

¿Puede sustituir la prueba de Brucellacapt® a la prueba de Coombs en el diagnóstico de la brucelosis humana?

Jordi Serra^a, Julián Velasco^b, Pere Godoy^c y Joaquín Mendoza^b

^aServicio de Análisis Clínicos. Hospital Comarcal del Pallars. Tremp. Lleida. ^bVIRCELL S. L. Santa Fe. Granada. ^cFacultad de Medicina. Universidad de Lleida.

FUNDAMENTOS. En este trabajo hemos estudiado la capacidad de la prueba Brucellacapt® para sustituir a la prueba de Coombs en el diagnóstico de la brucelosis humana.

MÉTODOS. Se estudiaron sueros de 66 pacientes de brucelosis. Los pacientes se dividieron en dos grupos: grupo 1 (42 pacientes primoinfectados) y grupo 2 (24 pacientes con antecedentes de la enfermedad). Como población complementaria se utilizaron 100 sueros de individuos de población general para el grupo 1, y 28 sueros de individuos sanos con antecedentes de brucelosis para el grupo 2. A todos los sueros se les practicaron las pruebas de Coombs y Brucellacapt®, y se estudió el rendimiento diagnóstico de ambas en los dos grupos mediante la elaboración de curvas ROC (*receiver operating characteristic*).

A 397 sueros de 66 pacientes con brucelosis se les practicaron las pruebas de Coombs y Brucellacapt® y los resultados obtenidos se compararon mediante una prueba no paramétrica.

RESULTADOS. En el grupo 1 ambas pruebas mostraron una sensibilidad de 1 y especificidades de 0,98 (Coombs) y 0,95 (Brucellacapt®). En el grupo 2 las sensibilidades fueron de 1 (Coombs) y 0,95 (Brucellacapt®), y las especificidades de 0,80 (Coombs) y 0,74 (Brucellacapt®). En dicho grupo las áreas bajo la curva fueron de 0,950 (Coombs) y 0,904 (Brucellacapt®). Al comparar los resultados de ambas pruebas mediante la prueba de Wilcoxon no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($Z = -0,213$; $p = 0,8$).

CONCLUSIONES. Los resultados obtenidos en las pruebas de Brucellacapt® y Coombs, empleando sueros en diferentes fases de la enfermedad, pueden considerarse intercambiables ya que ofrecen un rendimiento diagnóstico similar.

Palabras clave: brucelosis, prueba de Coombs, Brucellacapt®.

Can the Brucellacapt® test be substituted for the Coombs test in the diagnosis of human brucellosis?

BACKGROUND. Throughout this work we have studied the capacity of

Brucellacapt® test to replace Coombs test in the serological diagnosis of human brucellosis.

METHODS. A total of 66 initial sera from patients with diagnostic of brucellosis were studied. The patients were divided in two groups: 42 patients showing a primo-infection (group1), and 24 patients with a previous case of brucellosis (group 2). As a controls, for the group 1 we have used 100 sera from healthy donors, and for group 2, 28 sera from people that have had clinical brucellosis but actually are in good health. All serum samples were tested in either Coombs and Brucellacapt® tests. The diagnostic yield was calculated using ROC (receiver-operating characteristic) plots.

Moreover, the results obtained in Coombs and Brucellacapt® tests with 397 serum samples from 66 patients with brucellosis were compare with a non-parametric method.

RESULTS. The sensibility and specificity for group1 were respectively 1 and 0.98 for Coombs and, 1 and 0.95 for Brucellacapt® tests. For group 2, the results in Coombs test were 1 and 0.80, and in Brucellacapt® test 0.95 and 0.74. In this second group, the area under the ROC plot was 0.950 for Coombs and 0.904 for Brucellacapt® tests. Non statistical differences were observed comparing both serological tests using the Wilcoxon method ($Z = -0,213$; $p = 0,8$).

CONCLUSIONS. Brucellacapt® and Coombs tests yield similar diagnostic results in the follow-up of serological samples from patients with brucellosis, and its should consider as interchangeable.

Key words: Brucellosis, Coombs test, Brucellacapt® test

Introducción

El diagnóstico de certeza de la brucelosis viene dado por el aislamiento de *Brucella* spp. en muestras biológicas del paciente. Sin embargo, no siempre es posible tomar muestras para cultivo, se requieren largos períodos de incubación y, además, el porcentaje de positividad es variable. Recientemente se han descrito procedimientos de detección de ADN mediante la reacción en cadena por la polimerasa (PCR)¹⁻⁴, pero todavía no se dan las condiciones que permitan considerarlos métodos de rutina. Es por ello que las pruebas serológicas continúan siendo fundamentales en el diagnóstico de laboratorio de la brucelosis.

En las primoinfecciones el uso combinado de la prueba del rosa de Bengala y la seroaglutinación en tubo (SAT) ofrece un gran rendimiento diagnóstico. En zonas endémicas son frecuentes los casos en que el paciente no es la primera vez que entra en contacto con *Brucella* spp. (reinfecciones, formas evolucionadas, infecciones en individuos sometidos a estímulos antígenicos subclínicos pre-

Correspondencia: Dr.J. Serra.
Servicio de Análisis Clínicos.
Hospital Comarcal del Pallars.
C./ Pau Casals 5.
25620 Tremp.
Lleida.
Correo electrónico: emaluque@pie.xtec.es

Manuscrito recibido el 19-12-2000; aceptado el 7-03-2001.

Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 202-205

vios). En estos casos la respuesta inmune se caracteriza por el predominio de anticuerpos de clase IgG no aglutinantes⁵⁻⁷, que sólo son detectables por las pruebas de Coombs^{8,9} a *Brucella* spp. y enzoinmunoanálisis (ELISA)¹⁰.

La prueba de Coombs presenta el inconveniente de su laboriosidad, que en la práctica conduce a que muchos laboratorios no dispongan de ella, en tanto que la principal dificultad de las pruebas de ELISA radica en su falta de estandarización. Recientemente se ha comercializado una prueba denominada Brucellacapt®, cuyo diseño basado en una técnica de inmunocaptura permite detectar los anticuerpos no aglutinantes de las clases IgG e IgA, así como anticuerpos aglutinantes. Un estudio previo¹¹ ha concluido que los títulos obtenidos por la prueba de Brucellacapt® son superiores a los de Coombs, cuando éstos últimos son $\geq 1/2.560$.

Los objetivos del presente estudio son: a) estudiar el rendimiento diagnóstico de Brucellacapt® en una zona endémica y compararlo con el de la prueba de Coombs y b) estudiar la intercambiabilidad de los resultados de las pruebas de Brucellacapt® y Coombs.

Pacientes y métodos

Pacientes

Se estudiaron 66 pacientes diagnosticados de brucelosis en el Hospital Comarcal del Pallars, en una zona endémica del Pirineo de Lleida^{12,13}, durante el período 1996-1998. Estos pacientes fueron clasificados en dos grupos atendiendo al tipo de historia clínica. El grupo 1 estaba formado por 42 pacientes primoinfectados (sin antecedentes personales de brucelosis, con clínica aguda y un período de evolución inferior a seis meses). En el grupo 2 se incluyeron 24 pacientes con historia previa de brucelosis (historia clínica y/o antecedentes personales). Los criterios diagnósticos utilizados fueron: a) aislamiento de *Brucella* spp., en muestras biológicas del paciente; b) clínica compatible y título de SAT $\geq 1/160$ o, c) clínica compatible y título de Coombs que cuadruplicaba el título de SAT.

Población complementaria

Muestras serológicas de 100 individuos de la población general de la zona estudiada con factor de riesgo ocupacional fueron utilizadas como población complementaria del grupo 1. Además, muestras serológicas pertenecientes a 28 individuos sanos con antecedentes de haber sufrido una brucelosis, al menos dos años antes de este estudio, se emplearon como población complementaria del grupo 2.

Sueros del estudio de intercambiabilidad

Se utilizaron 397 sueros de 66 pacientes con brucelosis obtenidos entre el diagnóstico y 1 año después del tratamiento.

Prueba de Coombs

Se utilizó una suspensión antigénica comercial de *B. abortus* ATCC 11192 (MONLAB). Dicha suspensión se centrifugó durante 1 hora a 3.000 rpm para eliminar el antígeno soluble, y el sedimento se resuspendió en igual volumen de solución salina. Se realizaron diluciones seriadas de los sueros en solución salina, comenzando en

1/10 hasta 1/40.960, y se añadió una cantidad equivalente de la suspensión antigénica, previamente diluida 1/10 en solución salina. Los tubos se incubaron durante dos horas a 37° C y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante, se añadió solución salina y se volvió a centrifugar, el procedimiento de lavado se efectuó tres veces. Después del último lavado se añadieron a cada tubo 10 ul de antiglobulina humana policlonal (Organon) y se incubaron durante 24 horas a 37° C. Transcurrido ese tiempo se efectuó la lectura.

Brucellacapt®

Se utilizó el reactivo comercial Brucellacapt® (VIRCELL SL; Granada, España), siguiéndose las instrucciones de trabajo proporcionadas por el fabricante. Como fase sólida se utilizaron tiras de pocillos de fondo en U tapizados anti-IgG e IgA humanas. Se efectuaron diluciones seriadas de los sueros y se añadió una suspensión de células de *B. abortus* coloreadas. Tras la incubación a 37° C durante 24 h en cámara húmeda se realizó la lectura. La prueba se efectuó con los sueros «ciegos», es decir desconociéndose previamente el grupo al que pertenecían y los resultados obtenidos en la prueba de Coombs.

Métodos estadísticos

Los títulos obtenidos se convirtieron a numeración ordinal para ser tratados estadísticamente.

Para el estudio del rendimiento diagnóstico se elaboraron curvas ROC (*receiver operating characteristic*), empleando el programa GraphROC 1.5 para Windows (GR-2028). De las dos pruebas estudiadas se obtuvo el punto de máxima eficiencia, la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo y el área máxima bajo la curva en las siguientes situaciones:

1. Primoinfectados (grupo 1) frente a grupo complementario de población general.
2. Reinfectedos (grupo 2) frente a grupo complementario de brucelosis antigua.
3. Todos los pacientes (grupos 1+2) frente a grupo complementario de población general.

Para determinar la existencia de posibles diferencias en el estudio de intercambiabilidad de resultados se practicó la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon, y se aceptó un nivel de significación (p) para el estadístico z de 0,05.

Resultados

Estudio de rendimiento diagnóstico

En la prueba de Coombs, y para las tres situaciones estudiadas, el valor discriminante óptimo fue el título 1/320. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos al aplicar el modelo del valor predictivo mediante las curvas ROC a la prueba de Coombs con dicho valor discriminante.

En la prueba de Brucellacapt® el título 1/160 ofreció la máxima sensibilidad en las tres situaciones y se consideró valor discriminante óptimo en los pacientes del grupo 1 y en el conjunto de casos (grupos 1 + 2). Para los pacientes del grupo 2 el título 1/160 mostró una baja especificidad (0,59) por lo que se consideró como mejor

TABLA 1. Prueba de Coombs: aplicación del modelo del valor predictivo

Prueba de Coombs	VD	S	E	EF	VPP	VPN	Área
Grupo 1+2 frente a población general	$\geq 1/320$	1,00	0,98	0,98	0,92	1,00	0,994
Grupo 1 frente a población general	$\geq 1/320$	1,00	0,98	0,98	0,88	1,00	0,995
Grupo 2 frente a antecedente de brucelosis	$\geq 1/320$	1,00	0,80	0,80	0,68	1,00	0,950

VD: valor discriminante; S: sensibilidad; E: especificidad; EF: eficiencia; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; Área: área bajo la curva ROC.

valor discriminante el título 1/320. En la tabla 2 se exponen los resultados obtenidos mediante las curvas ROC con los títulos 1/160 y 1/320.

Estudio de intercambiabilidad de resultados

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de Coombs y Brucellacapt®, así como la correlación de títulos. El 94 % de los resultados obtenidos por Brucellacapt® se situaron dentro de un rango de ± 2 diluciones respecto a la prueba de Coombs, produciéndose 129 empates, 146 rangos negativos y 122 rangos positivos. En conjunto, los resultados obtenidos por ambas técnicas fueron muy similares, y las diferencias estudiadas por la prueba de Wilcoxon no fueron estadísticamente significativas ($Z = -0,213$; $p = 0,8$).

Discusión

Los datos estadísticos obtenidos al aplicar el modelo del valor predictivo a las pruebas de Coombs y Brucellacapt® en los pacientes del grupo 1 y en el total de pacientes (grupos 1+2) permite afirmar que el rendimiento diagnóstico de ambas pruebas es prácticamente idéntico. Se utilizó como población complementaria un grupo de 100 individuos sanos con factor de riesgo ocupacional porque en la zona estudiada el mecanismo predominante de transmisión de la brucelosis es el contagio directo^{12,13}. Los resultados obtenidos concuerdan con los recientemente publicados por Orduña et al¹⁴, especialmente las áreas bajo las curvas ROC. Las menores sensibilidades de Brucellacapt® y Coombs en dicho trabajo pueden deberse,

como los autores apuntan, a la presencia de algunos casos de muy corta evolución.

Sin embargo, y tal como se ha señalado en la introducción, en los pacientes con las características del grupo 1 (primoinfectados) la prueba de Coombs no es necesaria para el diagnóstico, ya que el uso conjunto de las pruebas del rosa de Bengala y de la SAT ofrece un gran rendimiento, y el hemocultivo presenta una buena sensibilidad⁵. Las sensibilidades obtenidas con dichas pruebas fueron: 1 para el rosa de Bengala y 1 para la SAT con el valor discriminante $\geq 1/160$ y 0,92 para el hemocultivo. En estos pacientes la principal aplicación de la prueba de Coombs es la de facilitar el seguimiento y la detección de recidivas¹⁰.

Los pacientes con contacto previo con *Brucella* spp. (grupo 2) fueron diagnosticados mediante la prueba de Coombs, ya que todos ellos presentaron valores de seroaglutinación en tubo $< 1/160$. Se utilizó como población complementaria un grupo de individuos sanos con antecedentes de brucelosis porque se consideró que representaban adecuadamente el estado serológico basal (previo a la reinfección) de los pacientes de dicho grupo. Los resultados muestran que la prueba de Coombs con el valor discriminante $\geq 1/320$ presenta una sensibilidad de 1 pero una especificidad de 0,8. Por tanto existe un cierto porcentaje de falsos positivos debido a la existencia de anticuerpos residuales producidos durante exposiciones antiguas. Dichos falsos positivos se sitúan entre los títulos 1/320 y 1/1.280.

La prueba de Brucellacapt® (valor discriminante $\geq 1/320$) en los pacientes del grupo 2, mostró un rendimiento parecido a la prueba de Coombs, aunque ligeramente inferior ya que la sensibilidad fue de 0,95 (Coombs

TABLA 2. Prueba de Brucellacapt®: aplicación del modelo del valor predictivo

Prueba de Brucellacapt®	VD	S	E	EF	VPP	VPN	Área
Grupo 1+2 frente a población general	1/160	1,00	0,95	0,96	0,91	1,00	0,995
	1/320	0,96	0,99	0,98	0,98	0,98	
Grupo 1 frente a población general	1/160	1,00	0,95	0,96	0,87	1,00	0,997
	1/320	0,97	0,99	0,98	0,97	0,99	
Grupo 2 frente a antecedente de brucelosis	1/160	1,00	0,59	0,75	0,58	1,00	0,904
	1/320	0,95	0,74	0,79	0,65	0,95	

VD: valor discriminante; S: sensibilidad; E: especificidad; EF: eficiencia; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; Área: área bajo la curva ROC.

TABLA 3. Relación entre los resultados obtenidos por las pruebas de Coombs y Brucellacapt®

Coombs		Brucellacapt®												
Título	Nº	<1/40	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1.280	1/2.560	1/5.120	1/10.240	1/20.480	1/40.960	1/81.920
<1/40	17	10	3	4										
1/40	10		6	3	1									
1/80	18		2	6	6	4								
1/160	39		4	4	17	6	7	1						
1/320	50			5	16	18	7	4						
1/640	70				4	21	22	12	7	4				
1/1.280	96					14	23	28	14	6	6	2	1	2
1/2.560	59					2	15	18	13	4	4	3		
1/5.120	25							5	7	5	4		1	3
1/10.240	7								2	2	2	1		
1/20.480	4										1	1		2
1/40.960	2												1	

Nº: número de sueros.

En negrita, los sueros en los que el título obtenido coincide en las dos técnicas.

1,00) y la especificidad 0,74 (Coombs 0,80), y el área bajo la curva ROC de 0,904 (Coombs 0,950). La zona de falsos positivos se sitúa fundamentalmente entre los títulos 1/320 y 1/1.280 como sucedía con la prueba de Coombs. No obstante, el menor rendimiento diagnóstico obtenido de Brucellacapt® en la casuística estudiada puede verse compensado por su fácil realización y superior estandarización. Dicha estandarización debiera garantizar la intercambiabilidad de resultados entre laboratorios, objetivo muy difícil de alcanzar con la prueba de Coombs.

Los resultados del estudio de intercambiabilidad mostraron una aceptable correlación entre ambas técnicas. El número de sueros estudiados (397), los datos descriptivos (en un tercio de los sueros el título coincide en las dos técnicas, el número de rangos positivos y negativos está equilibrado, y en una gran mayoría de los sueros la desviación entre las dos técnicas no supera las dos diluciones) y finalmente, la falta de diferencias estadísticamente significativas de la prueba no paramétrica apoyan esta conclusión.

No hay que obviar que la diferencia observada de ± 2 diluciones de algunos sueros que se encuentran en la zona diagnóstica (títulos 1/160 - 1/320) podría ser problemática. Sin embargo, con los valores discriminantes escogidos las diferencias observadas entre los títulos de las dos pruebas en los sueros obtenidos en el momento del diagnóstico, únicamente en un caso del grupo 2 comportaron una clasificación distinta del paciente.

En un estudio comparativo previo Gómez et al¹¹ concluyeron que en títulos $>1/2.560$ los resultados de Brucellacapt® eran claramente superiores a los de la prueba de Coombs. La sensación empírica de las primeras experiencias con Brucellacapt® fue que los títulos podían ser mucho más altos que los de la prueba de Coombs. Dicha sensación se confirmó con los resultados del estudio de Gómez et al. Por ello el fabricante introdujo modificaciones en la suspensión antigénica con la finalidad de obtener títulos menores sin disminuir la sensibilidad de la prueba. Nuestro trabajo se ha efectuado con la nueva generación de Brucellacapt® presente en el mercado. De ahí que nosotros no viéramos las diferencias constatadas en el trabajo anteriormente citado.

Consideramos que la valoración conjunta de los dos estudios efectuados nos permite una mejor aproximación a la pregunta originalmente planteada en este trabajo ¿puede sustituir Brucellacapt® a la prueba de Coombs? Para ello se ha realizado una comparación de resultados y un estudio de la capacidad de las pruebas para clasificar correctamente a los pacientes. A la vista de los resultados obtenidos concluimos que:

1. Brucellacapt® ofrece un rendimiento diagnóstico similar al de la prueba de Coombs.

2. Los resultados de Brucellacapt® y Coombs obtenidos en sueros en diferentes fases de la enfermedad pueden considerarse intercambiables.

3. No obstante, hay que considerar que la casuística

estudiada responde a un número determinado de pacientes y a una zona con características epidemiológicas propias. Por lo tanto los datos de rendimiento diagnóstico deben ser interpretados en este contexto.

4. Se debe valorar la posible repercusión de las diferencias entre Brucellacapt® y Coombs en la zona diagnóstica (títulos 1/160-1/320). Para ello consideramos que la conducta más adecuada es que cada laboratorio trabaje en paralelo con ambas técnicas durante cierto período de tiempo y valore la prueba de Brucellacapt® en su población y frente a la prueba de Coombs que esté utilizando.

Bibliografía

1. Cleeckaert A, Verger J.M, Grayon M, Grépinet O. Polymorphism at the dnaK locus of *Brucella* species and identification of a *Brucella melitensis* species-specific marker. *J Med Microbiol* 1996; 45:200-205.
2. Leal DS, Martínez A, López A, Martínez P. Single-step PCR first detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3.087-3.090.
3. Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 477-478.
4. Morata P, Queipo MI, Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2.443-2.446.
5. Ariza J, Pellicer R, Pallarés P, Foz A, Gudíol F. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 131-140.
6. Coghlan JD, Weir DM. Antibodies in human brucellosis. *Br Med J* 1967; 2:269-271.
7. Kerr WR, Coghlan JD, Payne DJ, Robertson L. The laboratory diagnosis of chronic brucellosis. *Lancet* 1966; 2: 1.181-1.183.
8. Foz A, Garriga S. Relation entre la fixation du complement et «les anticorps incomplets» (test de Coombs) dans le brucellose humaine. *Rev Immunol* 1954; 18:288-289.
9. Kerr WR, McCaughey WJ, Coghlan JD, Payne DJ, Quaipe RA, Robertson L, et al. Techniques and interpretations in serological diagnosis of brucellosis in man. *J Med Microbiol* 1968; 1:181-193.
10. Pellicer T, Ariza J, Foz A, Pallarés R, Gudíol F. Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. *J Infect Dis* 1988; 157: 918-924.
11. Gómez MC, Rosa C, Geijo P, Escubano MA. Estudio comparativo del test Brucellacapt con el test de Coombs para *Brucella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17: 283-285.
12. Serra J, Pujol R, Godoy P. Estudio seroepidemiológico de la brucelosis en un área rural endémica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18: 74-78.
13. Serra J, Godoy P. Incidencia, etiología y epidemiología de la brucelosis en un área rural de la provincia de Lleida. *Rev Esp Salud Pública* 2000; 74: 51-59.
14. Orduña A, Almaraz A, Prado A, Gutiérrez MP, García-Pascual A, Dueñas A, et al. Evaluation of an Immunocapture-Agglutination Test (Brucellacapt) for Serodiagnosis of Human Brucellosis. *J Clin Microbiol* 2000; 4.000-4.005.