueda de reactivos o soluciones estabilizadoras o deslipidizantes que ayuden a mejorar la calidad de la muestra.

BIBLIOGRAFÍA

Acha NP, Szyfres B. 2003. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, Third ed., Vol. 1. Pan American Health Organization (PAHO), Washington, DC.

Al Dahouk, S., Le Flèche, P., Nöckler, K., Jacques, I., Grayon, M., Scholz, H. C., Neubauer, H. (2007). Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1), 137-145.

Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D., & Verger, J. M. (1988). Serological methods. *Techniques for the brucellosis laboratory*, 157-167.

Araj, G. F. (2010). Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *International journal of antimicrobial agents*, 36, S12-S17.

Bosilkovski, M., Katerina, S., Zaklina, S., & Ivan, V. (2010). The role of Brucellacapt test for follow-up patients with brucellosis. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 33(5), 435-442.

Bundle, D. R., Gidney, M. A., Perry, M. B., Duncan, J. R., & Cherwonogrodzky, J. W. (1984). Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O: 9 O-antigens by monoclonal antibodies. *Infection and immunity*, 46(2), 389-393.

Castro HA, González SR, Prat MI. Brucelosis: Una revisión práctica. 2005. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamérica*. 39,2: 203-16.

Cloekaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, et al. Classification of *Brucella spp.* isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect*. 2001;3:729-38.

Corbel, M. J. (1976). The immunogenic activity of ribosomal fractions derived from *Brucella abortus*. *Journal of hygiene*, 76(01), 65-74.

Crawford, R. P., Huber, J. D., & Adams, B. S. (1990). Epidemiology and surveillance. *Animal brucellosis*, 1.

Dricot, A., Rual, J. F., Lamesch, P., Bertin, N., Dupuy, D., Hao, T., ... & Lopez-Goñi, I. (2004). Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. *Genome research*, 14(10b), 2201-2206.

Ewalt, D. R., Payeur, J. B., Martin, B. M., Cummins, D. R., & Miller, W. G. (1994). Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6(4), 448-452.

Gall, D., & Nielsen, K. (1994). Improvements to the competitive ELISA for detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 15(3), 277-291.

Godfroid, J., Cloeckert, A., Liautard, J. P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., ... & Letesson, J. J. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary research*, 36(3), 313-326.

Hernández, M. I., Peña, F. G., & Betancourt, X. (1996). Manual de Procedimientos de Laboratorio INDRE/SAGAR: Brucelosis.

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2014/morbilidad/nacional/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_fuente_notificacion.pdf

Kaufmann, A. F., Meltzer, M. I., & Schmid, G. P. (1997). The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable? *Emerging infectious diseases*, 3(2), 83.

Kittelberger, R., Hilbink, F., Hansen, M. F., Penrose, M., de Lisle, G. W., Letesson, J. J., Schurig, G. (1995). Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0: 9 I immunoblot analysis of the antibody response to *Brucella* protein antigens in bovine brucellosis. *Veterinary microbiology*, 47(3-4), 257-270.

Kolar, J. (1987, January). Control of *Brucella melitensis* brucellosis in developing countries. In *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie* (Vol. 138, No. 1, pp. 122-126). Elsevier Masson.

Konstantinidis, A., Minas, A., Pournaras, S., Kansouzidou, A., Papastergiou, P., Maniatis, A., Hadjichristodoulou, C. (2007). Evaluation and comparison of fluorescence polarization assay with three of the currently used serological tests in diagnosis of human brucellosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26 (10), 715.

Ling, W. (2010). Review of Detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction.

López Merino A. Brucellosis in Latin America. En: Young EJ, Corbel MH, Editores. *Brucellosis; clinical and laboratory aspects*. Boca Raton FL, USA: CRC Press, Inc;1989. pp. 151–161.

Lopez-Merino, A., & Lopez-Santiago, R. (1989). Immunology of Brucellosis in humans. *Brucellosis*, 45-58.

Lucero, N. E., Escobar, G. I., Ayala, S. M., Paulo, P. S., & Nielsen, K. (2003). Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *Journal of medical microbiology*, 52(10), 883-887.

Luigi PF, Mastrandrea S, Rappelli P, Cappuccinelli P. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. (38)5:2005–2006.

Mandell, LG, Bennett JE, Dolin R. En: *Principles and practice of infectious diseases*. Genus *Brucella*. Churchill Livingstone; 2000. pp. 2386–2392.

Mantecón, M. Á., Gutiérrez, P., del Pilar Zarzosa, M., Dueñas, A. I., Solera, J., Fernández-Lago, L Orduña-Domingo, A. (2006). Utility of an immunocapture-agglutination test and an enzyme-linked immunosorbent assay test against cytosolic

proteins from *Brucella melitensis* B115 in the diagnosis and follow-up of human acute brucellosis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 55(1), 27-35.

Moreno E and Gorvel JP. 2004. Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organism in professional and no professional phagocytes. En: *Brucella* molecular and cellular biology. Horizon Bioscience. England. Chapter 14: 289-306.

Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., & Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 3569-3576.

Moriyón, I., Díaz, R., & López, I. (2001). Bacteriología del género *Brucella*. Manual de Brucelosis. Junta de Castilla y León. España. Pág, 21-23.

Nasir, M. S., & Jolley, M. E. (1999). Fluorescence polarization: an analytical tool for immunoassay and drug discovery. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 2, 177-190.

Nicoletti, P. (1969). Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. *Amer J Vet Res*.

Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*, 90(1), 447-459.

Nielsen, K., Gall, D., Jolley, M., Leishman, G., Balsevicius, S., Smith, P., Thomas, F. (1996). A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *Journal of immunological methods*, 195(1-2), 161-168.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet infectious diseases*, 6(2), 91-99.

Peeridogaheh, H., Golmohammadi, M. G., & Pourfarzi, F. (2013). Evaluation of ELISA and Brucellacapt tests for diagnosis of human Brucellosis. *Iranian journal of microbiology*, 5(1), 14.

Queipo-Ortuño MI, Tena F, Colmenero JD, Morata P. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of *Brucella* DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2008. 27:109-114.

Rose, J. E., Lambert, G., & Roepke, M. H. (1964). Ultracentrifugation and heat-inactivation studies on seroagglutinins of pregnant heifers artificially infected with virulent *Brucella abortus*. *American journal of veterinary research*, 25, 329-332.

Ross, H. M., Foster, G., Reid, R. J., Jahans, K. L., & MacMillan, A. P. (1994). *Brucella* species infection in sea-mammals. *Veterinary Record*, 134(14), 359-359.

Sbrilgio LV, Sbrilgio H, Sains S. 2007. Brucelosis. Una patología generalmente subdiagnosticada en humanos y que impacta negativamente en la producción pecuaria y desarrollo de nuestros países. *Revista Bioanálisis*. Enero-Febrero, 18-22.

Secretaría de Salud. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Casos por entidad federativa de enfermedades zoonóticas hasta la semana epidemiológica 52 de 2010. pp17. <http://www.salud.gob.mx/unidades/epide>
Revisado 21 de Noviembre de 2011.

Surucuoglu S, El S, Ural S, Gazi H, Kurutepe S, Taskiran P, et al. Evaluation of real time PCR method for rapid diagnosis of brucellosis with different clinical manifestations. *Polish Journal of Microbiology*. 2009; 58:15-19.

Torres–Padilla JC, López–Merino A, García–Escamilla RM, Gutiérrez–García JN. 2004. Seroprevalencia de anticuerpos anti–*Brucella* en disponentes de sangre con fines terapéuticos en tres bancos de sangre del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Gaceta Médica de México*. 140 (4):391-398.

Zammit, T., & Scicluna, G. C. (1905). Intermittent fever in Malta. *British medical journal*, 1(2309), 711.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Magda Celina Navarro Soto

Candidato para el Grado de Doctora en Ciencias con acentuación en Inmunobiología

- Tesis: ESTUDIO DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA BRUCELOSIS HUMANA EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN.
- Campo de Estudio: Ciencias de la Salud
- Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 30 de septiembre de 1976, hija de Gabriel Navarro Perales y María Bertila Soto García.
- Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Veterinario en 1999.
- Experiencia Profesional: Profesor de Asignatura A en la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2011; práctica independiente de la profesión Médico Veterinario desde 2000.