

**RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS PARA EL
DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS ANIMAL: BASES PARA SU
INTERPRETACION, PROBLEMAS Y ALTERNATIVAS**

J.M. BLASCO

jblasco@unizar.es



PROBLEMA ESENCIAL

**INTERPRETACION EXCESIVAMENTE SIMPLE (“ADMINISTRATIVISTA”)
= DECLARAR LA BRUCELOSIS DEPENDE **EXCLUSIVAMENTE** DEL
RESULTADO DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS**

**SIN EMBARGO, EN SITUACIONES M4-B4 EL RESULTADO
SEROLOGICO **DEBERÍA SER SOLO UN INDICADOR MAS** Y
LA DECISION FINAL DEBERIA TOMARSE TENIENDO
EN CONSIDERACION:**

- DATOS **CLINICOS**
- ANTECEDENTES **EPIDEMIOLOGICOS**
- RESULTADOS **SEROLOGICOS**
- RESULTADOS **BACTERIOLOGICOS**
- **SENTIDO COMUN**

Características esenciales de los tests diagnósticos

Son óptimos cuando **(1) detectan TODOS animales infectados y**
(2) dan siempre resultado negativo con TODOS animales sanos

$$(1) \% \text{ Sensibilidad} = \frac{\text{Infectados positivos}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de infectados}} \times 100$$

baja SE = riesgo de dejar infectados

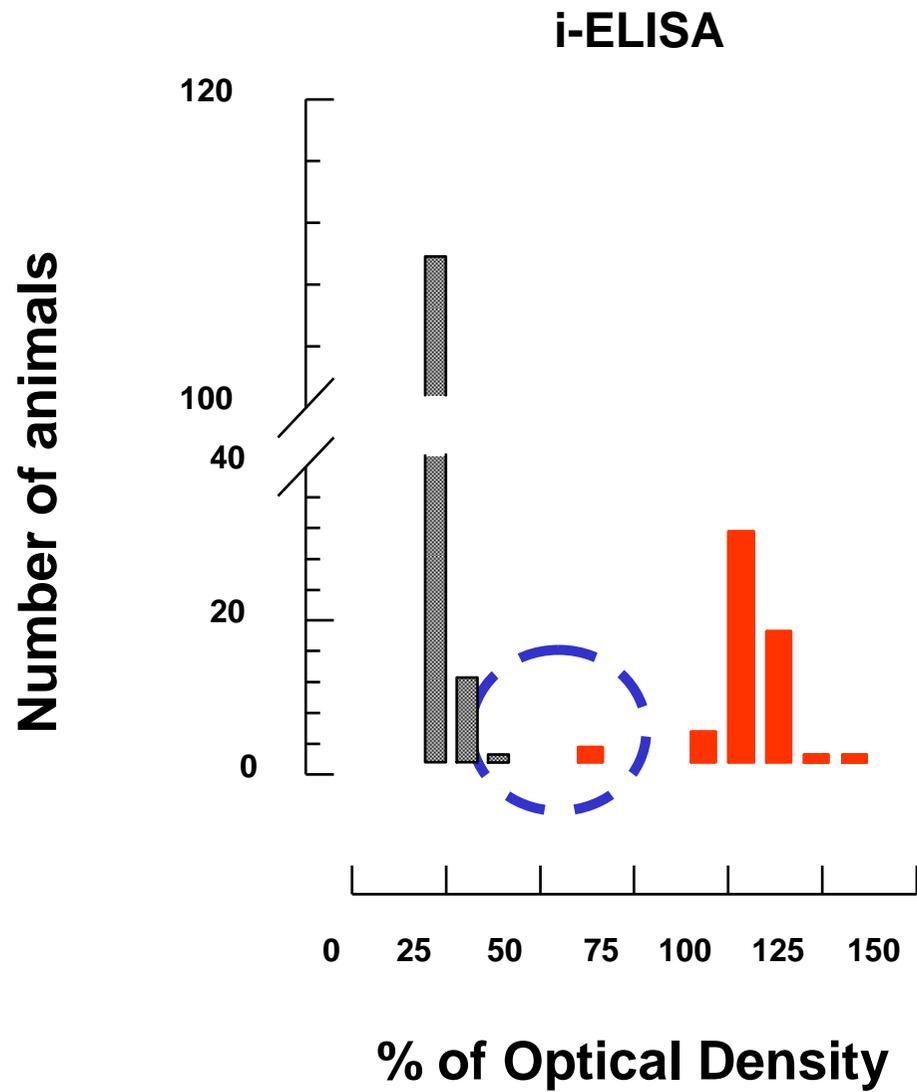
$$(2) \% \text{ Especificidad} = \frac{\text{Sanos negativos}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de sanos}} \times 100$$

baja SP = sob्रेसacrificio

Que es preferible.....

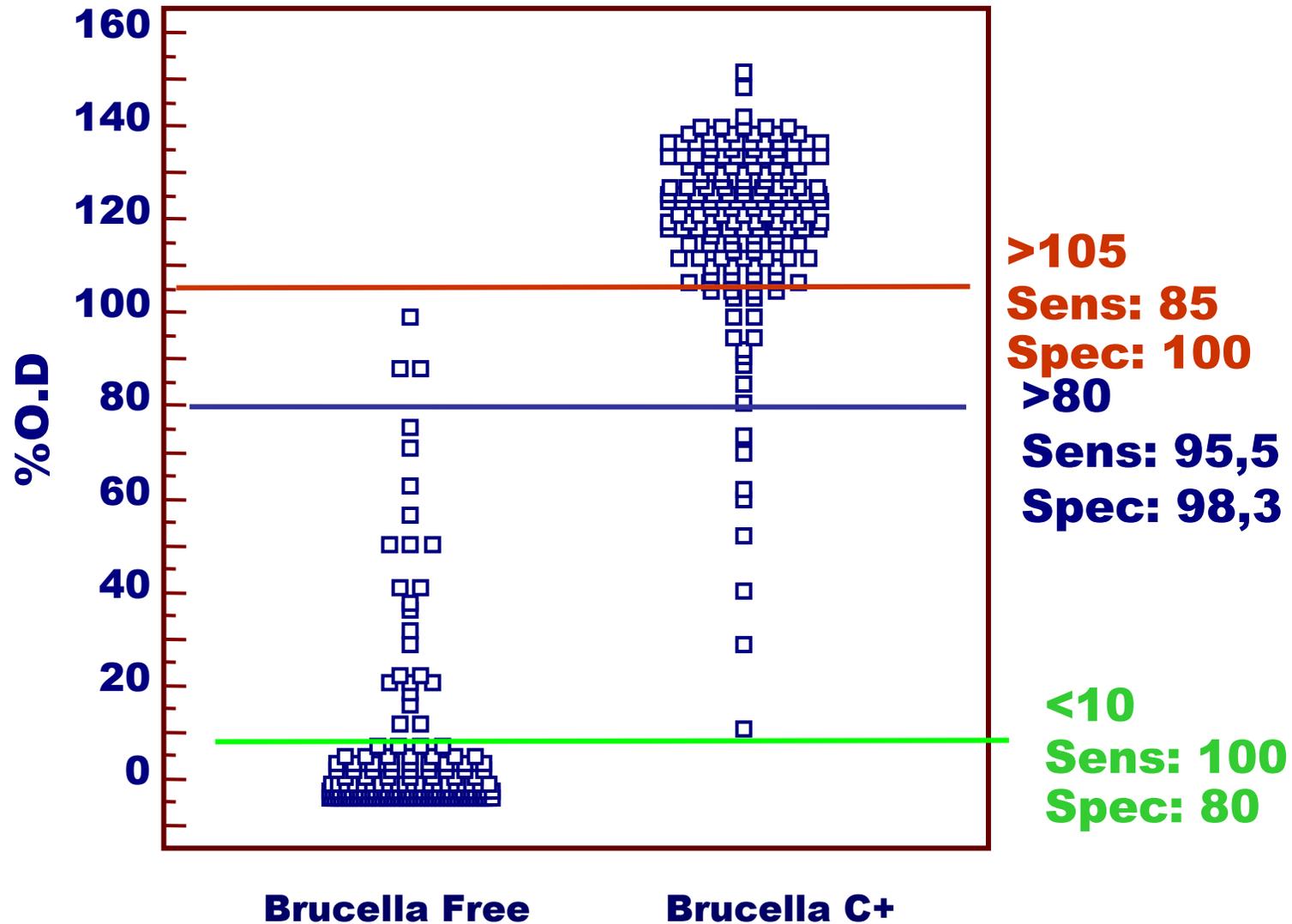
¿primar la **Sensibilidad o la **Especificidad**?**

**Los tests perfectos
NO EXISTEN CASI
NUNCA**



LOS TESTS IMPERFECTOS ABUNDAN

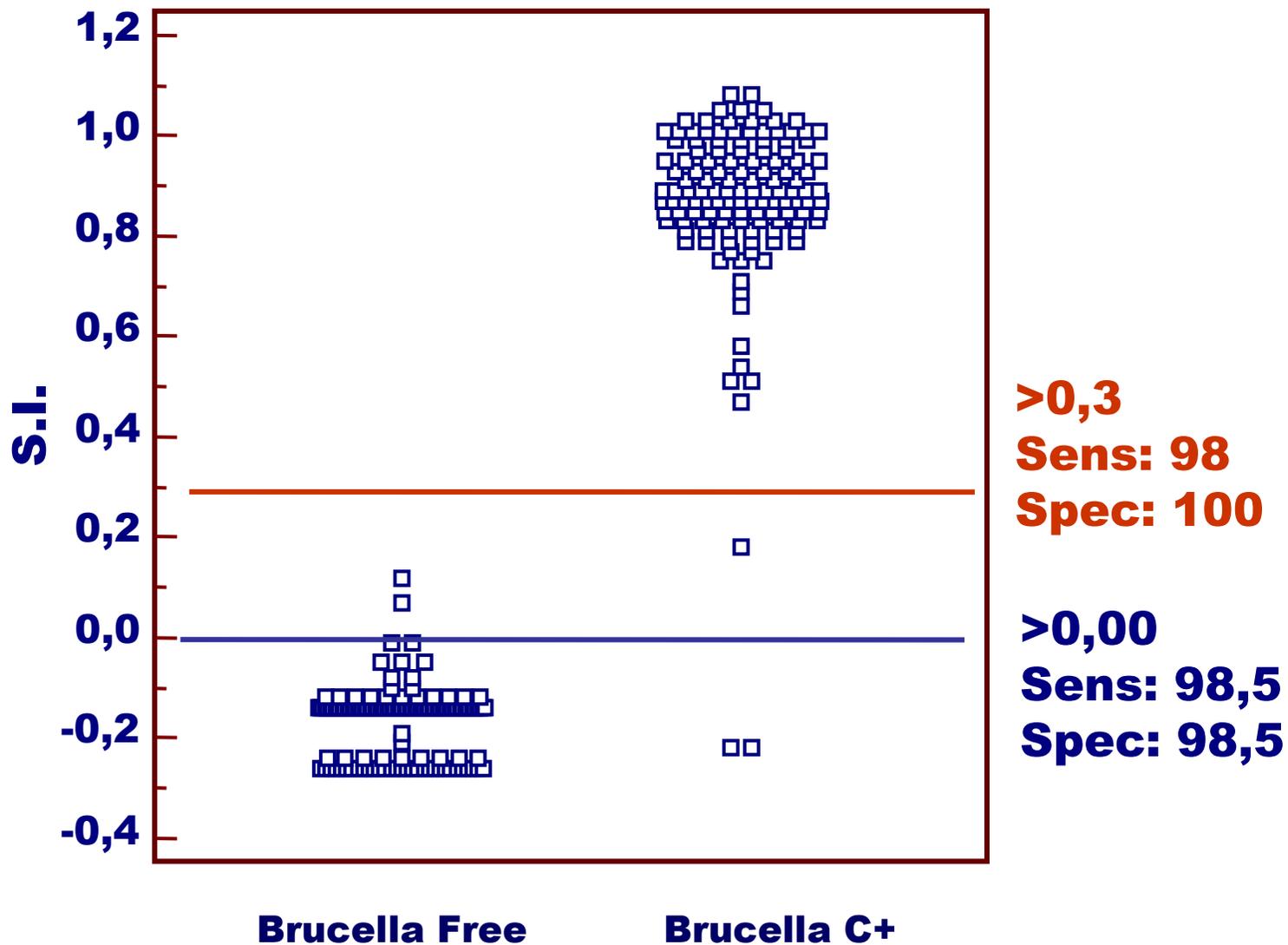
CHEKIT (IDEXX) (iELISA)



(Blasco et al, 2010 no publicado)

(Blasco et al, 2010 no publicado)

(iELISA) SERELISA (SYNBIOTICS)



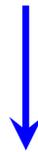
Censo: 5 millones de vacas; Prevalencia indiv.: 0.07 %

Supuesto 1: iELISA: 97 % Sensibilidad y 100% Especificidad



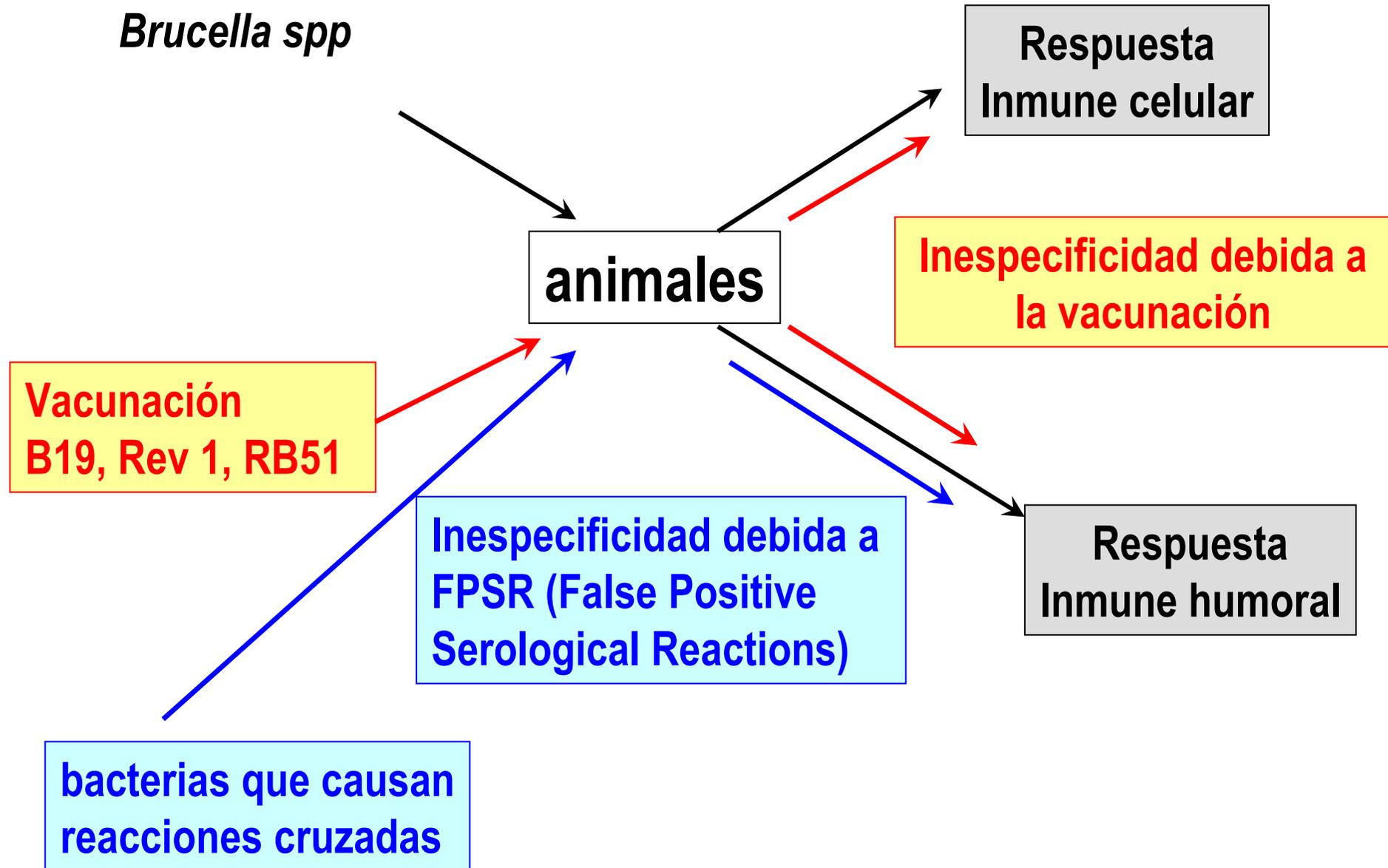
Un total de 105 vacas infectadas quedarían sin diagnosticar

Supuesto 2: iELISA: 100 % Sensibilidad y 98.5% Especificidad



Un total de 75.000 vacas sanas serían sacrificadas innecesariamente

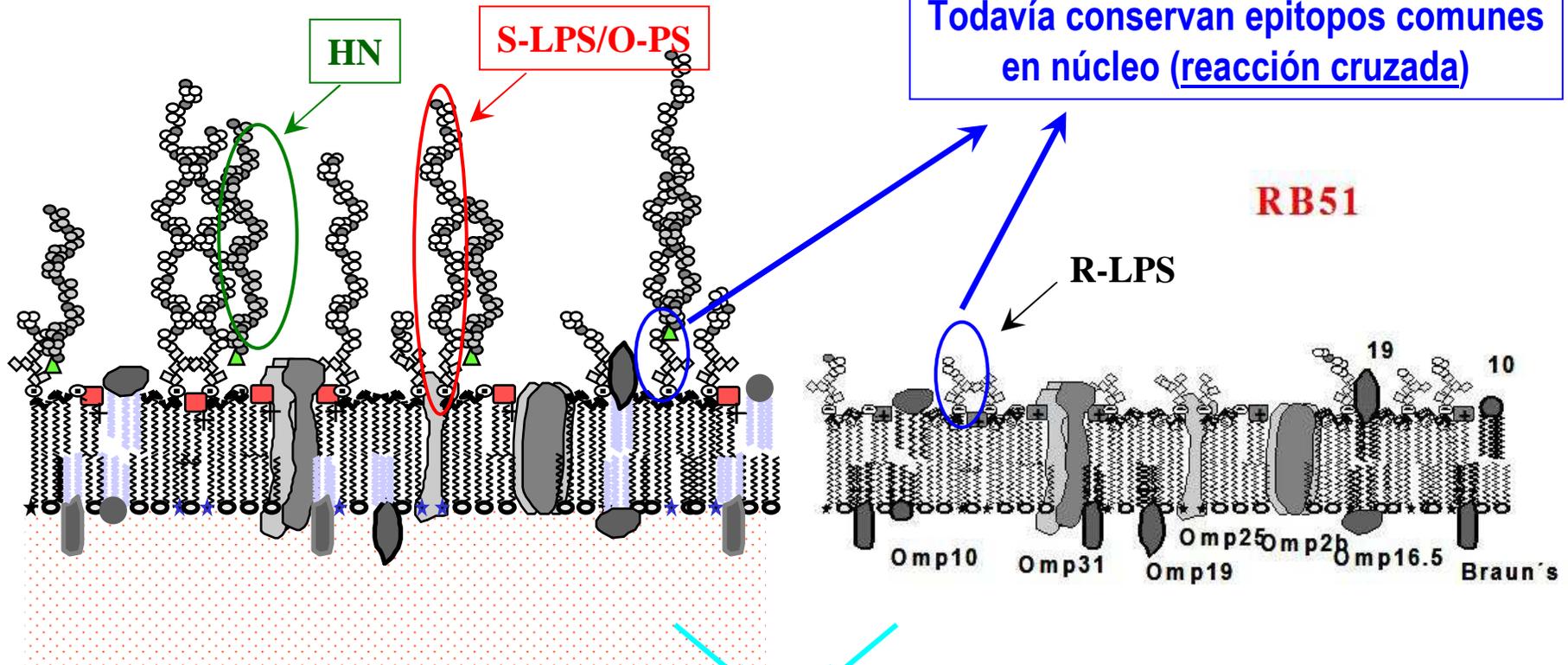
Factores que afectan a la Especificidad o a la Falta de Especificidad



Antígenos principales de *Brucella*

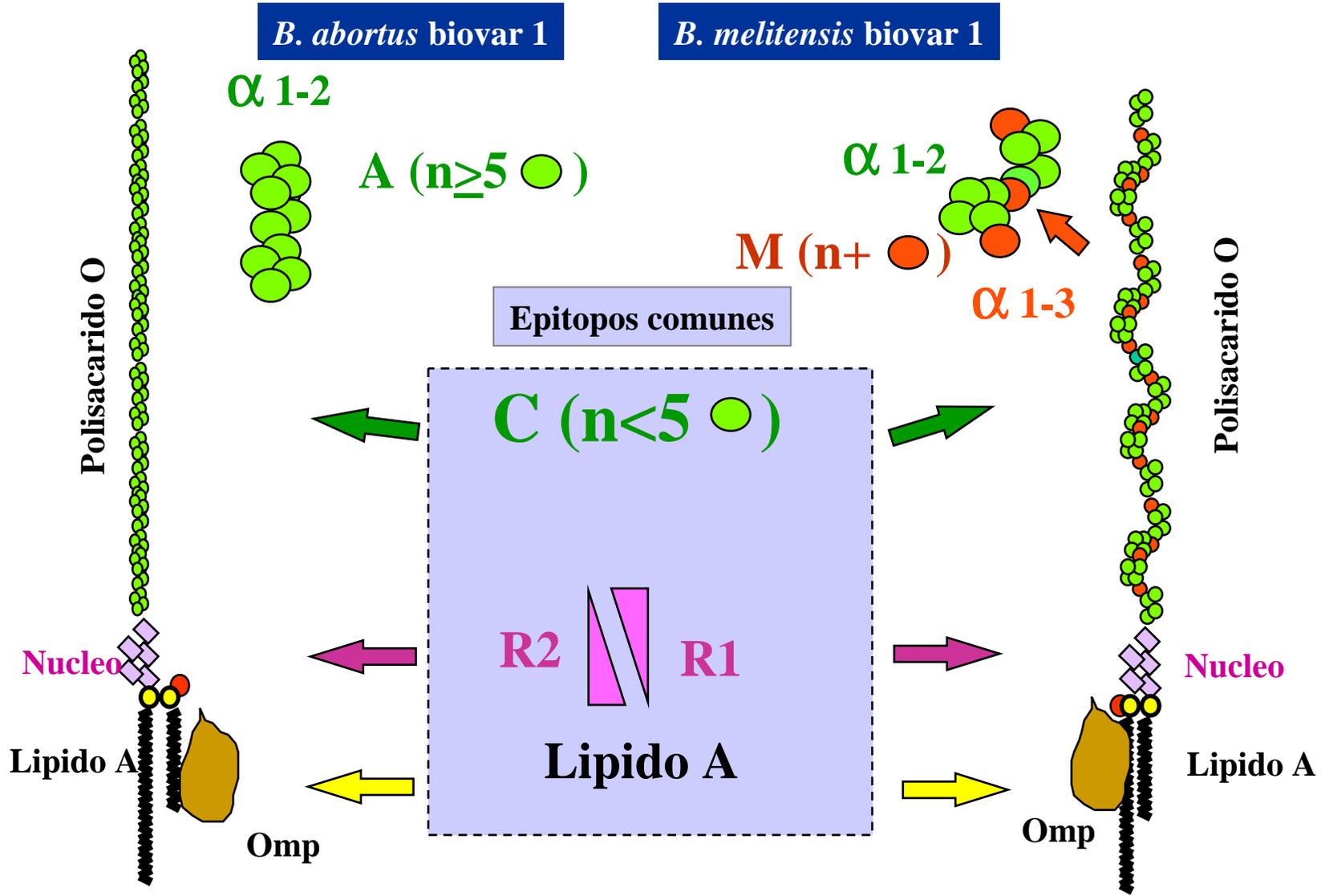
Cepas S: *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*
(y B19 y Rev 1)

Cepas R: *B. ovis* y *B. canis*
(y RB51)

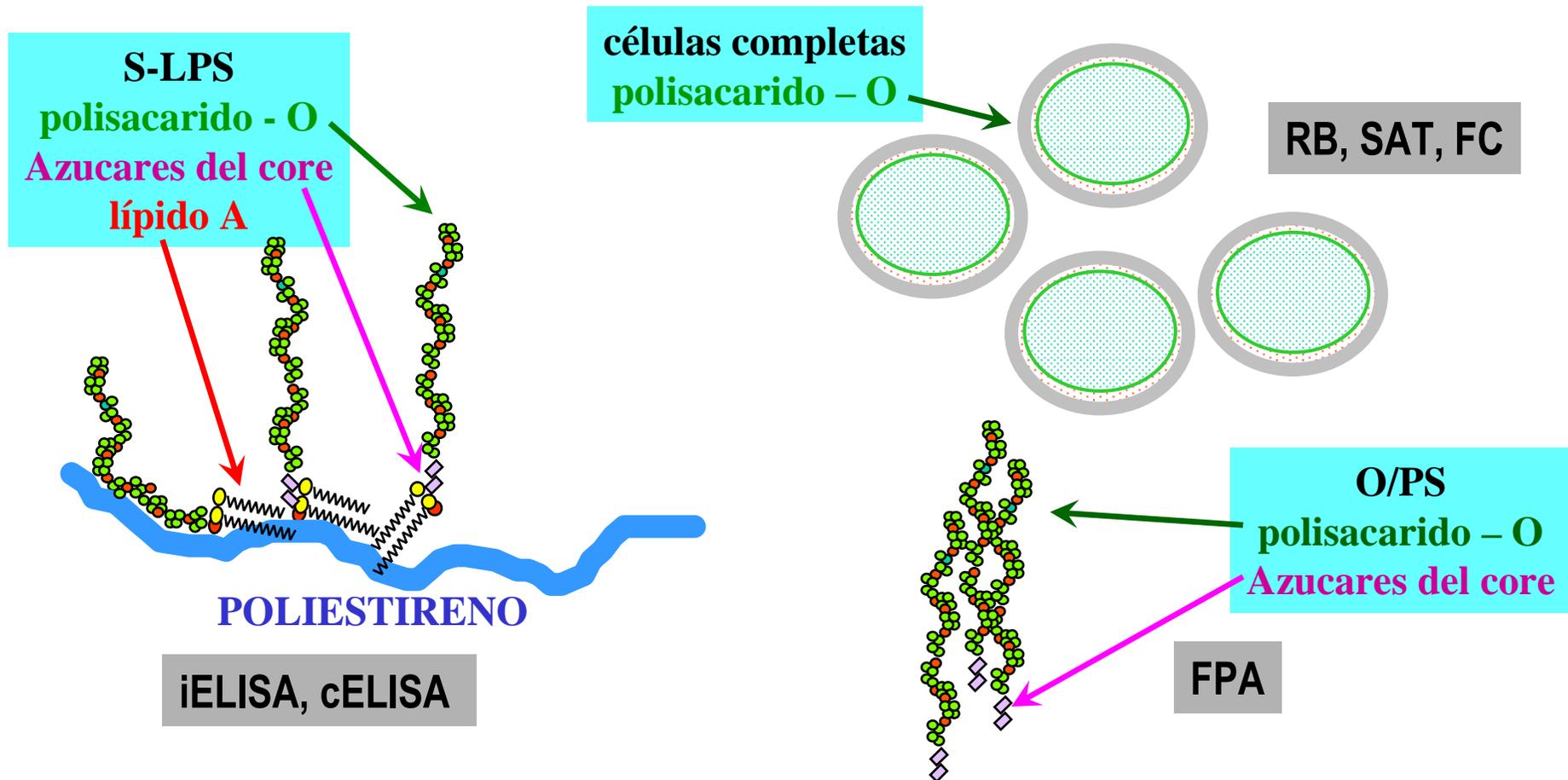


Proteínas citosólicas-periplasmáticas (comunes)

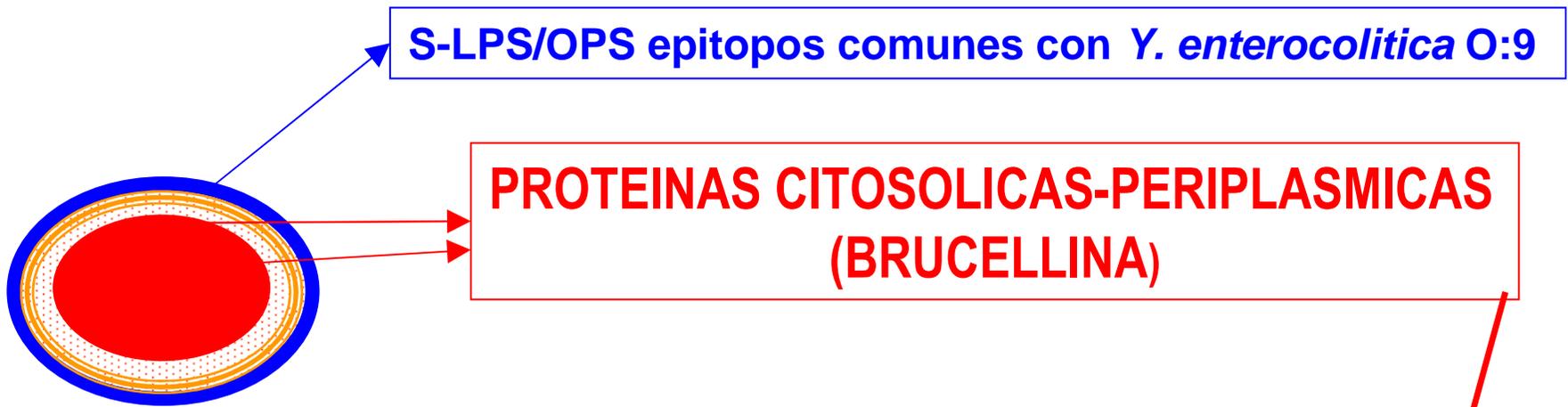
epitopos del LPS-S



Importancia de la exposición de antígenos



- Con cel. Completas \Rightarrow solo Ac frente al Polisacárido O
- Con LPS/PS-O \Rightarrow Ac frente a TODOS EPITOPOS del LPS, incluidos los comunes de las cepas R (*B. ovis* y *B. canis*)



S-LPS/OPS epitopos comunes con *Y. enterocolitica* O:9

**PROTEINAS CITOSOLICAS-PERIPLASMICAS
(BRUCCELLINA)**

compartidas por todas especies de *Brucella*
a diferencia del S-LPS, **inducen hipersensibilidad (DTH)**

**Son totalmente (mayoritariamente) específicas de *Brucella*
y no son compartidas por *Y. enterocolitica* O:9**

Vecinos filogenéticos
(*Rhizobiaceae* y
 α -2 *Proteobacteria*)

Pueden resolver el
problema de FPSR

Que sepamos.....no dan problemas?

Pruebas diagnósticas principales en función del antígeno usado

Antígeno	Pruebas diagnósticas
Células completas	RB FC RT SAT Coombs (i-cELISA)
LPS-S /LPS-R	i-cELISA DDG (FC)
Polisacárido O (O-PS)	i-cELISA FPA
HN	DDG/IDR (iELISA)
Proteínas citosólicas	CIE/ DDG (iELISA) DTH (p. intradérmica)

INMUNOGLOBULINAS detectadas según el tipo de prueba serológica

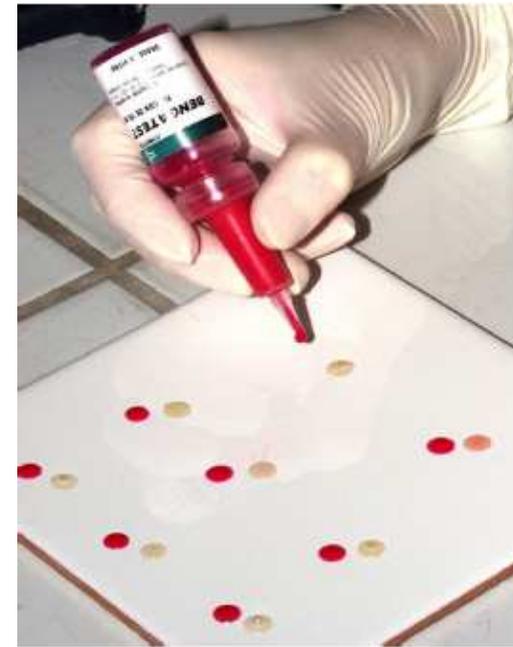
Inmunoglobulina	Tests diagnósticos
Ig M	SAT iELISA (si anti IgM o anti IgG/H+L)
Ig G	FC DDG SAT Coombs iELISA (si anti IgG o proteína A/G)
Ig A	iELISA (si anti IgA)
Todas	RB RT cELISA FPA

Background: choice of test

± 18.000 € equipment
little human power

FPA: 10\$/test
cELISA: 6€/test
iELISA: 5€/test

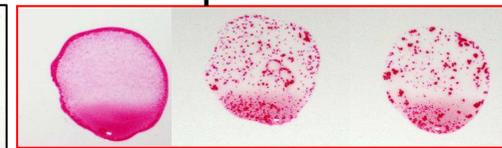
±5 cents of € per test (in EU)
2000 test/day/person



negative



positive



Un concepto importante: la dependencia

- ❑ Dos tests son **dependientes** cuando determinan el mismo fenómeno biológico
- ❑ Dos tests son **independientes** cuando determinan fenómenos biológicos diferentes (total o parcialmente)
 - serología vs. brucellina (independencia **total**)
 - suero vs. leche (independencia **parcial**)

tests dependientes :

- Menos discordancia pero menos información añadida

tests independientes :

- Mas discordancia pero también más información añadida

Uso de tests en serie o en paralelo

Dos tests **dependientes** en serie/paralelo = tirar dinero
(ej., cELISA + FPA)

Dos tests **totalmente independientes** (ej., RB + Brucellina):

- **en serie** = información perdida (SE diagnóstica) o ganada (SP en FPSR)
- **en paralelo** = información añadida (SE diagnóstica)

Dos tests **parcialmente independientes**

- **paralelo: RB + iELISA (IgG/H+L)**= información añadida (**buena**: aumento de SE -ej. vac RB51- o **mala**: pérdida de SP -ej. *B. ovis*-)
- **serie: RB + FC** = información perdida (baja SE -FC no detecta IgM-)

PRUEBAS DE DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO

RBT, CFT ⇒ *habituales en la UE/OIE*

Bovino

iELISA, cELISA, FPA ⇒ *oficiales UE/OIE para comercio*

SAT, GD-HN, Brucellina ⇒ *“otros” OIE*

RBT, CFT ⇒ *habituales en la UE/OIE*

ovino/
caprino

FPA, Brucellina ⇒ *“alternativos” OIE para comercio*

iELISA, GD-HN ⇒ *“otros” OIE*

RBT, CFT ⇒ *oficiales en la UE*

porcino

RBT, i-cELISA, FPA ⇒ *OIE para comercio*

Brucellina ⇒ *“otros” OIE*

CFT *oficial para B. ovis en la UE/OIE*

ovino/
B. ovis

iELISA, GD ⇒ *“otros” OIE*

Prueba de Rosa de Bengala: estandarización y problemas

Manual OIE:

Estandarizar el antígeno de manera que de **positivo** con una dilución **1/47.5** del OIEISS y **negativo** con la dilución **1/55**

Antígeno	Dilución OIESS	Sensibilidad
CNRB (E)	1/80	93.3 %
CVL (UK)	1/35	85.9 %
LNIV (P)	1/60	88.9 %
Pourquier (F)	1/47.5	87.4 %
Sanofi (F)	1/47.5	86.6 %)
R-Merieux (F)	1/47.5	85.9 %

ESTANDARIZACION FRENTE AL OIEISS (ANTIGUO Isabs)



BAJA SENSIBILIDAD



ALGUNOS SUEROS SON RB - / CFT +

La UE recomienda usar ambos → caro y sin sentido práctico
Cambios en estandarización son precisos!!! ...mientras tanto:

	CFT +	CFT -	Kappa
St RB +	197	11	0.921
St RB -	6 (2.8%)	217	
RBm +	203	14	0.940
RBm -	0 (0.0%)	214	

PERO.....OJO EN PORCINO!!!!!!

132 cultivo positivo	Positivos	Sensibilidad (%)
RB modificado	131	99,2
RB standard	125	94,7

292 <i>Brucella</i> free	Positivos	Especificidad (%)
RB modificado	46	84,2
RB standard	4	98,9

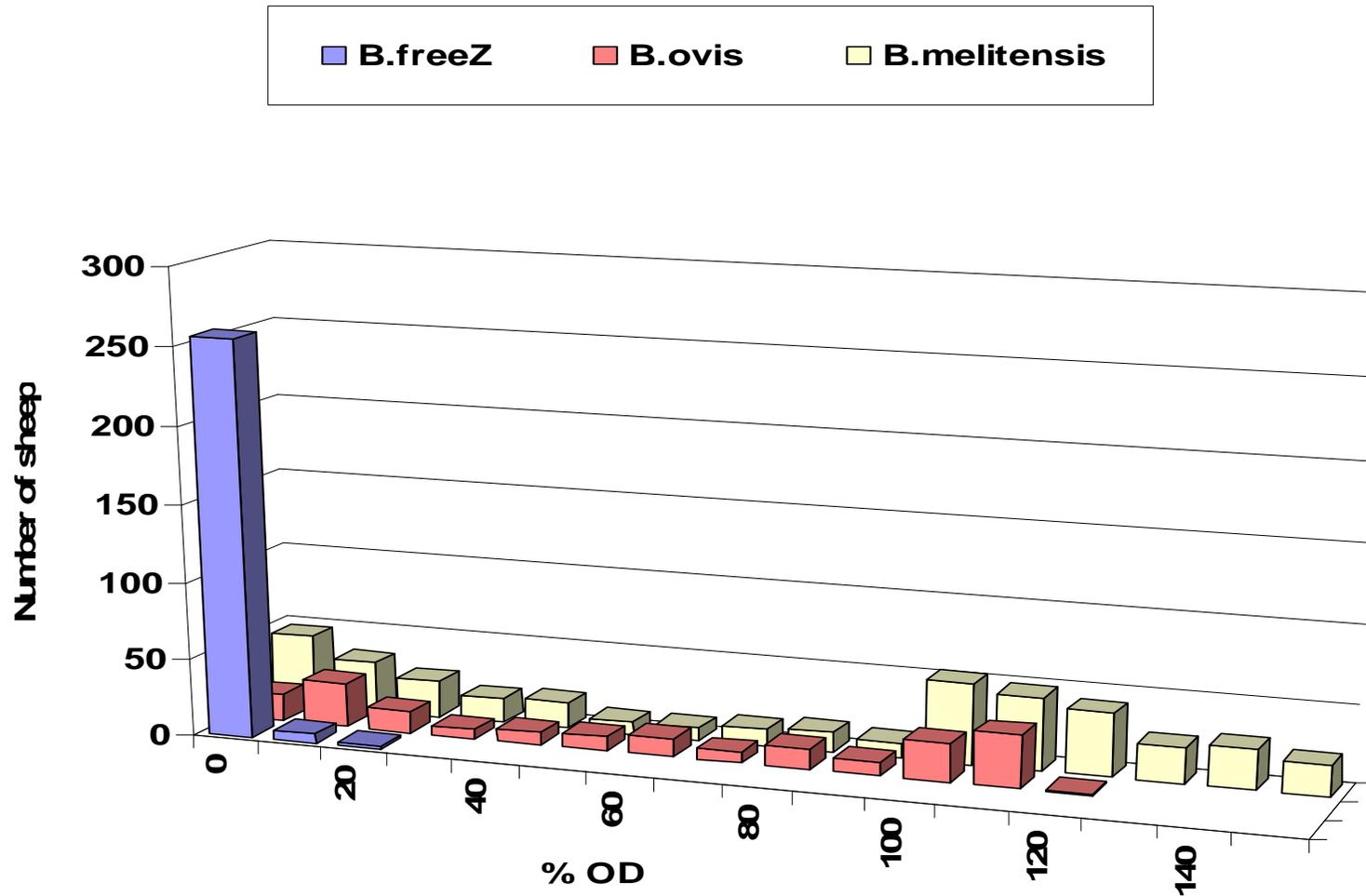
Prueba de Fijación del C'

Problemas principales

- **Valor confirmativo?: administrativo nunca biológico**
- **Prozonas**
- **Poder anticomplementario**
- **Sueros hemolizados**
- **Coste muy elevado**
- **Complejidad técnica**
- **Subjetividad (+, ++, +++, +++++)**

debería enviarse al MUSEO !!!!

LOS iELISA IMPERFECTOS ABUNDAN



¿Cómo establecer el punto de corte?

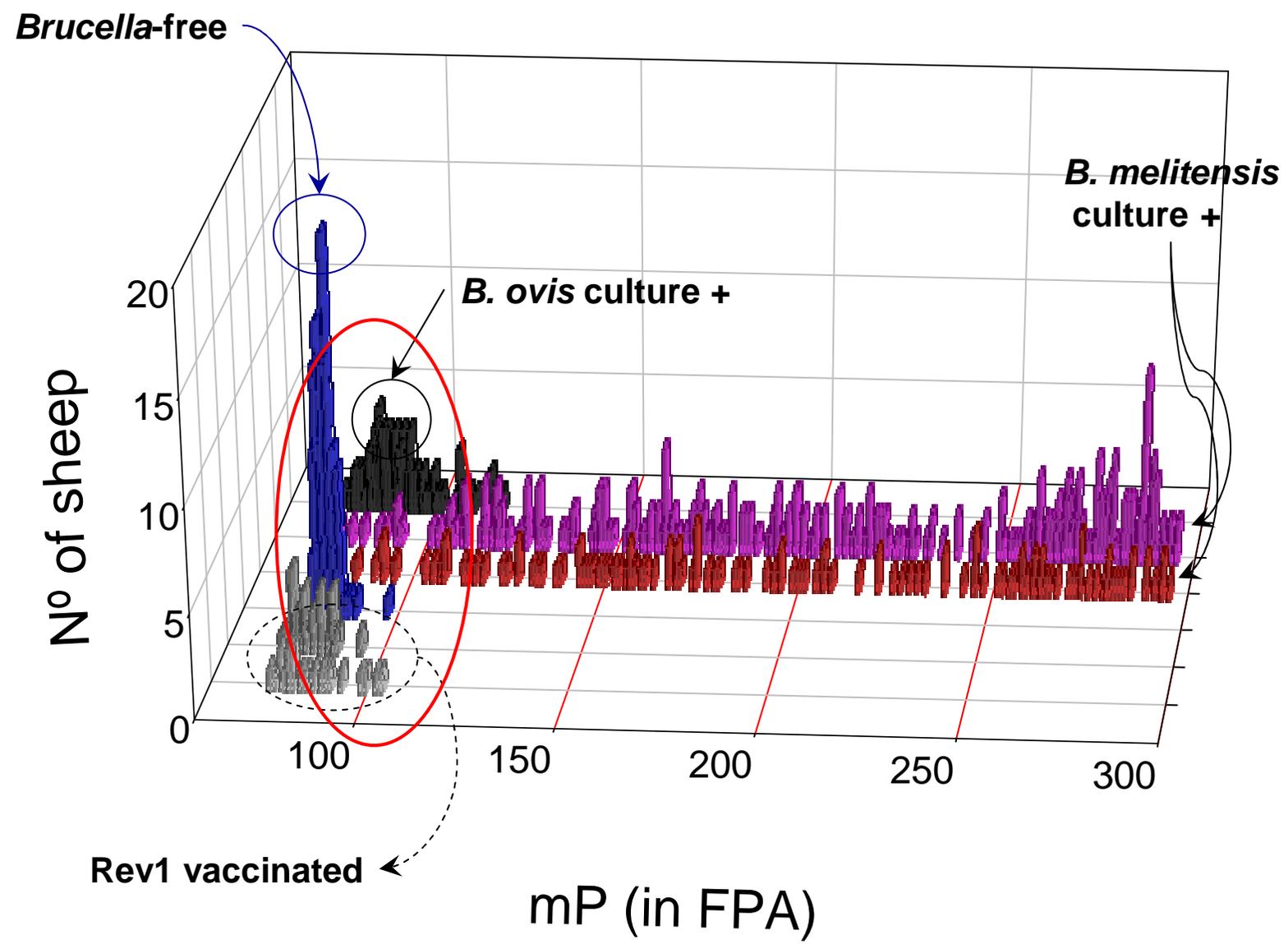
Análisis ROC de los % OD obtenidos en el i-ELISA anterior

“optimal” ROC values
(PI= max. sum. SE+SP)

Values for 100% specificity

Obs	Probab.	Pos.	Neg.	False pos.	False Neg.	Sensit.	1-Spec
1	0.99999	118	264	0	67	0.63784	0.00000
2	0.99967	124	264	0	61	0.67027	0.00000
3	0.98887	138	262	2	47	0.74595	0.00758
4	0.72464	167	256	8	18	0.90270	0.03030
5	0.07233	185	0	264	0	1.00000	1.00000

(Blasco et al, 2010 no publicado)



Pruebas basadas en otros antígenos (polisacárido O)

OTROS PROBLEMAS DEL DIAGNOSTICO SEROLOGICO EN TODAS ESTAS PRUEBAS BASADAS EN S-LPS /O-PS

cellosis in diagnosis and the consequent effect on the export trade. Great Britain has always been free from *B. suis* infection and enjoys a thriving export trade as a result of the generally high health status of its stock. During the 7 years prior to 1988, the number of pigs tested for export certification giving a CFT reaction of greater than 20 international complement-fixation test units (icftu) never exceeded 0.004%, whereas the figures for 1988, 1989, and 1990 were 0.42%, 0.70%, and 1.5%, respectively. Since 1988, at least 4% of exporting herds have had more than 5% CFT positive reactions, with some herds reaching levels of more than 50% of animals tested failing at this level. *Y. enterocolitica* O:9 has been isolated from many herds involved, and despite extensive investigation, *B. suis* has not been recovered (Wrathall et al. 1991).

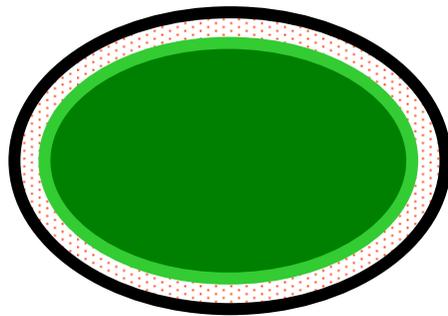
el problema de las reacciones serológicas positivas falsas

debidas a infecciones producidas por varias bacterias gramnegativas:

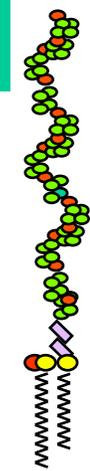
Escherichia coli O157
Salmonella N (O:30)
Vibrio cholerae O:1
Stenotrophomonas maltophilia
Escherichia hermanii

Y. enterocolitica O:9

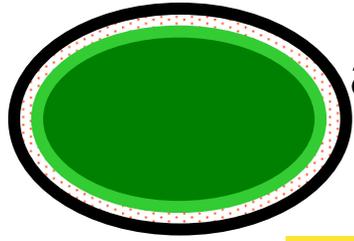
epitopos comunes
en S-LPS (O-PS)



B. abortus



FPSR



antígenos para RB y FC = **bacterias completas**

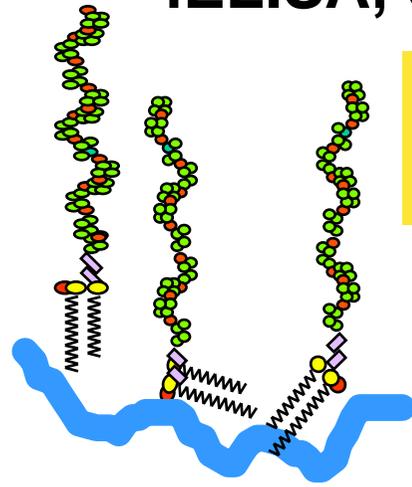
NO SON ESPECIFICOS en caso de FPSR

Especificidad de RB en regiones indemnes de Francia

- **1.017 granjas**
- **7.814 cerdos**
 - **Cerdos + : 2.77%**
 - **Granjas + : 13.3%**

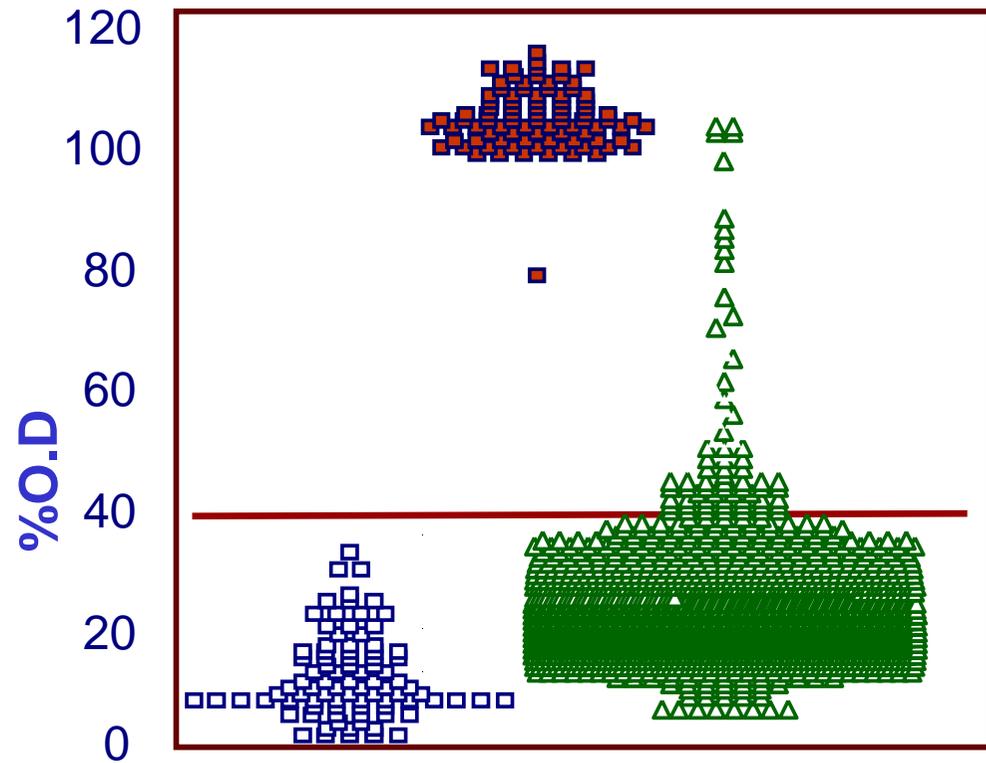
¿los tests ELISA/FPA resuelven el problema?

iELISA, cELISA, FPA usan S/LPS o O/PS



POLIESTIRENO

por tanto, **NO SON** totalmente específicos para resolver el problema de las FPSR



-  Cerdos cultivo positivo
-  Cerdos libres de *Brucella*
-  Cerdos infectados con *Y. enterocolitica* O:9

CONSECUENCIAS en contextos libres (o casi) de enfermedad

**interpretación por
EXCESO de los
resultados serológicos**

**interpretación por
DEFECTO de los
resultados serológicos**

**SOBRESACRIFICIO
de animales sanos**

**Diseminación del
problema de las
FPSR**

**Aumento del riesgo de
diseminación de la
Brucelosis**

SOLUCIONES POSIBLES (contextos M4- B4)

1. Repeticiones y estudios epidemiológicos

- Reacciones transitorias (< 2 meses, 85%)
- Títulos FC bajos y tienden a decrecer-desaparecer
- Animales jóvenes principalmente (menos de 3 años)
- 1 o 2 animales por rebaño (80% de los casos)
- sin relación con la brucelosis y ligadas esencialmente a la infección por *Y. enterocolitica* O:9

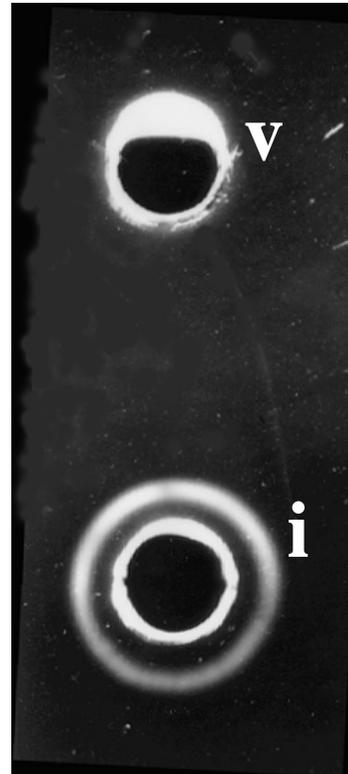
SOLUCIONES POSIBLES (contextos M4-B4)

2. Pruebas basadas en otros antígenos

- hapteno nativo DDG-IDR**
- prot. citosólicas Precipitación Gel
Brucellina**

Precipitación en gel con NH

inmunodifusion
Radial (IDR)



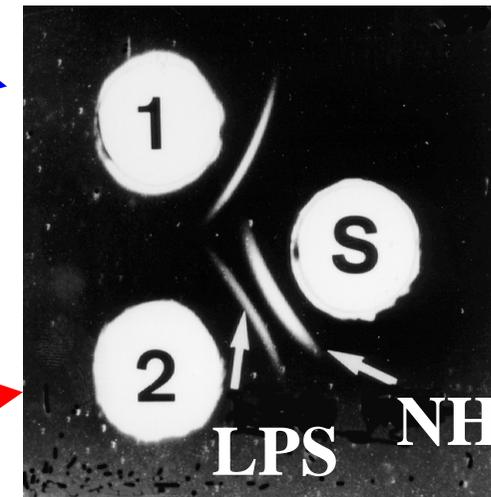
Las brucellas S contienen hapteno nativo (HN)

Doble difusion (DDG)

Suero de animales

Vacunados
con B19 o Rev1
o FPSR

Infectados por
B. abortus o
B. melitensis



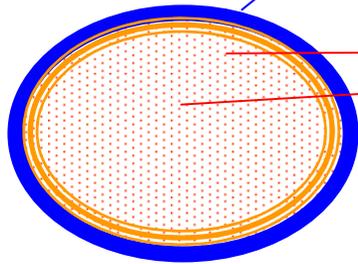
Específicas también para FPSR *Muñoz et al 2005, CDLI, 12, 141*

La explicación es desconocida....creemos que guarda relación con la cantidad y la afinidad de los anticuerpos

Pruebas potencialmente utilizables como confirmación (OIE)

Tests con Proteínas citosólicas

S-LPS/OPS epitopos comunes con *Y. enterocolitica* O:9



B. abortus

**PROTEINAS CITOSOLICAS-PERIPLASMICAS
(BRUCCELLINA) SON ESPECIFICAS**

**test
serológicos**

**pueden resolver el
problema de las FPSR**

**tests de CMI *in vitro*
IL/IFNg**

mal resultado

**CMI *in vivo*
Prueba cutánea (DTH)
(OK a nivel de rebaño)**

PRUEBA CUTANEA CON BRUCELLINA

Inocular ID (50 μ g/0.1 ml)
(*procurando ser
higiénicos*)



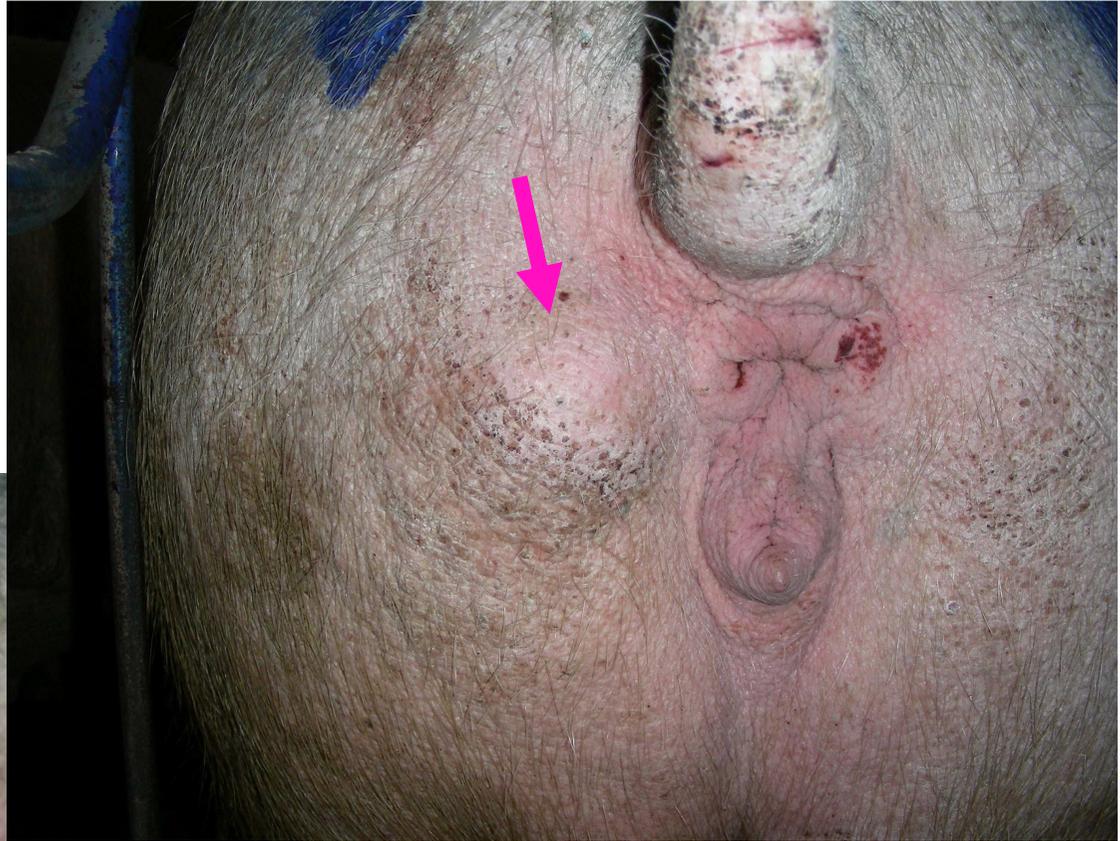
leer a las 48 h. de la
inoculación
(*palpar siempre para
observar la inflamación*)



**inflamación de
leve a moderada
con hiperemia**

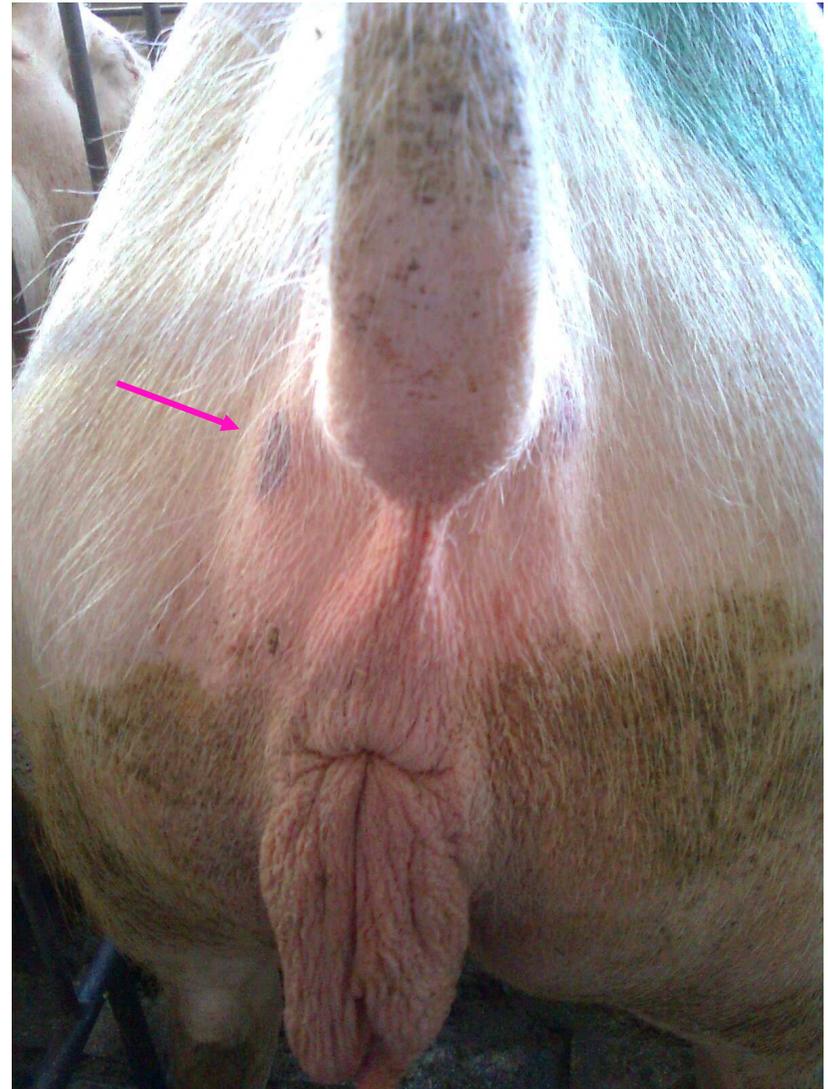


**inflamación
severa**





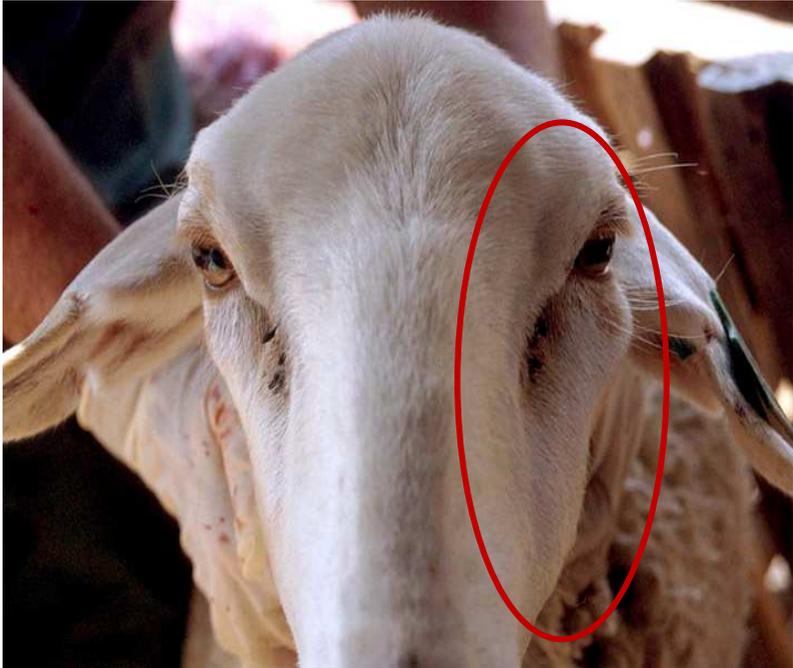
**inflamación severa
con hemorragia**





Intradérmica

72h



Intradérmica/subcutanea

48h

Proteínas citosólicas

Las proteínas de *Brucella* inducen

respuesta
Celular (CMI)

DTH (skin) test

Anticuerpos

Respuesta retardada con respecto
a la de los anti-S-LPS

Tests serológicos
(DDG,CIE,IDR)

SE inferior a la de los
Tests con LPS-S

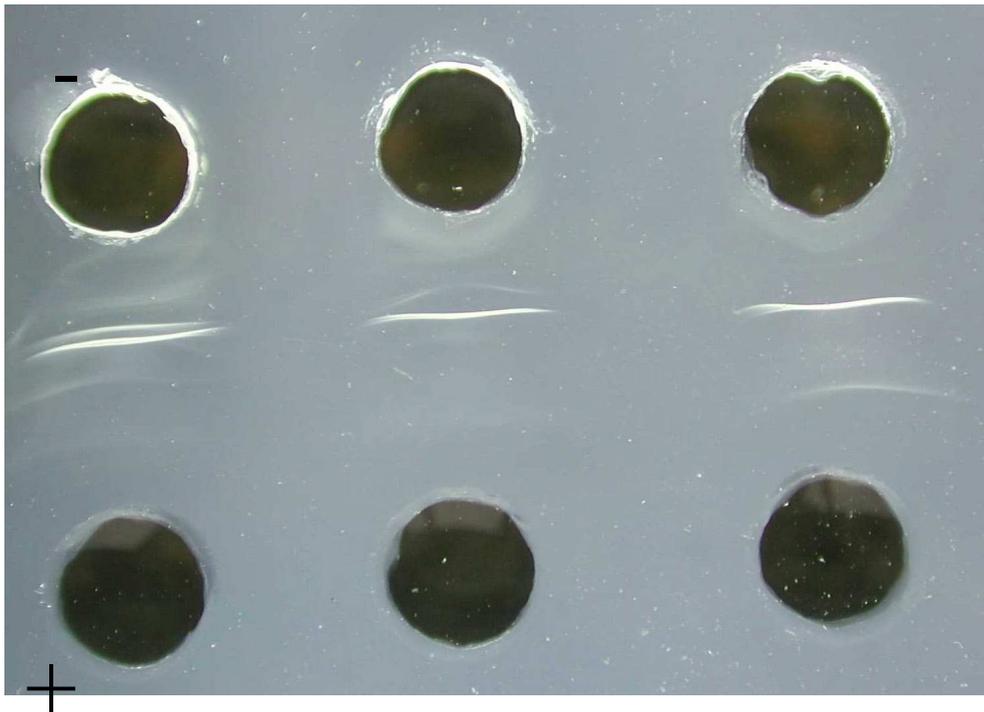


Muy útiles a nivel de rebaño
en casos de FPSR

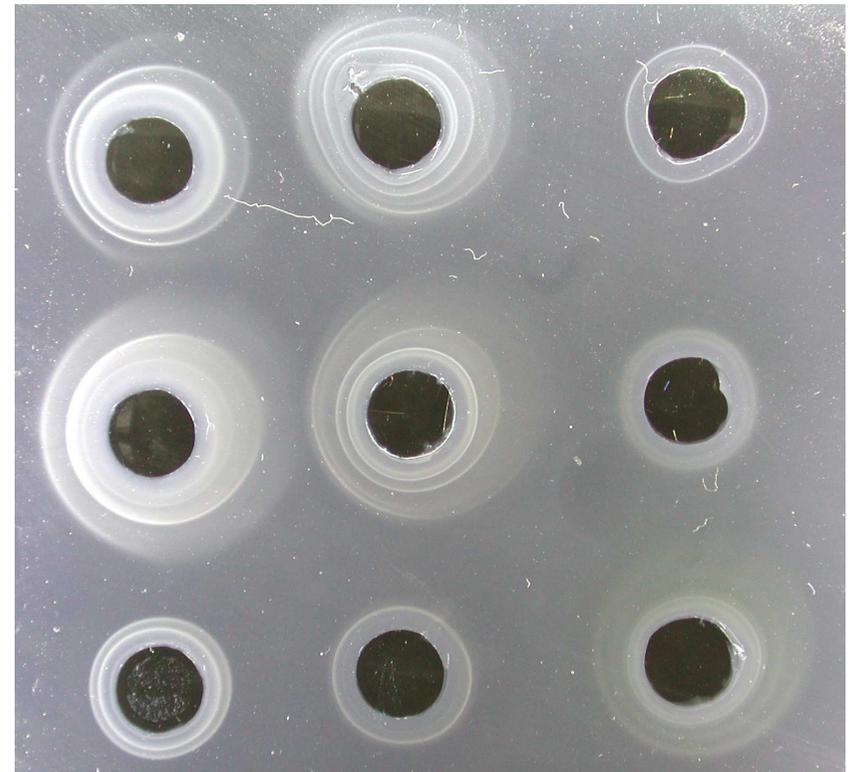
Tests de precipitación en gel con Proteínas citosólicas

Fundamento: las proteínas citosólicas son solubles en agua y pueden difundir en geles. Algunas tienen carga neta negativa y migran al ánodo en CIE

CIE



IDR



Valor diagnostico de los tests serológicos en ganado bovino

Test	% Sensib con cultivo positivo	% Espec. con brucella free	% Espec. en FPSR	% Espec terneras vac SC ¹ . con S19	Coste	Equipo	Experiencia en erradicacion
RB	94-99.7	100	86.4	70	++	+	buena
FC	82-94	100	94.4	90 ²	++++	+++	buena
RID-NH	89-93.5	100	100	100	+	+	buena
i-ELISA S-LPS	95-100	100	58.4	95-98	+++	+++	no hay
c-ELISA	84.4-97.5	100	88.8	96.5	++++	+++	no hay
FPA	95-99	100	100??	97-99	++++	++++	no hay
DDG-NH	88.4	100	100	100	+	+	buena
CIE proteínas	91.2	100	100	-	+	++	no hay

1. Aumenta en vac CJ

2. Sobreestimada, resulta en sobresacrificio

Tests basados en el S-LPS y realizados en la leche

- Ring Test

- iELISA

Tests en leche

**Muestra accesible (en lactantes)
La leche es rica en IgG1 (e IgA)**

**Animales seropositivos en suero pueden ser negativos en leche
Vacunados (B19/Rev 1/RB51) pueden también tener Ac en leche**

**SE individual es mas baja que la de los tests serológicos y
la especificidad en caso de vacunación esta comprometida**

Su uso esencial es para el screening de

- rebaños de leche en control**
- detectar Ac anti LPS-S**
- en zonas oficialmente indemnes**

iELISA en leche

i-ELISA con S-LPS y conjugado anti- IgG

Sensibilidad analítica mayor que el Ring Test

Mejor SE

(hasta 30% de ELISA + pueden ser RT -)

Detección más precoz

	Nº muestras analizadas	PCR	RT	ELISA
Cultivo +	56	87.5	94.6	98.2
Brucella-free	37	100	100	100

Tests para el diagnóstico de *Brucella ovis/ B. canis*

- DDG

- FC

- iELISA

Usando antígenos R
específicos

Diagnóstico de *B. ovis*

Test	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
FC	92.7	100 ?
GD	96.4	100 ?
iELISA	97.6	100 ?
GD + iELISA	100	100 ?

La FC es la oficial UE/OIE para comercio internacional

Se conoce muy poco de la **especificidad** de los antígenos de *B. ovis* y las reacciones cruzadas son un peligro inexplorado (*B. nodosus*, *C. pseudotuberculosis ovis*)

BRUCELLINA??

¿SOLUCIONES?

sentido común

Apoyar **SIEMPRE** los resultados serológicos con la información **clínica (C)** y **epidemiológica (E)**:

uno o dos RB + y FC-



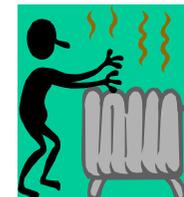
muy pocos RB +, 1-2 FC+ títulos bajos



varios RB +, FC + alto



varios RB +, **título FC aumenta, C/E**



RB +, FC +, **GD-NH +, Brucellina C/E**



usar **CULTIVO** siempre que sea posible