

BRUCELOSIS: ASPECTOS ACTUALES DE PRINCIPAL INTERÉS

Javier Ariza Cardenal

Servicio Enfermedades Infecciosas, C. S. U. de Bellvitge

EPIDEMIOLOGÍA

La brucelosis ha sido bien conocida en las últimas décadas como una zoonosis de distribución mundial. La enfermedad se ha erradicado en muchos países del mundo más desarrollado, pero la infección por *Brucella melitensis* sigue siendo endémica en el área Mediterránea, Oriente Próximo, la península de Arabia, el subcontinente Índico y Latinoamérica.

En España, la gran mayoría de aislamientos procedentes de pacientes con brucelosis han correspondido a *B. melitensis*. La enfermedad humana se ha asociado con el contacto directo con el ganado, propio de algunas profesiones como pastores, ganaderos, matarifes etc., pero también en gran parte con el consumo de alimentos lácteos no controlados, predominante en el medio rural, pero también existente en el urbano y su entorno. Las tasas correspondientes al registro de declaración obligatoria han mostrado una disminución progresiva en los últimos 15 años, coincidiendo con intensas campañas de vacunación y de intervención sobre la brucelosis animal en muchas regiones españolas. Mientras la tasa máxima se alcanzó en 1984, con 22,33 casos por 100.000 habitantes, los últimos registros fueron 3,9 en los años 1998 y 1999, y 2,8 casos por 100.000 habitantes en el 2000.

ETIOPATOGENIA

El género *Brucella* incluye un grupo homogéneo de microorganismos facultativos intracelulares pertenecientes a la α -2 subdivisión de las Proteobacterias. Debido a la similitud del DNA de las diferentes variedades, se ha propuesto agruparlas en una sola especie, *B. melitensis*. Sin embargo, por razones de tipo práctico y epidemiológico se mantiene la distinción de los 6 tipos principales: *B. melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Brucella. ovis* y *Brucella neotomae*.

El microorganismo carece de plásmidos como expresión de su adaptación a un medio intracelular estable, libre de competición bacteriana. Su particular parasitismo intracelular se relaciona con algunas diferencias estructurales de su membrana externa en comparación con otras bacterias gram negativas. En su ubicación intracelular es resistente a la acción de los policationes y a los sistemas de *killing* dependientes de oxígeno de los fagocitos. Utiliza la vía de autofagosomas para evadir la fusión fagolisosómica y poder replicarse en el interior de las células del sistema mononuclear fagocítico. Esta capacidad de supervivencia intracelular determina el patrón clínico característico de la brucelosis, el curso ondulante de la enfermedad, su tendencia a presentar recaídas y evolucionar a formas crónicas. La inmunidad celular es el principal mecanismo de defensa, mediante la activación macrófaga y de su capacidad para erradicar las bacterias intracelulares por la acción de algunas citocinas (interferon- γ , factor α de necrosis tumoral e interleucina-12) producidas por linfocitos sensibilizados. Coincidiendo con el desarrollo de la inmunidad celular aparece también una hipersensibilidad retardada que parece tener importancia en la patogenia de la enfermedad. No obstante, el papel de la inmunidad humoral en los mecanismos de defensa es, sin duda, significativo.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El comportamiento clínico de la brucelosis es bien conocido y ha sido objeto de múltiples descripciones. La infección puede afectar cualquier sistema o tejido del organismo. La enfermedad debida a *B. melitensis* es la más agresiva y la ocasionada por *B. suis* la que tiene mayor capacidad para producir abscesificación. El uso de la antibioterapia y el mayor desarrollo sanitario pueden modificar la presentación clínica referida en las descripciones clásicas y la sintomatología puede diferir según el entorno social en el que se desarrolle. La afectación de los órganos del sistema mononuclear fagocítico, hepatoesplenomegalia y linfadenopatías y del osteoarticular es especialmente característica. El desarrollo de focalidades de la enfermedad se produce en más del 30% de los casos, frecuencia que se relaciona fundamentalmente con el tiempo de evolución de la enfermedad antes de iniciar la terapéutica antibiótica. La observación de un paciente con espondilitis, sacroiliitis, poliartritis o tenosinovitis, orquiepididimitis y meningitis linfocitaria deben plantear el diagnóstico diferencial de la brucelosis en nuestro medio. La observación de formas focales abscesificadas, como reactivación de una brucelosis antigua, consideradas muy raras en nuestros días, podrían ser proporcionalmente más frecuentes en los próximos años si los casos de brucelosis de reciente adquisición siguen disminuyendo y pueden plantear problemas diagnósticos a los médicos poco familiarizados con la enfermedad.

DIAGNÓSTICO

Diagnóstico bacteriológico

El diagnóstico definitivo de la enfermedad requiere el aislamiento de *Brucella*, el cual suele hacerse en los hemocultivos. El medio bifásico de Castañeda ha sido muy eficaz y el sistema estándar reconocido durante muchos años. En términos generales, cursan con hemocultivo positivo el 75-80% de las infecciones por *B. melitensis* y alrededor del 50% de las producidas por *B. abortus*.

Los nuevos sistemas de hemocultivos automatizados, del tipo Bactec 9200 o similares, se han mostrado extraordinariamente eficaces. Su capacidad de detección es probablemente mayor que el método clásico de Castañeda y que los otros sistemas descritos, pero lo más significativo es la precocidad de esta detección, que suele producirse habitualmente entre los 3 y los 5 días. Utilizando esta metodología se recupera el microorganismo durante la primera semana de incubación en más del 95% de los casos en los que puede aislarse *Brucella*, lo que garantiza su aislamiento inclusive en los casos sin sospecha clínica de la enfermedad. El subcultivo ciego de rutina a los 7 días no es necesario y debe reservarse para aquellos casos con una elevada sospecha de brucelosis, especialmente si ha existido una antibioterapia previa.

Con menor frecuencia se plantea el aislamiento de *Brucella* en otras muestras. El microorganismo crece bien en los medios habituales, y en pocos días, cuando se cultiva líquido articular, pus procedente de abscesos, líquido cefalorraquídeo (LCR) u otras muestras tisulares, aunque la frecuencia de recuperación en estos casos suele ser alrededor del 30%. También en este tipo de muestras el sistema Bactec 9200 aumenta la rentabilidad del cultivo de forma significativa respecto de los métodos convencionales.

En los últimos años, el grupo de Colmenero *et al.* ha observado resultados muy satisfactorios con la utilización de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en sangre periférica de pacientes con brucelosis, para el diagnóstico de la fase inicial de la enfermedad y para la identificación de las recaídas (sensibilidad 100%, especificidad 98,5%). No obstante, estos resultados no han podido ser confirmados por otros autores y la interferencia de algunos elementos hemáticos ha sido considerada un factor limitante de la sensibilidad de la prueba. Recientemente, Zerva *et al.* obtuvieron buenos resultados al

realizar la prueba en muestras de suero (sensibilidad 94%, especificidad 100%). Por lo tanto, la PCR puede ser de mucha utilidad para el seguimiento evolutivo de los pacientes que presentan un curso clínico complicado, pero para ello será necesario que otros grupos corroboren su eficacia y que se defina con precisión la metodología más apropiada. La aplicación de la PCR en muestras clínicas diversas distintas de la sangre, (líquido articular, LCR, pus de abscesos etc.), cuyos cultivos son, con frecuencia, negativos en los medios habituales parece muy recomendable en aquellos laboratorios que dispongan de la infraestructura necesaria para su realización.

Diagnóstico serológico

Las pruebas serológicas tienen una gran trascendencia en el diagnóstico de la brucelosis. La mayoría de ellas detectan anticuerpos frente al lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa. Su principal limitación es su incapacidad para diferenciar con la suficiente sensibilidad y especificidad entre infección activa y curada, ya que los anticuerpos persisten generalmente durante un período prolongado tras la recuperación clínica.

Las pruebas clásicas de uso más extendido, con las que se pueden manejar una gran mayoría de pacientes con brucelosis, son la prueba de la seroaglutinación de Wright y la aglutinación de Rosa de Bengala, que detectan la presencia de anticuerpos aglutinantes, y la prueba de Coombs para cuantificar los anticuerpos no aglutinantes. La negatividad de estas tres pruebas prácticamente excluye el diagnóstico de brucelosis. La valoración adecuada de sus resultados requiere la utilización de un antígeno de calidad y bien estandarizado, ya que lo contrario es causa frecuente de títulos poco fiables y confusiones diagnósticas. Clásicamente un título de 1/80-1/160 se ha considerado un punto de corte indicativo de enfermedad si va acompañado de un cuadro clínico sugestivo o compatible. No obstante, cualquier título positivo debe valorarse cuidadosamente a la luz de los datos clínicos, antes de ser descartado como no significativo.

La prueba Rosa de Bengala es una prueba de aglutinación rápida muy eficaz, que se utilizó inicialmente como prueba de cribado al permitir una aproximación diagnóstica en pocos minutos. No obstante, la experiencia práctica acumulada le ha concedido un protagonismo que va más allá del correspondiente a una simple prueba de cribado. El medio ácido en el que se efectúa la prueba favorece considerablemente la expresión del componente aglutinante de los anticuerpos. Su sensibilidad y especificidad para identificar anticuerpos aglutinantes anti-*Brucella* es muy elevada, de tal forma que solo excepcionalmente resulta negativa en la fase aguda de la infección y con muy poca frecuencia en las fases evolucionadas o crónicas de la enfermedad.

La prueba de Coombs para la detección de anticuerpos no aglutinantes de tipo IgG e IgA se ha mostrado extraordinariamente fiable en la práctica clínica a través de los años y aporta, en 48 h, una información complementaria de gran utilidad. La modificación del método introducida por Otero *et al*, efectuando la prueba en placa en lugar de tubo, la simplifica notablemente y permite recomendar su empleo de forma habitual a los pacientes con brucelosis. En la gran mayoría de los casos, los títulos obtenidos son superiores a los de la aglutinación, una o dos diluciones en las primeras fases de la enfermedad, pero varias veces más a medida que el tiempo de evolución se prolonga.

Recientemente, se ha incorporado en nuestro país una nueva prueba de inmunocaptura-aglutinación denominada Brucellacapt® para la detección de anticuerpos totales frente a *Brucella*. La prueba utiliza una laminilla con una serie de pocillos que contienen inmunoglobulinas antihumanas. Varios trabajos de autores españoles han comprobado una especificidad similar a la prueba de Coombs, pero con una mayor sensibilidad. Probablemente, una de las principales razones de la sensibilidad de la prueba es el que su realización se produce en un pH ácido, lo que favorece en gran manera la

aglutinación de los anticuerpos. Los títulos $\geq 1/320$ se consideran significativos. Estos resultados, y la simplicidad y rapidez de la realización del método Brucellacapt® hacen prever que sustituirá en gran medida a la prueba de Coombs para el diagnóstico serológico habitual de la brucelosis.

Desde hace unos 15 años, se ha utilizado el método de enzimoimmunoanálisis (ELISA) para la determinación de las inmunoglobulinas específicas frente al LPS de *Brucella*, mostrando una extraordinaria sensibilidad y especificidad. Los estudios existentes sobre el ELISA IgG, IgM e IgA y su correlación con las pruebas serológicas clásicas nos han permitido conocer con detalle el curso evolutivo de las inmunoglobulinas específicas en las diferentes fases de la enfermedad y su diferente papel en los resultados de las pruebas de aglutinación y Coombs. La determinación de anticuerpos IgM tiene una correlación muy alta con la seroaglutinación, especialmente en los primeros meses de evolución. Tras estos primeros, hay un descenso habitual en los títulos de ELISA-IgM, independientemente de la evolución clínica del paciente. Las inmunoglobulinas IgG e IgA tienen también un componente aglutinante, pero su papel relativo en las pruebas de aglutinación es menos importante que el de las IgM en los primeros meses de la enfermedad. Su correlación con la seroaglutinación se incrementa notablemente a lo largo del tiempo y se hace muy notable a partir de los tres primeros meses; el papel de estas inmunoglobulinas en las pruebas de aglutinación es tanto más importante cuanto mayor sea el período evolutivo considerado. Las IgG e IgA tienen un componente muy notable como anticuerpos no aglutinantes, que son los que detecta la prueba de Coombs. Así, la prueba ELISA IgA, y especialmente la determinación ELISA IgG, muestran una alta correlación con la prueba de Coombs. La detallada y fiable información que aportan los métodos de ELISA, junto con la posibilidad de ser introducido a gran escala sin grandes dificultades técnicas y por un coste aceptable, hizo pensar que el ELISA-IgM sustituiría a la prueba de aglutinación y el ELISA-IgG a la prueba de Coombs en el diagnóstico habitual de la brucelosis. Sin embargo, en estos años, el uso extendido y habitual de esta prueba ha tropezado con la inexistencia de una estandarización adecuada de los sistemas comerciales. De hecho, los laboratorios que utilizan este método proporcionan a menudo resultados confusos que son difíciles de interpretar. Así, su empleo generalizado no es aconsejable en tanto no se produzca una estandarización bien establecida.

Para diferenciar si los anticuerpos son de tipo IgM o IgG en la prueba de seroaglutinación y disponer así de una información respecto del tiempo de evolución de la enfermedad se ha utilizado clásicamente la prueba de la seroaglutinación tras un posterior tratamiento de la muestra con 2-mercaptoetanol (2ME) o ditrioteitol (DTT), que detecta únicamente los anticuerpos IgG porque los de la clase IgM son inactivados. La información que proporciona esta prueba es útil, pero mucho menos precisa que la obtenida con el método de ELISA, ya que se ha visto que también puede inactivar a las IgA además de las IgM. Recientemente, se ha diseñado una prueba colorimétrica de uso muy sencillo y rápido, la prueba de *dipstick* que identifica las IgM mediante una cinta de nitrocelulosa impregnada de anticuerpos monoclonales anti-IgM humana. Esta prueba se expresa de forma semicuantitativa en cruces, se ha mostrado muy sensible y específica y se considera especialmente apropiada para el diagnóstico en lugares con pocos recursos.

En los pacientes que sufren una recaída de la enfermedad se observa un nuevo incremento de las IgG y también de las IgA, pero no de las IgM, en el curso evolutivo de las inmunoglobulinas, muy bien objetivado por el método de ELISA. Entre las pruebas clásicas, este viraje se detecta mucho mejor con la prueba de Coombs que con la prueba de la aglutinación. Los datos aportados recientemente parecen indicar que el Brucellacapt®, cuyos títulos parecen tener variaciones más pronunciadas, podría detectar mejor estas oscilaciones relacionadas con la recaída de la brucelosis.

La interpretación de la serología en relación con la evolución crónica de la enfermedad es un problema no resuelto. La presunción clásica de los autores americanos de que la prueba de aglutinación con 2ME era un buen marcador de evolución a la cronicidad no se sostiene en la actualidad, a la luz de los datos comentados previamente. En este sentido, hay que tener en cuenta que la persistencia serológica es más frecuente en los pacientes que han partido de títulos muy elevados al principio de la enfermedad y en aquellos que han tenido focalidad de la infección aunque hayan seguido una evolución satisfactoria. Desde un punto de vista práctico, cualquier título serológico debería compararse con los títulos previos si estuvieran disponibles; un incremento de los anticuerpos IgG o IgA, o la persistencia de estos títulos en pacientes con una situación clínica compatible, deberían sugerir la actividad de la infección. En este sentido, conviene recordar que la comparación de dos títulos serológicos entre sí requiere su realización en pareado y que una variación sólo se considera valorable si es superior a una dilución.

Las pruebas que determinan anticuerpos frente a las proteínas citoplasmáticas de *Brucella* (contrainmunolectroforesis y más recientemente el método de ELISA) se han mostrado también muy sensibles y específicas en el diagnóstico de la brucelosis, aunque su empleo ha sido mucho menos extendido. Estos anticuerpos aparecen más tardíamente que los anti-LPS y su evolución se ve más interferida por el curso del tratamiento antibiótico. Por ello, se ha reportado que estos anticuerpos pueden ser un marcador de actividad más sensible que los anti-LPS.

En nuestra opinión, las brucelosis que tienen una respuesta serológica de bajo nivel y especialmente si es de tipo IgG e IgA, con ausencia de IgM, podrían corresponder a formas de reactivación o de adquisición no reciente, tras una infección previa asintomática o desapercibida; a este respecto hay que recordar que, en algunos pacientes, el tiempo de incubación de la enfermedad puede ser de varios meses.

TRATAMIENTO

El tratamiento de la brucelosis no ha sufrido variaciones significativas en los últimos años. En su localización intracelular el microorganismo encuentra la forma de evadir la acción antimicrobiana, de manera que no ha requerido desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos utilizados durante décadas para tratar la enfermedad. El problema estriba en la dificultad para conseguir la erradicación intracelular del microorganismo, de tal forma que ningún antibiótico, por sí solo, lo logra, y ello ha conducido a la necesaria utilización de combinaciones diversas con efecto sinérgico o aditivo, administradas durante varias semanas, para reducir en lo posible la aparición de recaídas. Cuando éstas se presentan, la bacteria mantiene una sensibilidad antibiótica idéntica a la del episodio inicial, por lo que puede emplearse una pauta antibiótica similar para su tratamiento.

Las tetraciclinas son los antibióticos más efectivos en el tratamiento de la brucelosis y deberían ser la base de cualquier combinación terapéutica. Los aminoglucósidos, a pesar de su escasa penetración intracelular, muestran un efecto sinérgico con las tetraciclinas. La combinación de doxiciclina, a dosis de 100 mg/12 h por vía oral durante 6 semanas, y un aminoglucósido por vía intramuscular durante 2 semanas es la más activa, siendo considerada como el tratamiento clásico y de elección de la enfermedad, con un tasa de recaídas de alrededor del 5%. Si bien el aminoglucósido clásicamente utilizado ha sido la estreptomina (1g/día; 750 mg/día en pacientes mayores de 50 años), actualmente se recomienda el uso de la gentamicina en monodosis de 4 mg/kg, ya que tiene mayor actividad *in vitro* y menor toxicidad, pero el período de 2 semanas debe mantenerse.

La combinación oral de doxiciclina (100 mg/12 h) y rifampicina (15 mg/kg/día, usualmente 900 mg/día en una dosis matutina en ayunas), ambas durante 45 días, es la

mejor alternativa al tratamiento clásico. Por su tolerancia y comodidad tiene más aceptación, pero se acompaña de un porcentaje de recaídas más elevado, alrededor del 15%, lo que tiene especial importancia en las formas complicadas de la enfermedad.

Las fluoroquinolonas, el cotrimoxazol y la azitromicina han proporcionado malos resultados en los estudios experimentales y en el tratamiento de la enfermedad humana. Las combinaciones de doxiciclina o rifampicina con quinolonas o cotrimoxazol han sido utilizadas por algunos autores, pero sus resultados no han sido suficientemente contrastados y estas pautas deberían ser consideradas alternativas secundarias.

Para la brucelosis de la embarazada, una pauta de monoterapia con rifampicina durante 8 semanas podría ser una razonable opción. La brucelosis infantil en niños mayores de 7 años debe manejarse como la brucelosis del adulto. En el caso de niños pequeños, se recomienda rifampicina o cotrimoxazol durante 4-6 semanas, más gentamicina durante 7-10 días; la mejor alternativa a esta pauta es la combinación oral de rifampicina y cotrimoxazol durante 6 semanas.

La mayoría de accidentes de laboratorio consistentes en pinchazos no requieren la administración preventiva de antibióticos. No obstante, si el accidente implica la vía conjuntival, se recomienda el uso de doxiciclina; aunque el tiempo aconsejado es motivo de controversia, una pauta de 7-10 días es, probablemente, adecuada.

El tratamiento de muchas formas localizadas de la brucelosis no requiere modificaciones respecto a las recomendaciones generales mencionadas. Sin embargo, en el caso de la espondilitis, algunos de osteoartritis u orquiepidimitis y las formas supuradas de la enfermedad, que se acompañan de un mayor índice de fallos terapéuticos, se recomienda prolongar el tratamiento con doxiciclina al menos durante 8 semanas; el drenaje quirúrgico no suele ser necesario en muchos de estos pacientes. Para los casos de endocarditis se recomienda la triple combinación de doxiciclina, rifampicina y aminoglucósidos para optimizar la actividad bactericida; la gentamicina debería prolongarse 3 semanas y la doxiciclina y rifampicina al menos durante 8 semanas. Los criterios utilizados para el recambio valvular son los mismos que para las otras endocarditis infecciosas, aunque éste es, a menudo, requerido en el caso de la brucelosis. El tratamiento de la neurobrucelosis tropieza con la dificultad de conseguir niveles de antibióticos elevados en el LCR; se recomienda la adición de rifampicina al tratamiento clásico y la prolongación de la antibioterapia en función de la respuesta clínica.

BIBLIOGRAFÍA

- ARIZA J, PELICER T, PALLARÉS R, FOZ A, GUDIOL F. Specific antibody profile in human brucellosis. Clin Infect Dis 1992; 14:131-140.
- ARIZA J, GUDIOL F, PALLARÉS R, *et al.* Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampin or doxycycline plus streptomycin, a randomized, double-blind study. Ann Intern Med 1992; 117:25-30.
- ARIZA J. Brucellosis: an update. The perspective from the Mediterranean basin. Rev Med Microbiol 1999; 10:125-135.
- COLMENERO JD, REGUERA JM, MARTOS F, *et al.* Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. Medicine 1996; 75:195-211.
- DIAZ R, MORIYÓN I. Laboratory techniques in the diagnosis of human brucellosis. En: Young EJ, Corbel MJ (eds). Brucellosis: Clinical and laboratory aspects. Boca Ratón: CRS Press, 1992.

MORATA P, QUEIPO-ORTUÑO MI, REGUERA JM, GARCÍA-ORDOÑEZ MA, PICHARDO C, COLMENERO JD. Posttreatment follow-up of brucellosis by PCR assay. J Clin Microbiol 1999; 37:4163-4166.

ORDUÑA A, ALMARAZ A, PRADO A, *et al.* Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for the serodiagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol 2000; 38:4000-4005.

SOLERA J, LOZANO E, MARTÍNEZ-ALFARO E, ESPINOSA A, CASTILLEJOS ML, ABAD L. Brucella spondylitis: review of 35 cases and literature survey. Clin Infect Dis 1999;29:1440-1449.

YAGUPSKY P. Detection of *Brucella* in blood cultures. J Clin Microbiol 1999; 37:3437-3442.

YOUNG EJ. An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis 1995; 21:283-290.