

## Avances en el diagnóstico microbiológico de la brucelosis humana en Cuba (2012-2021)

Advances in the microbiological diagnosis of human brucellosis in Cuba (2012-2021)

Odisney Lugo Suárez<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4965-2985>

Ana Margarita Obregón Fuentes<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5897-2596>

Eduardo Echevarría Pérez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4395-9337>

Yaindrys Rodríguez Olivera<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9210-8208>

María Eugenia Toledo Romaní<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8600-9062>

Alberto Baly Gil<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7999-1801>

Daleina Hernández Oliva<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6949-2005>

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [odisney@ipk.sld.cu](mailto:odisney@ipk.sld.cu)

### RESUMEN

**Introducción:** El diagnóstico microbiológico de la brucelosis humana en Cuba desapareció durante la década de los años 90 del pasado siglo. Con el objetivo de su rescate y la confirmación de los casos el Laboratorio Nacional de Referencia se propuso evaluar y aplicar novedosas técnicas serológicas y moleculares para fortalecer el algoritmo de trabajo.

**Métodos:** Se realizaron siete investigaciones (2012-2020) en servicios con sistemas serológicos (FAB, HTFA, microtécnica del FAB, Brucellacapt®) y moleculares (PCR bcsp, PCR *Brucella* Real-TM y mPCR Bruceladder) que permiten la detección directa e indirecta de *Brucella* spp.

**Resultados:** Los valores de desempeño de los métodos serológicos evaluados superaron el 90 %. La PCR-BCSP se destacó en la confirmación de casos serológicamente negativos (85 %), mientras que el sistema *Brucella* Real-TM confirmó el (60 %) de los sueros negativos a la PCR-BCSP. Además, se obtuvieron evidencias moleculares de la presencia de *Brucella canis* y *Brucella abortus* (cepas vacunales y de campo) en muestras clínicas de humanos y animales cubanos.

**Conclusión:** Las metodologías diagnósticas descritas conforman el primer algoritmo serológico– molecular para la pesquisa y el diagnóstico de la brucelosis humana en Cuba, herramienta que provee la información necesaria para la adopción de estrategias dirigidas a prevenir esta zoonosis en nuestro país.

**Palabras clave:** brucelosis; diagnóstico serológico; diagnóstico molecular.

## ABSTRACT

**Introduction:** Microbiology diagnosis of human brucellosis disappeared in Cuba in the 1990s. To reinstate it and confirm the cases, the National Reference Laboratory proposed to evaluate and implement new serological and molecular techniques to strengthen the working algorithm.

**Methods:** Seven studies (2012-2020) were performed in services with serological (FAB, HTFA, FAB microtechnique, Brucellacapt®) and molecular (bcsp PCR, *Brucella* Real-TM PCR, and Bruceladder mPCR) systems that allowed direct and indirect detection of *Brucella* spp.

**Results:** The performance of the serological methods evaluated exceeded 90%. PCR-BCSP excelled in the confirmation of serologically negative cases (85%), while the *Brucella* Real-TM system confirmed 60% of PCR-BCSP negative sera. In addition, molecular evidence was obtained for the presence of *Brucella canis* and

*Brucella abortus* (vaccine and field strains) in Cuban human and animal clinical samples.

**Conclusion:** The described diagnostic methodologies constitute the first serological-molecular algorithm for the screening and diagnosis of human brucellosis in Cuba. This is a tool that provides the essential information for the adoption of strategies aimed at preventing this zoonosis in our country.

**Keywords:** brucellosis; serological diagnosis; molecular diagnosis.

Recibido: 16/01/2023

Aceptado: 04/08/2023

## Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la brucelosis una “zoonosis olvidada” con impactos negativos que se aprecian, sobre todo, en países pobres con servicios de salud deficientes. Entre las 12 especies del género *Brucella* las que consideran patógenas para el hombre son: la *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* y *Brucella canis*.<sup>(1)</sup> El ser humano adquiere la enfermedad, fundamentalmente, por el contacto de sus mucosas o piel escoriada con secreciones y tejidos de animales enfermos o por el consumo de carnes semicrudas, leche y sus derivados mal pasteurizados.<sup>(2)</sup>

Debido a que la brucelosis humana puede afectar cualquier órgano o sistema y le provoca daños que en ocasiones son irreversibles, los síntomas de su presentación no son patognomónicos, por lo que la enfermedad se confunde con otras afecciones que pueden o no ser infecciosas. El diagnóstico de *Brucella* spp. se realiza por cultivo (“prueba de oro”) con nivel de contención III, métodos

serológicos (más utilizados, baratos y reproducibles) y ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (rápidos, específicos y sensibles).<sup>(3)</sup>

En Cuba la brucelosis es una enfermedad de declaración obligatoria. A partir de 1980 se reporta una reducción de la focalidad animal, debido al plan para el control y erradicación de esta zoonosis, lo que propicia una baja prevalencia en los humanos.<sup>(4)</sup> Sin embargo, a partir de 1990 (crisis económica conocida como período especial en Cuba) se deprime el diagnóstico microbiológico, aumenta la cría descontrolada de animales con fines de autoconsumo y se inicia la comercialización no estatal de carne y derivados lácteos mal pasteurizados. Lo anterior favorece el aumento de la morbilidad por enfermedades zoonóticas, entre ellas la brucelosis.<sup>(5)</sup>

Durante el período 2000-2011 no existe una red de laboratorios para la confirmación de la enfermedad en los humanos, lo que favorece el subregistro a nivel nacional.<sup>(5)</sup> El presente trabajo tuvo como objetivo general fortalecer el diagnóstico serológico y molecular de la brucelosis humana en Cuba y, para ello, se analizó un grupo de investigaciones realizadas durante el período 2012-2020.

## Métodos

Se realizaron siete investigaciones (2012-2020) en servicios y sistemas con un componente observacional, descriptivo y de corte transversal. Esto permitió que en el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (LNR-IPK) se estableciera un algoritmo serológico y molecular para pesquisar y diagnosticar la brucelosis humana, mediante la evaluación, implementación y diseño de variantes de técnicas de laboratorio.

### Metodologías evaluadas

Con el objetivo de detectar anticuerpos producidos contra las especies lisas de *Brucella spp.* entre los años 2012 y 2017 se evaluaron, los sistemas serológicos comerciales *Febrile Antigen Brucella* (FAB) (*Diagnostic Senese SpA*, Italia),<sup>(6)</sup>

*HumaTex Febrile Antigens* (HTFA) (Human, Italia),<sup>(7)</sup> Brucellacapt (VIRCELL, España)<sup>(8)</sup> y una microtécnica de la prueba semicuantitativa del FAB (diseñada y validada en el LNR-IPK).<sup>(9)</sup> Las técnicas de referencia fueron los ELISAs IgM e IgG contra la *Brucella*.

Para evaluar la sensibilidad se utilizaron muestras positivas a brucelosis por los ELISAs IgM /o IgG *Brucella*, pertenecientes a la seroteca del LNR-IPK y todas estaban conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (40 para el FAB; 50 para el HTFA, la microtécnica del FAB y el Brucellacapt). La especificidad se estableció a partir de sueros negativos a los ELISAs (120 para el FAB; 100 para el HTFA, la microtécnica del FAB y el Brucellacapt), que procedían de donantes de sangre (Banco de Sangre Central de La Habana) y de individuos con enfermedades infecciosas (leptospirosis, dengue, hepatitis A, hepatitis B, Epstein Barr, citomegalovirus, toxoplasmosis), en las que predomina la fiebre. Estos sueros se suministraron por los laboratorios del IPK que trabajan los microorganismos pertinentes. Por último, la aplicación de estas tecnologías se realizó en sueros de pacientes con clínica y epidemiología compatible con infección por *Brucella* spp. (466 para el FAB; 400 para el HTFA, 285 para la microtécnica del FAB y 695 para el Brucellacapt).<sup>(6,7,8,9)</sup>

El diseño de la microtécnica concibió el uso de dos sueros controles negativos y cinco con titulaciones conocidas por FAB. Además, se redujeron a la décima parte los volúmenes de suero y reactivos; se empleó una placa de poliestireno de 96 pocillos con fondo U y se usó una atmósfera húmeda durante la incubación de la reacción.<sup>(9)</sup>

En el año 2012 se estimó el costo económico del FAB,<sup>(6)</sup> mientras que en 2017 se realizó el de la prueba semicuantitativa del FAB en placa (microtécnica) y en tubo.<sup>(9)</sup> Para ello se utilizó la simulación de Monte Carlo y se determinaron los costos directos por microcosteo y los indirectos como el 49 % de los directos.

Las técnicas moleculares evaluadas entre los años 2016 y 2021 fueron la PCR a punto final *bcs*p, que amplifica un fragmento de 223 pb para el gen que codifica la proteína inmunogénica de la membrana externa de 31 kDa *bcs*p (del inglés: *Brucella Cell Surface Salt-Extractable Protein*), conservada en *Brucella* spp.;<sup>(10)</sup> el sistema comercial *Brucella* Real-TM de SACASE que detecta el gen *wbo*A, presente

en *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis* y *B. canis*,<sup>(11)</sup> y la PCR múltiple (mPCR) Bruceladder que permite la diferenciación hasta especies de las cepas de campo de *B. abortus* bv1-6,9, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. melitensis* bv1-3, *B. microti*, *B. canis*, *B. suis* bv1-5, *B. ceti* y *B. pinnipedialis*, así como las cepas vacunales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev1.<sup>(12)</sup>

Las técnicas de referencia utilizadas fueron los ELISAs IgM e IgG *Brucella*, pero en el caso de la PCR múltiple también se utilizó la PCR-*bcsp*. Por otra parte, la extracción de ADN se realizó en todos los casos con el estuche comercial QIAamp Mini Kit (QIAGEN, Alemania).

El límite de detección en la PCR-*bcsp* se determinó con ADN de *B. abortus* ATCC 1119-3, donado por el Instituto Gorgas de Panamá; en la Real-TM de SACASE se trabajó con un tercer control que fue extracto de ADN de *B. abortus* S19, facilitado por los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos; mientras que para la mPCR Bruceladder los Laboratorio de la Defensa Civil facilitaron los ADN de *B. abortus* S19 y *B. abortus* 544 y el Instituto Gorgas de Panamá proporcionó los ADN de *B. abortus* 99 y *B. canis* 507.<sup>(10,11,12)</sup>

Para establecer la especificidad analítica se utilizaron extractos de ADN de bacterias filogenéticamente relacionadas con las brucelas, que se obtuvieron de cultivos proporcionados por los laboratorios de Enfermedades Diarreicas Agudas y de Respiratorio del IPK. Estos cultivos fueron *Escherichia coli* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y aislamientos de *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae* O1 y *Yersinia enterocolitica*.<sup>(13)</sup>

La sensibilidad diagnóstica de la PCR-*bcsp* se determinó con 80 sueros (seroteca de pacientes confirmados a brucelosis por ELISAs positivos) y para la especificidad se emplearon 160 sueros negativos por los ELISAs, todos pertenecían a la seroteca del LNR-IPK. La técnica se aplicó a 80 sueros de pacientes con clínica y antecedentes epidemiológicos sugestivos de la enfermedad, extraídos en los primeros 30 días de iniciado el cuadro clínico.<sup>(10)</sup>

Por otra parte, para la *Brucella* Real-TM de SACASE se estudiaron 10 muestras de sueros de pacientes sospechosos negativos por los ELISAs y por la PCR-*bcsp*.<sup>(11)</sup> Además, en la PCR múltiple (mPCR) Bruceladder se emplearon 119 muestras clínicas positivas al PCR-*bcsp*. De estas, pertenecían a humanos 45 sueros, nueve sangres totales y un fragmento de hígado; mientras que en animales se colectaron 23 sueros (bovinos, equinos, porcinos), dos líquidos amnióticos (bovinos), 37 fragmentos de tejidos (bovinos) y la secreción vaginal de un canino.<sup>(12)</sup>

### Procesamiento y análisis estadístico de la información

Las informaciones generadas de estas investigaciones se introdujeron en bases de datos diseñadas al efecto y se empleó el programa Excel (Microsoft Office) y para su análisis se utilizó el paquete estadístico EPIDAT 3.1. y el ADD-IN de EXCEL@Risk, según el caso correspondiente.

### Aspectos éticos

En todo momento se cumplió con los principios para la evaluación de las pruebas diagnósticas establecidas por la Regulación No.47-2007 del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) 2018 y las guías del Programa de Habilidades en Lectura Crítica en español (CASPe, por sus siglas en inglés). Se cumplió con las medidas de bioseguridad dictadas por las Resoluciones 8-2000, 103-2002 y 38-2006 del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), en cuanto a la manipulación de extractos de ADN y a muestras clínicas de individuos o animales con sospecha de estar infectados por *Brucella* spp. Se contó con la autorización para trabajar con los extractos de ADN, sueros y muestras de vísceras que se proporcionaron por los laboratorios y entidades correspondientes. No se relevó la identidad de los pacientes y la información se conservó con carácter confidencial y se utilizó solo con fines científicos.

## Resultados

La tabla 1 muestra los valores del desempeño de las técnicas serológicas para la detección de anticuerpos contra las especies lisas de *Brucella* spp. Nótese que el FAB mostró mejores resultados que la HTFA, al tiempo que la microtécnica del FAB logró indicadores similares a los de su técnica homóloga.<sup>(6,7,9)</sup>

**Tabla 1** - Desempeño diagnóstico de las técnicas de pesquisa para la detección de anticuerpos producidos contra las especies lisas de *Brucella* spp. en Cuba

	FAB		HTFA		Microtécnica FAB	
	% (n/N)	IC (95 %)	% (n/N)	IC (95 %)	% (n/N)	IC (95 %)
<b>Sensibilidad diagnóstica</b>	100 (40/40)	98,8 – 100	98 (49/50)	93,1 – 100	98 (49/50)	93,1– 100
<b>Especificidad diagnóstica</b>	97,5 (117/120)	93,5 – 100	92 (92/100)	86,2–97,8	100 (100/100)	99,5 – 100

Leyenda: FAB: *Febrile Antigen Brucella*; HTFA: *HumaTex Febrile Antigens*, IC: Índice de Anticuerpos; N: Total de muestras; n: Muestras.

Fuente: Elaboración propia.

Tras la aplicación de la prueba cualitativa en tarjeta, se consideraron reactivos los sueros en los que se observó aglutinación. Estos fueron útiles para realizar la semicuantificación en tubos o placas, según la técnica. En el caso del FAB fue reactivo el 15,5 % (72/466) de las muestras con el HTFA el 20 % (80/400) y con la microtécnica el 98,9 % (282/285).<sup>(6,7,9)</sup>

Los sueros con títulos superiores o iguales a 160, luego de emplear la prueba semicuantitativa, se tomaron como positivos. De este modo, la positividad para cada una de las técnicas de pesquisa fue la siguiente: 34,7 % (25/72) por FAB,



13,7 % (11/80) por HTFA y 40 % (112/282) por la microtécnica. Sin embargo, en la tabla 2 se puede apreciar que, al aplicar los ELISAs (técnicas serológicas confirmatorias) a todos los sueros reactivos en tarjeta, el porcentaje de positividad aumentó en todas las técnicas de pesquisa, siendo más notable en el caso de la HTFA. De igual modo, se constató que los anticuerpos IgG prevalecían en los sueros analizados por el FAB, mientras que los anticuerpos IgM se destacaron en los estudiados por HTFA y la microtécnica.<sup>(6,7,9)</sup>

**Tabla 2** - Positividad por ELISAs IgM e IgG *Brucella* en sueros de pacientes sospechosos de brucelosis analizados por FAB, HTFA y microtécnica del FAB

Total de sueros reactivos por las técnicas de pesquisa (sueros)	Porcentaje (positivos por ELISA/ reactivos por técnicas de pesquisa)	Porcentajes (positivos a IgM, IgG o IgM +IgG/ total de positivos por ELISAs)	
		Técnica	Porcentaje (positivos/n)
FAB (n = 72)	52,8 (38/72)	ELISA IgM	15,8 (6/38)
		ELISA IgG	73,7 (28/38)
		ELISA IgM + IgG	10,5 (4/38)
HTFA (n = 80)	86,3 (69/80)	ELISA IgM	49,3 (34/69)
		ELISA IgG	43,5 (30/69)
		ELISA IgM + IgG	7,2 (5/69)
Microtécnica FAB (n = 282)	44 (124/282)	ELISA IgM	65 (80/124)
		ELISA IgG	11 (14/124)
		ELISA IgM + IgG	24 (30/124)

Leyenda: FAB: *Febrile Antigen Brucella*; HTFA: *HumaTex Febrile Antigens*; ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, IgM: Inmunoglobulina M; IgG: Inmunoglobulina G; n: Muestras.

Fuente: Elaboración propia.

Con el análisis de los costos se estimó que el total del FAB fue de 21,46 CUP (tomándose en consideración la tasa de cambio de 1 CUP = 1 CUC, vigente en el momento de la investigación); el traslado y la recepción de las muestras en el IPK fue la actividad que más encareció el proceder (7,66 CUP).<sup>(6)</sup> Por otro lado, el costo de la microtécnica resultó menor en 37,23 CUP (24 CUP = 1 CUC) que el de la prueba semicuantitativa del FAB, debido a que el precio del antígeno utilizado disminuyó de 28,21 CUP a 3,22 CUP.<sup>(9)</sup>

En cuanto al sistema serológico comercial Brucellacapt, se obtuvo un 100 % (50/50) de sensibilidad y un 83 % (83/100) de especificidad diagnóstica. Los resultados de su aplicación demostraron que en el 71,1 % (494/695) de los sueros analizados existían anticuerpos totales antibrucelas. El título de positividad para esta técnica ( $\geq 320$ ) solo se alcanzó en el 16,4 % (114/695) de las muestras. No obstante, al aplicárseles los ELISAs se logró confirmar la enfermedad en el 35,1 % (244/695) de los pacientes con clínica y epidemiología compatibles con la enfermedad.<sup>(8)</sup>

La PCR-*bcs*p mostró una sensibilidad analítica de 6,403 fg/ $\mu$ L, pero, al repetir este ensayo teniendo como matriz el ADN humano, el límite de detección disminuyó a 640,3 fg/ $\mu$ L. Además, se constató un 100 % de especificidad analítica y a la sensibilidad y especificidad diagnósticas correspondieron valores del 96,3 % (77/80) y 100 % (160/160), respectivamente. Su aplicación en sueros de pacientes sospechosos y negativos a los ELISAs confirmó la infección en el 85 % (68/80) de estos.<sup>(10)</sup>

El estuche comercial *Brucella* Real-TM de SACACE mostró las curvas de amplificación esperadas en el 60 % (6/10) de las muestras. No se realizó el ensayo de sensibilidad analítica porque el número de determinaciones (25) era limitado.<sup>(11)</sup>

La PCR múltiple (mPCR) Bruceladder tuvo un límite de detección de 7,32 pg/ $\mu$ l, así como valores de especificidad y repetibilidad del 100 %. Se identificó el patrón genómico completo de *B. canis* y de la cepa vacunal *B. abortus* RB51 en dos sueros de humanos. En los animales se encontró la cepa vacunal *B. abortus* S19 en dos pulmones (25 %), tres hígados (43 %), dos bazo (40 %), cuatro riñones (67 %) y un

tejido mamario (50 %). El patrón de *B. abortus*, cepa de campo, se observó en dos corazones (40 %), un hígado (14 %) y una médula ósea (50 %).<sup>(12)</sup>

La aplicación del algoritmo serológico molecular para el diagnóstico de brucelosis humana entre los años 2012 y 2020 permitió pesquisar 4687 individuos con riesgo ocupacional y se constató una positividad del 33 %. Además, se estudiaron las muestras de 6791 pacientes con sospecha clínica y epidemiológica de la enfermedad y resultó positivo el 14,1 % (959) de ellos (registros del LNR-IPK).

## Discusión

Las pruebas serológicas para la brucelosis tienen una gran trascendencia en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. La mayoría de ellas detectan anticuerpos frente al lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa. Su principal limitación es su incapacidad para diferenciar con suficiente sensibilidad y especificidad entre infección activa y curada, ya que los anticuerpos persisten generalmente durante un período prolongado tras la recuperación clínica, por lo que se requiere combinar sistemas serológicos de pesquisa y de confirmación.<sup>(14)</sup>

En Cuba el FAB es la primera prueba de pesquisa para humanos que se introduce luego de 20 años sin diagnóstico microbiológico de la enfermedad. Los resultados obtenidos, en cuanto a sus valores de desempeño, determinan que desde 2012 se introduzca en todos los Centro provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) del país con el objetivo de pesquisar activamente a los grupos de riesgo asociados a áreas con focalidad animal. En ese momento predominan las muestras positivas al ELISA IgG, lo que indica que la mayoría de los individuos se estaban detectando durante el tránsito hacia la cronicidad y respalda la hipótesis de que desde la década de los 90 esta patología comienza a ser subdiagnosticada y subnotificada en nuestro medio.<sup>(6)</sup>

El Brucellapt es un ensayo de inmunocaptura-aglutinación que detecta anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes. Esta cualidad determina que sea muy

útil en la detección de la infección durante la fase crónica y las recaídas.<sup>(8)</sup> Su aplicación, unida con la de los ELISAs IgM e IgG *Brucella*, constituye la combinación más sensible y específica en el diagnóstico serológico de la enfermedad.<sup>(14)</sup> Los resultados del estudio realizado en nuestro medio respaldan su incorporación al algoritmo diagnóstico de la brucelosis en Cuba.

Por su parte, la microtécnica del FAB permite el estudio de un mayor número de muestras (380/estuche) y ahorra el tiempo de ejecución del procedimiento, por lo que es menos afanoso para el laboratorista. El predominio de la detección de los anticuerpos IgM a través de este método indica que con el de cursar del tiempo los médicos de asistencia comenzaron a pensar oportunamente en la enfermedad y la infección por *Brucella* spp. se detecta, fundamentalmente, durante la fase aguda.<sup>(9)</sup>

La PCR es una herramienta útil para el diagnóstico certero y oportuno de la brucelosis en cualquiera de sus fases clínicas porque detecta precozmente las recidivas y permite el seguimiento de los pacientes tras concluir el tratamiento antimicrobiano.<sup>(15)</sup>

La PCR-*bcsp* muestra excelentes resultados analíticos y diagnósticos, además de una elevada positividad en sueros de pacientes sospechosos negativos por las pruebas serológicas del LNR-IPK. Se considera que este rendimiento se debe, entre otras razones, a que la toma de la muestra se realiza durante la bacteriemia inicial de la enfermedad (ruptura, entre la 1ra y 7ma semana posinfección de células fagocíticas que albergan a las brucelas) y al rescate del diagnóstico en individuos infectados por *B. canis* en Cuba, ya que las metodologías serológicas con las que cuentan los laboratorios no permiten detectar los anticuerpos que se producen contra las especies rugosas.<sup>(16)</sup>

Por otra parte, el porcentaje de detección del gen *wboA* mediante la *Brucella Real-TM* (Sacase) en sueros negativos a los ELISAs IgM e IgG *Brucella* y la PCR convencional *bcsp* fortalece el diagnóstico microbiológico de la enfermedad y la confirmación microbiológica de esta zoonosis en Cuba.<sup>(11)</sup>

La no disponibilidad de un Laboratorio de Contención de Nivel 3 de Seguridad Biológica para diagnóstico rutinario de brucelosis ha propiciado que por más de

treinta años no se conozcan las especies de brucelas que circulan en Cuba, razón por la que se implementa la mPCR Bruceladder. El reconocimiento, con patrón genómico completo, de *B. canis*, *B. abortus* y dos cepas vacunales de esta última, demuestra, molecularmente, la circulación de estas especies en nuestro medio. Además, se constata que *B. abortus* es la especie predominante, ya que los reportes que existen hasta la década de los años 80 también destacan su mayor prevalencia, pero junto a *B. suis*.<sup>(4,12)</sup>

En este medio, la detección de la cepa vacunal *B. abortus* RB51 en humanos constituye una alerta porque se trata de una mutante rugosa derivada de la cepa virulenta *B. abortus* 2308, en cuya superficie bacteriana falta la cadena O de polisacáridos (residuos de perosamina); por tanto, no induce respuesta de anticuerpos detectable por los sistemas serológicos de rutina y es resistente a la estreptomycin y la rifampicina, que son los antimicrobianos más efectivos en el tratamiento de la brucelosis.<sup>(17)</sup> Ante este hallazgo se decide aplicar la mPCR Bruceladder a todas las muestras de pacientes con recaídas que hayan sido confirmados en el LNR-IPK y tratados con los antimicrobianos mencionados para informar con prontitud al médico de asistencia sobre la existencia de resistencia antimicrobiana.

## Conclusiones

A partir de la selección de las técnicas serológicas y moleculares con valores de desempeño adecuados y como respuesta a la desaparición, casi total, del diagnóstico microbiológico de la brucelosis humana en Cuba se conformó paulatinamente en el LNR-IPK el primer algoritmo serológico-molecular destinado a la pesquisa y al diagnóstico de casos clínicos, lo que fortalece la vigilancia de laboratorio en el contexto cubano.

La detección directa e indirecta de *Brucella* spp., así como la confirmación oportuna y certera de la mayoría de los casos sospechosos, contribuye a la reducción del subregistro de pacientes a nivel nacional y provee al Programa Nacional de Zoonosis de la información de laboratorio requerida para orientar las políticas de salud pública en cuanto al control de esta enfermedad.

## Agradecimientos

Los autores del artículo agradecen a cada uno de los investigadores y especialistas que contribuyeron con su trabajo a la realización de este artículo.

## Referencias bibliográficas

1. Elbehiry A, Aldubaib M, Marzouk E, Abalkhail A, Almuzaini AM, Rawway M, *et al.* The Development of Diagnostic and Vaccine Strategies for Early Deteccion and Control of Human Brucellosis, Particularly in Endemic Areas. *Vaccines* 2023;11:654. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11030654>
2. Enkelmann J, Stark K, Faber M. Epidemiological trends of notified human brucellosis in Germany, 2006-2018. *Int J Infect Dis.* 2020;93:353-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.019>.
3. Yagupsky P, Morata P, Colmenero JD. Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clin Microbiol Rev.* 2019 [acceso 18/12/2022];33(1):e00073-19. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31722888/>
4. Ortiz R, Arieta M, Mesejo J. Principales experiencias epizootiológicas y económicas de sanidad animal en Cuba. La Habana: Ed. Ciencia Veterinaria, 1985. p. 7-10.
5. de la Puente LV, Cutiño JAM, López GT. Marcadores moleculares para la taxonomía e identificación del género *Brucella* (Alphaproteobacteria). *Rev Cubana Invest Bioméd.* 2020 [acceso 18/12/2022];39(1):1-11. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002020000100011](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002020000100011)
6. Obregón AM, Muñoz K, Echevarría E, Rodríguez Y, Rodríguez J, Valdés Y, *et al.* Evaluación del sistema serológico *Febrille Antigen Brucella* para la pesquisa de anticuerpos contra brucelas, en Cuba. *Rev. Cubana Med Trop.* 2015 [acceso

20/11/2022];67(3):92-3.

Disponible

en:

<https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/92/93>

7. Cervantes G. Evaluación del desempeño de un sistema comercial para la pesquisa de anticuerpos contra *Brucella*. [Tesis de diploma]. La Habana (Cuba): Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí; 2017. 73p.

8. Echevarría E, Obregón AM, Rodríguez Y, Lugo O. Evaluación del sistema Brucellacapt® para el diagnóstico serológico de la brucelosis humana en Cuba. Rev Cub Med Trop. 2019 [acceso 15/11/2022]. 71(1):e325 Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S037507602019000100005&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037507602019000100005&lng=es).

9. Lugo O, Obregón AM, Echevarría E, Baly A. Microtécnica del FAB para la pesquisa de anticuerpos contra *Bucella* spp. Cuba Salud 2018 [acceso 15/11/2022]. Disponible en: <http://www.convencionsalud2018.sld.cu/index.php/convencionsalud/2018/paper/view/1488/564>.

10. Lugo O. Abordaje clínico epidemiológico de casos con brucelosis en Cuba. Implementación del diagnóstico temprano de laboratorio [Tesis de especialidad]. La Habana (Cuba): Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí; 2016. 130p.

11. Hernández D. Prueba molecular cuantitativa de PCR para el diagnóstico de la brucelosis humana en Cuba. [tesis de Diploma]. La Habana (Cuba): Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí; 2021. 83p.

12. Echevarría E. Diferenciación molecular de *Brucella* spp. en muestras clínicas de humanos y animales cubanos. [Tesis de Maestría]. La Habana (Cuba): Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí; 2020. 82p.

13. Mukherjee F, Jain J, Patel V, Nair M. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. J Med Microbiol. 2007 [acceso 10/12/2022];56:1309-16. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17893166/>

14. Xu N, Qu C, Sai L, Wen S, Yang L, Wang S, *et al.* Evaluating the efficacy of serological testing of clinical specimens collected from patients with suspected brucellosis. PLoS Negl Trop Dis. 2023 [acceso 01/12/2022];17(2):e0011131. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9942959/>
15. Che L, Qi C, Bao WG, Ji XF, Liu J, Du N, *et al.* Monitoring the course of *Brucella* infection with qPCR-based detection. International Journal of Infectious Disease. 2019;89:6-71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.09.013>
16. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Brucella y Francisella*. En: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 9na ed. España: Elsevier; 2021. p. 383-90.
17. Negrón ME, Kharod GA, Bower WA, Walke H. Human *Brucella abortus* RB51 Infections Caused by Consumption of Unpasteurized Domestic Dairy Products United States, 2017-2019. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2019;68(7):185. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30789879/>

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

### Contribuciones de los autores

*Conceptualización:* Odisney Lugo Suárez, Ana Margarita Obregón Fuentes, Eduardo Echevarría Pérez.

*Curación de datos:* María Eugenia Toledo Romaní, Alberto Baly Gil.

*Análisis formal:* Odisney Lugo Suárez, Ana Margarita Obregón Fuentes, Eduardo Echevarría Pérez, Yaindrys Rodríguez Olivera, Alberto Baly Gil, Daleina Hernández Oliva.

*Supervisión:* Odisney Lugo Suárez, Ana Margarita Obregón Fuentes, Eduardo Echevarría Pérez.



*Visualización:* Odisney Lugo Suárez, Ana Margarita Obregón Fuentes, Eduardo Echevarría Pérez.

*Investigación:* Odisney Lugo Suárez, Ana Margarita Obregón Fuentes, Eduardo Echevarría Pérez, Yaindrys Rodríguez Olivera, Daleina Hernández Oliva.

*Metodología:* Odisney Lugo Suárez, Ana Margarita Obregón Fuentes, María Eugenia Toledo Romani, Alberto Baly Gil.

*Redacción – borrador original:* Odisney Lugo Suárez, Ana Margarita Obregón Fuentes.

*Redacción – revisión y edición:* Odisney Lugo Suárez, Ana Margarita Obregón Fuentes, Eduardo Echevarría Pérez, Yaindrys Rodríguez Olivera, Daleina Hernández Oliva.