



# BRUCELOSIS

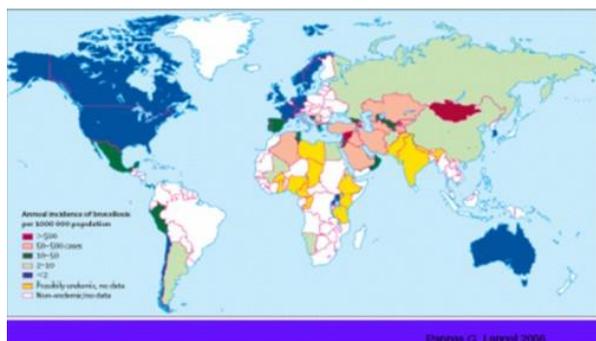
**Bioq. Patricia Etchevés**  
**Presidente de Bioars**  
[patriciaetcheves@fibertel.com.ar](mailto:patriciaetcheves@fibertel.com.ar)

## Generalidades

La brucelosis es una patología antropozoonótica de distribución mundial. La brucelosis humana en sentido estricto puede estar causada por diversas especies del género *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*). *B. melitensis* es con mucho la especie más patógena para el ser humano. La enfermedad se transmite por contacto directo con los animales infectados recién paridos o indirectamente tras la ingestión de alimentos contaminados (leche cruda y queso fresco elaborado con leche no higienizada). La transmisión humano-humano es muy rara, pero está descrita.

Las diversas especies de animales domésticos (oveja y cabra, vaca y cerdo) son los hospedadores naturales de *Brucella* y actúan como reservorio de la infección. De manera clásica, se reconoce a la cabra, y en segundo término a la oveja, como hospedador natural de *B. melitensis*, a la vaca hospedador de *B. abortus*, mientras que el ganado porcino lo es para *B. suis*. No obstante, los ciclos de infección pueden cerrarse entre los diversos tipos de ganado cuando la convivencia entre ellos es estrecha. En la inmensa mayoría de los casos, las especies silvestres juegan un papel muy secundario en la epidemiología de la enfermedad.

En países con elevada densidad de animales y alta tasa de infección, como América Latina y zonas del Mediterráneo, la brucelosis representa un problema sanitario difícil de controlar y de alto impacto económico.



Por otra parte, la brucelosis no presenta un cuadro clínico característico que permita una detección precoz del infectado, lo que favorece la evolución a la cronicidad, complicando las alternativas terapéuticas y la curación definitiva.

En Argentina, al igual que otros países endémicos, existe la obligatoriedad del control para brucelosis de las transfusiones sanguíneas y de los donantes de órganos en caso de transplante. Esto hace imprescindible el desarrollo de técnicas de screening adecuadas, estandarizadas y con alta sensibilidad y especificidad.

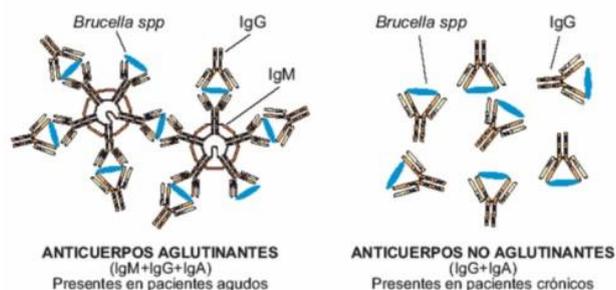
## Respuesta Inmune

El ingreso de *Brucella* en el organismo induce la activación de los mecanismos de defensa que se inician con la participación de algunos componentes de la inmunidad innata, como el complemento (C), los neutrófilos y los macrófagos.

Los neutrófilos son las primeras células del huésped que se ponen en contacto con *Brucella*. La opsonización de las bacterias por anticuerpos y complemento facilita su fagocitosis. Otras células que reaccionan ante la presencia de *Brucella* son los macrófagos. El ingreso de la bacteria a los mismos se produce a través de la interacción entre la molécula CD14 y el LPS. Esta interacción induce también la producción de IL-12 que estimula las células NK y los linfocitos T colaboradores o helper (LTH) CD4+, que secretan TNF- $\gamma$ , favoreciendo el desarrollo de una respuesta inmune predominantemente mediada por LTH1. Este subgrupo de linfocitos T estimula fundamentalmente la respuesta de tipo celular y participa en forma directa en la protección contra microorganismos intracelulares, ya que su amplio patrón de citoquinas incluye IL 2, 3, 6, 12, IFN- $\gamma$  sobre todo TNF- $\gamma$ , esencial para la activación de macrófagos.

Los linfocitos también son impactados por distintos antígenos de *Brucella*. Las proteínas de las bacterias son procesadas dentro de la célula presentadora de antígenos y sus péptidos asociados a moléculas CMH clase I y II son presentados a los LTH CD4+ y LT citotóxicos (LTC) CD8+. Estos últimos son capaces de lisar macrófagos y otras células infectadas con *Brucella*. El LPS es considerado un antígeno T independiente, capaz de activar a los linfocitos B (LB) sin la participación de los LTH. Los primeros anticuerpos que se

generan en el curso de una infección son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA, dependiendo de la especie animal. Pueden aparecer, dentro de la clase IgG, anticuerpos bloqueantes o no aglutinantes, también llamados asimétricos, en especial en infecciones crónicas, donde suelen alcanzar títulos elevados. Estos anticuerpos se diferencian de los anticuerpos completos en ciertas propiedades tanto in vitro como in vivo como, entre otras, la incapacidad de activar complemento por cualquiera de las vías o dar adecuadas reacciones de aglutinación.



### Diagnóstico de la brucelosis humana

El diagnóstico de certeza se establece aislando al microorganismo a partir de cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos. Los métodos serológicos sólo aportan un diagnóstico presuntivo.

#### Métodos Directos:

Se basan en evidenciar la presencia de la bacteria o de sus componentes en los tejidos de los animales o del hombre. El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de la bacteria, frecuentemente a partir de hemocultivos. Los cultivos deben mantenerse en incubación un tiempo no menor a 30 días debido a que las bacterias del género *Brucella* son de crecimiento lento. En los últimos años se han desarrollado sistemas de hemocultivos automáticos o semiautomáticos, que permiten detectar más del 95% de los cultivos positivos antes del séptimo día de incubación.

A medida que progresa la enfermedad, disminuye la probabilidad de positividad de los hemocultivos, por lo que se hace necesario el aislamiento a partir de ganglios linfáticos, hígado o bazo.

#### Métodos Indirectos:

Existen numerosas pruebas que están destinadas a detectar no sólo el mayor número de individuos infectados, sino al mismo tiempo diferenciar entre infectados y aquellos que han tenido un contacto ocasional con los antígenos de *Brucella* sin sufrir la infección, así como detectar las reacciones cruzadas.

La mayoría de las pruebas de laboratorio utilizan como antígenos suspensiones de *Brucella* en fase S o R, según la cepa bacteriana. Las cepas recomendadas por los organismos internacionales en la elaboración de los mismos son *B. abortus* 1119-3 ó 99S. Estos antígenos permiten detectar anticuerpos anti *B. abortus*, *suis* y *melitensis*, mientras que para anticuerpos anti *B. canis* y *B. ovis* se necesitan antígenos específicos de especie.

Dentro de las pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico se encuentran:

#### - Aglutinación lenta en tubo de Wright (SAT):

Es la más antigua y la más utilizada aún para el diagnóstico de brucelosis animal y humana.

Bases metodológicas: se realizan diluciones crecientes del suero a investigar que se enfrentan con cantidades constantes de antígeno observándose la presencia o no de aglutinación luego de un período de incubación.

De esa forma, se determina el título como la máxima dilución aglutinante.

Antígeno: suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5%.

pH: entre 6.4 y 7.0

Título significativo: Un título mayor o igual a 1/100 se considera positivo; un título 1/50 se considera sospechoso.

#### - Prueba de aglutinación con y sin 2-mercaptuetanol (2-ME):

Es una variante de la anterior que emplea el tratamiento previo con 2-ME como agente reductor que inactiva los anticuerpos de clase IgM.

Bases metodológicas: se realizan simultáneamente las pruebas de aglutinación en tubo con y sin tratamiento del suero con 2-ME. La diferencia de título obtenida entre ambas pruebas corresponde a los anticuerpos IgM.

Antígeno: suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5%.

Título significativo: mayor de 1:20.

#### - Reacción de Huddleson:

Es una reacción de aglutinación rápida en placa.

Bases metodológicas: se enfrentan cantidades decrecientes del suero a investigar con cantidades constantes de antígeno y se observa la presencia o no de aglutinación. Existe una escala de títulos, establecida por convención, que permite la expresión de resultados.

Antígeno: suspensión de *B. abortus* al 11% de gérmenes en fenol, con verde brillante y cristal violeta y diluida en solución fisiológica con fenol al 0.5%.

pH: entre 6.4 y 7.0

Título significativo: mayor de 1:100; un título de 1/50 se considera sospechoso. En ocasiones se observa el fenómeno de prozona, donde puede estar ausente la aglutinación en los títulos más altos a causa de un exceso de anticuerpos. Este hecho debe tenerse en cuenta para evitar falsos resultados negativos por esa causa.

#### - Prueba de Rosa de Bengala:

Es una reacción de aglutinación rápida en placa. Los anticuerpos que aglutinan en forma inespecífica con el antígeno de brucelas lisas se inhiben a pH 3.6, pero bajo estas condiciones se mantiene la actividad de los anticuerpos específicos.

Bases metodológicas: se pone en contacto una alícuota del suero (40µL) con 40µL de antígeno y se observa la presencia de aglutinación.

Antígeno: suspensiones de *B. abortus* al 8,0%, ajustadas a pH ácido, con el agregado del colorante Rosa de Bengala.

pH: 3.65

Se informa como positiva o negativa.

Antígeno Tamponado en Placa (BPA):

Es una reacción de aglutinación rápida en placa

Bases metodológicas: se ponen en contacto 80 µL de suero con 30 µL de antígeno y se observa la presencia de aglutinación.

- Antígeno: suspensión de *B. abortus* al 11% con cristal violeta y verde brillante.

pH: 3.65.

Se informa como positiva o negativa según el resultado de la aglutinación.

Tabla I: características de las técnicas de aglutinación en placa.

	pH	%°Celular	Colorante	Titulación
Huddleson	6.4 - 7.0	11 %	verde brillante + cristal violeta	SI
Rosa de Bengala	3.65	8 %	Rosa de Bengala	NO
Antígeno Tamponado en Placa (BPA)	3.65	11 %	verde brillante + cristal violeta	NO

- Prueba de Coombs: Es una prueba de aglutinación en tubo que permite detectar tanto anticuerpos completos como incompletos.

Bases metodológicas: se realizan diluciones seriadas del suero a investigar, que se incuban con una suspensión antigénica de *B. abortus* para que se produzca la aglutinación mediada por los anticuerpos completos. Las suspensiones correspondientes a las diluciones mayores se lavan adecuadamente y se agrega suero antiespecie (Coombs) para detectar de esta forma la aglutinación mediada por los anticuerpos incompletos.

Antígeno: suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5%.

Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes de la clase IgG.

Título significativo: el título obtenido es, como mínimo el de la aglutinación de la primera etapa y, frecuentemente, mucho más elevado. Este incremento es tanto mayor cuanto mayor es la concentración de anticuerpos no aglutinantes o incompletos.

- Fijación de complemento: Es una prueba altamente específica y es la prueba de referencia internacional.

Bases metodológicas: en la primera etapa de la reacción se incuban diluciones del suero inactivado con el antígeno y el complemento. En la segunda etapa se agrega el sistema hemolítico y se compara la hemólisis

con los estándares correspondientes a 0, 25, 50, 75 y 100% de lisis.

Antígeno: puede utilizarse una dilución 1:200 del antígeno empleado en la reacción de Huddleson, o un antígeno soluble denominado HS que se prepara a partir de una suspensión bacteriana tratada con solución salina caliente.

Título significativo: mayor de 1:20.

- Inmunofluorescencia indirecta: Es una prueba de interacción primaria.

Bases metodológicas: se incuban diluciones crecientes del suero a investigar sobre una impronta de *Brucella*.

Se agrega luego el anticuerpo anti-especie marcado con FITC y se observa en un microscopio de fluorescencia, determinándose el título.

Antígeno: suspensión de bacterias fijadas a un portaobjeto.

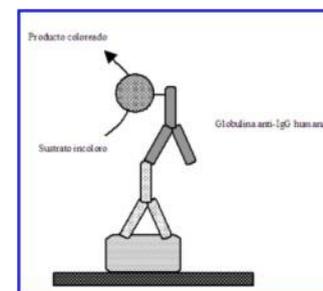
Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes.

Título significativo: mayor de 1:80

- ELISA: Es una técnica altamente sensible, específica y versátil, emplea muy bajo volumen de suero y da muy buenos resultados aún en presencia de hemólisis.

- ELISA indirecto (ELISA-I):

Bases metodológicas: el antígeno se fija a placas de poliestireno, luego se incuban con el suero a investigar, posteriormente con un anti-especie conjugado con una enzima, se agrega el sustrato correspondiente y se mide el color desarrollado a la longitud de onda



determinada. Pueden usarse conjugados que reconozcan las distintas clases de inmunoglobulinas.

Antígeno: los antígenos pueden ser particulados o solubles, LPS u otras proteínas bacterianas. Se ha obtenido un antígeno libre de LPS (antígeno CP), que es altamente eficaz en detectar la respuesta a IgG durante una infección activa, evitando al mismo tiempo las reacciones cruzadas debidas al LPS.

Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes.

- BRUCELLACAPT®: Está basado en una técnica de inmunocaptura, por lo que permite la detección, en un solo paso, de anticuerpos no aglutinantes de las clases IgG e IgA, así como de anticuerpos aglutinantes.

Bases metodológicas: Basado en el principio del test de Coombs, usa anticuerpos IgG e IgA antihumanos para favorecer la aglutinación de los anticuerpos a *Brucella*. La prueba consta de tiras de pocillos de fondo en U que contienen inmunoglobulinas antihumanas. Tras la adición de los sueros y su dilución, se añade el antígeno y se incuban 24 horas hasta que se produce la aglutinación. Esta prueba permite detectar anticuerpos aglutinantes y también anticuerpos incompletos que sólo podían ser medidos mediante el test de Coombs.

Un título superior a 1/320 es sugerente de brucelosis, pero debe siempre evaluarse conjuntamente las demás pruebas clínicas y la seroprevalencia de la enfermedad en la zona antes de emitir un diagnóstico.



Para el diagnóstico de brucelosis humana se emplean habitualmente como pruebas tamices BPA, Rosa de Bengala o Huddleson y como pruebas confirmatorias aglutinación lenta en tubo con y sin 2-ME, Coombs y Fijación de complemento.

### Interpretación de las pruebas diagnósticas

Cuando se utilizan los métodos serológicos de diagnóstico deben tenerse en consideración la reactividad cruzada, y el tipo de anticuerpo que predomina en cada etapa. En la etapa aguda se generan anticuerpos aglutinantes. Las IgM e IgA irán descendiendo progresivamente hasta negativizarse antes de los 6 meses, mientras que la IgG podrá permanecer detectable durante 2 ó 3 años. Estos anticuerpos completos o aglutinantes son capaces de reaccionar con antígenos de la superficie bacteriana y pueden detectarse mediante reacciones de aglutinación en placa, lenta en tubo y fijación de complemento. Los títulos de las reacciones de aglutinación son elevados desde las primeras semanas de la infección. La prueba de aglutinación con 2-ME correlaciona con la evolución clínica de la infección. En el comienzo de la misma la diferencia entre los títulos de aglutinación con y sin 2-ME puede ser importante debido a la presencia mayoritaria de anticuerpos IgM, que se inactivan con 2-ME. Los anticuerpos de clase IgG permiten seguir el curso de la infección. No obstante, a medida que ésta se torna crónica comienzan a incrementarse, en forma progresiva, los anticuerpos de la clase IgG incompletos o no aglutinantes, que no son capaces de dar positivas las reacciones de aglutinación directa ni activar adecuadamente el sistema complemento. Cuando la concentración de anticuerpos no aglutinantes en el suero investigado alcanza valores relativos importantes, estas reacciones pueden arrojar resultados de bajo título y aún negativos.

Para lograr un diagnóstico inicial correcto de la Brucelosis en sus primeras fases las técnicas que detectan anticuerpos aglutinantes como Rosa de Bengala son suficientes para la pronta detección de la infección. En ocasiones, puede interesar detectar la presencia de anticuerpos totales, tanto completos como incompletos. En este caso la prueba de Coombs puede ser reemplazada por los métodos de IFI y ELISA que cumplen con este requisito y permiten discriminar además los isotipos de inmunoglobulinas involucrados.

Sin embargo, en recaídas y reinfecciones, situaciones propias de las áreas endémicas, la respuesta inmune está caracterizada por el predominio de anticuerpos IgG e IgA no aglutinantes. En estos casos, ni el Rosa de Bengala, ni la Seroaglutinación de Wright (SAT) podrían ser considerados como las herramientas de detección más adecuadas. Por otra parte, los tests ELISA tampoco son útiles, pues detectan tanto los anticuerpos incompletos como los completos con niveles residuales. El test de Coombs y el BRUCELLACAPT® son las herramientas más eficaces aquí, pues detectan los anticuerpos no aglutinantes que son los de mayor significación diagnóstica, y, por tanto, permiten diferenciar la serología de pacientes que presentan cuadros crónicos de brucelosis (resultado positivo al test de Coombs o Brucellacapt), de la serología de personas que han sufrido la enfermedad en el pasado (resultado negativo al test de Coombs o Brucellacapt).

### Referencias

- Zhan Y, Cheers C. Endogenous Interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 1995; 63(4): 387-9.
- Parma EA, Santisteban G, Margni RA. Analysis and in vivo assay of cattle anti *B. abortus* agglutinating and non-agglutinating antibodies. *Veter Microbiol* 1984; 9:391-8.
- Margni RA, Binaghi RA. Nonprecipitating asymmetric antibodies. *Annual Review of Immunology* 1988; 6: 535-34.
- Ruiz de Castañeda M. Laboratory diagnosis of brucellosis in man. *Bull WHO* 1961; 24: 73.
- Da Costa M, Guillow JP, Gari Bastuji B, Thiébaud M and Dubray G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genes *Brucella* by DNA amplification. *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 267-75.
- Bennett CW. *Serología Clínica*. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana; 1976. p.131-8.
- Navarro Rodríguez A, Betton Díaz J, Torronteras SR, Cuello Contreras J, Viciano Fernández P, López Contreras L, et al. - Utilidad del test de inmunofluorescencia indirecta y la prueba de la «rosa de Bengala» en el diagnóstico de la brucelosis. *Rev Clin Esp* 1984; 175(1): 27-32.
- Ruelas CD, Rosadio RA. Desarrollo y estandarización de una prueba de ELISA indirecta para brucelosis bovina. *Rev Inv Vet Perú* 1999; 10(2): 43-55.

- 
- Spencer TL, Burges GW. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. *Res in Vet Science* 1984; 36: 194-8.
  - Golbaum F, Rubbi C, Wallach J, Miguel S, Baldi P, Fossati C. Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring antiprotein humoral immune response. *J Clin Microbiol* 1992; 30(3): 604-7.
  - McGiven JA, Tucker JD, Perrett LL, Stack JA, Brew SD, MacMillan AP. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *J Immunol Methods* 2003; 278(1-2): 171-8.
  - Hugo Abel Castro, Sofía Raquel González, María Inés Prat. Brucellosis: una revisión práctica. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2005; 39 (2): 203-16.
  - Lucero, N. E. and J. E. Bolpe. 1998. Buffered plate antigen test as a screening test for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 36:1425-7.
  - Casao, M.A., Navarro, E., Solera, J. 2004. Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis. *Journal of Infection* 49: 102-108.
  - Orduña, A. et al 2000. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol*. 38: 4000-5