

Valor de las pruebas de Rosa de Bengala, Coombs y contrainmuno-electroforesis para diagnosticar los casos de brucelosis humana en los que la seroaglutinación es negativa

Sr. Director. Las pruebas de Rosa de Bengala (RB), seroaglutinación (SAT) y Coombs detectan anticuerpos frente al lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* spp.¹, y la de contrainmuno-electroforesis (CIEF) frente a sus proteínas citosólicas². Los títulos de la SAT se correlacionan con los de la prueba de RB², sin embargo, excepcionalmente en algunos casos de brucelosis crónica la SAT puede ser negativa. Foz³ en un estudio de 286 pacientes encontró dos casos en los que el título de la SAT fue menor de 10. Marrodán (Brucelosis humana: Significado de las inmunoglobulinas anti-lipopolisacárido, anti-polisacárido B y anti-proteínas en la evolución clínica de la enfermedad, Tesis Doctoral, Universidad de Navarra, Facultad de Farmacia 1998) encontró cuatro casos en los que el título de la SAT fue menor de 20, pero en todos la prueba de RB fue positiva, con títulos que oscilan entre 4 y 16.

Recientemente hemos recibido en nuestro laboratorio dos muestras de suero de dos pacientes con brucelosis (cultivo positivo) con más de 4 meses de evolución, y en los que el título de la SAT fue menor de 20. Un suero fue enviado por la Dra. I. Dorronsoro del Servicio de Microbiología del Hospital de Navarra (Pamplona) y el otro por el Dr. J. M. Hernández-Molina del Hospital de la Inmaculada (Uécal-Overa, Almería). En esta comunicación presentamos los resultados de las pruebas de RB, SAT, Coombs y CIEF obtenidos con estos dos sueros, con el propósito de llamar la atención, una vez más, sobre su utilidad para la realización de un diagnóstico correcto de la brucelosis.

La prueba de RB se realizó con una suspensión de *B. abortus* preparada por el *Central Veterinary Laboratory* (Weybridge, Surrey, Inglaterra) dilui-

da al 1:5 en el tampón original (tampón lactato) y con el mismo pH (pH 3,6). Con cada suero se prepararon dobles diluciones (desde 1:2 a 1:512) en tampón fosfato [PBS (PH 7,2)] y se realizó la prueba con cada una de las diluciones. Las pruebas de SAT, SAT con 0,01 M de dithiothreitol (SAT-DTT) y CIEF se realizaron según las técnicas previamente descritas^{2,4} y la prueba de Coombs según el procedimiento descrito por Otero et al⁵ con una sola modificación, que consistió en resuspender las células después del lavado de las mismas en 100µl de PBS conteniendo 0,1% de un inmunosuero específico antiimmunoglobulinas humanas IgG o IgA (Operón, Zaragoza). Las placas se incubaron a temperatura ambiente y a las 18 horas se procedió a su lectura. El análisis de la presencia de anticuerpos IgM frente al LPS se realizó mediante la utilización de los *dipstick*-IgM desarrollados por Smits et al⁶.

Los resultados expresados en la tabla 1 muestran que los títulos de la prueba de RB de los sueros negativos en la SAT (sueros 1 y 2) fueron muy similares a los obtenidos con los sueros que se incluyeron como control. Uno de éstos era positivo en la prueba del *dipstick*-IgM (suero 3), y otro negativo, pero contenía anticuerpos aglutinantes resistentes al dithiothreitol (suero 4). Los resultados de la prueba de Coombs están de acuerdo con los publicados por Foz, quien repetidamente ha mostrado que en las brucelosis crónicas los títulos de SAT son muy bajos o negativos y los del Coombs superan en "8,16,32,64 y aún más veces" a los de la SAT³.

Previamente ha sido mostrado que la reactividad de los sueros en la CIEF expresada según: a) el número de líneas de precipitación, y b) el título en el que se observa la formación, al menos, de una línea de precipitación, está en relación con el tiempo de evolución de la enfermedad². Estos hechos explican los resultados obtenidos con los sueros 1 y 2, correspondientes a casos de brucelosis con una larga evolución, que fueron los que desarrollaron el mayor número de líneas de

precipitación y con los que se obtuvo el título más alto en la CIEF con las proteínas citosólicas (tabla 1).

Los resultados obtenidos con la prueba de RB, muestran que los anticuerpos no aglutinantes a pH 7,2 son, sin embargo, activos a pH 3,6, es decir que recuperan su capacidad aglutinante a pH ácido, y explican la superioridad de la prueba de RB sobre las pruebas rápidas de aglutinación en placa en las que se utilizan las preparaciones antigénicas denominadas *febrile antigen*², porque el pH ácido evita el fenómeno de zona.

Estos resultados, por otra parte, plantean un problema muy concreto y práctico que es necesario resolver, que no es otro que determinar si las suspensiones de brucela que se emplean en la reacción de SAT (tubo o microplaca) deben ser preparadas o no en un tampón ácido. Finalmente hay que decir que tres hipótesis pueden explicar este fenómeno: a) que la negatividad de la prueba de SAT se debe a un fenómeno de inhibición de la reacción de aglutinación por anticuerpos IgA bloqueantes⁷, fenómeno que debe desaparecer a pH 3,6; b) que el valor del pH afecta a la afinidad de los anticuerpos IgG e IgA, y como consecuencia, modifica su capacidad aglutinante, y c) que este fenómeno se debe, como en el caso de la brucelosis bovina¹, a que en los sueros analizados SAT negativos y RB positivos, predomina una subclase de IgG cuya capacidad aglutinante es superior a pH ácido.

Manuel Rubio, Blanca Barrio
y Ramón Díaz

Departamento de Microbiología. Servicio
de Microbiología Clínica. Clínica
Universitaria. Universidad de Navarra.

Bibliografía

- Díaz R, Levieux D. Rôle respectif en sérologie de la brucellose bovine des antigènes et des immunoglobulines G₁ et G₂ dans les tests d'agglutination, de Coombs et au Rose Bengal ainsi que dans le phénomène de zone. C R Acad Sc Paris 1972; 274: 1.593-1.596.

TABLA 1. Resultados de las pruebas de RB*, SAT*, Coombs* y CIEF obtenidos con los sueros SAT negativos y controles

Número de suero	<i>Dipstick</i> -IgM	RB	SAT		Coombs		CIEF	
			PBS	DTT	IgG	IgA	Número de líneas	Título
1	Neg	16	<20	<20	40.960	20.480	6	32
2	Neg	32	<20	<20	81.920	40.960	8	64
3	4 pos	128	5.120	320	Neg	Neg	2	8
4	Neg	16	640	640	5.120	2.560	3	16

*Expresado en títulos.

RB: rosa de Bengala; SAT: seroaglutinación; CIEF: contrainmuno-electroforesis; PBS: tampón fosfato; DTT: dithiothreitol; Neg: negativo; Pos: positivo.

2. Díaz R, Maraví-Poma E, Rivero A. Comparison of counter-immuno-electrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis. *Bull World Health Organ* 1976; 53: 417-424.
3. Foz A. Enfermedades producidas por gérmenes del género *Brucella*. En: Pedro Pons A, ed. *Patología y Clínica Médicas*. Tomo VI. Enfermedades infecciosas. Intoxicaciones. Enfermedades profesionales y por agentes físicos. *Enfermedades Alérgicas*. Barcelona: Editorial Salvat, 1968; 338-374.
4. Marrodan T, Nenova-Poliakova R, Rubio M, Ariza J, Clavijo E, Smits HL, et al. Evaluation of three methods to measure anti-*Brucella* IgM antibodies and interference of IgA in the interpretation of mercaptan based tests. *J Med Microbiol* 2001; 50: 633-666.
5. Otero J, Fuertes E, Palenque, Noriega AR. Microtiter-adapted method that facilitates the Coombs test for brucellosis. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 737-738.
6. Smits HL, Basah MA, Díaz R, Marrodan T, Douglas JT, Rocha A, et al. Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute brucellosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 4.179-4.182.
7. Serre A, Dana M, Roux J. Nature des anticorps bloquants dans la Brucellose humaine. *Path Biol* 1970; 18: 367-374.

Detección de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina mediante una prueba de aglutinación con látex

Sr. Director. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) es un importante patógeno, fundamentalmente nosocomial, que produce infecciones graves en servicios médicos y unidades de alto riesgo de infección y que se aísla con frecuencia en muestras de sangre, orina y tracto respiratorio inferior¹. Según los datos del Cuarto Estudio Nacional de *Staphylococcus* (1996), la prevalencia en Madrid y Cataluña de SARM fue del 27,7% y del 30,4% respectivamente¹.

El mecanismo de resistencia de *S. aureus* a la meticilina, está determinado por el gen *mecA* que codifica la producción de la PBP2a; en estas cepas de SARM la PBP2a tiene una baja afinidad para unirse a los antibióticos β -lactámicos. Esta resistencia puede ser homogénea o heterogénea, y en este último caso se observa en una de cada 10^{5-7} células de una población y sólo se expresa en determinadas condiciones de temperatura, pH y osmolaridad. Algunos aislados pueden presentar resistencia homogénea a meticilina *borderline* por sobreproducción de β -lactamasas o de la PBP4².

Para detectar la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*, disponemos de diferentes métodos; el de referencia es la detección de *mecA* mediante hibridación de ADN o por

reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero ninguna de las dos técnicas está al alcance de todos los laboratorios de microbiología debido a su alto coste y a la dificultad de realización³.

Otros métodos disponibles usados comúnmente para detectar la resistencia a la meticilina son el agar con 6 μ g/ml de oxacilina, la difusión con disco y la microdilución en caldo. Algunas modificaciones como la incubación a 30-35°C en lugar de a 37°C, la adición de NaCl al 2% al medio de cultivo y la prolongación del periodo de incubación a 24 o 48 horas en vez de las 16-18 horas habituales, facilitan la detección de la resistencia. Otros métodos rápidos automatizados de microdilución aportan resultados en varias horas (3,5-11 horas). Estos métodos pueden presentar problemas para la detección de cepas con resistencia heterogénea³.

Aparte de éstos, existe en el mercado microbiológico la posibilidad de detectar mediante una prueba de aglutinación, la existencia de la PBP2a de SARM, utilizando partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la PBP2a. Algunos estudios han demostrado que esta prueba tiene una sensibilidad del 97% y una especificidad del 100%⁴.

Debido pues a los datos de prevalencia observados en nuestro medio¹ y a la diversidad de cuadros clínicos que este microorganismo puede generar (bacteriemia, endocarditis, infección metastásica, enfermedad mediada por toxinas [síndrome del shock tóxico, impétigo, síndrome de la piel escaldada, enterocolitis, intoxicación alimentaria])⁵ su identificación debe realizarse de forma rápida y correcta.

Nosotros hemos realizado un estudio, utilizando esta prueba de aglutinación citada (que detecta la PBP2a de SARM), denominada comercialmente MASTALEX-MRSA. Se estudiaron 96 aislados de *Staphylococcus* spp. procedentes de sangre, catéteres y secreciones respiratorias, recogidas durante el periodo de 1999-2000. La prueba se realizó siguiendo las recomendaciones descritas por la casa comercial (MAST DIAGNOSTIC; Francisco Soria Melguizo). Para extraer la PBP2a de las colonias éstas se resuspenden en cuatro gotas de un reactivo de extracción 1 y se someten a 100°C durante 3 minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente y a continuación se añade una gota del reactivo 2. La suspensión se centrifuga a 3.000 rpm durante 5 minutos y se mezclan 50 μ l del sobrenadante con una gota del látex sensibilizado; una

aglutinación positiva a los 3 minutos indica la presencia de la PBP2a.

Las personas encargadas de la realización de esta técnica no conocían previamente la identificación de la cepa a aglutinar.

La identificación microbiológica rutinaria de las cepas correspondientes a *S. aureus* tuvo lugar observando el crecimiento en placas de agar sangre de colonias pigmentadas amarillentas, visualizando la fermentación del medio con manitol salado, resultando positiva la prueba de la coagulasa y confirmando con el sistema WIDER (Francisco Soria Melguizo).

La resistencia de *S. aureus* a meticilina se determinó mediante la difusión con disco a oxacilina y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el anteriormente citado sistema automático WIDER.

De las 96 cepas estudiadas, 48 habían sido identificadas en nuestro laboratorio de forma rutinaria como *S. aureus*, 24 sensibles a oxacilina (CMI menor de 2 μ g/ml) y 24 resistentes a oxacilina (CMI mayor de 4 μ g/ml) y las otras 48 cepas restantes correspondían a *Staphylococcus* coagulasa negativa, 24 sensibles a oxacilina (CMI $\leq$ 0,25 μ g/ml) y 24 resistentes a oxacilina. No se incluyeron en el estudio cepas de *S. aureus* con resistencia *borderline*.

Los 24 SARM presentaron una aglutinación con látex claramente positiva, observándose una sensibilidad del 100%. Ningún *S. aureus* sensible a la oxacilina ni *Staphylococcus* coagulasa negativa sensible o resistente a oxacilina dio un resultado positivo con la prueba de látex, obteniendo por tanto una especificidad del 100% aunque consideramos necesario ampliar el estudio a cepas con resistencia *borderline* para verificar esta especificidad y no obtener falsos positivos.

Para nosotros ha resultado una técnica de metodología sencilla, donde se necesita escaso material (colonias del microorganismo, tubos eppendorf, baño de agua a 100°C, centrífuga a 3.000 rpm y los reactivos específicos incluidos en el kit comercial) y que aporta resultados de fácil interpretación en un tiempo máximo de 20 minutos con buena sensibilidad y especificidad. Además presenta la ventaja de poder ofrecer al clínico, datos de posible resistencia a la meticilina desde el mismo momento en que disponemos de colonias compatibles con *S. aureus* en las placas de agar sangre y por lo tanto susceptibles de ser aglutinadas con partículas de látex sensibilizadas.

Como conclusión final podemos extraer la idea de que MASTALEX