

Comparación de las pruebas: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología y hemocultivo con respecto a sensibilidad y especificidad, para la detección de *Brucella* spp en muestras humanas

María Genoveva Álvarez-Ojeda¹, Carolina Saldaña-Fuentes², María Romelia Ballesteros-Elizondo³, Irma O. Martínez-Vázquez², Ahidé López-Merino⁴, Evangelina Briones Lara⁵ y Alberto Morales-Loredo^{6*}

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro de Investigación Regional del Noreste, Río Bravo, Tamaulipas, México; ²Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas, San Nicolás de los Garza, N.L., México; ³Servicios de Salud de Nuevo León. Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León, Guadalupe, N.L., México; ⁴Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México; ⁵Instituto Mexicano del Seguro Social. Hospital de Especialidades Gineco-Obstétricas "Dr. Ignacio Morones Prieto", Monterrey, N.L., México; ⁶Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Centro de Desarrollo de Agronegocios, General Escobedo, N.L., México.

Resumen

Objetivo: Comparar la prueba PCR, para la detección de *Brucella* spp, en muestras de sangre humana, con respecto a rosa de Bengala (RB), aglutinación estándar en placa (MAP), 2-mercaptoetanol (2-ME) y hemocultivo establecidas en la NOM 022-SS2-1994, en cuanto a sensibilidad y especificidad. **Material y métodos:** En el año 2005, se muestreó a 92 personas de los municipios de Anáhuac y Sabinas Hidalgo, Nuevo León (N.L.), en donde se registró un brote de brucelosis en humanos. A partir de sangre completa, se realizó el hemocultivo y se obtuvo ADN. Se amplificó un fragmento de 223 pares de bases de la secuencia que codifica para una proteína de 31 kDa específica del género *Brucella*. **Resultados:** La PCR detectó 23 muestras positivas. La sensibilidad y especificidad de PCR comparada con RB fue de 44.68 y 95.56%, respectivamente. Comparada con MAP fue de 51.61 y 88.52%, mientras que con 2-ME fue de 53.57 y 87.50%. Cuando se comparó con el aislamiento bacteriano, se obtuvo un 100.0% de sensibilidad y 80.23% de especificidad considerando tanto personas positivas como negativas para serología. **Conclusiones:** La prueba de PCR puede ser una herramienta alternativa al cultivo bacteriano, en el diagnóstico de brucelosis humana.

PALABRAS CLAVE: *Brucella* spp. PCR. Serología.

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of polymerase chain reaction for detection of *Brucella* spp in human blood samples compared with the serological tests and blood culture. **Material and Methods:** In 2005, a total of 92 people were sampled from the towns of Anahuac and Sabinas Hidalgo, Nuevo Leon, where an outbreak of human cases had taken place in the same year as this study. The sera collected were analyzed by serological tests according to the NOM 022-SS2-1994. DNA was obtained using CTAB extraction method and it was used to amplify a fragment of

Correspondencia:

*Alberto Morales-Loredo

Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, CDA.

Francisco Villa s/n. Nte.

Col. Ex Hacienda El Canadá, C.P. 66054

Gral. Escobedo, N.L., México

E-mail: amorales@lcrn.mx

Fuentes de financiamiento: Fundación Produce Nuevo León, A. C.

mediante el proyecto con la clave 177. Uso de la prueba de PCR para el diagnóstico de brucelosis en comunidades rurales de Nuevo León dedicadas a la producción caprina.

Fecha de recepción: 22-09-2014

Fecha de aceptación: 13-01-2015

223 bp of the coding sequence for a protein of 31 kDa present in all *Brucella* species. **Results:** The polymerase chain reaction test detected 23 positive samples. The sensitivity and specificity compared with RB was 44.68 and 95.56%, respectively. Compared with mouse antibody production, it was 51.61 and 88.52%, and 2-mercaptoethanol was 53.57 and 87.50%. When isolation (positives cultures) was compared with polymerase chain reaction, we obtained 100.0% sensitivity and 80.23% specificity, taking into account people with positive and negative serology. **Conclusions:** The polymerase chain reaction test can be an alternative tool to bacterial culture in human brucellosis diagnosis. (Gac Med Mex. 2015;151:620-7)

Corresponding author: Alberto Morales-Loredo., amorales@lcrn.mx

KEY WORDS: Brucella spp. PCR. Serology.

Introducción

La brucellosis es una enfermedad infecciosa producida por bacterias del género *Brucella*, que se caracterizan por ser patógenos intracelulares facultativos. Es una clásica zoonosis (antropozoonosis) que ocasiona problemas de salud entre los individuos que ingieren alimentos provenientes de animales infectados y representa un riesgo ocupacional para las personas que trabajan o mantienen un estrecho contacto con el ganado infectado. La enfermedad es de distribución mundial y es endémica en algunos países, donde presenta un importante problema de salud pública¹. El control de la enfermedad en animales tiene un gran impacto en la reducción de la incidencia en humanos².

La incidencia de brucellosis en la población humana de México es oscilatoria, con una variación temporal, dependiente de la entidad. La Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud notificó 2,073 casos confirmados en el año 2010. Los estados con mayor incidencia fueron: Sonora con 248, Guanajuato con 317, Jalisco con 179, N.L. con 154 y Michoacán con 145 casos³. Del año 2000 al 2009, los registros de nuevos casos de brucellosis en humanos, a nivel nacional, muestran cómo la tasa de incidencia de 1.66 reportada en 2006 se incrementó a 2.38/100,000 habitantes en 2010³.

En países como el nuestro, el riesgo de adquirir la infección en el humano está en correlación con los hábitos higiénicos y alimenticios. La movilización de lácteos hacia las zonas urbanas, como parte del proceso de comercialización, ha contribuido en buena medida a la diseminación de la enfermedad, sin importar qué tan alejados están los sitios de las zonas endémicas⁴. Los animales aceptados hasta el momento como portadores tienen en muchos casos íntimo contacto con el hombre, lo que explica la dimensión del problema que plantea esta zoonosis. Por otra parte, la brucellosis muestra sintomatología poco definida en los humanos, por lo que se dificulta la detección precoz del

infectado, lo que favorece la evolución a la cronicidad, complicando las alternativas terapéuticas y la curación definitiva⁴. El espectro clínico diverso de la brucellosis, sobre todo en la forma crónica, puede hacer que el diagnóstico se pase por alto o se retarde si el médico no tiene la sospecha de su existencia. El diagnóstico definitivo de la brucellosis humana se basa en el aislamiento de la bacteria^{3,4}. Sin embargo, la proporción de cultivos positivos varía entre 15 y 85%^{5,6}. La Norma Oficial Mexicana 022-SS2-1994, para la prevención y control de la brucellosis en el hombre en el primer nivel de atención, establece el diagnóstico serológico de la brucellosis por medio de los métodos de RB, MAP y con 2-ME, además de las pruebas confirmatorias como el hemocultivo o mielocultivo positivos⁷.

Se ha demostrado que las técnicas moleculares presentan gran sensibilidad y especificidad para la detección de *Brucella* en diversas muestras biológicas (sangre, médula, leche, orina, etc.)^{8,9}. La prueba de PCR toma un protagonismo para el diagnóstico rápido y eficiente, dejando al aislamiento para estudios epidemiológicos^{9,10}. Para utilizarse de rutina en laboratorios de diagnóstico, la técnica debe validarse, es decir, evaluar la prueba, con muestras clínicas, los aspectos de sensibilidad, especificidad y control de calidad¹¹. En este trabajo se planteó el objetivo de evaluar la prueba PCR en cuanto a su sensibilidad y especificidad, para la detección de *Brucella* spp, en muestras de sangre humana, comparada con los métodos serológicos y el hemocultivo.

Material y métodos

Sitios de muestreo

El estudio se realizó en los municipios de Anáhuac y Sabinas Hidalgo, en el estado de N.L.; los cuales fueron identificados y seleccionados con base en los brotes de brucellosis humana ahí sucedidos y reportados por la Secretaría de Salud del gobierno del estado en el año 2005.

Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra fue determinado mediante la siguiente fórmula: $n = 3.84p(1-p)/T^2$; donde n es el tamaño requerido, p es la prevalencia poblacional desconocida, y T es la cantidad o límites hacia arriba y hacia abajo de P en puntos porcentuales; en otras palabras, el grado de precisión en la estimación y nivel de confianza, 100 (1-a)%¹². En este caso se consideró una prevalencia de 0.0345 para el estado de N.L. reportada en el año 1992¹³. Considerando un nivel de confianza de 95% (T = 0.05) y aplicando la fórmula, el tamaño de muestra (n) fue de 51. Considerando que el valor de prevalencia utilizado para cálculo de tamaño de muestra fue de un reporte del año 1992, se incrementó a 92 muestras analizadas en este estudio¹³.

Población estudiada

Se incluyeron en el estudio 92 individuos de los distintos estratos socioeconómicos, que incluyeron personas con síntomas, además de personas con ausencia de síntomas pero que convivieron con personas enfermas de los asentamientos rurales relacionados con el brote de brucelosis humana.

Tipo de muestra

Se utilizó sangre completa para hemocultivo y PCR. Suero para las pruebas serológicas. La toma de la muestra la efectuó personal de la Secretaría de Salud, se extrajeron de cada paciente 10 ml de sangre completa y se dividieron en 2 partes: 5 ml sin EDTA (para suero) y 5 ml con EDTA.

Análisis serológico y aislamiento

Las pruebas de RB, MAP y la microaglutinación en presencia de 2-ME se realizaron de acuerdo a lo descrito por la NOM 022-SSA-1994 (2000). Además, se inocularon 3 ml de sangre de cada individuo en el medio bifásico de Ruiz Castañeda modificado, para realizar el aislamiento mediante el hemocultivo.

Métodos moleculares

Como control positivo se utilizó ADN de la cepa vacunal Rev1 de *Brucella melitensis* en las reacciones de PCR.

Extracción de ADN a partir de aislados de hemocultivo, cepa control y muestras por el método CTAB

Se tomó una asada de la colonia y se depositó en tubos Eppendorf® de 1.5 ml de capacidad, se le adicionaron 400 µl de TE 1X pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) y se inactivaron a 95 °C por 20 minutos. Posteriormente, la extracción se realizó por el método de Wilson 1993 modificado¹⁴. Para la extracción del ADN bacteriano a partir de glóbulos blancos, se tomaron 400 µl de sangre completa y se depositaron por separado en tubos Eppendorf®, se les adicionaron 900 µl de TE 1X pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), se centrifugaron a 10,000 rpm/5 min en una microcentrifuga SIGMA®, se decantó el sobrenadante y el botón obtenido fue utilizado para la extracción de ADN.

Condiciones de amplificación de la PCR

Se utilizaron los iniciadores que amplifican parte del gen que codifica para una proteína inmunogénica de 31 KDa de la membrana externa de *Brucella abortus* (BCSP31) reportados por Bayle, et al., 1992, las secuencias B4 (5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3') y B5 (5'-CGCGCTTGCCCTTCAGGTCTG-3') amplifican un fragmento de 223 pares de bases (pb). La BCSP31 es específica del género *Brucella* y está conservada en *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*¹⁵.

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 µl, en un termociclador PCR Express (Hybaid Thermo, Middlesex, Reino Unido). La mezcla de PCR contenía 25 pmoles de cada uno de los iniciadores, 200 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleósidos trifosfatados (Bioline, Inc., Randolph, MA EE.UU.), 1.0 mM MgCl₂, 1 X de regulador de reacción (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ pH 8.3), 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Roche® Applied Science), aproximadamente 100 ng de ADN molde y agua desionizada para un volumen final de 25 µl.

La mezcla de reacción se sometió a las condiciones de ciclos térmicos siguientes: un ciclo de desnaturación inicial a 93 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de tres pasos: desnaturación a 93 °C durante 60 s, alineamiento de iniciadores a 60 °C durante 30 s y una extensión a 72 °C durante 30 s. Con una extensión final a 72 °C durante 10 min.

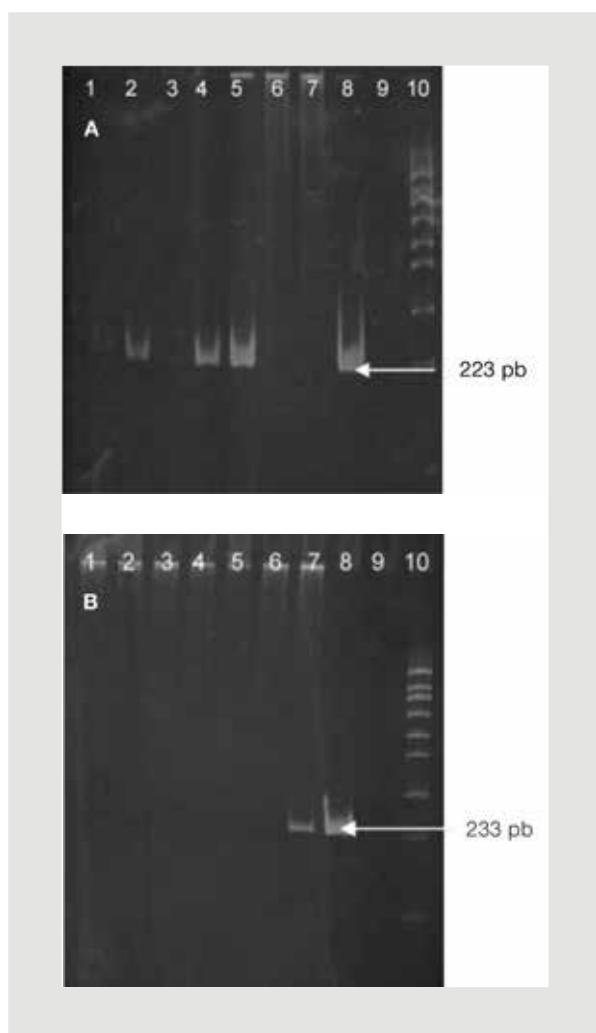


Figura 1. Electroforesis de las amplificaciones del ADN de las muestras de sangre humana. Panel A y B: Carriles 1 a 7, muestras de sangre; carril 8, control positivo (Cepa Rev1), carril 9, control negativo (agua) y carril 10, marcador de peso molecular (Ladder 100).

Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega, Inc.) al 1.5%; en una solución reguladora TBE (Tris base 445 mM, ácido bórico 445 mM, EDTA 10 mM), teñido con bromuro de etidio (10 µg/ml). Se depositaron 8 µl de cada muestra (amplicón) mezclado con 2 µl de solución amortiguadora de carga (0.25% P/V azul de bromofenol, 0.25% P/V xilencianol, 30% P/V glicerol pH 8.0). Como marcador de peso molecular se empleó el de 100 pb de ADN (Bioline). La migración fue a 100 V por una hora. Los productos de amplificación se visualizaron con un transiluminador UV (Spectroline Transiluminador, modelo

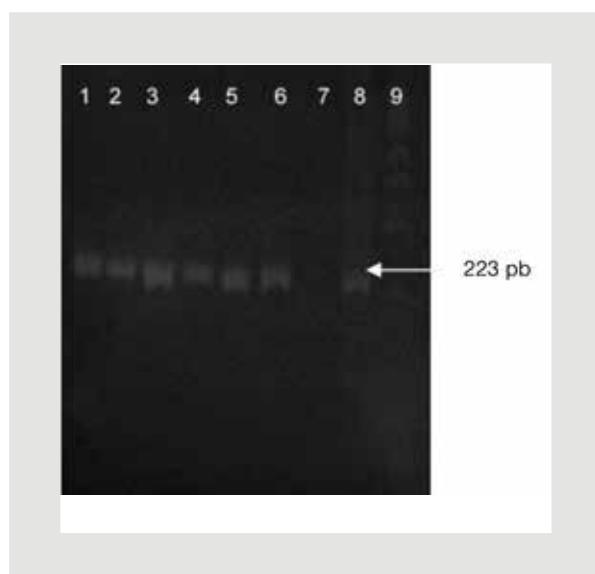


Figura 2. Electroforesis de las amplificaciones de los aislados de hemocultivo. Carriles 1 a 6 cepas aisladas, carril 7 control negativo (agua), carril 8 control positivo (ADN de cepa Rev1) y carril 9 marcador de peso molecular (Ladder 100).

7C-254R Electronics Corporation, en Westbury, Nueva York, EE.UU.) bajo luz UV. Las imágenes se capturaron con una cámara Polaroid y película A667 adaptada con filtro para luz ultravioleta (Figs. 1 y 2).

Análisis estadístico

Para determinar la utilidad de la PCR en el diagnóstico de la brucelosis, aquella se comparó con los resultados de las pruebas de hemocultivo, RB, MAP y 2-ME como pruebas oficiales (NOM-022-SSA2-1994). La sensibilidad y especificidad relativa de las pruebas se calculó por medio de la tabla de contingencia de dos filas por dos columnas; así se comparó la PCR (variable en filas) y la serología y hemocultivo (variable en columnas). Además se emplearon las fórmulas reportadas¹⁶, de acuerdo a los siguientes conceptos: la sensibilidad relativa es la capacidad del método alternativo para detectar el organismo blanco comparado con el método de referencia (serología y hemocultivo). La especificidad relativa es la capacidad de la PCR de no detectar al organismo blanco cuando este no es detectado por el método de referencia.

Además se utilizó la prueba de índice de Kappa para evaluar el nivel de concordancia entre las pruebas¹⁷. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa OpenEpi v3.

Tabla 1. Resultados serológicos, de hemocultivos y PCR de las muestras analizadas de los municipios de Anáhuac y Sabinas Hidalgo, N.L.

Resultado	Prueba				
	RB	MAP	2-ME	Hemocultivo	PCR
Positivo	47 (51%)	31 (33.70%)	28 (30.43%)	6 (6.52%)	23 (25%)
Negativo	45 (49%)	61 (66.30%)	64 (69.57%)	86 (93.48%)	69 (75%)
Total de sueros	92	92	92	92	92

RB: rosa de Bengala; MAP: aglutinación estándar en placa; 2-ME: 2 mercaptoetanol.

Tabla 2. Resultados de sensibilidad, especificidad de PCR e índices Kappa para las muestras de estudio

Parámetro	RB	MAP	2-ME	Hemocultivo
Sensibilidad	44.68%	51.61%	53.57%	100.0%
Especificidad	95.56%	88.52%	81.16%	80.23%
Índice Kappa	0.398	0.429	0.432	0.346

RB: rosa de Bengala; MAP: aglutinación estándar en placa; 2-ME: 2 mercaptoetanol.

Resultados

Pruebas serológicas

De las 92 muestras analizadas, empleando los métodos serológicos para el diagnóstico de la brucelosis, se obtuvieron resultados positivos en 47, 31 y 28 para RB, MAP y 2-ME, respectivamente (Tabla 1).

Reacciones de PCR a partir del ADN de las muestras de sangre y hemocultivo

El ADN de 92 muestras sanguíneas humanas provenientes de individuos relacionados con el brote de brucelosis humana de los municipios de Anáhuac y Sabinas Hidalgo, N.L., fueron analizadas por medio de la PCR; 23 de las muestras (Tabla 1) mostraron claramente la amplificación del fragmento esperado de 223 pb.

La prueba de PCR, a partir de muestras de sangre provenientes de individuos relacionados con el brote de brucelosis humana, permitió detectar un 25% (23/92) de muestras positivas a diferencia de la prueba de RB que detectó un 51%, MAP un 33.70%, 2-ME un 30.43% y el hemocultivo un 6.52% (Tabla 1).

Hemocultivo

Brucella spp fue aislada en 6 hemocultivos de las 92 muestras de sangre colectadas. Los aislamientos

fueron confirmados por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos como *B. melitensis*. Estas muestras fueron positivas para PCR y para serología en todos los métodos.

Comparación análisis de concordancia de la PCR con las pruebas serológicas y hemocultivo

Mediante el análisis de contingencia realizado para cada una de las pruebas serológicas y el hemocultivo versus la técnica de PCR, se obtuvieron los siguientes resultados: al comparar la PCR con la prueba RB, la PCR mostró un 44.68% de sensibilidad, 95.56% de especificidad y una leve concordancia (0.398). Cuando se comparó PCR con MAP se obtuvieron 51.61 y 88.52% de sensibilidad y especificidad, además de una moderada concordancia (0.429). Al comparar la PCR con 2-ME se obtuvo un 53.57 y 87.50% de sensibilidad y especificidad respectivamente, además de una moderada concordancia (0.432). Al comparar la PCR con el hemocultivo, la PCR obtuvo un 100.0% de sensibilidad, 80.23% de especificidad y una leve concordancia (0.346) (Tabla 2).

De las 92 muestras analizadas no se consiguieron datos sobre el cuadro clínico de los pacientes, además se desconocía si la muestra había sido tomada cuando el paciente estaba bajo tratamiento, si era la primera vez que se presentaba la infección o si

Tabla 3. Asociación de resultados de las pruebas serológicas, PCR y hemocultivo

N.º de grupo	RB	MAP	2-ME	Hemocultivo	PCR	Cantidad de muestras
1	+	-	-	-	-	13
2	-	-	-	-	+	2
3	+	+	-	-	+	1
4	+	-	-	-	+	5
5	+	+	+	-	+	9
6	-	-	-	-	-	41
7	+	+	+	-	-	12
8	-	+	-	-	-	1
9	-	+	+	-	-	1
10	+	+	-	-	-	1
11	+	+	+	+	+	6
TOTAL						92

RB: rosa de Bengala; MAP: aglutinación estándar en placa; 2-ME: 2 mercaptoetanol.

el paciente estaba sufriendo recaídas, debido a que estos pacientes fueron visitados en sus ranchos y esta población no realiza visitas constantes al centro médico de salud.

Análisis comparativo de pruebas diagnósticas para brucelosis

Los resultados de las muestras de los municipios de Anáhuac y Sabinas Hidalgo, N.L., nos indican que se obtuvieron 47 muestras positivas por RB, 31 por MAP, 28 por 2-ME y 6 por aislamiento. Para PCR, solamente se obtuvieron 23 muestras positivas, cada uno de estos resultados fue agrupado en 11 casos, los cuales se muestran en la tabla 3.

Discusión

Algunos estudios realizados han demostrado que cuando la infección está establecida en forma endémica en la zona, prácticamente todas las personas tienen o han tenido contacto con el patógeno, sin que necesariamente muestren síntomas, como fue el caso de los 13 individuos del grupo 1 en donde 13 pacientes resultaron RB positivos, y el resto de las pruebas negativas. La presencia de anticuerpos puestos de manifiesto con la prueba de RB muestra que alguna vez esos individuos se infectaron y han permanecido

positivos. Este hallazgo fue puesto de manifiesto en la encuesta seroepidemiológica nacional efectuada en el país en individuos aparentemente sanos¹³.

En el grupo 2, 2 pacientes resultaron (+) para PCR y (-) para serología y hemocultivo, posiblemente la muestra se tomó en una fase temprana de la enfermedad y/o el individuo cursaba una infección con muy pocas bacterias circulantes, por lo que no se aisló *Brucella* y si este individuo resolvió la infección pronto no se indujo la formación de anticuerpos^{4,18}.

En algunos casos se ha visto que el aislamiento y la identificación del agente etiológico no siempre es posible, sobre todo en algunas formas clínicas de la enfermedad, y que los cultivos de sangre pueden ser negativos cuando no hubo una fase aguda aparente o cuando en esta no se estableció el diagnóstico^{4,7,19}. Por otro lado, las pruebas serológicas presuntiva y confirmatorias indican ser negativas ya que no se presentó una reacción antígeno-anticuerpo, por lo que no se consideró como caso positivo. La prueba RB puede ser negativa en personas que tienen pocos días de evolución o con enfermedad crónica. Es relevante mencionar que la prueba puede resultar positiva aun después del tratamiento y la recuperación del enfermo, incluso hasta por años, por lo que en forma aislada y sin contar con antecedentes clínicos es de poco valor. Sin embargo, en el grupo 4, fue positiva junto con la PCR, lo que sugiere realizar un

análisis del estado clínico y se vuelva a realizar el hemocultivo de los pacientes, para en caso de tener aislamiento iniciar un tratamiento para el control de la brucelosis²⁰. Un paciente resultó (+) PCR, (+) RB, (+) MAP, y 2-ME y hemocultivo negativos. El hemocultivo fue negativo posiblemente debido a que la cantidad de sangre fue insuficiente, los autores recomiendan de 5 a 10 ml por botella. Otros investigadores han visto que los hemocultivos no siempre resultan positivos cuando la serología es positiva debido a que *Brucella* debe estar viable y en una concentración suficiente y requiere de un período de incubación prolongado, ya que es una bacteria de lento crecimiento²¹. Por otra parte, se presentó una reacción antígeno-anticuerpo en RB, y se confirmó con MAP, por lo que el paciente tenía anticuerpos aglutinantes IgM. Posiblemente la infección se encontraba en etapa inicial, ya que los anticuerpos IgM son los que se generan en el comienzo de la enfermedad y van decreciendo en un lapso de 3-6 meses, con o sin curación de la enfermedad⁷. Cuando se obtuvieron los resultados PCR (+), RB (+), MAP (-), 2-ME (-) y hemocultivo (-) probablemente se debió a que se encontró el patógeno en sangre y fue detectado por la PCR. La serología presuntiva positiva se debió a una reacción antígeno-anticuerpo, lo que indica que en estos pacientes hay producción de anticuerpos específicos¹⁹.

Los resultados PCR (+), RB (+), MAP (+), 2-ME (+) y hemocultivo (-) obtenidos en 9 pacientes nos confirmaron la presencia de ADN de *Brucella* en sangre, sin embargo no fue posible aislar la bacteria, probablemente debido a que hubo bajos niveles de *Brucella* en circulación sanguínea al momento de hacer la toma de sangre. Además cuando el paciente presenta la enfermedad en etapa crónica o focal existen pocas bacterias en circulación, por lo que se dificulta el aislamiento²².

El grupo de 41 pacientes que resultaron negativos a todas las pruebas representaron a los verdaderos negativos, ya que las muestras fueron tomadas al azar, de pacientes con síntomas y sin síntomas.

Por otra parte en áreas donde la enfermedad es endémica, las pruebas serológicas a menudo dan resultados positivos aun en ausencia de síntomas, es decir, que los anticuerpos no sólo aparecen en el suero de enfermos brucelósicos en el transcurso de esta enfermedad y su convalecencia; sino que también se les encuentra en individuos aparentemente sanos que cursan la infección subclínica o inaparente. Por consiguiente, las pruebas serológicas tienen un valor limitado para el diagnóstico de la brucelosis en el origen del brote, como fue el caso del grupo de 12

individuos en los que la PCR fue (-), RB (+), MAP (+), 2-ME (+) y hemocultivo (-). Mientras que las pruebas serológicas presuntiva y confirmatorias resultaron positivas, ya que se presentaron las titulaciones de valor diagnóstico señaladas para cada prueba^{19,21}.

Por otra parte la prueba RB detecta la presencia de anticuerpos aglutinantes como la IgM, IgG e IgA en los primeros días en los que se presentan los síntomas de la enfermedad. Elfaki, 2005, concluyó que la terapia con antibiótico limita la presencia de anticuerpos IgM *Brucella*-específicos, pero no elimina los anticuerpos IgG residuales de los pacientes tratados^{22,23}. Con respecto a los resultados obtenidos por las serologías confirmatorias, se requiere conocer los antecedentes del enfermo y valorar las características clínicas.

Los resultados de PCR (+), RB (+), MAP (+), 2-ME (+) y hemocultivo (+), obtenidos en 6 pacientes, indican que la PCR detectó al patógeno en sangre en nuestro estudio. La PCR se ha utilizado en pacientes detectando otras secuencias como las del RNA ribosomal (16S y 23S) y de genes que codifican las proteínas Omp25 y Omp31^{24,25}, e incluso se ha utilizado para diferenciar especies de *Brucella*. En un estudio realizado por Morata, et al.²⁶ se demostró que la PCR combinada con ELISA alcanzó una sensibilidad hasta del 94.9% y una especificidad del 96.5%, por lo que se ha recomendado como el método diagnóstico de elección. Así mismo se ha demostrado que la PCR no sólo es útil como un recurso de diagnóstico, sino que también tiene implicaciones pronósticas, ya que puede ser utilizada en evaluar la respuesta terapéutica; recientemente Vrioni, et al.⁸ lograron demostrar por medio de PCR en tiempo real que el DNA de *B. melitensis* persiste a pesar de existir curación clínica, esto explica la razón de las recidivas de la enfermedad y plantearía la posibilidad de que la brucelosis una vez adquirida, permanece como una infección latente^{8,27}.

El diagnóstico definitivo se basa en el aislamiento de la *Brucella* en cultivos de sangre, médula ósea, hígado y otros tejidos. El desarrollo del microorganismo en el medio bifásico de Ruiz Castañeda habitualmente ocurre entre los siete y veintiún días, aunque existen casos de crecimiento tardío que pueden llegar hasta los 35 días^{6,25}; este método es uno de los más utilizados, aunque tiene la desventaja de que la bacteria crece lentamente. A medida que la enfermedad progresá, disminuye la probabilidad de positividad de los hemocultivos, por lo que se hace necesario el aislamiento a partir de ganglios linfáticos, hígado o bazo⁸.

Finalmente, se logró detectar 23 muestras positivas provenientes de individuos de los municipios de Anáhuac

y Sabinas Hidalgo, N.L. mediante PCR, 21/23 muestras coincidieron con una o varias pruebas serológicas positivas. Las pruebas serológicas (RB, MAP y 2-ME) detectaron un porcentaje mayor de resultados positivos comparados con PCR y se confirmó la prueba de RB como la mejor prueba de escrutinio para brucellosis.

Tomando como pruebas de referencia MAP y 2-ME, según la NOM 022-SSA2-1994 en la identificación de humanos positivos a brucellosis, estas resultaron superiores en un 8.7 y 7.43% comparadas con la PCR, respectivamente. La PCR con respecto a los métodos RB, MAP, 2-ME y aislamiento obtuvo valores de sensibilidad desde 44.68 a 100.0% y de especificidad de 80.23 a 95.56%, respectivamente. Además, se obtuvo una moderada concordancia entre la PCR y las pruebas serológicas (MAP y 2-ME), sin embargo, la PCR con respecto al hemocultivo y RB tuvieron una leve concordancia.

La PCR presentó una sensibilidad de 100.0% cuando se comparó con hemocultivo, lo que nos indicó el gran valor de la prueba molecular para utilizarse en la detección del patógeno en la sangre humana. En cuanto a la especificidad (80.23%), fue más baja que la sensibilidad, esto puede ser debido al difícil aislamiento de la bacteria en sangre, por la escasa cantidad circulante al momento de obtener la muestra para el hemocultivo.

Agradecimientos

A la Fundación Produce Nuevo León, A. C. por financiamiento de esta investigación. Al personal del Laboratorio Central Regional del Norte, dependiente de la Unión Ganadera Regional de Nuevo León., así como al del Laboratorio Estatal de los Servicios de Salud en el estado de Nuevo León, en donde se desarrollaron los trabajos de laboratorio.

Bibliografía

1. Casañas MC, Queipo-Ortuño MI, Rodríguez-Torres A, et al. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 32-kilodalton Brucella antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001;20:127-31.
2. Ortiz EE, Silva E, Izquierdo M. Normalización y evaluación del inmunoensayo ABICAP-BRU para su diagnóstico serológico de la brucellosis bovina. *Revista electrónica de veterinaria* 2007;VIII:(4):57-89.
3. SINAVE/DGE/SALUD 2011 Boletín SSA. Vigilancia Epidemiológica Semana 39; 2011. [Consultado 4 abril 2012] Disponible en <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2011/sems9/pdf/cua8.pdf>.
4. Briones-Lara E, Saucedo-Palacios G, Martínez-Vázquez IO, et al. Respuesta al tratamiento de brucellosis en niños. Evaluación con reacción de Huddleson y PCR. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2007;45:448-55.
5. Al-Tawfiq JA. Therapeutic options for human brucellosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008;6:109-20.
6. Pappas G, Akritidis N, Bouskoulas M, et al. Brucellosis. *N Engl J Med.* 2005;352:2325-36.
7. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana. NOM 022-SSA2-1994 para la prevención y control de la brucellosis en el hombre en el primer nivel de atención. Diario Oficial de la Federación; 30 noviembre 1995.
8. Vrioni G, Pappas G, Priavali E, et al. An Eternal Microbe: Brucella DNA Load Persists for Years after Clinical Cure. *Clin Infect Dis.* 2008;46:131-6.
9. Kazemi B, Yousefi Namin SA, Dowlatshahi M, et al. Detection of Brucella by Peripheral Blood PCR and Comparison with Culture and Serological Methods in Suspected Cases. *Iranian J Publ Health.* 2008;37: 96-102.
10. Marianelli C, Graziani C, Santangelo C, et al. Molecular Epidemiological and Antibiotic Susceptibility Characterization of Brucella Isolates from Humans in Sicily, Italy. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2923-8.
11. Yu WL, Nielsen K. Review of detection of Brucella spp. by polymerase chain reaction. *Croat Med J.* 2010;51:306-13.
12. Milian-Suazo F. Manual para determinar el tamaño de muestra para estudios de campo en medicina veterinaria. México. INIFAP-Produce; 2001.
13. López-Merino A, Migranas-Ortiz R, Pérez-Miravete A, et al. Seroepidemiología de la brucellosis en México. *Salud Pública Méx* 1992;34:230-40.
14. Wilson SM, McNeerney R, Nye O, et al. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:776-82.
15. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg.* 1992; 95:271-5.
16. Malorny B, Hoofar J, Hugas M, et al. Inter-laboratory diagnostic accuracy of *Salmonella* specific PCR-based method. *Int J Food Microbiol.* 2003;89:241-9.
17. Azzimonti RJC. La concordancia entre dos tests clínicos para casos binarios: problemas y solución. *ABCL.* 2005;39:435-44.
18. López-Merino A, Contreras-Rodríguez A. Agentes Infecciosos: *Brucella*. *Rev Latinoam Microbiol.* 2006;48:146-53.
19. Cevallos-Falquez O, Carranza-Patiño M, Saucedo-Aguilar S, et al. Diagnóstico serológico (Rosa de Bengal) y molecular (PCR) de brucellosis en humano. *Ciencia y Tecnología.* 2010;3:27-32.
20. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004;4:115-23.
21. Nimri LF. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. *BMC Infect Dis.* 2003;3:5.
22. Ayyub M, Al-Juhani, NR, Alfi AY et al. Brucellosis and dengue fever -a co-infection or cross reactivity? *Biomedica.* 2006;22:80-3.
23. Chanto G, Rojas N, Ching A, et al. Prevalencia de anticuerpos séricos contra la bacteria *Brucella* sp. en una población humana tropical. *Rev Biol Trop.* 2007;55:385-91.
24. Padilla RC, Montoya PY, Carrillo PC. Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella* sp. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 2003;20:102-4.
25. Gemechu MY, Gill JP, Arora AK, et al. Polymerase chain reaction (PCR) assay for rapid diagnosis and its role in prevention of human brucellosis in Punjab, India. *Int J Prev Med.* 2011;2:170-7.
26. Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, et al. Development and Evaluation of a PCR-Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay for Diagnosis of Human Brucellosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41:144-8.
27. Elshamy M, Ahmed AI. The effects of maternal brucellosis on pregnancy outcome. *J Infect Dev Ctries* 2008;2:230-4.