

# DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS HUMANA POR LABORATORIO

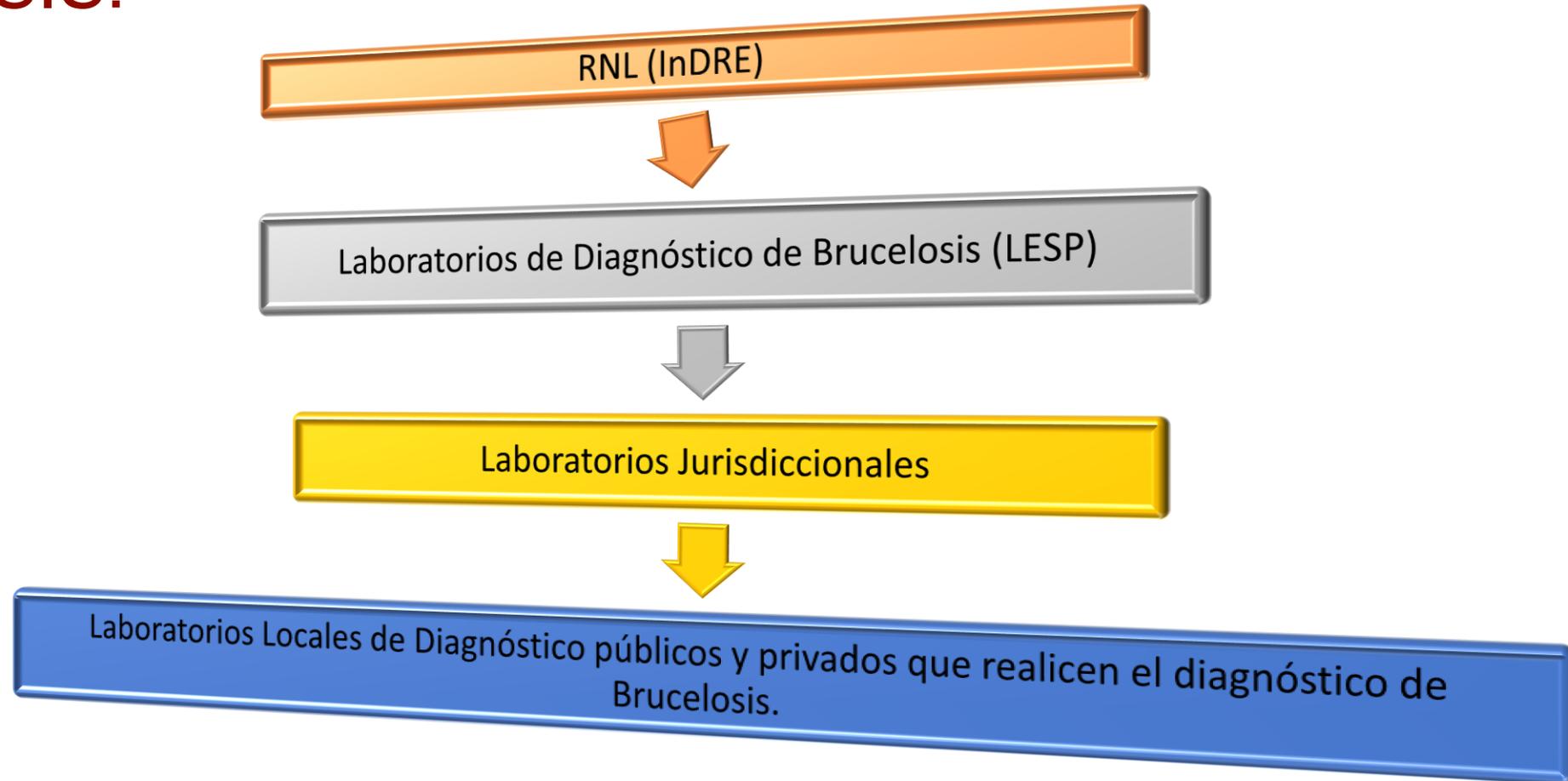
QFB. Juan Carlos Camacho Mtz.

Puebla Pue. 27 de Agosto 2015.

- ORGANIZACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE BRUCELOSIS.
- LINEAMIENTOS DE LABORATORIO DE BRUCELOSIS
  - Recepción, manejo y envío de muestras.
- DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO.
  - Tipo de muestra.
  - Métodos de diagnóstico.
  - Diagnóstico serológico:
    - a) Aglutinación con Antígeno Rosa de Bengala.
    - b) Aglutinación estándar en microplaca (SAT).
    - c) Aglutinación en microplaca con 2- Mercaptoetanol (2-ME).
  - Diagnóstico Bacteriológico

# RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE BRUCELOSIS:

- 31 laboratorios del país.
- El D.F. no cuenta con Laboratorio Estatal.



## TOMA, ENVÍO Y RECEPCIÓN DE MUESTRAS:

### TOMA DE MUESTRA

- Para personas con sintomatología sospechosa.
- Con antecedentes de riesgo
- Proviene zona endémica

### ENVÍO DE MUESTRA

- En viales o tubos de plástico.
- Con estudio epidemiológico del paciente.
- Debidamente identificada.
- Traslado de acuerdo al **Sistema Básico de Triple Embalaje.**

### RECEPCIÓN DE MUESTRA

- Rechazo si no cumple con los criterios de aceptación.

## TOMA, ENVÍO Y RECEPCIÓN DE MUESTRAS:

PRUEBA	MUESTRA CLÍNICA	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	CRITERIOS DE RECHAZO	ESTÁNDAR DE SERVICIO
Rosa de bengala Aglutinación estándar y 2-Me	Suero	<ul style="list-style-type: none"> <li>Volumen mínimo de 2.0 mL.</li> <li>No hemolizada, icterica, contaminada, lipémica.</li> <li>Identificación legible.</li> <li>Estudio epidemiológico.</li> <li>Muestra refrigerada (2-8) °C</li> <li>Oficio de solicitud de estudio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Volumen menor a 2.0 mL</li> <li>Muestra derramada, vial vacío o roto, hemolizada, icterica, contaminada, lipémica.</li> <li>Identificación ilegible.</li> <li>Sin Estudio Epidemiológico</li> <li>Sin solicitud de estudio</li> </ul>	<p>Diagnóstico 3 días.</p> <p>Control de Calidad 4 días.</p> <p>Zoonosis 24 horas</p>

## TOMA, ENVÍO Y RECEPCIÓN DE MUESTRAS: FLEBOTOMÍA



**Paso 1:**  
Lávese bien las manos  
antes de iniciar el  
procedimiento.



**Paso 2:**  
Reúna todos los  
materiales necesarios.



**Paso 3:**  
Póngase los  
guantes.



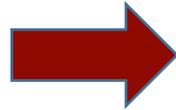
**Paso 4:**  
Utilice un torniquete para que las  
venas sean más accesibles.

## TOMA, ENVÍO Y RECEPCIÓN DE MUESTRAS: FLEBOTOMÍA



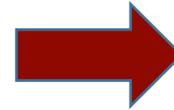
### Paso 5:

Aplique el torniquete alrededor del antebrazo, de tres a cuatro pulgadas por encima de la zona de inserción. No deje colocado el torniquete por más de 60 segundos.



### Paso 6:

Palpe y limpie el sitio.



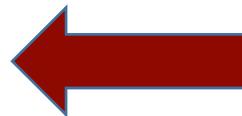
### Paso 7:

Utilice un ángulo de 15° e inserte la aguja de 2-4 pulgadas en la vena.



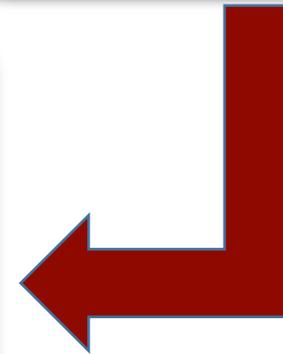
### Paso 9:

Retire la aguja y aplique presión con una gaza, y aplique una curita.



### Paso 8:

Retire el torniquete y deje que el tubo se llene.



## TOMA, ENVÍO Y RECEPCIÓN DE MUESTRAS: TRIPLE EMBALAJE

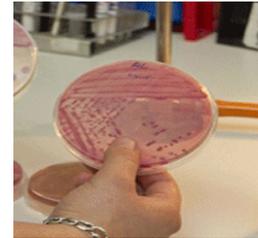




## MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO:

# MÉTODOS DIRECTOS

**Aislamiento en medios de cultivo.**



**Amplificación del genoma por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**



## MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO:



**Aglutinación de bacterias teñidas con rosa de bengala.**

**Aglutinación de bacterias no teñidas (SAT).**

**Aglutinación de bacterias no teñidas en presencia de un agente reductor (2-ME).**

**ELISA, Coombs, Brúcela Capt.**

## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO:

- Los métodos serológicos son importantes en enfermedades cuyo agente etiológico no es fácil de aislar.
- El hallazgo de anticuerpos específicos proporciona la **evidencia de que ha ocurrido la infección.**

# DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO:

## ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO:

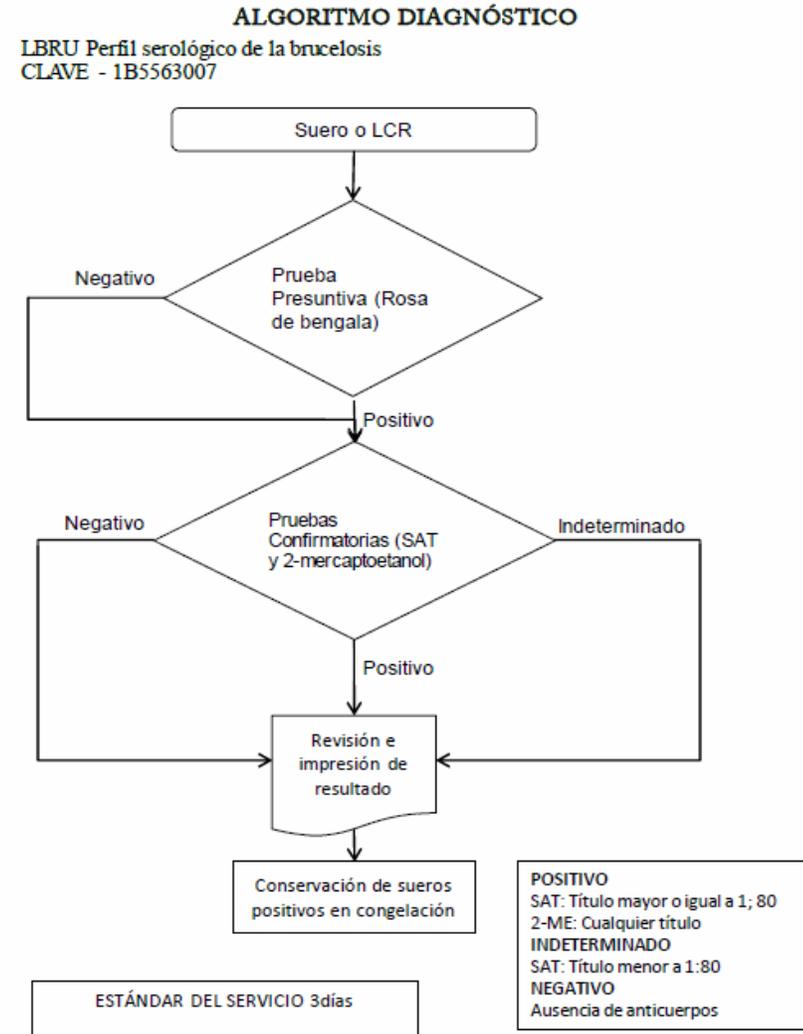


Figura. 3. Algoritmo para el diagnóstico serológico de Brucelosis

## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: AGLUTINACIÓN EN PLACA CON ROSA DE BENGALA.

- Es un método confiable.
- Prueba cualitativa que puede usarse como prueba tamiz para:
  - Selección de individuos sospechosos por datos clínicos o epidemiológicos.
  - Aceptación o rechazo de posibles donadores de sangre.

# DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO:

## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: AGLUTINACIÓN EN PLACA CON ROSA DE BENGALA.

- El antígeno es una suspensión celular teñida con Rosa de Bengala y estandarizada a una concentración celular del 8 -12% para humanos.
- pH: 3.65
- Cepa de *B. abortus* 99S o 1119-3 (en fase lisa inactivada)
- Especificidad: 99%
- Sensibilidad: 90%



# DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO:

## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: AGLUTINACIÓN EN PLACA CON ROSA DE BENGALA.

### PROCEDIMIENTO

30 mL  
Muestra o  
Controles

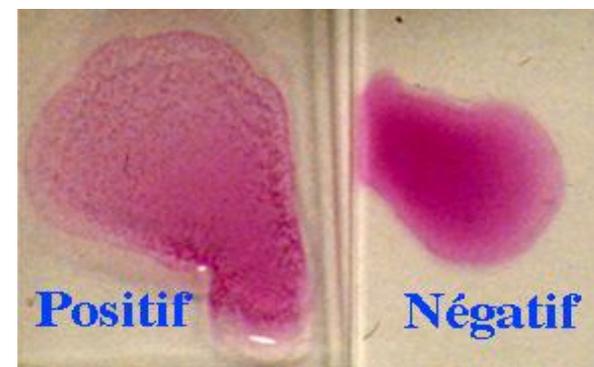


30 mL  
Reactivo  
Rosa de  
Bengala

Homogenizar

Agitar por 4  
minutos

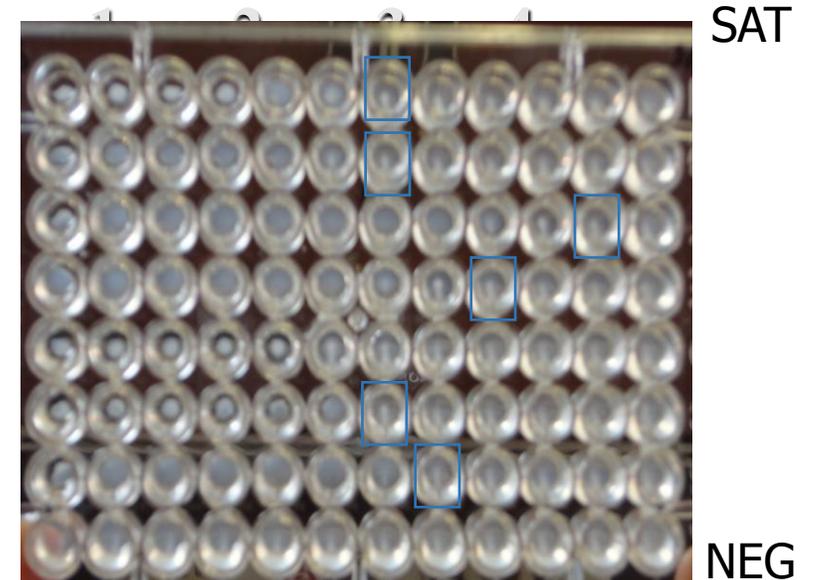
Leer



# DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO:

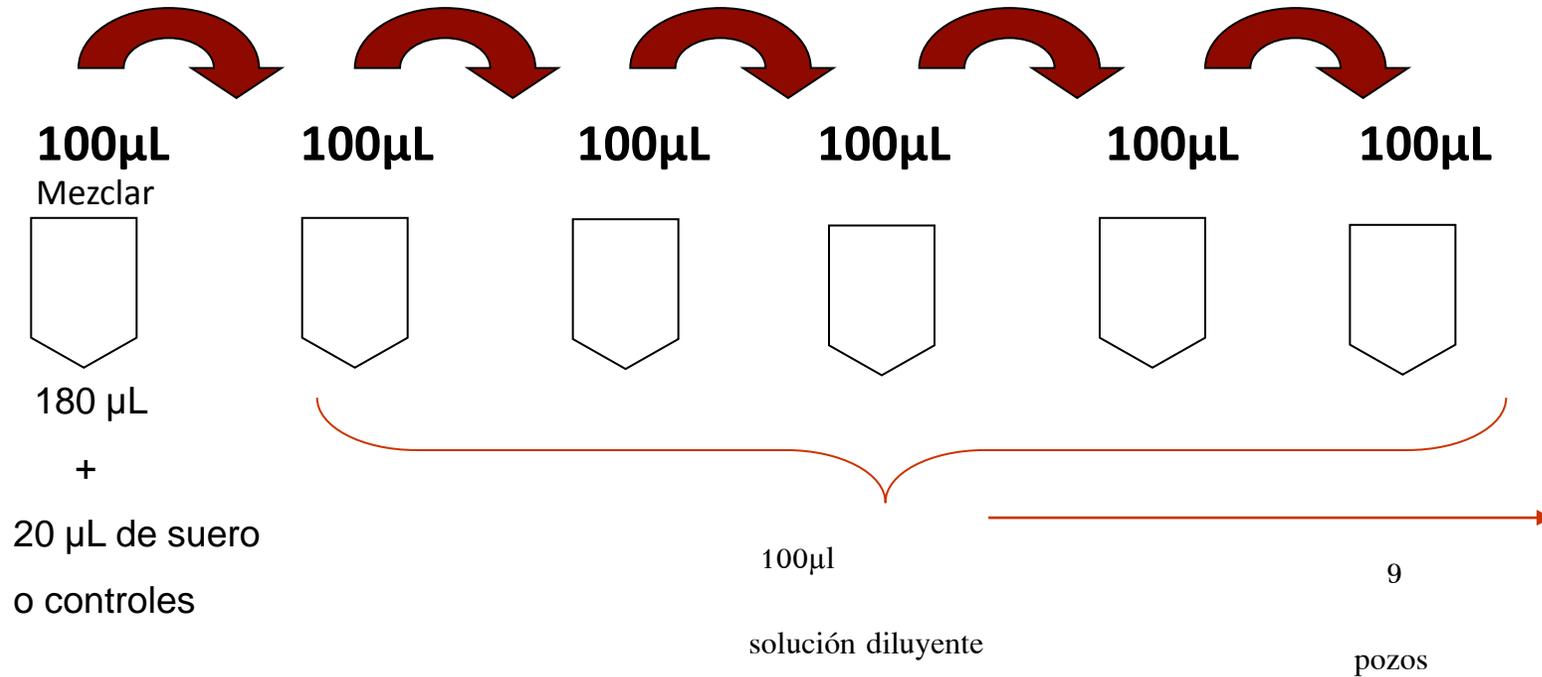
## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: AGLUTINACIÓN EN MICROPLACA SAT Y 2-ME.

- Prueba estándar o SAT.  
Solución salina fenolada al 0.5%
- Prueba 2 –Me (IgG).  
Agente reductor 2 mercaptoetanol (2-Me) al 0.71%
- Antígeno blanco.  
Diluido 1:10 en S.S fisiológica.



# DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO:

## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: AGLUTINACIÓN EN MICROPLACA SAT Y 2-ME.



**Solución diluyente :** Solución Salina Fenolada. 0.5% (SAT)

2- Mercaptoetanol al 0.71% (2-Me)

# DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO:

## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: AGLUTINACIÓN EN MICROPLACA SAT.



Es un método cuantitativo que identifica inmunoglobulinas de las clases **IgM, IgG e IgA.**

# DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO:

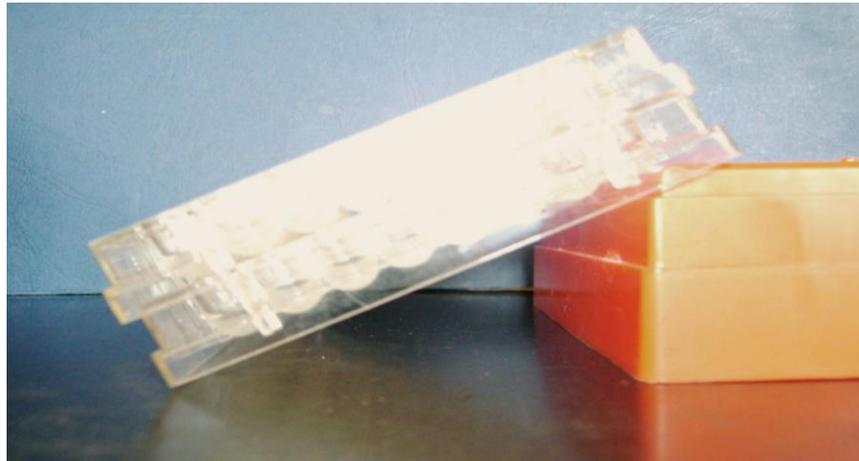
## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: AGLUTINACIÓN EN MICROPLACA 2-ME.

Es un método cuantitativo que identifica inmunoglobulinas de las clases **IgG**.



# DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO:

## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: Lectura Mat y 2-ME.



# DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO:

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Posibilidades	Rosa de bengala	Confirmatorias <sup>1</sup>		Interpretación del resultado	Resultado reportable
		SAT	2-ME		
A	Positivo	Título $\geq$ 1:80	Negativo	Infección en etapa inicial	<b>Positivo</b>
B	Positivo	Título $\geq$ 1:20	Título $\geq$ 1:20	Infección de curso prolongado	<b>Positivo</b>
C	Positivo	Negativo	Título $\geq$ 1:20	Revisar técnica	<b>Repetir el análisis</b>
D	Positivo	Negativo	Negativo	Repetir el estudio, si continúa negativo se descarta brucelosis <sup>2</sup>	Caso probable Negativo <b>(Indeterminado)</b>
E	Negativo	Negativo	Negativo	Sin infección	<b>Negativo</b>
F	Positivo	Título $\leq$ 1:40	Negativo	Infección en etapa inicial o control de tratamiento	Caso probable <sup>3</sup> <b>(Indeterminado)</b>

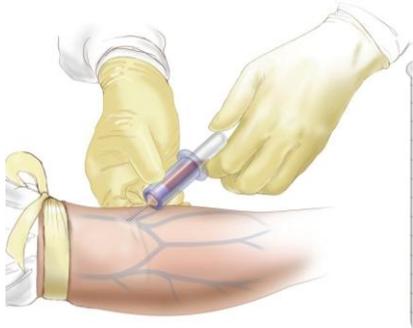
<sup>1</sup>. La aglutinación estándar en tubo (SAT) es equivalente a la microaglutinación en placa (AMP).

<sup>2</sup>. La primera muestra se reporta como caso probable y se solicita nueva muestra en 15 días; de continuar el rosa positivo y confirmatorias negativas el resultado se considera negativo.

<sup>3</sup>. El primer resultado se reporta como caso probable y se pide nueva muestra en 15 días para repetir el estudio, en caso de mantenerse el resultado se reporta como caso probable y el resultado queda a criterio del médico tratante.

# DIAGNÓSTICO BACTERIOLOGICO

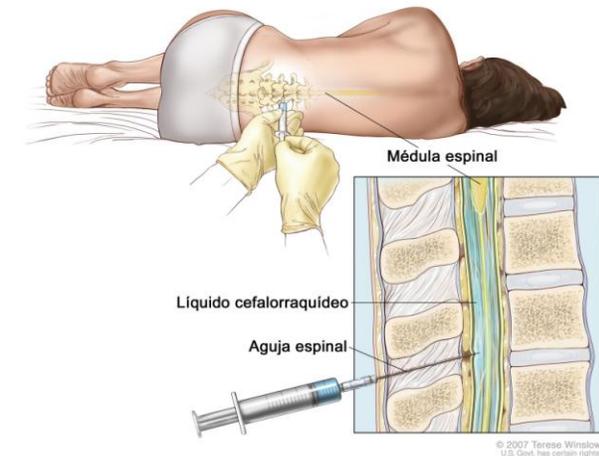
## TIPO DE MUESTRA:



Sangre total



Hemocultivo



Líquido Cefalorraquídeo



Medula Ósea, Ganglios Linfáticos (Biopsias)

## MEDIOS ENRIQUECIDOS

- GS, TSA, AB.



## MEDIO MUY ENRIQUECIDO

- Medio Bifásico de Ruíz Castañeda



## MEDIO SELECTIVO

- Farell



## DIFICULTADES PARA EL AISLAMIENTO

PERIODO DE INCUBACION VARIABLE Y DE  
COMIENZO INSIDOSO

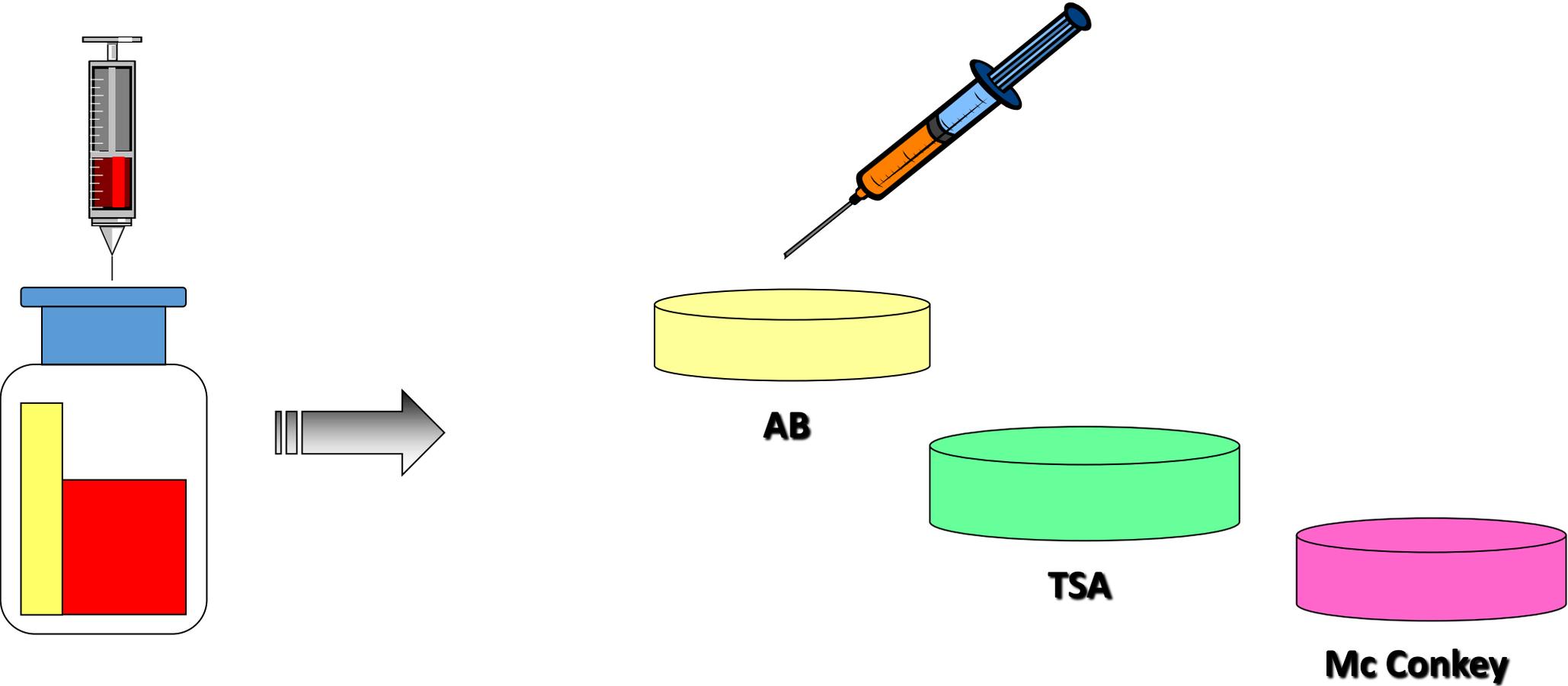
REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES COMPLEJOS

SE ENCUENTRA EN PEQUEÑO NUMERO EN  
CIRCULACION SANGUINEA Y DE MANERA  
INTERMITENTE

EMPLEO DE ANTIBIOTICOS PREVIO AL CULTIVO

CONDICIONES DE ESTRICTA ASEPSIA

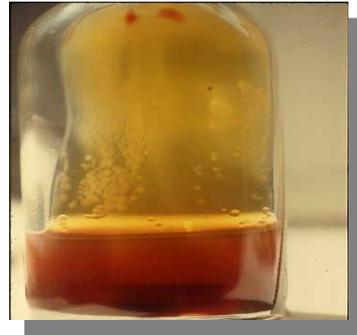
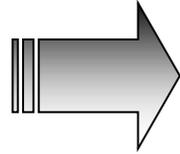
# DIAGNÓSTICO BACTERIOLOGICO



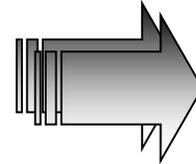
# DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO



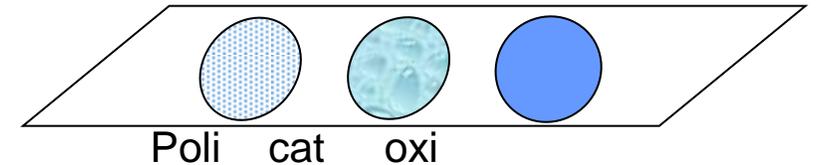
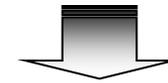
Toma de muestra de sangre



Siembra de sangre en Hemocultivo



Aislamiento y resiembra en TSA (colonias pequeñas y translúcidas)



## Pruebas bioquímicas

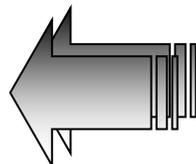
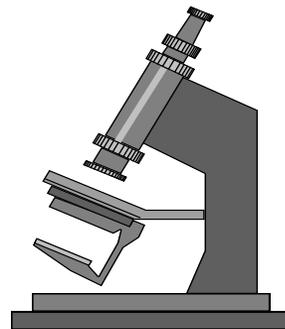
**CIT**: citrato de Simmons, Neg.

**Urea**: producción de ureasa, Pos.

**TSI**: triple azúcar hierro, Neg.

**MIO**: indol y movilidad, Negativas

**H<sub>2</sub>S**: producción de H<sub>2</sub>S en papel filtro con acetato de plomo, Variable



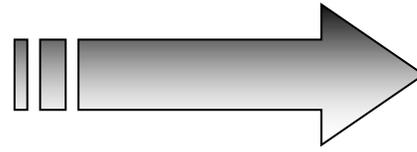
**Tinción GRAM**  
bacilos cortos  
Gram (-)

Estándar de Servicio: 6 Semanas

# CULTIVO DE CEPAS

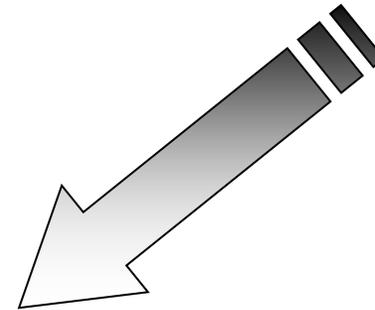


**CEPAS ENVIADAS**



**PRIMO AISLAMIENTO**

**CULTIVO MASIVO**



Estándar de servicio 2 Semanas

## IDENTIFICACIÓN

**MORFOLÓGICA**

\* **SEROLÓGICA**

\* **BIOQUÍMICA**

\* **FAGOTIPIFICACION**

**Colonias pequeñas**

**Brillantes**

**Redondas**

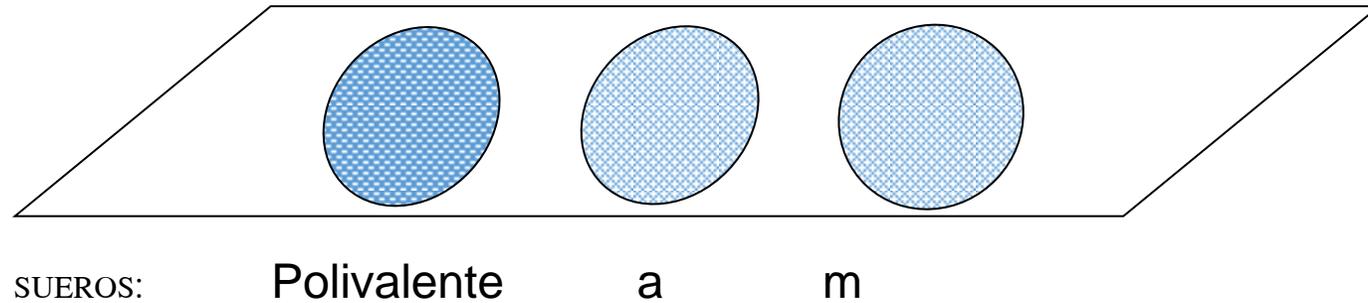
**Translúcidas**

**Ambarinas**

**No hemolíticas (cuando se usa GS)**



# SEROTIPIFICACION



## DETERMINACIÓN DE GÉNERO Y ESPECIE

- 1 Aglutinación de suspensión bacteriana + suero polivalente, antisueros monoespecíficos M y A
2. Uso de Sol. Salina fenolada para descartar autoaglutinación
3. Uso de acriflavina para observar la fase



## PRUEBAS FISIOLÓGICAS

<b>Catalasa</b>	<b>Positiva</b>
<b>* Oxidasa</b>	<b>Positiva</b>
<b>* Reducción nitratos</b>	<b>Positivo</b>
<b>* Urea</b>	<b>Positiva</b>
<b>* Movilidad</b>	<b>Negativa</b>
<b>* H<sub>2</sub>S</b>	<b>Variable</b>
<b>* Crec. en Mc Conkey</b>	<b>Negativo</b>

## CRECIMIENTO EN COLORANTES

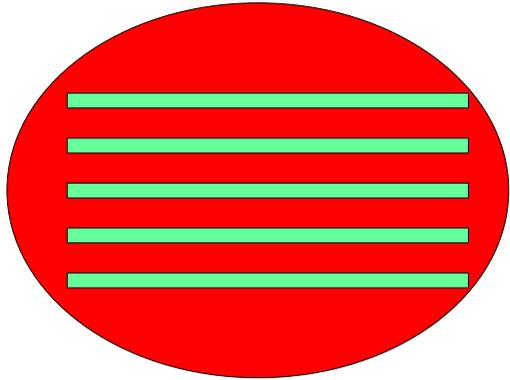
- Las especies de *Brucella* muestran sensibilidad diferencial a varios colorantes de anilina
  - Esta característica ayuda para determinar especie
    -
- \* Se utilizan soluciones al 0.1% de:
- a) *Fucsina* a una dilución de 1:50000
  - b) *Tionina* en diluciones 1:25000 y 1:50000
  - c) *Safranina* a una dilución de 1:10000

# DIAGNÓSTICO BACTERIOLOGICO

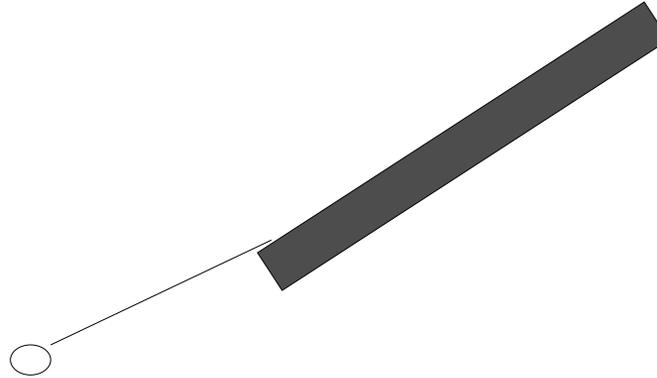
•

# CRECIMIENTO EN COLORANTES

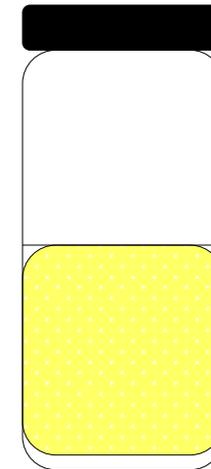
Incubar a 37°C por 5 días



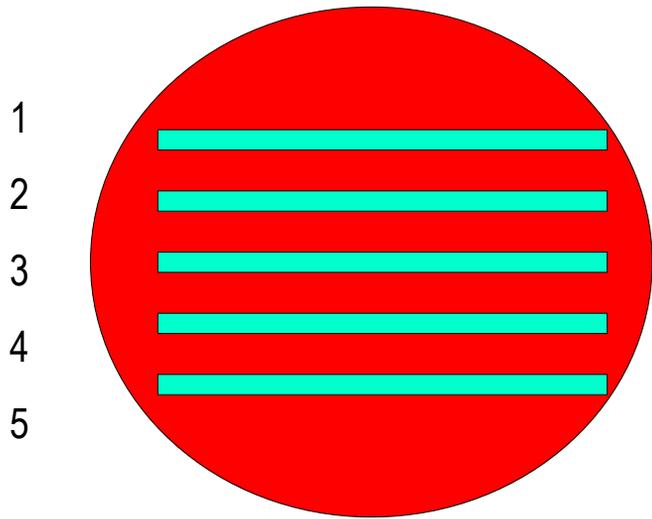
Trazar 5 líneas en el agar, cuidando no cargar el asa durante el lineado



Suspensión de *Brucella* al tubo 4 del Mac Farland



# INTERPRETACIÓN



reporta en términos del N° de línea de crecimiento:

5 líneas con desarrollo = 5+

4 líneas con desarrollo = 4+

3 líneas con desarrollo = 3+

2 líneas con desarrollo = 2+

1 línea con desarrollo = 1+

} Repetir la prueba

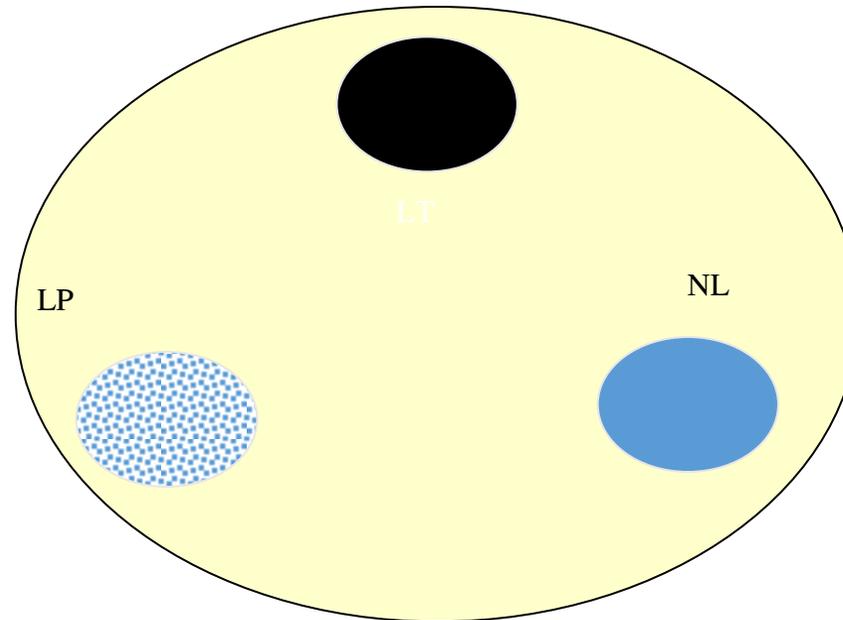
# FAGOTIPIFICACION

\* Resistencia a la lisis de fagos:

LT: Lisis Total

LP: Lisis Parcial

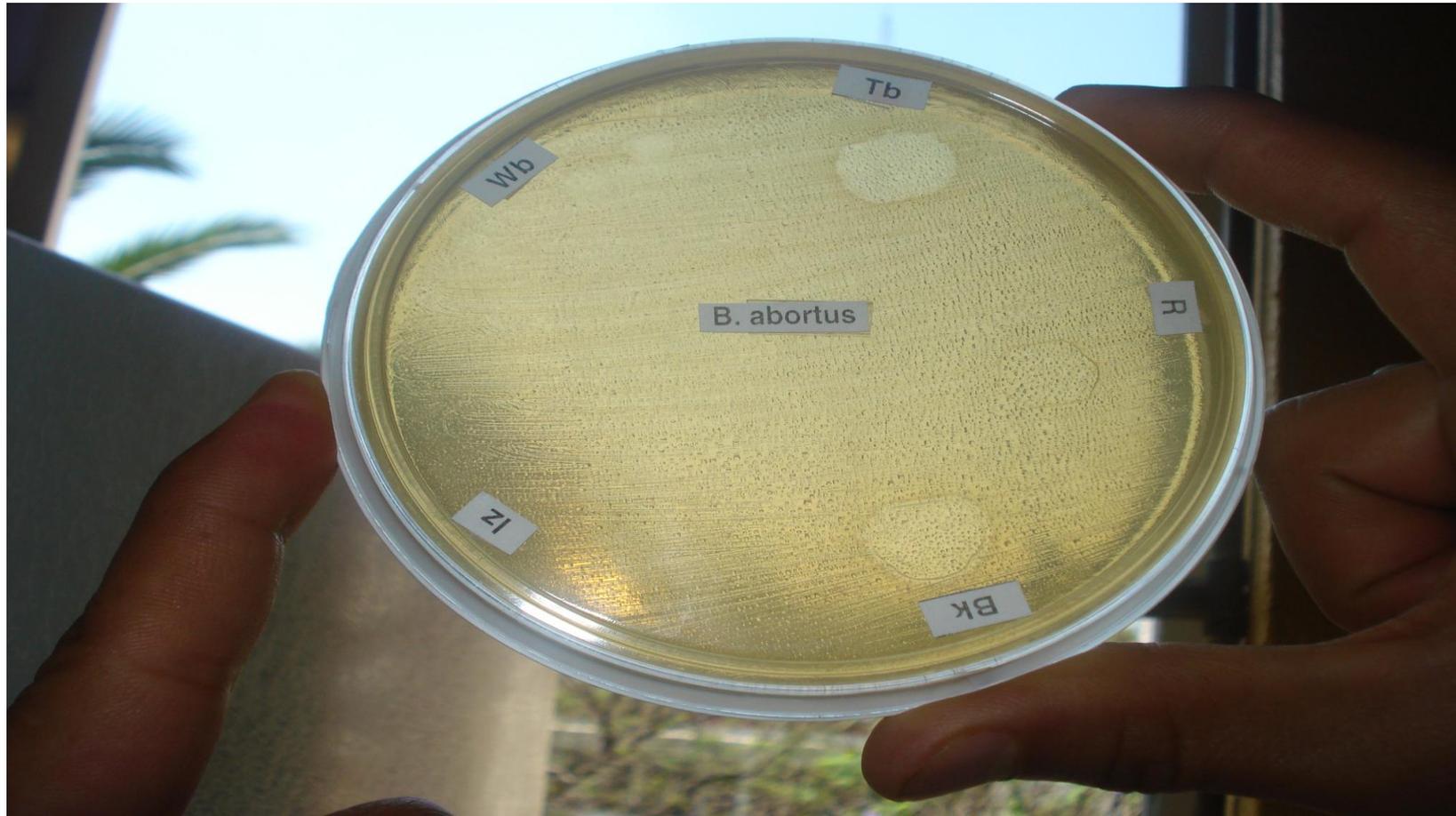
NL: No Lisis

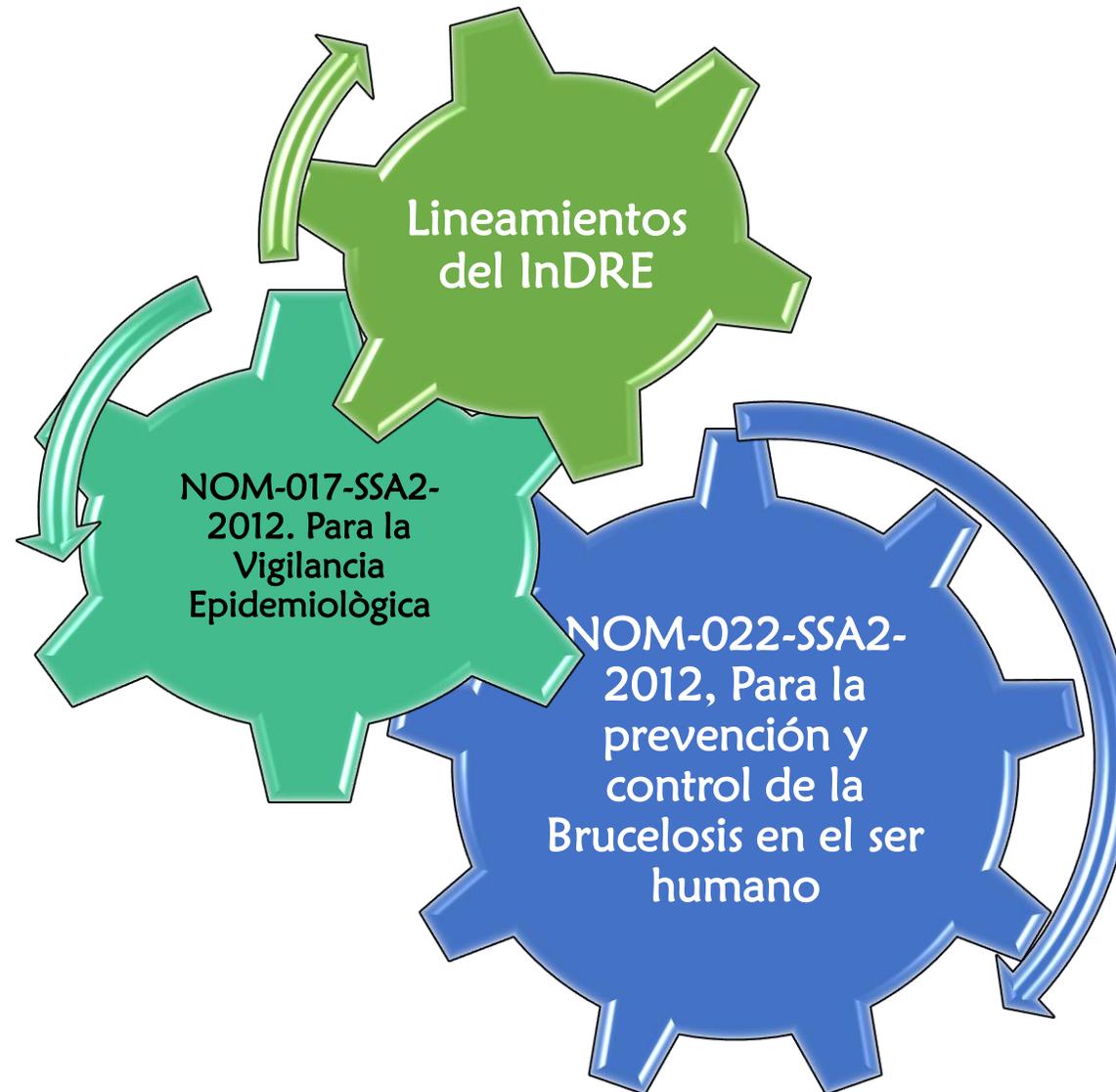


## ***CONSIDERACIONES***

- 1. Identificar bien y no mezclar la gota correspondiente a cada fago**
- 2. La superficie de la placa debe estar seca**

## FAGOTIPIFICACION





*Muchas  
Gracias!*

Contacto:

[zoolabslp@hotmail.com](mailto:zoolabslp@hotmail.com)

Tel. 01 (444) 821 14 82 Ext. 106.

Laboratorio de control de rabia y otras Zoonosis  
Anillo Periférico ote. 150  
Col Abastos  
San Luis Potosí S.L.P.