

# Respuesta al tratamiento de brucelosis en niños.

## Evaluación con reacción de Huddleson y PCR

### RESUMEN

Introducción: la brucelosis representa un problema de salud pública y requiere de un diagnóstico minucioso. Produce recaídas frecuentes aun con tratamiento adecuado. El objetivo fue evaluar la respuesta al tratamiento en niños con brucelosis mediante seroaglutinación de Huddleson y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

Material y métodos: se siguió con pruebas de seroaglutinación de Huddleson y con PCR para *Brucella* sp. a las 6, 12 y 24 semanas, a una cohorte de niños con brucelosis. Se utilizó trimetoprim-sulfametoazol y rifampicina en la mayoría de los casos. Se evaluó la evolución hacia fracaso terapéutico o recaída.

Resultados: se ingresaron 23 niños. La mediana en edad fue 4.7 años; 61 % consumió productos lácteos no pasteurizados. La duración de los síntomas fue de siete días a un año. Se aisló *Brucella* sp. en hemocultivo en dos de 21 niños y *Brucella melitensis* en mielocultivo en uno de cuatro niños; 69 % tuvo serología positiva (Huddleson) con títulos de 1:160 a 1:12000. En 21/21 (100 %) niños la PCR fue positiva al ingreso al estudio. A las seis semanas, 17 % presentó fracaso terapéutico. A las 12 semanas, tres niños (13 %) persistieron con PCR positiva y se cambió de antimicrobianos. A las 24 semanas, cinco niños (21.7 %) presentaron recaída. Un niño persistió positivo a pesar del cambio de esquema antimicrobiano. La concordancia entre las dos pruebas fue baja en los tres períodos de seguimiento:  $\kappa = 0.08$ ,  $\kappa = 0.12$  y  $\kappa = 0.28$ , respectivamente.

Conclusiones: esta investigación sugiere que el tiempo de tratamiento de seis semanas tal vez no sea suficiente para la eliminación de la *Brucella*. Por otro lado, la prueba de PCR puede utilizarse en la detección temprana de recaídas.

### SUMMARY

Introduction: brucellosis poses a significant public health problem and requires meticulous diagnosis; the outcome has frequent relapses even when the treatment is appropriate.

Objective: To evaluate the response to the treatment in children with brucellosis by means of Huddleson seroagglutination test and PCR.

Methods: Using a prospective design, a cohort of children with brucellosis was followed up by carrying out Huddleson seroagglutination test of and PCR for *Brucella* at 6, 12 and 24 weeks. Most of children were treated with trimethoprim + sulfametoazole and rifampicin. The progress towards therapeutic failure or relapse was evaluated.

Results: twenty-three children fulfilled the inclusion criteria. The median age was 4.7 years; 61 % had consumed potentially infected milk or dairy products. The duration of symptoms ranged from seven days to one year. *Brucella* sp. was isolated in blood culture in two of 21 children and *Brucella melitensis* in myeloculture in one of four children. 69 % had positive Huddleson serological test from 1:160 to >1:12000. PCR tested positive in 100% of children when entering to the study. Six weeks after beginning treatment 17% of children had therapeutic failure. At twelve weeks, three children (13 %) persisted with positive PCR and their antimicrobial treatment was modified. At twenty-four weeks, five children (21.7 %) presented relapse. A child persisted positive in spite of modifying the antimicrobial scheme. The agreement between the two tests was low in the three follow up periods ( $\kappa = 0.08$ ,  $\kappa = 0.12$  and  $\kappa = 0.28$  respectively).

Conclusions. A 6-weeks period treatment cannot be enough to eliminate *Brucella*. PCR test can be used to early identify relapses.

Evangelina Briones-Lara,<sup>1</sup>  
Gerardo del C.  
Palacios-Saucedo,<sup>2</sup>  
Irma Olivia Martinez-Vázquez,<sup>3</sup>  
Alberto Morales-Loredo,<sup>4</sup>  
Leticia del Pilar Bilbao-Chávez<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Coordinadora Delegacional de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Saltillo, Coahuila

<sup>2</sup>Unidad de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Monterrey, Nuevo León

<sup>3</sup>Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

<sup>4</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Monterrey, Nuevo León

<sup>5</sup>Servicio de Pediatría, Hospital de Especialidades 25, IMSS

Comunicación con:  
Evangelina Briones-Lara.  
Tel y fax: (844) 415 6297.  
Correo electrónico:  
evangelina.briones@imss.gob.mx

### Palabras clave

- ✓ brucelosis
- ✓ niños
- ✓ reacción en cadena de la polimerasa
- ✓ técnicas de laboratorio clínico

### Key words

- ✓ brucellosis
- ✓ children
- ✓ polymerase chain reaction
- ✓ clinical laboratory techniques

## **Introducción**

La brucelosis representa un problema de salud pública en México.<sup>1</sup> La Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud notificó 2164 casos para la semana 52 del año 2005. Los estados con mayor incidencia fueron Coahuila, Nuevo León, Sinaloa y Guanajuato.<sup>2</sup> La seroprevalencia varía de 0.24 a 13.5 % y a nivel nacional se estima en 3.24 %, pero en áreas endémicas puede llegar a 18.6 %.<sup>3,4</sup> Se calcula que el número de casos puede elevarse de tres a 26 veces debido al importante subregistro, por lo que ascendería de 18 mil a 156 mil casos por año.<sup>3,5</sup>

En más de 90 % de los pacientes, la brucelosis suele manifestarse con un cuadro febril que puede comprender un breve periodo, pero dadas las características patogénicas la enfermedad tiende a mantenerse activa durante largo tiempo.<sup>1,6-8</sup> En la fase aguda se diagnostica menos de 1 % de los casos,<sup>7</sup> por lo que una proporción importante evoluciona a complicaciones serias (1 a 30%).<sup>6</sup> Cuando la infección tiene más de dos meses es capaz de afectar bazo, hígado, médula ósea, o incluso articulaciones y columna vertebral.<sup>6,7,9</sup> Las formas localizadas están generalmente relacionadas con ausencia del organismo en sangre. Esta localización puede ser una manifestación clínica de brucelosis bacteriémica, por lo que debe considerarse una complicación y una manifestación crónica. Esto se debe a que *Brucella* es un organismo capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del sistema fagocíticomomonuclear, de ahí que la enfermedad tenga un curso clínico prolongado, con recaídas que van de 4 a 41 %.<sup>10</sup>

El espectro clínico diverso de la brucelosis, sobre todo en la forma crónica, puede hacer que el diagnóstico se pase por alto o se retarde si el médico no tiene alta sospecha de su existencia. Aunque el diagnóstico de la brucelosis humana se basa en la serología y el aislamiento de la bacteria, el diagnóstico definitivo sólo se establece con el cultivo.<sup>11</sup> Sin embargo, la proporción de cultivos positivos varía entre 15 y 85 %.<sup>8</sup> La Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-1994, para la prevención y control de brucelosis en el hombre en el primer nivel de atención establece que el diagnóstico de bru-

celosis se realiza por medio de rosa de Bengala, aglutinación estándar y 2-mercaptoetanol, además de las pruebas confirmatorias de laboratorio (hemocultivo o mielocultivo positivos).<sup>5</sup> Aunque los médicos del primer nivel de atención generalmente atienden pacientes en la fase aguda, es importante indicar que en la brucelosis localizada o crónica, tanto las pruebas serológicas como los cultivos pueden ser negativos.<sup>5,8,9</sup> Además, con excepción de la prueba del 2-mercaptoetanol, las pruebas de seroaglutinación no permiten evaluar el estado de actividad de la enfermedad.<sup>7,12</sup>

Debido a las limitaciones de los métodos serológicos, sobre todo para la evaluación terapéutica de la brucelosis, es necesario incorporar otros que permitan mejorar la exactitud y rapidez del diagnóstico, así como la vigilancia de la respuesta al tratamiento. Una alternativa es el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante la cual se pueden detectar de manera específica y en unas cuantas horas, fragmentos del genoma de un organismo.<sup>13-15</sup> El objetivo del presente estudio fue evaluar clínicamente y mediante la seroaglutinación de Huddleson y PCR, la respuesta al tratamiento en niños con brucelosis.

## **Material y métodos**

De junio de 1999 a agosto de 2004 una cohorte de niños con diagnóstico de brucelosis fue seguida en forma prospectiva por 24 semanas. Los niños recibieron atención en la consulta externa o área de hospitalización del Hospital Regional de Especialidades 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social en Monterrey, Nuevo León. El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité Local de Investigación y Ética de la unidad. Se dio información detallada a los tutores de los niños acerca de la naturaleza, objetivo y métodos, y se solicitó su consentimiento de acuerdo con los *Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos*, de la Declaración de Helsinki.

El diagnóstico de brucelosis se estableció con base en la presencia de datos clínicos compatibles como fiebre, lesiones osteoarticulares (poli o monoartritis, sacroileítes, granulomas

óseos, abscesos), problemas abdominales (hepatoesplenomegalia, hepatitis, granulomas en hígado o bazo), neurológicos (meningitis, encefalitis, polineuritis, mononeuritis), respiratorios (bronquitis crónica) y hematológicos (anemia hemolítica, pancitopenia). Y por la presencia de dos de los siguientes criterios: pruebas microbiológicas y serológicas positivas; antecedente de ingesta de alimentos producidos con leches no pasteurizadas o contacto directo con animales enfermos o sus desechos.

Se excluyeron los pacientes con alergia a los antibióticos utilizados como tratamiento y se eliminaron quienes no aceptaron la toma de las muestras sanguíneas y que no completaron el seguimiento.

A cada paciente se le tomaron dos muestras de sangre de punciones venosas periféricas diferentes o una por punción y otra por catéter, para hemocultivo, procesadas en el sistema automatizado BACTEC 9120 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Franklin Lakes, NJ USA) siguiendo las recomendaciones del NCCLS. Una parte de estas muestras (3 mL) fue utilizada para la prueba de seroaglutinación de Huddleson siguiendo las instrucciones del fabricante (antígenos febris Interbiol, Interbiol, México). Se consideraron como títulos positivos de seroaglutinación de Huddleson cuando éstos fueron  $\geq 1:160$ .<sup>5</sup> Cuando esta prueba fue positiva a un título  $> 1:320$ , se determinó la aglutinación en una dilución 1:10 del suero problema, por lo que diluciones con aglutinación superiores se multiplicaron por 10.

Se llevó a cabo prueba de PCR de la siguiente forma:

*Cepas control:* el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica proporcionó cepas de referencia de *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella ovis*; la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, las cepas vacunales S19 y RB51 de *Brucella abortus*.

*Extracción de DNA:* se utilizó el método fenol-cloroformo adecuado por Martínez-Vázquez en 1997.<sup>16</sup>

*Reacciones de PCR:* se realizaron en volumen de 25  $\mu$ L, utilizando 10-200 ng de DNA, 25 a 50 pmol de cada uno de los iniciadores,<sup>17</sup> 200  $\mu$ M de cada uno de los 4 desoxinucleótidos trifosfatados (GIBCO-BRL, Gaithersburg,

MD USA), 1 a 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X Buffer Taq (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8) y 2.5 unidades de Taq-DNA polimerasa (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD USA). Se utilizó un termociclador modelo Ericomp (Ericomp Inc., San Diego, CA USA) con los siguientes parámetros: 2 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de tres pasos/ciclo como sigue: desnaturización a 94 °C/1 minuto, alineamiento de iniciadores a 60 °C/1 minuto y una extensión a 72 °C/1 minuto con una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

*Reacciones de PCR anidada (Nested-PCR):* tomando como templado 2  $\mu$ L del producto amplificado por PCR se realizó una Nested-PCR utilizando los iniciadores reportados por Leal-Klevezas y colaboradores.<sup>18</sup> Las condiciones de la reacción y del programa del termociclador fueron las mismas que para la reacción de PCR anterior. Los productos amplificados (5  $\mu$ L) fueron fraccionados por electroforesis en geles de agarosa (1.5 % p/v) con un flujo eléctrico de 100 V, se tiñeron con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/mL) y se fotografiaron con cámara Polaroid (GelCam DS-34, England, UK) con filtro para luz ultravioleta. La prueba de PCR se consideró positiva cuando se amplificó un fragmento de aproximadamente 200 pares de bases (pb) correspondiente a una porción del gen *omp2* de *Brucella* sp.

Todos los pacientes menores de nueve años fueron tratados con trimetoprim-sulfametoazol a 8/40 mg/kg/día vía oral en dos dosis y rifampicina a 20 mg/kg/día vía oral en dos dosis. Los niños de nueve años y mayores fueron tratados con tetraciclínas a 30 mg/kg/día vía oral en cuatro dosis al día, rifampicina a 20 mg/kg/día vía oral en dos dosis y estreptomicina a 20 mg/kg/día vía intramuscular en una dosis al día, esta última por 21 días. El tiempo mínimo de tratamiento fue de seis semanas.

Los signos y síntomas fueron seguidos clínicamente a las 6, 12 y 24 semanas posteriores al inicio del tratamiento. Se consideró mejoría clínica si remitieron sin evidencia de infección a las seis semanas postratamiento y fracaso clínico si no existió respuesta. Se realizó seroaglutinación de Huddleson y PCR para *Brucella* spp. en el mismo intervalo. Se consideró como fracaso terapéutico a la persistencia de las manifestaciones clínicas de la enfer-

**Evangelina Briones-Lara  
et al. Huddleson y PCR  
en brucelosis infantil**

medad o PCR positiva a las seis semanas de tratamiento; y que había recaída en quienes la prueba de PCR se tornó positiva después de haber sido negativa a las 12 o 24 semanas. Los pacientes con fracaso terapéutico continuaron el mismo esquema antibiótico hasta completar 12 semanas. Si persistían positivos, se cambió a 30 mg/kg/día vía oral de ciprofloxacina en dos dosis más 20 mg/kg/día vía oral de rifampicina a en dos dosis.<sup>7,19</sup>

## **Resultados**

Se atendieron 28 niños con diagnóstico de brucelosis durante el periodo del estudio; 23 reunieron los criterios de inclusión y cinco no completaron el seguimiento. La mediana de edad fue de 4.7 años (rango dos meses a 14 años); 13 fueron hombres y 10 mujeres (relación 1.3:1) (cuadro I). En 14 niños (61 %) se confirmó el antecedente de ingesta de productos lácteos no pasteurizados. Seis (26 %) tuvieron diagnóstico serológico de brucelosis al envío. Otros diagnósticos de envío o ingreso fueron síndrome febril (26 %), aplasia medular (8.6 %), meningitis (8.6 %) y hepatitis (8.6 %). La mediana del tiempo de evolución de los síntomas fue de 30 días (rango siete días a un año) (cuadro I). Los signos y síntomas al inicio del padecimiento fueron: fiebre 96 %, ataque al estado general 96 %, hepatomegalia y esplenomegalia 30.4 %, hepatomegalia 4 %, esplenomegalia 8 % y pérdida de peso 26 %. La hemoglobina tuvo una media de  $9.86 \pm 1.89$  g/dL (rango 6.2 a 13.5). La serie blanca tuvo una media de  $8006 \pm 7329$  leucocitos/mm<sup>3</sup> (rango 1100 a 35 600). La sedimentación globular estuvo elevada en ocho de los 11 (73 %) pacientes en los que se realizó (media, 36 mm/hora). Al ingreso al estudio, la seroaglutinación de Huddleson fue positiva en 16 pacientes (69 %) con títulos de 1:160 a > 1:12 000. En 21/21 niños la PCR para *Brucella* fue positiva al ingresar al estudio. La prueba Rosa de Bengala fue positiva en todos los pacientes en que se realizó (9/9). Se aisló *Brucella* sp. en dos de 21 niños. En cuatro pacientes se efectuó mielocultivo y sólo en uno fue aislada *Brucella melitensis* (cuadro I).

En 91 % de los pacientes hubo mejoría clínica a las seis semanas de tratamiento y fra-

caso clínico sólo en dos. Un paciente persistió febril durante las 24 semanas de seguimiento y en el otro reapareció la fiebre en la semana 24 (cuadro II). A las seis semanas postratamiento, en cuatro pacientes (17 %) se documentó fracaso terapéutico por PCR para *Brucella* positiva (pacientes 1, 3, 16 y 23). En nueve niños la prueba serológica de Huddleson continuó positiva a las seis semanas, aunque con títulos menores (pacientes 7, 12, 13, 15, 16, 17, 20, 22 y 23); en dos, la PCR también fue positiva a las seis semanas. La correlación entre ambas pruebas fue baja ( $\kappa = 0.08$ ).

A las 12 semanas, los pacientes 1, 3 y 23 (13 %) persistieron con PCR positiva. En el paciente 5 (4.3 %), la PCR fue positiva después de haber sido negativa, y en el paciente 17 (4.3 %) al que no se realizó control a las seis semanas resultó con PCR positiva. El paciente 14 presentó elevación de los títulos en la prueba de Huddleson después de haber sido negativos a las seis semanas. En dos de los cinco con PCR positiva a las 12 semanas, la prueba de Huddleson también fue positiva. Además, de los seis niños con Huddleson positiva a las 12 semanas, dos tuvieron PCR positiva. La correlación entre ambas pruebas fue baja ( $\kappa = 0.12$ ).

A las 24 semanas de seguimiento, en cinco pacientes (21.7 %) se documentó recaída por la prueba de PCR (pacientes 2, 6, 8, 10 y 14). Un paciente persistió positivo a pesar del cambio del tratamiento antimicrobiano (paciente 23). A este tiempo de seguimiento, cuatro niños tuvieron la prueba serológica de Huddleson positiva (pacientes 13, 14, 16 y 23); en uno de ellos persistentemente positiva a pesar de que la PCR fue negativa a las 12 y 24 semanas (paciente 16, cuadro II). En dos de los cuatro pacientes con Huddleson positiva también la PCR resultó positiva y sólo en dos de los seis niños con PCR positiva el Huddleson fue también positivo. La correlación entre ambas pruebas fue baja ( $\kappa = 0.28$ ).

## **Discusión**

La brucelosis es una enfermedad multisistémica que suele aparecer con muchas enfermedades, lo que provoca malos diagnósticos y un incremento en la morbilidad. Los pacientes de este

estudio mostraron cuadros clínicos diversos con diagnósticos de envío que variaron desde fiebre de origen desconocido hasta anemia aplásica, lo que sugiere la afección multisistémica de esta enfermedad, como lo reportaron Ayala-Gaytán y colaboradores.<sup>20</sup>

Fue notable el número de pacientes con datos clínicos de brucelosis localizada o complicada, lo que muestra una evolución crónica del padecimiento. Algunos autores proponen que la brucelosis crónica es una forma especial de la enfermedad que está en relación a una respuesta particular de hipersensibilidad.<sup>8</sup> Aunque en el presente estudio no se utilizaron

las pruebas de seroaglutinación recomendadas por la *Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-1994* —la seroaglutinación estándar en tubo (SAT) y la prueba de 2-mercptoetanol (2-ME)— los resultados negativos de la prueba de Huddleson apuntan a una presentación de tipo anérgico, que en forma característica se distingue por no tener anticuerpos detectables en sangre.<sup>9</sup>

Una de las limitantes de este estudio es no haber utilizado el estándar de oro serológico, la prueba de anticuerpos anti-*Bruceella* por aglutinación de bacterias completas (prueba de aglutinación estándar, SAT), que a pesar

**Evangelina Briones-Lara  
et al. Huddleson y PCR  
en brucelosis infantil**

**Cuadro I**  
**Características generales y resultado de exámenes de laboratorio  
al ingreso de 23 niños con brucelosis**

Paciente	Edad (años)	Sexo	Diagnóstico al ingreso	Evolución (meses)	Huddleson	Hemocultivo	PCR
1	11	M	Dermatomiositis, neuropatía periférica	12	1:160	+*	+
2	11	F	Anemia aplásica	2 semanas	—	—	+
3	4	M	Síndrome febril	12	1:320	—	+
4	3	F	Hepatitis crónica	6	—	NR	+
5	9 meses	M	Inmunodeficiencia celular	7	—	—	+
6	5	F	Aplasia medular	1	1:320**,‡	—	+
7	10	F	Aplasia medular	1	>1:800‡	+	+
8	2 meses	M	Meningitis, absceso cerebral	7 días	—	—	+
9	20 meses	M	Meningitis	1	—	—	+***
10	8	M	Brucelosis	12	1:3200‡	NR	+
11	10	F	Brucelosis	2	1:1600	NR	+
12	2	M	Síndrome febril, hepatoesplenomegalia	3 semanas	1:1280	—	NR
13	8	F	Brucelosis	3	1:6000	—	+
14	4	M	Brucelosis	4	1:400‡	NR	+
15	4	F	Brucelosis	1	1:3200‡	NR	NR
16	9	F	Leucemia aguda, síndrome febril	1	1:160‡	—	+
17	3	M	Hepatoesplenomegalia	2	1:3200‡	+	+
18	7	F	Pancitopenia, leucemia aguda	15 días	—	—	+
19	14	F	Síndrome febril	1	—	—	+
20	3	M	Neoplasia hepática	2	1:400	—	+
21	11	M	Síndrome febril	2 semanas	1:160	—	+
22	5	M	Brucelosis	4	1:400‡	NR	+
23	3	M	Leucemia aguda	1	1:12000‡	NR	+

\* Mielocultivo positivo para *Brucella melitensis*

\*\* También presentó títulos por SAT de 1:320, 2-ME de 1:160 y Rosa de Bengala positiva

\*\*\* PCR positiva en LCR

<sup>†</sup>Rosa de Bengala positiva

M = masculino F = femenino — negativo + positivo NR = no realizado

de su bajo costo no se encuentra disponible en el cuadro básico de reactivos de laboratorio de numerosas instituciones. Sin embargo, esta prueba y la de anticuerpos anti-*Brucella* por aglutinación en presencia de 2-mercaptoetanol (a pesar de que ésta es un marcador de brucelosis activa por su correlación con la evolución clínica de la enfermedad), son de utilidad limitada en brucelosis localizada o crónica, por el tipo de anticuerpos que se inducen.<sup>7,8</sup>

Es primordial conocer lo que cada una de las pruebas aporta y sus limitaciones. La de anticuerpos anti-*Brucella* por aglutinación de bacterias teñidas con Rosa de Bengala fue positiva en todos los pacientes en los que se efectuó.

tuó este reporte. Puede ser negativa en los enfermos que tienen pocos días de evolución o con enfermedad crónica. Es relevante mencionar que permanece positiva aun después del tratamiento y la recuperación del enfermo, incluso hasta por años, por lo que en forma aislada es de poco valor diagnóstico; en el cuadro II puede observarse que persistió positiva incluso en quienes no se presentó recaída.<sup>6,7</sup>

Los resultados sugieren la limitación de la prueba de Huddleson para el diagnóstico y seguimiento postratamiento. Desafortunadamente es el único recurso serológico con el que se cuenta en algunas unidades médicas, como ocurrió en nuestro caso. Fue negativa al momento del diagnóstico en siete de 23 pacientes con PCR positiva. Durante el seguimiento dio positiva en pacientes en los que no se tuvo fracaso clínico y en algunos con PCR negativa, con comportamiento similar al de Rosa de Bengala. Por lo que resulta fundamental que para aplicar esta prueba se requiere conocer los antecedentes y el cuadro clínico del paciente, y así tener una interpretación correcta de los resultados, en virtud de que al inicio de la enfermedad la prueba puede ser negativa.<sup>12</sup>

Es apreciable el alto porcentaje de hemocultivos negativos en esta muestra, y aunque el hemocultivo es la prueba más irrefutable de infección activa, puede dar positivo en pacientes sin síntomas y pierde sensibilidad a medida que avanza la enfermedad, bien sea por interferencia de los mecanismos naturales de defensa o por factores terapéuticos que reducen el contenido de bacterias en la sangre.<sup>8,21,22</sup> Aunque *Brucella* se encuentre en sangre, sobre todo en el periodo febril, su recuperación en cultivo es más difícil que otras bacterias que ocasionan bacteriemia, debido a que sus requerimientos nutricionales son relativamente complejos. Es una bacteria de crecimiento lento y requiere de medios especiales con una tensión alta de dióxido de carbono.

Factores propios de la enfermedad que contribuyen a la baja sensibilidad de los cultivos incluyen que su presencia en sangre es intermitente y poco frecuente debido a su ciclo de vida intracelular, cursa con un periodo de incubación variable, es de inicio insidioso, no tiene datos clínicos patognomónicos que orienten a sospecharla y tiende a volverse crónica.<sup>8,10,23</sup>

**Cuadro II**  
**Resultados del seguimiento postratamiento mediante PCR y  
reacción de Huddleson de 23 niños con brucelosis**

Paciente	Huddleson				PCR			
	Basal	6	12	24	Basal	6	12	24
1	+	—	—	—	+	+	+	—
2	—	—	—	—	+	—	NR	+
3	+	—	—	—	+	+	+	—
4	—	—	—	—	+	NR	—	—
5	—	—	—	—	+	—	+	—
6	+	—	—	—	+	—	NR	+
7	+	+*	+*	NR	+	—	—	—
8	—	NR	—	NR	+	—	—	+
9	—	NR	—	—	+**	—	—	—
10	+	NR	+*	—	+	—	—	+
11	+	NR	NR	—	+	NR	NR	—
12	+	+	—	—	NR	NR	—	NR
13	+	+	—	+	+	—	—	—
14	+	—	+	+*	+	—	—	+
15	+	+	—	—	NR	—	—	—
16	+	+*	+*	+	+	+	—	—
17	+	+*	+	—	+	NR	+	—
18	—	—	—	—	+	—	—	—
19	—	—	—	—	+	—	—	—
20	+	+	—	—	+	NR	—	—
21	+	NR	—	—	+	—	—	—
22	+	+*	—	—	+	—	—	—
23	+	+	+*	+	+	+	+	+

— negativo      + positivo;      NR = no realizado

\* Huddleson y Rosa de Bengala positivos

\*\* Positivo en LCR

El cultivo es más útil en la fase aguda de la enfermedad, sobre todo previo al uso de antibióticos, pues se ha demostrado que la probabilidad de aislamiento se reduce en personas con tratamiento antibiótico, aunque éste no haya sido el adecuado.<sup>8,24</sup> En brucelosis crónica es más difícil el aislamiento, ya que el paso de *Brucella* a la circulación es poco frecuente. Además, se ha reportado el aislamiento de colonias en forma L (bacterias con pared celular modificada inducida por antibióticos) que pueden pasar inadvertidas si no se emplean los medios de cultivo adecuados y se realiza una búsqueda intencionada.<sup>7</sup>

En la actualidad existen otros sistemas de aislamiento y se cuenta con métodos moleculares como el de PCR, que se puede aplicar en sangre, líquido cefalorraquídeo y otras muestras para la identificación de *Brucella*. La PCR es una prueba rápida, sensible y eficaz que permite identificar ADN libre, bacterias vivas y muertas, y bacterias dañadas por el sistema inmune o los antibióticos que son incapaces de crecer en los medios de cultivo habituales.<sup>7</sup> Esto se dio a conocer a finales de 1995 por Leal-Klevezas y colaboradores en muestras de sangre y leche de caprinos infectados de manera natural, así como en sangre de pacientes cuyo hemocultivo y serología fueron positivos.<sup>25</sup> Los resultados de este reporte revelan que la prueba de PCR fue muy útil para establecer el diagnóstico de brucelosis en todos los pacientes en los que se realizó, y debido a que los diagnósticos de envío fueron diversos, significó una buena alternativa diagnóstica, siendo más marcada su utilidad en 26 % de los casos en los que hubo resultados negativos con otros métodos diagnósticos.

En este estudio puede observarse que hubo una disparidad entre la frecuencia de fracaso clínico y fracaso terapéutico, por lo que es importante resaltar que la información sobre el perfil clínico y microbiológico de las recaídas en brucelosis es limitada.<sup>21</sup> La frecuencia de fracaso clínico y terapéutico en los casos presentados confirma que la brucelosis tiene una tendencia muy marcada hacia las recaídas después de terminar el tratamiento y que éstas ocurren en los primeros seis meses.<sup>15</sup> Al final del tratamiento, un número importante de pacientes suele presentar síntomas inespecíficos

y debido a que no hay criterios bien definidos de la recuperación completa de brucelosis no es fácil decidir si esos pacientes están realmente curados, por lo que se requiere realizar un seguimiento estricto durante este periodo.<sup>21</sup>

17 % de casos con fracaso en la erradicación de *Brucella* y 22 % con recaída en el presente estudio, sugieren que la duración del tratamiento de seis semanas pudiera no ser suficiente para la eliminación de la bacteria. Otra posible explicación es la resistencia antimicrobiana, ya que se ha descrito resistencia de cepas de *Brucella*, mediada por plásmidos de amplia especificidad derivados de *Escherichia coli*.<sup>7</sup>

Por ser una población pediátrica, se utilizó de primera instancia el esquema B de la NOM, a pesar de que dicha norma está dispuesta para pacientes del primer nivel de atención médica y no para pacientes con formas localizadas o crónicas. Sobre todo en lo que se refiere al tiempo de tratamiento, donde aún no se establece el tiempo idóneo, que va de seis semanas a varios meses. En los niños mayores, la combinación de tetraciclina, rifampicina y estreptomicina es el esquema de elección recomendado.

En el presente estudio fue evidente la baja concordancia entre la prueba de Huddleson y PCR en los tres períodos de seguimiento, probablemente debido a las limitaciones ya descritas de la primera. Los resultados sugieren que la prueba de PCR es útil para el diagnóstico de brucelosis humana y puede ser utilizada también para el seguimiento postratamiento y la detección temprana de recaídas en estos pacientes. Estos resultados también sugieren que el tratamiento de seis semanas puede ser insuficiente para la eliminación de *Brucella* en niños. Sin embargo, se requiere estudios prospectivos, sobre todo ensayos clínicos controlados, para evaluar el tiempo más eficaz de tratamiento.

## Referencias

1. Foro Nacional de Brucelosis. Memorias. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica. Universidad Nacional Autónoma de México; 1998.

2. Epidemiología. Sistema Único de Información, número 52, vol. 22, semana 25 al 31 de diciembre de 2005. Disponible en <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2005/sem52/pdf/cua8.pdf>.
3. López-Merino A, Migrañas R, Pérez-MA, Magos C, Salvatierra IB, Tapia RC, et al. Seroepidemiología de la brucelosis en México. Salud Pública Mex 1992;34(2):230-240.
4. Torres-Padilla JC, López-Merino A, García-Escamilla RM, Gutiérrez-García JN. Seroprevalencia de anticuerpos anti-Brucella en disponentes de sangre con fines terapéuticos en tres bancos de sangre del Instituto Mexicano del Seguro Social. Gac Med Mex 2004;140(4):391-398.
5. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-1994 para la prevención y control de la brucelosis en el hombre en el primer nivel de atención. Diario Oficial de la Federación 30 de noviembre de 1995.
6. Ruiz-Castañeda M. Brucelosis. 3<sup>a</sup> edición. México: La Prensa Médica Mexicana; 1986.
7. López-Merino A. Brucella. En: Microbios en línea. Martínez-Romero E, Martínez-Romero J, editores. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/2002>
8. López-Merino A. Brucelosis. Avances y perspectivas. Publicación Técnica del INDRE No. 6. Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo. México: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos/Secretaría de Salud; 1991.
9. Joklik W, Willet H, Mos B. Zinsser Microbiología. 20<sup>a</sup> edición. México: Médica Panamericana; 1994.
10. Martínez-Soriano JP, Cab-Barrera EL, Tamez-González R, Leal-Klevezas DS. Detección de Brucella abortus por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Bioquímia 1993;18(4):1016.
11. Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KS. Microbiología médica. 2<sup>a</sup> edición. España: Harcourt Brace de España; 1997.
12. Mandell LG, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious disease. Genus Brucella. Churchill Livingstone; 2000.
13. American Academy of Pediatrics. Brucellosis. Red book: Report of the Committee on Infectious Disease. 23<sup>rd</sup> ed. Illinois, USA: American Academy of Pediatrics; 1994.
14. Queipo-Ortuño MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD. Rapid Diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. J Clin Microbiol 1997;35(11):2927-2930.
15. Solera JA, Espinosa P, Geijo E, Martínez-Alfaro L, Sáez MA, Sepúlveda, Ruiz-Ribó MD. Treatment of human Brucellosis with netilmicin and doxicicline. Clin Infect Dis 1996;22: 441-445.
16. Martínez-Vázquez IO. Ensayo clínico en caprinos inoculados para la detección temprana de Brucella melitensis. Nuevo León, México: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León; 1997.
17. Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-Merino A, Martínez-Soriano JP. Single step PCR for the detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals. J Clin Microbiol 1995;33(12):3087-3090.
18. Leal-Klevezas DS, López-Merino A, Martínez-Soriano JP. Molecular detection of Brucella spp. rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. Arch Med Res 1995a;26(3):263-267.
19. Zavala-Trujillo I, Nava-Zavala A, Guerra-Cáceres J, Quiroz-Miranda C. Brucellosis. Infect Dis Clin North Am 1994;8:225-241.
20. Ayala-Gaytán JJ, Molina-Gamboa JD. Características clínicas de la brucelosis en un hospital de tercer nivel. Rev Med IMSS 1992;30(5/6): 355-357.
21. Morata P, Queipo MI, Reguera JM, García OM, Pichardo C, Colmenero JD. Post treatment follow-up of brucellosis by PCR assay. J Clin Microbiol 1999;37(12):4163-4166.
22. Seijo-Bonilla J, Naranjo-López Y. Diagnóstico de brucelosis por los parámetros de laboratorio y su relación con la clínica. Bol Med Hosp Infant Mex 1982;39(1):33-36.
23. Al-Eissa YA, Al-Mofada SM. Congenital brucellosis. Pediatr Infec Dis J 1992;11(11):667-671.
24. Crosby E, Llosa L, Miro-Quesada M, Carrillo C, Gotuzzo E. Hematologic changes in brucellosis. J Infect Dis 1984;150(3):419-424.
25. Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, Martínez-Soriano JP. Nested PCR en la confirmación del diagnóstico de brucellosis en humanos. México: Reunión Regional de Investigación Médica del IMSS; 1995. p. 16. **rm**