

**Ministerio de Salud Pública**  
**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”**  
**Departamento de Bacteriología-Micología**



**Investigaciones clínicas-epidemiológicas y serológicas-moleculares de la  
brucelosis humana (2012 – junio 2023)**

**Autora:** Dra. Zaily Castillo Carmenate

**Tutora:** Lic. Ana Margarita Obregón Fuentes, Dr C.

**Asesora:** Dra. Odisney Lugo Suárez, MCs.

Dr. Eduardo Echevarría Pérez MCs.

**Tesis para optar por el título de Especialista de Primer Grado en Microbiología**

**La Habana, 2023**

## **Dedicatoria:**

A mi familia:

A mis padres por ser los pilares fundamentales en mi formación desde edades tempranas, porque a pesar de la distancia siempre han estado presente de una manera u otra dándome su apoyo incondicional, por haberme forjado como la persona que soy. Todos mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Gracias por ser los mejores padres del mundo.

A mi hermano que al igual que mis padres ha estado presente siempre que lo he necesitado.

A mis abuelos Nélica y Juan quienes en vida me cuidaron y protegieron y sé que ahora lo continúan haciendo desde el cielo, con ustedes conocí el amor de abuelos, único y diferente a cualquier otro, ese, que te llena de calor desde el corazón. Me harán falta por siempre, los amo y los extraño mucho.

A mis hijos Adilen y Ariel que me brindaron su apoyo, me comprendieron, tuvieron tolerancia e infinita paciencia y cedieron su tiempo para que "Mamá estudie" para permitir así llevar adelante un proyecto que pasó de ser una meta personal a otro emprendimiento más de familia. A ellos, mi infinito amor y gratitud.

A mi esposo por ser el mejor del mundo, el mejor padre, amigo...a ti te debo por el apoyo, el amor, y todo lo que has luchado a mi lado para que hoy yo pueda estar aquí.

A mis profesores gracias por enseñarme todo lo que se y más que eso, guiarme para ser una mejor persona y profesional. Mis especiales agradecimientos a los profesores Ana M Obregón, Odisney Lugo y Eduardo Echevarría, por abrirme las puertas de su laboratorio y depositar desde un inicio su confianza en mí.

## **Agradecimientos:**

Esta tesis, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte del autor, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación de todas y cada una de las personas que a continuación menciono, las cuales han sido un pilar importante en la realización de la misma.

Agradecer hoy y siempre a mi familia, gracias por su amor, apoyo y comprensión incondicional, y especialmente a mis padres por inculcarme los valores que le dan sentido a la vida, por enseñarme a luchar con fuerzas para alcanzar mis metas, por confiar en mí hasta el final.

Gracias a mi esposo, que durante estos años de carrera ha sabido apoyarme en mi superación profesional, desde el momento en que me hice médico hasta la actualidad.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora de tesis profesora Lic. Ana Margarita Obregón Fuentes por darme la oportunidad de ser partícipe en uno de sus proyectos y de poder contar con su capacidad y conocimiento científico, por acogerme en su laboratorio como un miembro más del mismo.

Agradecida por el gran apoyo y paciencia para guiarme durante el desarrollo de la tesis.

Agradecer también a mis asesores Dra. Odisney Lugo y Dr. Eduardo Echevarría por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis, destacar su disponibilidad y paciencia, su participación ha enriquecido el trabajo realizado.

Gracias a Melissa por su apoyo y por siempre estar dispuesta a transmitir sus conocimientos.

Le agradezco también al departamento de Bacteriología Micología por el apoyo brindado.

## Resumen

La vigilancia de la brucelosis humana constituye un pilar primordial para el Programa de Control de Zoonosis cubano. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal (2012 - junio 2023) con tres grupos de pacientes, Grupo I: 4976 sospechosos de brucelosis, Grupo II: 199 casos confirmados y Grupo III: 22 niños sugestivos de la enfermedad. Para la confirmación se utilizaron los ELISA-IgM, ELISA-IgG, la PCR-*bcsp* y el *Brucella* Real-TM (Sacace). Resultaron positivas por serología o PCR *bcsp*, 847 muestras clínicas (17 %). El suero resultó ser el de mayor positividad por PCR *bcsp* [16 % (774/4959)]. En el Grupo II de pacientes predominó la fiebre [94 % (178/199)], el sexo masculino [61 % (122/199)], el color de la piel blanca (35 %), el grupo de edades entre los 19 y 59 años (50 %), y el ser trabajador agropecuario (17,5 %). Dentro de 16 casos pediátricos confirmados (73 %) prevaleció el sexo femenino [69% (11/16)], la piel blanca [56 % (9/16)], las edades entre 11 y 15 años [37% (6/16)] y los estudiantes [94% (15/16)]. También predominó la fiebre en 15 casos (94 %) y las artralgias en dos enfermos (12,5%). La provincia de Pinar del Río aportó el mayor número de muestras a la vigilancia de laboratorio [140 muestras (3 %)] y el mayor porcentaje de positivos, del Grupo II [26 % (51/199)] y III [44 % (7/16)]. Se demuestra la circulación directa e indirecta de *Brucella* spp., con alto potencial zoonótico y poder de transmisibilidad en el país.

**Palabras claves:** brucelosis; diagnóstico; vigilancia

## Contenido

---

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 Justificación del estudio:.....	3
1.3 Preguntas científicas:.....	4
1.4 Objetivos:.....	4
II. MARCO TEORICO .....	5
2.1 Definición y sinonimia .....	5
2.2 Epidemiología.....	5
2.3 Patogenia y respuesta inmune.....	7
2.4 Manifestaciones clínicas y enfermedad localizada .....	8
2.5 Tratamiento .....	10
2.6 Diagnóstico diferencial .....	11
2.7 Agente etiológico.....	11
2.7.1 Taxonomía.....	11
2.7.2 Cacterísticas del género <i>Brucella</i> .....	12
2.7.3 Cacterísticas genéticas de <i>Brucella spp.</i> .....	13
2.8 Diagnóstico microbiológico.....	14
2.8.1 Diagnóstico indirecto .....	14
2.8.2 Diagnóstico directo.....	16
2.8.3 Diagnóstico molecular .....	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
3.1 Diseño y periodo de estudio.....	23
3.2 Marco de la investigación.....	23
3.3 Universo de estudio .....	23
3.4 Muestras: .....	23
3.5 DNA de referencia: .....	24
3.6 Procedimientos .....	25
3.6.1 Métodos empleados en esta investigación.....	25
3.6.1.1 Técnica ELISA-IgM anti-brucela.....	25
3.6.1.2 Técnica ELISA-IgG anti-brucela.....	26
3.6.1.3 PCR a punto final BCSP .....	27

3.6.1.4 PCR-RT cualitativa que amplifica el gen WboA presente en <i>Brucella abortus</i> , <i>Brucella melitensis</i> , <i>Brucella canis</i> , <i>Brucella ovis</i> y <i>Brucella suis</i> .....	28
3.7 Análisis estadístico.....	31
3.8 Consideraciones éticas.....	31
3.9 Limitaciones del estudio.....	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1 Discusión general.....	61
V. CONCLUSIONES.....	64
VI. RECOMENDACIONES.....	65
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
VIII. ANEXOS.....	1

## I. INTRODUCCIÓN

---

La brucelosis, también conocida como fiebre de malta o fiebre ondulante, es una de las zoonosis más importantes a nivel mundial. Por sus características invalidantes tiene graves consecuencias en la salud pública y es causa de importantes pérdidas económicas en el sector ganadero.<sup>(1)</sup> Esta enfermedad es causada por bacterias intracelulares, inmóviles y de crecimiento lento que pertenecen al género *Brucella*, el cual agrupa 12 especies, siendo *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella canis* las que se consideran patógenas para el ser humano.<sup>(2)</sup> Esta zoonosis tiene una amplia distribución mundial, se reporta en países mediterráneos de África y Europa, en el Medio Oriente, Asia Central, la India, América Central y América del Sur. En América Latina, los países con mayor prevalencia son Argentina, México y Perú.<sup>(3)</sup>

La transmisión de la infección al ser humano ocurre por contacto directo o indirecto con animales enfermos o sus productos. Las vías por las que con mayor frecuencia el hombre enferma son la ingestión de productos alimenticios provenientes de animales infectados, como la leche cruda, quesos, mantequilla y helados; el contacto de las mucosas humanas con sangre, orina, secreciones vaginales, placenta o fetos abortados de animales enfermos; la inhalación del microorganismo en ambientes contaminados como establos; y por inoculación accidental durante el trabajo en laboratorios de diagnóstico y durante la vacunación del ganado con vacunas vivas. La transmisión persona a persona es muy rara.<sup>(1)</sup>

En los humanos la enfermedad es de comienzo agudo o insidioso con síntomas inespecíficos y en muchos casos graves. Las infecciones subclínicas y no diagnosticadas son frecuentes. La brucelosis humana constituye una infección sistémica importante, de carácter debilitante de tipo crónico, que se asocia a incapacidades y en la que se afectan diferentes órganos y sistemas. Las recaídas son frecuentes en los casos no diagnosticados ni tratados adecuadamente y en ellas es frecuente la presentación localizada con complicaciones osteoarticulares, gastrointestinales, genitourinarias, neurológicas y cardiovasculares, fundamentalmente.<sup>(4)</sup>

El diagnóstico clínico de la brucelosis humana constituye un reto para el médico de asistencia por la amplia gama de síntomas y signos que presenta esta enfermedad, este hecho favorece el subdiagnóstico existente y que, por ello, el número de casos activos sea probablemente de 10 a 25 veces superior al notificado. Por tanto, para la confirmación de los casos es fundamental considerar la correcta elaboración de la historia clínico – epidemiológica y los resultados del laboratorio de microbiología.<sup>(5)</sup>

Los métodos de diagnóstico microbiológico para la brucelosis detectan directamente el microorganismo a través del cultivo o la detección de su ADN por las técnicas de biología molecular, o indirectamente a través de la detección de los anticuerpos que el hospedero produce.<sup>(6)</sup>

A pesar de que los métodos serológicos son los más utilizados en los laboratorios de diagnóstico de brucelosis humana debido a que consumen poco tiempo y se reproducen con facilidad, el cultivo del microorganismo en sangre o tejidos continúa siendo el estándar o prueba de oro para el diagnóstico de esta enfermedad. No obstante, este proceder no se realiza en la mayoría de los laboratorios porque las brucelas pueden propagarse fácilmente a través de aerosoles, lo que implica que se requiera de medidas de contención biológicas adicionales, como el uso de gabinetes de bioseguridad clase III.<sup>(7)</sup>

A nivel Internacional se realizan esfuerzos para desarrollar diagnósticos más específicos y sensibles que permitan detectar las brucelas o sus productos. Tal es el caso de los sistemas moleculares basados en la aplicación de variantes de la técnica PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) que permiten detectar y en algunos casos cuantificar el ADN de las brucelas en diferentes muestras clínicas.<sup>(8)</sup>

Son numerosos los estudios que han demostrado que la PCR es una herramienta muy útil para el diagnóstico oportuno de la brucelosis aguda, para la detección precoz de recidivas y para el seguimiento de los pacientes luego que culminan el tratamiento antimicrobiano. La PCR y sus variantes son detectores más sensibles y específicos para las especies de *Brucella*, en comparación con los métodos convencionales como los hemocultivos y las pruebas serológicas. Estas herramientas facilitan, además, la cuantificación de los ácidos nucleicos, así como la automatización y computación de datos, sin necesidad de manipulación posterior a la amplificación del producto de PCR.<sup>(9)</sup>

En la actualidad los ensayos de PCR en tiempo real para la detección de *Brucella* spp. proporcionan un medio para identificar y cuantificar genes dianas de ADN mediante el monitoreo de la carga bacteriana, medida por el aumento de la fluorescencia durante el ciclo. Ejemplo de ello es el gen *wboA* que codifica para un lipopolisacárido de membrana externa de *Brucella* spp. y los genes que codifican para la proteína de membrana externa de 31 kDa (bcsp31), la proteína periplásmica de 26 kDa (*bp26*), la secuencia de inserción IS711 y la región 16S ARNr. Dentro de los métodos de PCR en tiempo real, en base a su fluorescencia, se encuentran los que utilizan SYBR Green, que es un colorante intercalante de ADN de doble cadena que permite visualizar la reacción. Este sistema es menos específico que aquellos que emplean sondas de hibridación, tales como las TaqMan. <sup>(9, 10)</sup>

## 1.2 Justificación del estudio:

En Cuba, la brucelosis humana es una enfermedad de declaración obligatoria. Se conoce que desde el año 2012 se rescató el diagnóstico de laboratorio en la red de salud pública, mediante la introducción del sistema serológico comercial FAB (del inglés *Febrile Antigen Brucella*), método que permitió realizar la pesquisa activa en los principales grupos de riesgos. De igual manera, y desde ese entonces, se introdujeron en el Laboratorio Nacional de Referencia de leptospiras y brucelas del IPK (LNRLB-IPK), los sistemas serológicos ELISA-IgM y ELISA-IgG para *Brucella*, con el objetivo de determinar si el paciente cursaba por una infección aguda o crónica.

Sin embargo, los resultados de la vigilancia serológica de brucelosis humana llevada a cabo en este laboratorio, después de la introducción de los sistemas serológicos muestran aún un elevado porcentaje de individuos sospechosos (con síntomas clínicos y epidemiología sugerente) que mantenían serologías negativas. Por esta razón en el año 2016, en este laboratorio se valida e implementa la PCR a punto final (PCR bcsp) que amplifica un fragmento de 223 pb presente en la Proteína de Membrana Externa de 31 KDa de *Brucella* spp., útil para el diagnóstico temprano de brucelosis subaguda, aguda y las recaídas. Con esta investigación se logró alcanzar hasta un 85% de positividad en los casos seronegativos con clínica y epidemiología sugestivas de la enfermedad. A pesar de los avances obtenidos, continuaban sin confirmación cerca de un 15% de los individuos. Por esta razón, se incorporó la PCR en tiempo real cualitativa *Brucella* Real-TM-SACASE, que amplifica el gen *WboA*

presente en *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella canis*, *Brucella ovis* y *Brucella suis*, con la finalidad de detectar la presencia del ADN de *Brucella* en estas muestras no confirmadas con los métodos disponibles hasta este momento.

Todo lo anteriormente expuesto, da pie a realizar la presente investigación y por ello se recopilan los resultados de la vigilancia de laboratorio a nivel nacional, durante 10 años de estudio.

Por esta razón la autora se realiza las siguientes preguntas científicas:

### **1.3 Preguntas científicas:**

1. ¿Cómo se comporta la vigilancia serológica y molecular en las muestras clínicas de casos sospechosos de brucelosis en Cuba (2012-junio 2023)?
2. ¿Qué sexo, edades, ocupación, lugar de residencia, síntomas y signos, tuvieron los casos con brucelosis en Cuba, durante los años 2017 a junio de 2023?
3. ¿El PCR en tiempo real permitirá confirmar la infección por *Brucella* spp. en casos pediátricos sospechosos cubanos, que son negativos por serología y por la PCR *bscp* (enero-junio 2023)?

### **1.4 Objetivos:**

1. Determinar la positividad serológica y molecular a *Brucella* spp., según muestras clínicas de pacientes sospechosos cubanos (2012-junio 2023).
2. Describir las variables socio-demográficas, clínico-epidemiológicas y la distribución temporo-espacial, de los casos cubanos con brucelosis (2017-junio 2023).
3. Detectar el gen *WboA*, presente en *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovis* y *Brucella canis* y describir algunas variables socio-demográficas y clínicas, en casos pediátricos cubanos, negativos por serología y por la PCR *bcsp* (enero-junio 2023).

## II. MARCO TEORICO

---

### 2.1 Definición y sinonimia

La brucelosis es una enfermedad zoonótica e infectocontagiosa ocasionada por las bacterias del género *Brucella*. Esta entidad nosológica sigue siendo endémica en la mayoría de los países en desarrollo y su transmisión se atribuye, fundamentalmente, al consumo de productos lácteos no pasteurizados y al contacto directo con animales enfermos, condiciones que determinan que se encuentre entre las cinco zoonosis que más afectan al ser humano. La brucelosis humana se presenta con síntomas inespecíficos, debilitantes y con elevada tendencia a evolucionar hacia la cronicidad, lo que determina que en ocasiones el diagnóstico clínico no se pueda realizar con la prontitud requerida.<sup>(11)</sup>

A lo largo del tiempo la brucelosis ha recibido diferentes nombres relacionados con sus descubridores, su presentación clínica o con la localización geográfica de los brotes epidémicos más sobresalientes. Los más conocidos son: fiebre ondulante, fiebre melitensis, fiebre de Malta, fiebre de Traum, fiebre de Chipre, enfermedad de Bang, fiebre de Gibraltar y fiebre sudoralis.<sup>(12)</sup>

### 2.2 Epidemiología

La brucelosis tiene una distribución mundial, pero es endémica en países del Mediterráneo (de África y Europa), del Medio Oriente, de Asia Central, de la India, de América Central y de América del Sur. En América Latina, los países con mayor prevalencia son Argentina, México y Perú.<sup>(13)</sup>

La brucelosis es reconocida como una amenaza potencial para los sectores agrícola y de salud pública en todo el mundo,<sup>(14)</sup> sin embargo, debido al subdiagnóstico y a la subnotificación de esta enfermedad, el número real de humanos y animales que enferman cada año sigue sin estar claro. Se conoce que la cifra de los 500 000 nuevos casos anuales resulta ínfima al constatar las consecuencias de la enfermedad, ya que investigaciones recientes estiman que se encuentran en riesgo de contraerla el 57,5 % de los africanos, el 47,7 % de los asiáticos, el 24,3 % de los europeos y el 19,4 % de los americanos. (0,19 mil millones/0,98 mil millones) de personas en las Américas, y 66,7 % (28/42) de países y (0,18/0,74 mil millones) de personas en Europa estaban en riesgo.<sup>(15)</sup>

Los principales reservorios de las brucelas son los animales de granja. Entre los más frecuentes se encuentran las ovejas, las cabras, el ganado vacuno, los cerdos, los perros, los caballos y los camellos. Los animales enfermos son capaces de excretar las bacterias durante mucho tiempo a través de los fluidos uterinos, los fetos muertos, la placenta o la leche materna.<sup>(16)</sup>

La infección del ser humano es un accidente en la cadena epidemiológica en el que la transmisión puede ocurrir de forma directa o indirecta. La vía directa incluye el contacto de heridas o conjuntivas humanas con órganos o secreciones del animal enfermo, la inhalación de aerosoles en ambientes contaminados, o la inoculación accidental del microorganismo. Mientras que la vía indirecta se refiere a la ingestión de productos de origen animal contaminados por brucelas. La transmisión de persona a persona es muy rara. Existen reportes de transmisión por vía sexual, a través de transfusiones de sangre, luego de trasplantes de órganos o tejidos, por vía transplacentaria, o a través de la lactancia materna.<sup>(16)</sup>

El periodo de incubación de la brucelosis humana es variable, suele durar entre 5 y 60 días o extenderse por más tiempo. La enfermedad es más frecuente en el sexo masculino, en edades entre 30 y 40 años y en zonas rurales. Los principales grupos de riesgo son el personal de laboratorio, los veterinarios, los granjeros y carniceros, entre otros.<sup>(13)</sup>

Entre las medidas para no adquirir la enfermedad se encuentran el uso de guantes, mascarilla y bata que protejan a los individuos que se exponen a animales que pudieran estar infectados. Por otra parte, el control de la brucelosis humana depende del control de la enfermedad animal. Esto se logra mediante amplios y costosos programas enfocados a la vacunación de los animales y al sacrificio de los que estén enfermos. Además, es importante promover hábitos alimenticios adecuados como son la cocción adecuada de los alimentos y la pasteurización de la leche.<sup>(17)</sup>

## 2.3 Patogenia y respuesta inmune

*Brucella spp.* sigue un patrón en su patogenia caracterizado por la adhesión a las mucosas y su paso a través de la barrera epitelial. Su instauración a ese nivel desencadena la respuesta de monocitos, de macrófagos y células fagocíticas, en las que penetran y permanecen como parásitos intracelulares facultativos. De esa forma viajan a través del retículo endotelial hasta los nodos linfáticos locales (retrofaríngeos, inguinales, ilíacos) y afectan fundamentalmente el hígado, el bazo y la médula ósea. Luego de un periodo comprendido entre 7 - 30 días, invaden el torrente sanguíneo provocando una bacteriemia inicial.<sup>(18)</sup>

Una vez dentro del torrente sanguíneo, las brucelas hacen uso de numerosos mecanismos para evitar o suprimir las respuestas bactericidas y poder sobrevivir. Los datos en animales sugieren que es probable que la cubierta de lipopolisacárido (LPS) presente en las cepas lisas (*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*) desempeñe un papel en la supervivencia intracelular, porque induce la producción de monofosfato de adenina y guanina, que inhibe la actividad fagosómica que provoca la fusión y la posterior explosión oxidativa.<sup>(16)</sup>

Las especies de brucela pueden presentarse con diferente grado de virulencia, toxicidad y pirogenicidad, lo que las convierte en pobres inductores de citocinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y los interferones. Por otra parte, estas bacterias no activan la vía alterna del complemento y se cree que son capaces de inhibir la muerte celular programada de las células infectadas.<sup>(19)</sup>

La susceptibilidad a la muerte intracelular difiere entre especies, por ejemplo, *B. abortus* muere fácilmente mientras que *B. melitensis* rara vez se ve afectada. Este hecho podría explicar las diferencias en cuanto a patogenicidad y manifestaciones clínicas en los casos humanos con brucelosis afectados por estas especies. Después de la replicación en el retículo endoplásmico, las brucelas se liberan con la ayuda de hemolisinas y se induce la necrosis celular. El desarrollo de la inmunidad mediada por células es el principal mecanismo de recuperación. La respuesta del huésped a la infección por *B. abortus* se caracteriza por el desarrollo de granulomas tisulares indistinguibles de los de la sarcoidosis. En cambio, la infección por las especies *B. melitensis* y *B. suis* (más virulentas) suele provocar micro abscesos viscerales.<sup>(19)</sup>

## 2.4 Manifestaciones clínicas y enfermedad localizada

El cuadro clínico y la gravedad de la brucelosis en los humanos dependen de la especie involucrada en la infección, la dosis infecciosa, la vía de transmisión y las características del huésped (estado inmunológico, estado nutricional, enfermedades concomitantes y fármacos administrados, sobre todo los reductores de la acidez gástrica)<sup>(17)</sup>. Después de un período de incubación variable, la enfermedad en los humanos se manifiesta con un marcado polimorfismo sintomático, sin síntomas, signos o parámetros de laboratorio patognomónicos de esta entidad nosológica, lo que propicia que, en ocasiones, el médico de asistencia no la sospeche con la debida prontitud.<sup>(13)</sup>

La brucelosis humana, en dependencia del tiempo de duración del cuadro clínico que la caracteriza, puede clasificarse como una entidad clínica febril aguda (dura menos de dos meses), subaguda (dura entre dos y hasta 12 meses), o como un cuadro que persiste y progresa a la cronicidad (dura más de 12 meses).<sup>(20)</sup>

Es importante señalar que tras finalizar el tratamiento antimicrobiano, entre el 5 y el 40 % de los pacientes desarrollan una recaída de la enfermedad, mientras que las recidivas suelen ocurrir en los seis primeros meses que siguen al tratamiento y, con menor frecuencia, hasta 18 meses después. En individuos en continua exposición a *Brucella* spp., es difícil diferenciar una recidiva de una reinfección. Los factores de riesgo asociados a presentar recidiva son la elección de un tratamiento inadecuado, la presencia de hemocultivos positivos en el episodio inicial, la duración de los síntomas por más de 10 días antes de iniciar el tratamiento, fiebre superior a 38,5°C, y conteo de plaquetas inferior a 150000/ml.<sup>(21)</sup>

Los síntomas y signos pueden ser generales e inespecíficos o relacionarse con la aparición de complicaciones graves. Entre los más frecuentes se encuentran la fiebre, por lo general ondulante, los escalofríos, la diaforesis, la cefalea, las mialgias, las artralgias, la lumbalgia y la pérdida de peso. También son frecuentes otros síntomas constitucionales como anorexia, astenia, fatiga, debilidad, malestar y pérdida de peso.<sup>(21, 22)</sup>

El desarrollo de focalizaciones o complicaciones ocurre en un 30 % de los pacientes que padecen la enfermedad %, y pueden presentarse en cualquier fase de la misma. Su frecuencia aumenta significativamente cuando se retrasa el diagnóstico y el tratamiento. La enfermedad osteoarticular es la complicación más común, siendo las la sacroileítis, la espondilitis y las artritis de grandes articulaciones (osteomielitis, bursitis y tenosinovitis) las presentaciones clínicas más frecuentes. Estas son de difícil tratamiento y se asocian con incapacidad e impotencia funcional.<sup>(23)</sup>

Por otra parte, entre las afecciones en el Sistema Nervioso Central (SNC) la meningoccefalitis es la complicación más frecuente, seguida de la meningitis, los abscesos cerebrales y las neuritis; mientras que a nivel ocular la focalización de la infección puede provocar uveítis, neuritis óptica, conjuntivitis, endoftalmitis.<sup>(24)</sup> Entre las afecciones cardiovasculares se destaca la endocarditis que puede afectar válvulas previamente sanas y es la principal causa de mortalidad. Otras complicaciones hematológicas que pueden aparecer son la anemia, el edema pulmonar, las arritmias y la trombocitopenia.<sup>(22)</sup>

Asimismo, las complicaciones genitourinarias más frecuentes son la prostatitis, la epidídimo-orquitis, la cistitis, la nefritis intersticial, la glomerulonefritis, la salpingitis y la vesiculitis seminal. La afectación hepática se manifiesta como una hepatitis granulomatosa difusa con un leve aumento de transaminasas. También pueden aparecer calcificaciones y abscesos en el hígado. El compromiso pulmonar es raro (menos del 5%) y los infiltrados pulmonares se asocian a derrame pleural.<sup>(24)</sup>

La brucelosis infantil tiene una presentación de leve a moderada y rara vez progresa a la cronicidad. La mayoría de las revisiones pediátricas refieren una amplia gama de síntomas y signos en niños con brucelosis, siendo la fiebre y los síntomas constitucionales (escalofríos, sudoración, fatiga, malestar general, anorexia, pérdida de peso, dolor abdominal, dolores de cabeza, mialgias y artralgias) los más comunes. Otras manifestaciones frecuentes son la hepatomegalia asociada o no a esplenomegalia y leve aumento de las transaminasas, la artritis y las afecciones hematológicas (anemia, trombocitopenia y pancitopenia). Aunque la aparición de complicaciones es rara en niños, se reportan endocarditis, miocarditis, neurobrucelosis (meningitis, encefalitis, mielitis y abscesos cerebrales uveítis, queratitis, conjuntivitis y defectos neurooftálmicos).<sup>(20)</sup>

## 2.5 Tratamiento

Aunque múltiples antibióticos muestran actividad *in vitro* contra especies de *Brucella*, se ha demostrado respuesta clínica ante un limitado número de ellos. La característica de las brucelas en cuanto a ser un patógeno intracelular facultativo, obliga a que se utilicen combinaciones de antimicrobianos. Los medicamentos más efectivos contra esta especie bacteriana son doxiciclina, gentamicina, estreptomicina, rifampicina y trimetoprim-sulfametoxazol.<sup>(21)</sup>

Para la brucelosis aguda en adultos y niños mayores de 8 años, las pautas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomiendan que se utilicen en combinación doxiciclina (100 mg dos veces al día) y rifampicina (600 mg/día) durante seis semanas. Este régimen es el más cómodo para cumplir por el paciente pero se asocia a recaídas, razón por la que se recomienda adicionar a él estreptomicina (1 g/día) día IM durante 21 días o gentamicina 1 g IM durante una semana.<sup>(13)</sup>

En pacientes con espondilitis o sacroilitis, generalmente se recomienda doxiciclina y rifampicina combinadas con un aminoglucósido (gentamicina) durante las 2 a 3 semanas iniciales, seguidas de 6 semanas de rifampicina y doxiciclina. (Bennett, 2021) Los pacientes con infecciones del sistema nervioso generalmente requieren una terapia combinada, se prefiere un régimen que incluya doxiciclina, estreptomicina y rifampicina o doxiciclina, trimetopín sulfametoxazol (TMP-SMZ) TMP-SMZ y rifampicina, siempre por un periodo no menor a tres meses. En el caso de los pacientes con endocarditis se utilizan aminoglucósidos junto con doxiciclina, rifampicina y TMP-SMZ durante al menos 4 semanas, seguida de al menos 2 o 3 agentes activos (sin aminoglucósidos) durante otras 8 a 12 semanas.<sup>(13)</sup>

El tratamiento de elección para niños menores de 8 años es la combinación de rifampicina y TMP-SMZ durante 6 semanas, con este régimen la tasa de recaída no sobrepasa el 5 %. Por otra parte, el tratamiento de la brucelosis en mujeres embarazadas todavía no está bien establecido, aunque se conoce que el TMP-SMZ ha sido eficaz en este grupo poblacional, ya sea como monoterapia o como parte de una terapia combinada con rifampicina o gentamicina. La recomendación más común es la rifampicina, sola o en combinación con TMP-SMZ. No obstante, debe tenerse en cuenta que el uso de TMP-SMZ al final del embarazo está asociado con kernicterus.<sup>(21)</sup>

## 2.6 Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de la brucelosis en los humanos se debe realizar con otras entidades que causan síndrome febril. Entre ellas se citan la fiebre tifoidea, la leptospirosis, la malaria, el dengue, la tuberculosis, la toxoplasmosis, los linfomas y las infecciones por los virus Epstein-Barr, hepatitis y citomegalovirus. Además, algunas patologías no infecciosas pueden confundirse con un cuadro de brucelosis crónica, principalmente las hepatopatías, las osteoartropatías, las neuropatías y algunas alteraciones psiquiátricas.<sup>(21)</sup>

## 2.7 Agente etiológico

### 2.7.1 Taxonomía

Las brucelas pertenecen al dominio Bacteria. El análisis de las secuencias del ácido ribonucleico 16S (ARNr 16S) permite ubicar a este género bacteriano dentro del grupo alfa del subgrupo dos de la clase Proteobacteria, junto a bacterias simbiotes como *Mycoplana* y *Ochrobactrum*. Estos microorganismos se incluyen en el orden Rhizobiales, clase Alphaproteobacteria, filo Proteobacteria, familia Brucellaceae.<sup>(17)</sup>

La clasificación taxonómica tradicional reconoce seis especies de *brucelas* subdivididas en 15 biovariedades, que se distinguen entre sí según características fenotípicas, patogénicas y de afinidad por el hospedador. Esta clasificación incluye a *Brucella melitensis* (biovariedades 1, 2 y 3) con afinidad por el ganado ovino y caprino, *Brucella abortus* (biovariedades 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9) con afinidad por bóvidos y *Brucella suis* (biovariedades 1, 2, 3, 4 y 5) con afinidad por el ganado porcino. Además contempla a *Brucella canis*, que tiene afinidad por los cánidos, a *Brucella ovis*, que prefiere los óvidos y *Brucella neotomae*, que se relaciona con las ratas del desierto.<sup>(25)</sup>

Con posterioridad, en 1994 se comienzan a aislar nuevas especies de *Brucella* a partir de mamíferos marinos. Tal es el caso de *Brucella maris* a partir de muestras de delfines, *Brucella cetaceae*, encontrada en marsopas, delfines y ballenas, y *Brucella pinnipediae* hallada en focas. En 2001, se describe *Brucella microti*, a partir del topillo campestre y el zorro rojo y *Brucella inopinata*, a partir de un implante de mama infectado en una mujer.<sup>(26)</sup> De igual modo, en 2014

se aisló *Brucella papionis* de mandriles, mientras que recientemente, se identifica a *Brucella vulpis* a partir de muestras de nódulos linfáticos de zorros rojos en Austria. En la actualidad se considera que el género *Brucella* está representado por 12 especies, las cuales, a pesar de ser en su mayoría indistinguibles morfológicamente, se diferencian en cuanto a sus características genéticas, a sus hospederos predilectos y a su potencial patogénico (ver tabla 1). La literatura internacional recoge que las especies que se consideran patógenas para el hombre son *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* y *Brucella canis*.<sup>(27)</sup>

**Tabla 1.** Especies de *Brucella* spp. y sus hospedadores animales.

<b>Especies</b>	<b>Hospederos animales</b>
<i>Brucella melitensis</i>	Ovinos, caprinos y camélidos
<i>Brucella abortus</i>	Ganado
<i>Brucella suis</i>	Cerdos, liebres, renos, roedores
<i>Brucella canis</i>	Perros
<i>Brucella ovis</i>	Ovejas
<i>Brucella neotomae</i>	Roedores
<i>Brucella pinnipedialis</i>	Focas
<i>Brucella ceti</i>	Delfines, marsopas
<i>Brucella microti</i>	Campañoles
<i>Brucella inopinata</i>	No conocida, se aisló de un implante mamario en 2010
<i>Brucella vulpis</i>	Zorro rojo
<i>Brucella papionis</i>	Babuinos

### 2.7.2 Características del género *Brucella*

El género *Brucella* está constituido por cocobacilos cortos y pequeños, gramnegativos, que miden de 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$  de diámetro por 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de longitud. Estas bacterias son intracelulares facultativas, inmóviles, no encapsuladas, no formadoras de esporas, de crecimiento lento y aerobias estrictas, aunque algunas cepas exigen crecer con presencia de dióxido de carbono. Estos microorganismos no fermentan los azúcares, no producen indol, no licuan la gelatina, no utilizan citratos, reducen los nitratos a nitritos y producen las enzimas catalasa y citocromo oxidasa (excepto *Brucella neotomae* y *Brucella ovis*).<sup>(28)</sup>

Las brucelas son resistentes a la congelación, al secado (liofilización) y permanecen viables durante largos periodos de tiempo en condiciones de alta humedad, baja temperatura, pH cercano a la neutralidad y poca luz solar. Sin embargo, son sensibles a la luz solar, las radiaciones ionizantes y a la mayoría de los desinfectantes comunes, con excepción de las sales cuaternarias de amonio.<sup>(29)</sup>

### **2.7.3 Características genéticas de *Brucella* spp.**

A pesar de las diferencias en virulencia y afinidad por el hospedador, las especies de *Brucella* tienen genomas muy similares, tanto en tamaño como en composición de bases, presentando una homología superior al 90%, demostrada en ensayos de hibridación ADN-ADN.<sup>(30)</sup>

El genoma de la mayoría de las brucelas posee dos cromosomas circulares, uno de 2,1 Mb (cromosoma 1) y otro de 1,2 Mb (cromosoma 2). Entre ambos codifican aproximadamente 3500 genes.<sup>(31)</sup> Este contiene aproximadamente  $3,2 \times 10^6$  pares de bases y un 57% de G+C, no presenta plásmidos u otros elementos genéticos móviles, aunque se ha descrito su capacidad para mantener y transferir plásmidos exógenos<sup>(32)</sup>. La ausencia de plásmidos propios en las brucelas demuestra su adaptación al ambiente intracelular (nicho ecológico estable) sin competencia microbiana, en el que no es necesaria la plasticidad genética que requeriría habitar ambientes como el intestino, con una elevada carga microbiana. Por otra parte, este fenómeno hace difícil la adquisición y transmisión de resistencia frente a los antibióticos, lo que podría explicar que hasta el momento no se reporten cepas resistentes a los fármacos utilizados para su eliminación.<sup>(33)</sup>

En la última década fueron secuenciados, analizados y están disponibles datos de la secuencia de cromosoma entero para cinco cepas de *Brucella melitensis* (16M, M28, M5-9, ATCC 23457 y NI); cuatro de *Brucella suis* (1330, ATCC 23445, VBI22 y 019); cuatro de *Brucella abortus* (S19, 9-941, A13334, y 2308); una de *Brucella ovis* (ATCC 25840); dos de *Brucella canis* (ATCC 23365 y HSK A52141); una de *Brucella microti* (CCM 4915); una de *Brucella pinnipedialis* (B2/94); y al menos otros 61 cromosomas de miembros del género en etapas diversas de terminación. Estas evidencias demuestran que el genoma de estas bacterias

consiste en dos cromosomas circulares de aproximadamente 2,05 y 1,15 Mb; además de varios genes, operones, rutas metabólicas de secreción adhesión y características de la pared celular. En contraste, *Brucella suis*, biovar 2 y 4, tienen dos replicones de 1,35 Mb y 1,85 Mb y *Brucella suis*, biovar 3 presenta un solo cromosoma de 3,31 Mb.<sup>(34)</sup>

## **2.8 Diagnóstico microbiológico**

Por las características clínicas de la brucelosis en humanos, siempre debe intentarse el diagnóstico microbiológico, ya sea mediante el aislamiento del microorganismo, la detección de su ADN, o a través de la demostración de anticuerpos específicos a títulos significativos o seroconversión. El diagnóstico microbiológico de brucelosis debe interpretarse considerando la clínica y la epidemiología del paciente. Un resultado negativo no descarta la infección, por lo que siempre se debe realizar una combinación de la mayor cantidad de métodos disponibles en los laboratorios.<sup>(35)</sup>

### **2.8.1 Diagnóstico indirecto**

El diagnóstico serológico de la brucelosis se basa en la confirmación del aumento de los títulos de anticuerpos específicos contra *Brucella*. Los ensayos serológicos se utilizan tanto para el diagnóstico inicial de la infección, como para el seguimiento post tratamiento. El título de anticuerpos debería disminuir después de un tratamiento eficaz, de no ser así se debe sospechar una focalización de la infección o una recaída.<sup>(36)</sup>

Las metodologías que más se han utilizado para el diagnóstico indirecto de la brucelosis son la prueba Rosa de Bengala, la prueba de seroaglutinación estándar en tubo (SAT), la prueba de Coombs anti-brucelas y, más recientemente, los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para la detección de las inmunoglobulinas M, G y A, producidas contra el LPS de estas bacterias.<sup>(37)</sup> Las pruebas serológicas mencionadas utilizan como antígeno células lisas de *Brucella abortus* 1119-3 y 99S, o al lipopolisacárido presente en *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis* (ELISA).<sup>(38)</sup>

A partir de los años 2000, se comercializan diferentes sistemas en forma de estuches para el serodiagnóstico de la brucelosis, que le brindan al laboratorista bondades dirigidas a una ejecución más homogénea de los procedimientos y a la obtención de resultados con mayor calidad. Entre estos sistemas se encuentra el *Febril Antigen Brucella* (FAB) y el Brucellacapt.<sup>(39)</sup>

La respuesta inmune humoral a las infecciones causadas por las especies lisas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) está caracterizada por la elaboración de anticuerpos contra el LPS. La secuencia de producción de anticuerpos sigue el patrón clásico de niveles crecientes de IgM en la primera semana de infección (detectables fácilmente mediante pruebas de aglutinación como la prueba de rosa de bengala y SAT), seguidos del aumento de la IgG1 en la segunda semana y de la IgG2 e IgA con posterioridad.<sup>(36)</sup>

La producción de los tres isotipos de inmunoglobulinas (M, G y A) continúa aumentando en las primeras fases de la enfermedad, alcanzando su punto máximo alrededor de la cuarta semana. En casos prolongados, la concentración de IgM disminuye, lo que resulta en un predominio neto de anticuerpos IgG e IgA, que pueden cuantificarse mediante un ELISA. Con el tiempo, los anticuerpos no aglutinantes (también llamados anticuerpos incompletos) se vuelven más abundantes que los aglutinantes, lo que puede dar lugar a resultados falsos negativos cuando solo se utilizan técnicas para detectar a los aglutinantes (producidos durante la primera fase de la infección). Por ello la detección de estos anticuerpos no aglutinantes requiere del uso de herramientas serológicas adicionales como la prueba de Coombs o el Brucellacapt.<sup>(34)</sup>

La administración temprana de terapia antimicrobiana disminuye la producción de anticuerpos contra las proteínas citosólicas de *Brucella*, pero apenas afecta la respuesta anti-LPS. Cabe destacar que como la respuesta inmune individual a las brucelas en humanos es muy variable, puede ocurrir que en muchos pacientes que aparentemente se han recuperado completamente de la enfermedad, los anticuerpos IgM detectables persistan durante períodos prolongados, y que en entre el 25 % y el 50 % de estos se detecten luego de un año del tratamiento.<sup>(34)</sup>

Por otra parte, una disminución rápida de los títulos de anticuerpos IgG e IgA generalmente indica una respuesta favorable a la terapia con antibióticos, mientras que los títulos altos persistentes o en aumento de los mismos pueden ser un signo de fracaso del tratamiento, enfermedad residual o recaída clínica inminente. De hecho los pacientes que experimentan una recaída de la enfermedad suelen mostrar un aumento significativo en los niveles de IgG y un incremento más moderado del isotipo IgA, pero no del isotipo IgM. En general, los títulos de anticuerpos caen más lentamente en pacientes con complicaciones focales, por lo que se debe considerar que los niveles de anticuerpos mensurables después de la terapia no necesariamente indican fracaso del tratamiento, evolución hacia la cronicidad o recaída.<sup>(34)</sup>

## **2.8.2 Diagnóstico directo**

### **2.8.2.1 Aislamiento y cultivo**

El aislamiento de *Brucella* spp. Se considera la técnica de referencia o “prueba de oro” para el diagnóstico de brucelosis. El cultivo de *Brucella* es específico y permite la identificación y tipificación definitiva de los aislados de este microorganismo, lo que es muy valioso, sobre todo, en las investigaciones epidemiológicas.<sup>(20)</sup>

Por otra parte, la sensibilidad del aislamiento de *Brucella* spp. es variable, y en ocasiones baja, porque depende, entre otros aspectos, del método de cultivo que se emplee, de que la muestra sea representativa del proceso patológico, del estadio de la enfermedad (agudo o crónico) y de los antimicrobianos que haya tomado el paciente.<sup>(40)</sup> Siendo así, mientras que durante las manifestaciones agudas entre el 50 % y el 80 % de los hemocultivos son positivos, sólo el 5 % de los casos crónicos lo son. La selección del aspirado de médula ósea como muestra a estudiar en pacientes que se sometieron a terapia con antibióticos o que están cursando por una forma crónica de la enfermedad permite obtener mejores resultados.<sup>(36)</sup>

Es importante señalar que el riesgo de adquirir una infección de laboratorio por *Brucella* spp. oscila entre el 40% y el 100% y depende de diversos factores como son los accidentes de laboratorio y la aerosolización de microorganismos durante las actividades de identificación de los mismos.<sup>(34)</sup>

Para el cultivo convencional de *Brucella* spp existen numerosos medios de cultivo que están disponibles en forma sólida, caldo o medio bifásico. Los medios bifásicos, como los frascos de hemocultivo de Ruiz Castañeda, el hemocultivo SEPTI-CHEK™ (BD BBL®) y el medio bifásico de rendimiento Hemoline (bioMérieux®) son los que se prefieren porque con ellos se evita el subcultivo. También están disponibles, de manera comercial, pruebas bioquímicas como API 20 NE® (bioMérieux®). Estas son particularmente útiles para una identificación rápida y sencilla del microorganismo.<sup>(36)</sup>

Entre las técnicas automatizadas y semiautomatizadas útiles para la identificación de las brucelas mediante el monitoreo continuo de la producción de CO<sub>2</sub> por el microorganismos, se encuentran el BACTEC™ (Becton Dickinson Diagnostic Systems®) y el BacT/ALERT™ (bioMérieux®). El sistema BACTEC™ Myco/F-Lytic (Becton Dickinson Diagnostic Systems®) también está diseñado para mejorar la tasa de recuperación de patógenos intracelulares como *Brucella* spp. Por actividad lítica combinada y automatización. Además, recientemente, comenzó a utilizarse el sistema de biotipado semiautomático Micronaut™ (Merlin Diagnostika®) que permite la identificación de especies y biovares a través de la metabolización de diversos sustratos por estas células bacterianas.<sup>(36)</sup>

### **2.8.3 Diagnóstico molecular**

#### **2.8.3.1 Tipificación molecular de las brucelas**

La falta de polimorfismo genético de *Brucella* spp ha limitado la identificación y la aplicación de técnicas convencionales de tipificación en este patógeno, como ha sucedido con la electroforesis en campo pulsado (PFGE), con la amplificación polimórfica al azar (RAPD) o la amplificación arbitraria (AP-PCR), obligando al desarrollo y aplicación de nuevos marcadores moleculares. Desde el punto de vista diagnóstico, la amplificación de un fragmento (223 pb) de una proteína de membrana inmunogenética, BCSP31, ha permitido la detección eficiente de *Brucella* spp en muestras clínicas. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con otros patógenos bacterianos, la identificación de las distintas especies de *Brucella* spp no se consigue mediante la secuenciación del 16S ARNr ni con la amplificación de la región del ADN ribosomal situada entre el 16S-23S.<sup>(34)</sup>

Una de las propuestas más eficientes para la diferenciación entre especies de *Brucella* consiste en la utilización de la distribución variable de una secuencia de inserción en el cromosoma, IS711, generándose diferentes tamaños de amplicón según la especie; esta técnica ha permitido la identificación de *Brucella abortus* (bv. 1, 2, 4), *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, y *Brucella suis* (bv.1) pero no así la identificación de *Brucella abortus* bv. 3, 5-7, ni de *Brucella suis* bv. 2-5. Un estudio posterior que utilizaba una región específica de *Brucella abortus* S19, eryC-eryD, permitió amplificar los biovares 3, 5, 6 y 9.<sup>(41)</sup>

Una mejor identificación ha sido posible mediante la utilización de una PCR múltiple de nueva generación, «*Bruce-ladder*», con ocho parejas de cebadores especie-específicos, que amplifican siete productos con diferencias en número y en tamaño, logrando la identificación de *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis*, *Brucella neotomae*, *Brucella pinnipedialis* y *Brucella ceti* (mamíferos marinos), aunque no la diferenciación de biovares. La información epidemiológica a largo plazo que proporciona el MLST (por sus siglas en inglés, *multilocus sequence typing*) mediante el estudio de nueve genes constitutivos (*gap*, *aroA*, *glk*, *dnaK*, *gyrB*, *trpE*, *cobQ*, *omp25* e *int-hyp*) en aislamientos de *Brucella* spp. ha permitido la diferenciación clara en grupos que corresponden a especies clásicas de *Brucella* spp.: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* y *Brucella neotomae*, además de observar una mayor diversidad en *Brucella suis* y un grupo diferenciado para *Brucella* spp. de mamíferos marinos. Una novedosa PCR con ligación, en la que la mayoría de los marcadores proceden de los genes utilizados en el esquema original de tipificación multilocus de secuencias (MLST, por sus siglas en inglés), ha logrado la identificación de todas las especies de *Brucella* descritas hasta el momento.<sup>(42)</sup>

La secuenciación genómica completa de *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* y *Brucella suis*, ha supuesto el inicio de nuevas técnicas dirigidas hacia la identificación de genes que permiten la diferenciación genómica de especies y biovariedades de *Brucella* spp., así como la caracterización genotípica. En este aspecto, la aplicación de técnicas de AFLP-PCR (por sus siglas en inglés, *amplified fragment length polymorphism* PCR); el análisis de la existencia y transcripción «*in vitro*» de determinados genes implicados en el metabolismo, virulencia, sistemas de secreción y recombinasas sitio-específicas; y la detección de repeticiones en tándem (TRs) presentes en ocho genes, han

supuesto un avance en la identificación de este género bacteriano. Concretamente, se ha alcanzado una información epidemiológica de mayor nivel con el uso de las técnicas MLVA (del inglés, *multilocus variable number of tandem repeats analysis*).<sup>(43)</sup>

Por otra parte, al emplearse las secuencias repetidas en tándem (VNTRs) se han podido asumir estudios locales epidemiológicos de contingencias relacionadas con esta enfermedad. A raíz de la descripción de una técnica de MLVA denominada HOOOF-Prints (del inglés, *Hypervariable Octameric Oligonucleotide Finger-Prints*), para la detección de TRs hipervariables en ocho loci de genoma de *Brucella* spp. se ha conseguido un importante avance en la tipificación de este microorganismo.<sup>(43)</sup>

Recientemente se han descrito otros procedimientos que permiten la identificación de todas las especies de *Brucella*, biovariedades de *Brucella suis* y cepas vacunales, basados en la discriminación por polimorfismo de nucleótido único (SNP) mediante la extensión de cebador, la PCR en tiempo real o la reacción en cadena de la ligasa. Estas pruebas son rápidas, sencillas e inequívocas y, al basarse en un análisis filogenético robusto, ayudan a garantizar la especificidad de especie/biovariedad de los marcadores que se utilizan. También se han definido otros métodos que pueden añadir información epidemiológica útil. Se trata de un esquema de secuenciación multilocus y de varios esquemas de tipificación basados en la utilización de análisis de repeticiones en tándem de un número variable de locus múltiples (MLVA). Dependiendo de los marcadores concretos escogidos, estos métodos permiten diferenciar las cepas a nivel de especie o incluso subclasificarlas pudiéndose llegar a obtener información epidemiológica útil a nivel de subespecie.<sup>(41)</sup>

#### **2.8.3.2 Diagnóstico molecular a partir de muestras clínicas. Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

Los métodos moleculares son herramientas valiosas para el diagnóstico clínico y la vigilancia en salud pública, así como para la identificación de especies y subespecies. Estas técnicas son más sensibles que los hemocultivos y más específicas que las pruebas serológicas. Las muestras clínicas útiles para ensayos moleculares son diversas, entre ellas se encuentran el suero, la sangre total, el líquido cefalorraquídeo (LCR), el líquido sinovial o pleural, la orina e incluso

muestras de tejido. Sin embargo, la detección directa del ADN de *Brucella* en pacientes con sospecha de brucelosis puede ser un desafío debido a la pequeña cantidad de bacterias circulantes en la sangre, especialmente en cursos crónicos o después de una terapia con antibióticos. Además, la detección de ADN no puede demostrar una infección activa con patógenos viables y, por lo tanto, puede no respaldar de manera eficiente la toma de decisiones terapéuticas.<sup>(36)</sup>

La PCR convencional y PCR en tiempo real, constituyen las herramientas más ampliamente usadas para el diagnóstico molecular de la brucelosis. Estas técnicas ofrecen una alta especificidad y juegan un papel importante en el diagnóstico rápido de la infección activa para la detección del ADN de *Brucella* spp. a partir de muestras clínicas.<sup>(36)</sup> La PCR convencional permite obtener «*in vitro*» millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula. Esta herramienta se basa en la síntesis de dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde. Permiten realizar un diagnóstico rápido, sensible y específico de la enfermedad, además de ser aplicable a estudios taxonómicos y epidemiológicos. El proceso completo de una PCR convencional, incluye la extracción de los ácidos nucleicos, utilizando estuches comerciales o protocolos tradicionales, la preparación de las mezclas de reacción y la amplificación, que requiere de los ciclos con las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión. Después de la PCR, se hace el revelado de los productos de amplificación, utilizando gel de agarosa.<sup>(44)</sup>

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa es una variante de la PCR utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional (o punto final), un molde de ADN, al menos un par de cebadores específicos, desoxinucléotido trifosfato (dNTP), un tampón de reacción adecuado y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo y se coloca en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado. Este termociclador es un aparato con capacidad para calentar y enfriar rápidamente las muestras, de modo que se aprovechen las cualidades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos y las enzimáticas del ADN polimerasa.<sup>(45)</sup>

El proceso de PCR en tiempo real, al igual que la PCR convencional, por lo general consiste en una serie de cambios de temperatura que se repiten de 25-40 veces, llamados ciclos, donde cada uno posee un mínimo de tres etapas. La primera, en torno a los 95°C, permite la separación de los ácidos nucleicos de doble cadena; la segunda, a una temperatura en torno a los 50°C-60°C, facilita el alineamiento de los cebadores al ADN molde y la tercera, a 68°C-72°C, permite la polimerización por parte de la ADN polimerasa. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real, es decir, PCR inmediata o simultánea.<sup>(45)</sup>

### **2.8.3.3 Aplicación de la PCR en tiempo real para el diagnóstico de la brucelosis**

Desde que en 2001 Redkar *et al.*, publican el primer ensayo basado en la técnica de PCR en tiempo real para la detección de ADN de *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* y *Brucella suis* se han sucedido varios ensayos que permiten la detección y/o cuantificación de ADN de *Brucella* spp. La tabla 2 muestra cronológicamente las principales investigaciones realizadas a nivel internacional con respecto a la aplicación de la PCR en tiempo real en el diagnóstico de brucelosis humana.<sup>(33)</sup>

En resumen, los principales genes dianas para la detección de brucelosis mediante la PCR incluyen aquellos que están en las proteínas de la membrana externa, la secuencia 16S del ARNr, las regiones espaciadoras 16S y 23S, los genes de mantenimiento, los genes de utilización de eritritol y las secuencias de inserción. Mediante las variantes de PCR, se han identificados estos genes a partir tanto de aislados como de muestras clínicas. La PCR muestra en estos ensayos un límite de detección que oscila desde un 10 y hasta 100 fg del ADN genómico bacteriano, lo que equivale a la detección de 10 a 7 000 células de brucelas por mililitro de sangre total o leche.<sup>(34)</sup>

Tabla 2. Principales investigaciones realizadas a nivel internacional con respecto la aplicación de la PCR en tiempo real en el diagnóstico de brucelosis humana.

Referencias	Cebadores/Diana	Sistemas de detección de fluorescencia	Género y especie
RedKar 2001*	c.s. común-específico de especie/ IS711 s.a.	Sondas FRET	<i>Brucella abortus</i> , <i>Brucella melitensis</i> , <i>Brucella suis</i>
Newby 2003*	BAF-BAR/alkB-IS711	Sondas FRET, sondas Taqman, SybrGreen I	<i>Brucella abortus</i> .
Sohn 2003*	B4-B5/BCSP31	Sondas Taqman	<i>Brucella</i> spp
Probert 2004*	c.s. común-específico de especie/ BCSP31 s.a.	Sondas Taqman	<i>Brucella</i> spp
	c.s. común-específico de especie/ IS711 s.a.	Sondas Taqman	<i>Brucella abortus</i>
	c.s. común-específico de especie/ IS711 s.a.	Sondas Taqman	<i>Brucella melitensis</i>
Al-Dahouk 2007*	B4-B5/BCSSP31	Sondas FRET	<i>Brucella</i> spp
Kattar 2007	Bru ITS-S-Bru 24 ITS-A/ 16S-23S ITS	Sondas FRET	<i>Brucella</i> spp
	Bru-25-S-Bru-24-A/Omp25	Sondas FRET	<i>Brucella</i> spp. (excepto <i>Brucella abortus</i> )
	Bru-31-F-Bru-31-A/Omp31	Sondas FRET	<i>Brucella</i> spp.
Bounaadja 2009*	IS421-IS511/IS711	Sondas Taqman	<i>Brucella</i> spp.
	BCSP11	Sondas Taqman	<i>Brucella</i> spp.
	63-BCSP1199/BCSP31 Per525-Per575/per	Sondas Taqman	<i>Brucella</i> spp.
Queipo-Ortuño 2009	B1-B2/BCSP31	Sondas FRET	<i>Brucella</i> spp., <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Surucuoglu 2009	RBGD kit	RBGD kit	<i>Brucella</i> spp.

Leyenda: \*: testado en cultivo puro; c.s.: cebador sentido; c.a.: cebador antisentido para la amplificación de una secuencia de 113 bp de *B. abortus*, 252 pb de *B. melitensis* y 170 pb del IS711 de *B. suis*; BAF-BAR: para una secuencia de 156 pb de *B. abortus* que incluye el gen alkB y el IS711; B4-B5: para 223 pb del gen BCSP31; bruc1-bruc2: para una secuencia del gen *per* (perosamina sintetasa de *Brucella* spp.); EFQ1-ERQ2: para 251 pb de *B. melitensis*; Bru ITS-S-Bru ITS-A: para 147 pb de la secuencia espaciadora 16S-23S ITS; Bru 25-S-Bru 25-A:141 pb de Omp25; Bru 31-F-Bru 31-R: para 281 pb de *Omp31*; IS421- IS511: para 178 pb de IS711 de *Brucella* spp.; BCSP1163-BCSP1199: para 55 pb de BCSP31 *Brucella* spp.; Per525-Per575: para 68 pb de *per* de *Brucella* spp.; B1-B2:para 207 pb de BCSP31 de *Brucella* spp; RBGD kit: *RoboGene Brucella Detection kit*.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

#### **3.1 Diseño y periodo de estudio.**

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en el periodo comprendido entre enero de 2012 y junio de 2023.

#### **3.2 Marco de la investigación**

Las investigaciones se efectuaron en LNRLB-IPK. Este laboratorio realiza numerosas actividades asociadas a la vigilancia, referencia y diagnóstico microbiológico especializado. Además posee el equipamiento tecnológico necesario para brindar estos servicios y enfrentar contingencias relacionadas con esta enfermedad infectocontagiosa.

#### **3.3 Universo de estudio**

Cuatro mil novecientos setenta y seis pacientes sospechosos de brucelosis humana cuyas muestras llegaron al LNRLB del IPK en el periodo comprendido entre enero de 2012 y junio de 2023.

#### **3.4 Muestras:**

Las muestras a utilizar en la presente investigación, según los objetivos trazados y para su mejor comprensión, se agruparon como sigue:

Grupo I: 4959 sueros, 12 sangres totales, 4 LCR y un tejido de hígado, obtenidas de pacientes cubanos sugestivos de brucelosis, que cumplieron con los siguientes requisitos:

- Remitidos desde sus provincias al LNRLB en el periodo de estudio.
- Acompañados con la información clínica epidemiológica pertinente en las solicitudes de diagnóstico o en los modelos para la recolección de información.
- Que cumplieron con el criterio de no exceder los 30 días entre la fecha de inicio de síntomas clínicos con respecto a la fecha de toma de muestra.

Grupo II: 199 pacientes con brucelosis, que cumplieron con los siguientes requisitos:

- Remitidos desde sus provincias y confirmados en el LNRLB durante el periodo de estudio.
- Acompañados con la información clínica epidemiológica pertinente en las solicitudes de diagnóstico o en los modelos para la recolección de información.
- Que cumplieron con el criterio de no exceder los 30 días el intervalo que medie entre la fecha de inicio de síntomas clínicos con respecto a la fecha de toma de muestra.

Grupo III: 22 sueros que procedieron de pacientes pediátricos sugestivos de brucelosis, que cumplieron con los siguientes requisitos:

- Remitidos desde sus provincias al LNRLB en el periodo de estudio.
- Acompañados con la información clínica epidemiológica pertinente en las solicitudes de diagnóstico o en los modelos para la de recolección de información.
- Negativos al aplicarles los métodos serológicos de ELISA-IgM, ELISA-IgG *Brucella*, y la PCR a punto final *bcsp*, según los PNO del LNRLB (ver Anexos 1, 2 y 3).

### **3.5 DNA de referencia:**

Como material genómico de referencia positivo en la PCR *bcsp*, se utilizó un ADN de referencia derivado de la cepa *Brucella abortus* ATCC 1119-3, donado gentilmente por el Instituto Gorgas de Panamá. Mientras que para la PCR en tiempo real de Sacase, se utilizaron los DNA controles que posee el estuche comercial.

### **3.6 Procedimientos**

Para la confirmación se utilizaron los estuches serológicos comercializados por la firma VIRCELL, S.L. de Granada, España, y los procedimientos de estas técnicas se realizaron según las indicaciones del fabricante. (Consultado en 2020: Vircell SL. [www.vircell.com](http://www.vircell.com)).

#### **3.6.1 Métodos empleados en esta investigación**

##### **3.6.1.1 Técnica ELISA-IgM anti-*Brucella***

Para la preparación de la placa de ELISA, se añadieron 100 µL de diluyente en los pocillos correspondientes y seguidamente 5 µL del suero problema, 5 µL del control positivo, 5 µL del suero cut off (en duplicado) y 5 µL de control negativo.

La placa así conformada se agitó por dos minutos, garantizando homogenizar los reactivos. Después se tapó con lámina adhesiva y se incubó en incubadora a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo la lámina adhesiva se retiró y se aspiró el contenido de todos los pocillos, lavándose cada uno de ellos cinco veces con 0,3 mL de solución de lavado, asegurándose de no dejar restos de la solución de lavado. A continuación, se añadieron 100 µL de conjugado humano IgM a todos los pocillos, se tapó nuevamente la placa con lámina adhesiva y se incubó en incubadora a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos. Al final se retiró la lámina adhesiva, se aspiró el contenido de todos los pocillos y se lavó cinco veces con 0,3 mL de solución de lavado para añadir a continuación 100 µL de solución de sustrato a todos los pocillos. La reacción se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos y transcurrido este tiempo se le añadieron a cada pocillo 50 µL de solución de parada. Los resultados finales fueron leídos espectrofotométricamente a 460- 620nm, antes de una hora de terminado el ensayo.

Los resultados fueron interpretados de la siguiente manera:

Muestra no valida (indeterminada): son aquellas con resultados dudosos (índice de anticuerpos entre 9 y 11).

Muestra negativa: son aquellas con índice de anticuerpos inferior a 9. Estas muestras no tienen anticuerpos específicos frente a *Brucella* de tipo IgM.

Muestra positiva: son aquellas con índice de anticuerpos superior a 11. Estas muestras tienen anticuerpos específicos frente a *Brucella* de tipo IgM.

### **3.6.1.2 Técnica ELISA-IgG anti-*Brucella*.**

Para la preparación de la placa de ELISA se añadieron 100 µL de diluyente en los pocillos correspondientes y seguidamente 5 µL del suero problema, 5 µL de control positivo, 5 µL del suero cut off (en duplicado) y 5 µL de control negativo.

La placa así conformada se agitó por dos minutos, garantizando homogenizar los reactivos. Después se tapó con lámina adhesiva y se incubó en incubadora a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo la lámina adhesiva se retiró y se aspiró el contenido de todos los pocillos, lavándose cada uno de ellos cinco veces con 0,3 mL de solución de lavado, asegurándose de no dejar restos de la solución de lavado. A continuación, se añadieron 100 µL de conjugado humano IgG a todos los pocillos, se tapó nuevamente la placa con lámina adhesiva y se incubó en incubadora a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos. Al final se retiró la lámina adhesiva, se aspiró el contenido de todos los pocillos y se lavó cinco veces con 0,3mL de solución de lavado para añadir a continuación 100 µL de solución de sustrato a todos los pocillos. La reacción se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos y transcurrido este tiempo se le añadieron a cada pocillo 50 µL de solución de parada. Los resultados finales fueron leídos espectrofotométricamente a 460-620nm, antes de una hora de terminado el ensayo.

Los resultados fueron interpretados de la siguiente manera:

Muestra no valida (indeterminada): son aquellas con resultados dudosos (índice de anticuerpos entre 9 y 11).

Muestra negativa: son aquellas con índice de anticuerpos inferior a 9. Estas muestras no tienen anticuerpos específicos frente a *Brucella* de tipo IgG.

Muestra positiva: son aquellas con índice de anticuerpos superior a 11. Estas muestras tienen anticuerpos específicos frente a *Brucella* de tipo IgG.

### 3.6.1.3 PCR a punto final (PCR *bcs*)

La PCR *bcs* amplificó un fragmento de 223 pb del gen que codifica para la proteína inmunogénica de la membrana externa de 31 kDa BCSP (del inglés: *Brucella Cell Surface Salt-Extractable Protein*), la cual se encuentra conservada en todas las especies y biovariedades del género *Brucella*.<sup>(46)</sup>

**Extracción de ADN:** El ADN de los sueros y las sangres totales, se extrajeron siguiendo las instrucciones del estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania) (ver Anexo 1). La concentración y calidad del ADN se verificó por espectrofotometría (BioPhotometer plus (Eppendorf, Alemania)).

**Cebadores:** se utilizaron los cebadores descritos por Lugo y cols, 2022. Cuyas secuencias fueron: **B<sub>4</sub>**: 5'-TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA-3' y **B<sub>5</sub>**: 5'-CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG-3'. Los mismos fueron sintetizados en el CIGB.

**Mezcla de reacción:** se preparó para un volumen final de 25 µL. Sus componentes fueron: 2,5 µL de tampón PCR 10X; 0,5 µL de deoxinucleótidos-trifosfato al 10 mM; 2,5 µL de colorante 10X; 1,25 µL de cada cebador (10 µM); 0,125 µL de la enzima *Taq* polimerasa (5 U/ µL) (QIAGEN, Alemania); volumen suficiente de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril y 5 µL de la muestra de ADN.

**Programa de amplificación:** contó con un ciclo de desnaturalización inicial a 93°C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 90°C por un minuto, hibridación a temperatura de 60°C por un minuto y extensión a 72°C por un minuto; con una extensión final a 72°C durante diez minutos. En cada ensayo se utilizó como control negativo agua ultra pura estéril y como positivo extracto de ADN de *Brucella abortus* ATCC 1119-3.

**Análisis de los productos amplificados:** los productos de ADN fueron analizados en geles de agarosa al 1,2 % con bromuro de etidio como agente intercalante, utilizando como tampón de corrida TBE al 1X. Se empleó una cámara electroforética OA 110 (EiEtRofoR, Italia) acoplada a la fuente de electroforesis EFD 300 (EiEtRofoR, Italia), ajustada a una diferencia de potencial de 100 V durante 60 minutos. Los amplicones se visualizaron en un fotodocumentador UVP Transilluminator (analytikjena, USA), usando como patrón de peso molecular la

escala de 100 pb (Promega, USA). Se consideró positivo cuando se observó el patrón de fragmento de talla de las 223 pb.

#### **3.6.1.4 PCR en tiempo real cualitativa que amplifica el gen WboA presente en *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella canis*, *Brucella ovis* y *Brucella suis*.**

El estuche *Brucella* Real-TM utilizado pertenece a la firma SACASE. Este es una prueba de "amplificación por PCR en tiempo real" para la detección cualitativa el gen WboA que está presente en las especies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, y *B. canis*, a partir de muestras de sangre total, sueros, tejidos, etc.

El kit *Brucella* Real-TM (SACASE) se basó en dos procesos principales: la extracción del ADN a partir de las muestras y la amplificación en tiempo real de este ADN utilizando cebadores y sondas con un colorante indicador fluorescente específico para el ADN de *Brucella* spp. El estuche brinda un control interno (IC) que sirvió como control de amplificación para cada muestra procesada y para identificar una posible inhibición de la reacción.

Se realizaron los procedimientos sugeridos por el fabricante (SACASE) para la preparación de las muestras y los reactivos, así como la amplificación del ADN. La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 25 µL.

La amplificación y análisis de los resultados se realizó en el equipo Rotor Gene Q 5-Plex-HRM (Qiagen, Alemania), utilizando un programa de un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 10 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 65°C durante 25 segundos, 72°C a 10 segundos y otros 35 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 56°C por 25 segundos con lectura de fluorescencia en el canal verde y una extensión final a una temperatura de incubación de 72°C por 10 segundos.

Curvas estándar y eficiencia:

La curva estándar fue generada por el método de análisis de Puntos de Ajuste, con el número de puntos de ajuste establecidos. Se usó la concentración de una serie de dilución del estándar o el modelo de referencia de ADN (*B. abortus*) que se representó en función del número de ciclos en los que la señal fluorescente aumente por encima del fondo o del umbral, conocido como el valor Ct (cycle threshold, siglas del inglés).

La pendiente de la curva estándar generada para cada enfoque de detección se ingresó en la siguiente ecuación para determinar la eficiencia de la reacción: eficiencia =  $10^{- (1 / \text{pendiente})}$ .

La visualización de los resultados se realizó mediante el softwareRGQ versión 2.3.1.49. Para la interpretación de los mismos, se tuvo en cuenta los valores del ciclo umbral (Ct).

Interpretación de los resultados:

Positivo: El ADN de *Brucella* se detectó en una muestra, si su valor de Ct  $\leq 33$ , definido en la cuadrícula de resultados en el Canal JOE (amarillo) / HEX / Cy3.

Negativo: El ADN de *Brucella* no se detectó en una muestra, si su valor Ct no está definido en la cuadrícula de resultados en el JOE (amarillo) / HEX / Cy3 (la curva de fluorescencia no cruza la línea de umbral) y el valor de Ct es  $< 31$ .

Invalidado: El resultado no es válido si el valor Ct cae en el rango de  $0 > 31$ , en la cuadrícula de resultados (la curva de fluorescencia no cruza la línea de umbral) en el canal FAM / Green. En este supuesto, la PCR-RT debe repetirse a partir de la extracción de ADN.

Para la describir la distribución temporo-espacial de las muestras y casos positivos a brucelosis, se calcularon las frecuencias absolutas y los porcentajes para posteriormente mapearlos por provincias, según las regiones geográficas del país.

### 3.6.2 Operacionalización de las variables:

Para la recopilación de los datos de los pacientes, se revisaron la información contenida en las solicitudes de diagnóstico y/o en los modelos para la de recolección de información, disponibles en el LNRLB-IPK.

Las variables operacionales fueron:

Variable	Clasificación	Categoría de la escala	Definición de las categorías de la escala
Edad	Cuantitativa ordinal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\leq 5</math></li> <li>- 6 – 10</li> <li>- 11-15</li> <li>- 16-18</li> <li>- 19 – 59</li> <li>- <math>\geq 60</math></li> </ul>	Se consideró la edad en años cumplidos.
Sexo	Cualitativa nominal dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Masculino</li> <li>- Femenino</li> </ul>	Según sexo biológico
Labor que realiza	Cualitativa nominal politómica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ganadero (a)</li> <li>- Veterinario (a)</li> <li>- Laboratorista</li> <li>- Trabajador (a) de matadero</li> <li>- Otra profesión</li> </ul>	Según la labor que desempeñe el individuo.
Contacto directo con animales	Cualitativa nominal politómica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vacas</li> <li>- Ovejas</li> <li>- Cabras</li> <li>- Caballos</li> <li>- Perros</li> <li>- Otros animales</li> <li>- No contacto con animales</li> </ul>	Se considerará cómo contacto directo el vínculo laboral o afectivo con los animales mencionados.
Consumo de derivados de la leche (leche, yogurt, mantequilla, etc.)	Cualitativa nominal dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sí</li> <li>- No</li> </ul>	En dependencia de la existencia o no de consumo de alguno o de todos los alimentos mencionados.
Síntomas clínicos presentes	Cualitativa nominal politómica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiebre</li> <li>- Sudoración profusa</li> <li>- Cefalea</li> <li>- Dolores musculares</li> <li>- Dolores articulares</li> <li>- Debilidad</li> <li>- Otros síntomas</li> </ul>	Se tomarán en consideración él o los síntomas presentes en el paciente

Tiempo de duración de los síntomas	Cualitativa nominal politómica	- Días - Meses - Años	Se tendrá en consideración el tiempo durante el cual el paciente haya estado presentando los síntomas sugestivos de brucelosis.
Existencia de complicaciones	Cualitativa nominal politómica	- Artritis - Espondilitis - Meningoencefalitis - Convulsiones - Epididimitis - Glomerulonefritis - Endocarditis - Uveítis - Cataratas - Otras	Según refieran los pacientes presentar o haber presentado alguna de estas entidades al unísono o luego de los síntomas sugestivos de brucelosis

### 3.7 Análisis estadístico

La información de la investigación se introdujo en Bases de Datos diseñadas al efecto empleando el programa Excel (Microsoft Office). Para el análisis de la información se utilizó el paquete estadístico EPIDAT 4.0.

El procesamiento de los datos se llevó a cabo utilizando medidas de estadística descriptiva como frecuencias absolutas y porcentajes.

### 3.8 Consideraciones éticas

Durante la realización de la investigación se respetaron estrictamente las siguientes cuestiones éticas:

- Se cumplieron las medidas de bioseguridad establecidas para el trabajo y manipulación de microorganismos y muestras según los niveles de riesgo establecidos por la Comisión Nacional de Seguridad Biológica en la Resolución 38/2006.

- Todas las etapas de la investigación, estuvieron comprendidas en un Proyecto Institucional aprobado cuyo título es: "Vigilancia serológica-molecular de Leptospirosis y Brucelosis en provincias cubanas", con código: PnoAP 21006.

- La información se conservó con carácter confidencial. No se reveló la identidad de los individuos a los que se les estudiarán sus muestras clínicas. Los resultados de las pruebas de laboratorio fueron enviados, por las vías establecidas del MINSAP e IPK, y se utilizó solo con fines científicos por el equipo de investigación.
- Toda la información relacionada con esta investigación se almacenó en formato electrónico, y se protegió en salvas en el LNRLB-IPK. La información, estuvo disponible para los investigadores del estudio.
- Los resultados obtenidos, una vez procesados, pudieran ser presentados en eventos científicos o publicados en revistas nacionales o internacionales; y en cuyas autorías se colegiará el nivel de participación de los diferentes especialistas implicados.
- Los resultados obtenidos durante la investigación contribuyeron al fortalecimiento de la vigilancia de la brucelosis humana en Cuba, y al Programa de Zoonosis Cubano.

### **3.9 Limitaciones del estudio**

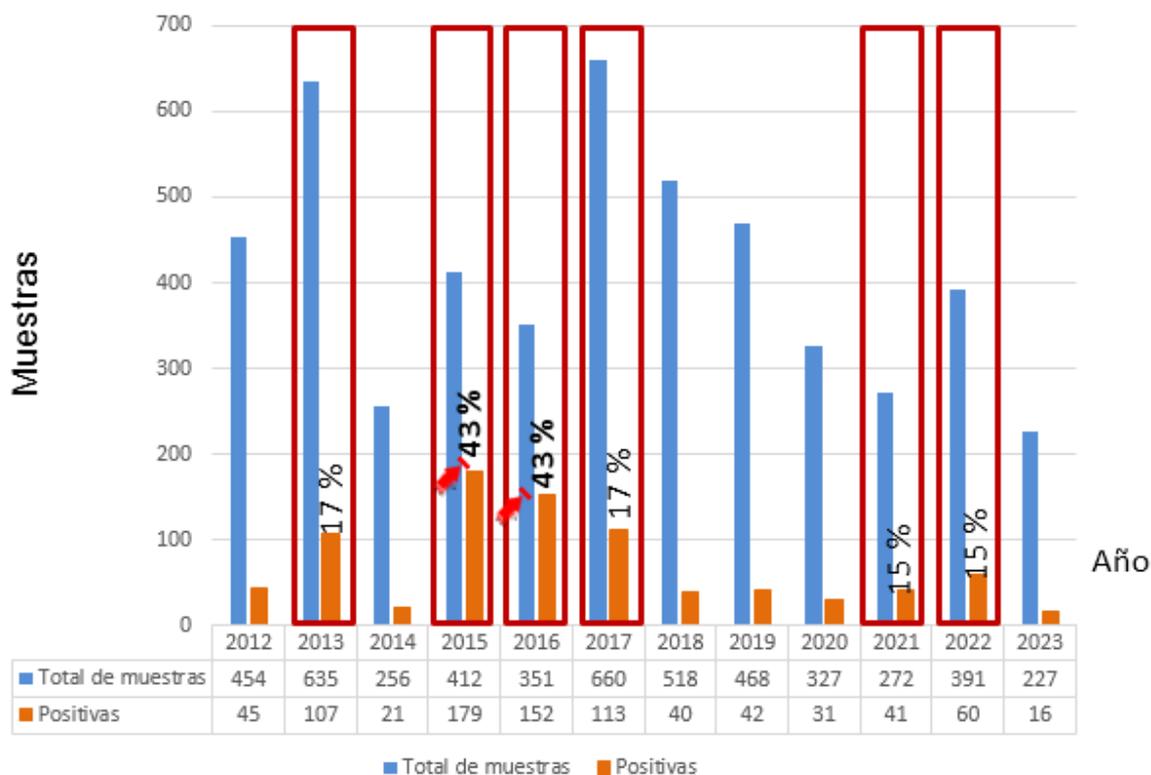
La presente investigación estuvo limitada por la no disponibilidad de la información clínica epidemiológica necesaria que acompaña a las solicitudes del diagnóstico de muchos casos sospechosos y confirmados, lo que constituyó un criterio de exclusión, que hizo fuera inferior el número de muestras incluidas de cada grupo de estudio.

Por otra parte, la cantidad insuficiente de muestra clínica invalidó su uso en algunos pacientes que pudieron haber conformado el estudio.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la positividad a *Brucella* spp. en muestras clínicas de los casos cubanos sospechosos (2012-junio 2023). Nótese que en todos los años fue superior el número de muestras recibidas con respecto a las que resultaron positivas.

De las 4976 muestras recibidas en el periodo, 847 resultaron positivas por serología o PCR, para un 17 %. En particular, los años 2015 (179/412) y 2016 (152/351) fueron los de mayor positividad con el 43 %, respectivamente, siguiéndoles en orden decreciente los años 2017 y 2013 con un 17% [(114/660) y (107/635), cada uno]. Por último, nótese que la positividad fue inferior en los restantes años, 2021 (41/272) y 2022 (60/391) con un 15 %; el año 2012 con un 10% (45/454); 2019 (42/468) y 2020 (31/320) con el 9 %; 2014 (21/256) y 2018 (40/518) con el 8 %; y hasta junio de 2023 (16/227) con un 7 %.



Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

**Figura 1. Positividad a *Brucella* spp. en muestras clínicas de los casos cubanos sospechosos (2012-junio 2023)**

Motta y cols. exponen valores de seropositividad por el sistema ELISA por debajo del 10 %, en un estudio realizado del 2007 al 2009 en pacientes con brucelosis, lo que indica, según los autores, poca eficacia del programa llevado a cabo en el departamento del Caquetá, Colombia.<sup>(47)</sup> Apréciase que la positividad serológica molecular que se alcanza es inferior a la reportada en este estudio, lo cual pudiera deberse a que en Cuba existe una búsqueda activa de la enfermedad.

Por otro lado, Jiang y cols. (2019) en China, reportan un 48,4 % (208/ 430) de positividad mediante cultivo. Este procedimiento con una moderada sensibilidad, pero elevada especificidad, constituye la prueba de oro, a pesar de ser un método laborioso y riesgoso para el laboratorista. El éxito de contar con el aislado permite de forma irrefutable confirmar la infección, así como realizar estudios bioquímicos y genéticos que aportan al conocimiento epidemiológico de la enfermedad.<sup>(48)</sup> Consideramos que las diferencias pueden responder al hecho de que en el estudio que se realiza en China el cultivo se aplica a muestras de pacientes en los que se sospechan complicaciones de la brucelosis, mientras que en la presente data de estudio se trabaja con muestras clínicas de casos sospechosos.

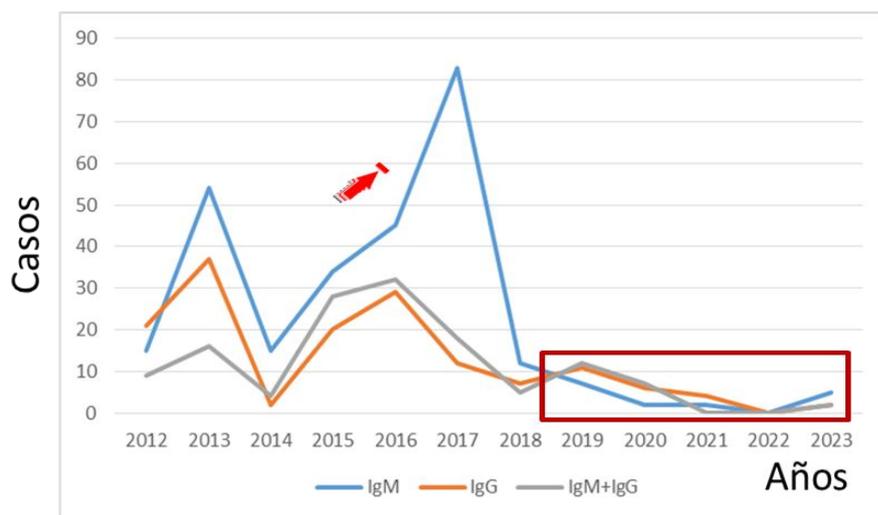
En Cuba, Plascencia y cols. En 2020 realizan un estudio de vigilancia serológica en 1289 sueros de pacientes sospechosos de la enfermedad, entre los años 2016 y 2019, con lo que encuentran un 49 % (635/1289) de seropositividad mediante la aplicación de los ELISA-IgM y ELISA-IgG para *Brucella*.<sup>(49)</sup> Las diferencias encontradas con nuestros resultados pueden deberse a los periodos analizados en ambos estudios y a la existencia (en este caso) de la etapa pandémica, durante la cual se prioriza la vigilancia del SARCOV-2 por sus implicaciones epidemiológicas en el contexto nacional e internacional. Además, es importante señalar que no estuvieron establemente disponibles los estuches serológicos de ELISA durante todos los años del estudio. Particularmente en el 2020, 2021 y 2022, se agotaron los reactivos y el diagnóstico, en el LNRLB-IPK, se verticaliza únicamente hacia los métodos moleculares. En la etapa pandémica muy pocas muestras se reciben de provincia y las que llegaban en mayor cantidad, procedían de la provincia de La Habana.

La figura 2, muestra la positividad serológica en las muestras clínicas de los casos cubanos con brucelosis, según tipo de anticuerpo y año de estudio (2012-junio 2023). Destáquese que de los 558 sueros positivos a brucelosis, el 5,5 % (274/4959) presentó anticuerpos de la clase IgM, el 3 % (151/4959) de la clase IgG y el 2,6 % (133/4959) presentó ambas inmunoglobulinas.

Por otra parte, el comportamiento de la detección de la IgM, según años de vigilancia, mostró que durante el año 2017 fueron detectados 83 casos positivos, siguiéndole en orden decreciente el 2013 con 54, el 2016 con 45, el 2015 con 34, mientras que el 2014 y 2012 se presentaron con 15 cada uno. A partir del 2018, las cifras obtenidas fueron inferiores a las comentadas.

Por otra parte, el comportamiento de los casos con anticuerpos IgG presentó en el 2012, 2013, 2015 y 2016 las mayores cifras de positividad, con 21, 37, 20 y 29 casos respectivamente. Sin embargo, la positividad de los casos con anticuerpos IgM+IgG mostró que la mayor cantidad de positivos correspondió a los años 2016 con 32 pacientes, 2015 con 28, 2017 con 18 y 2013 con 16 enfermos.

De manera global, hasta el año 2018 se obtuvieron las cifras más altas de pacientes con la presencia de IgM e IgG, aunque prevalecieron los casos con inmunoglobulina de la clase M. Posterior a este momento, se observó una disminución considerable en la detección de estos anticuerpos por los sistemas confirmatorios de ELISA para brucelas, mientras que a partir del año 2022, se observó un ligero incremento de la detección de la IgM.



Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

**Figura 2. Positividad serológica en las muestras clínicas de los casos cubanos con brucelosis, según tipo de anticuerpo y año de estudio (2012-junio 2023).**

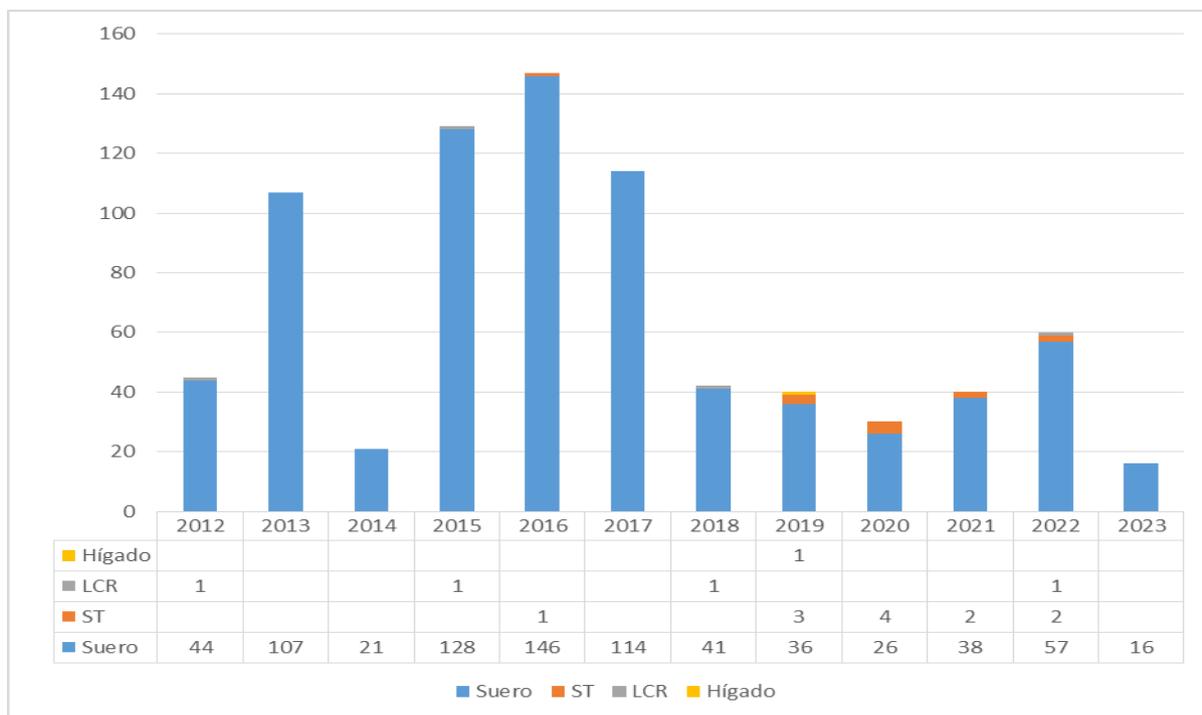
Los sistemas ELISA IgM e IgG para *Brucella* están comercialmente disponibles, son rápidos y tienen altos valores de desempeño para la detección de anticuerpos específicos (IgM o IgG) que se desarrollan durante la infección por este microorganismo. En un estudio realizado en Chile en el año 2008, se constata que de 10 pacientes sospechosos de brucelosis y estudiados por los sistemas ELISA-IgM y ELISA-IgG, ocho resultan positivos por ELISA-IgG para un 80 % y cinco por el ELISA-IgM, para un 50 %.<sup>(50)</sup> Los resultados de esta investigación discrepan de los obtenidos por Aranís y cols., lo cual puede atribuirse a la diferencia del tamaño de de la muestra. En el estudio del autor de referencia no se reporta la presencia de casos donde simultáneamente se detecten las dos clases de inmunoglobulinas (M y G), lo que sucedió en esta tesis.

Guzmán-Bracho y cols., en 2019, reportan que la frecuencia de resultados positivos para la prueba ELISA-IgG es del 51,6 % (288/558).<sup>(51)</sup> Este resultado es superior al obtenido en la presente investigación (3 %). Consideramos que esta discrepancia puede deberse, también, a que el tamaño de la muestra utilizada por estos autores es inferior a la que empleamos en la presente investigación y, como se expresó anteriormente, a la no disponibilidad de los estuches comerciales de los ELISA durante un periodo de la presente investigación.

De igual manera, Xu y cols., en 2023 en China, detectan un 88,37 % de positividad frente a la inmunoglobulina IgG y un 74,42 % frente a la IgM. Al medir simultáneamente ambas inmunoglobulinas observan un incremento de la positividad hasta la cifra del 98,84 %. Estos investigadores enfatizan que la combinación de varias pruebas serológicas resulta útil para el diagnóstico<sup>(52)</sup> criterio que es compartido con el colectivo de autores de la presente tesis.

Por otra parte, en Cuba, Lugo en 2017 valida una microtécnica del FAB para la pesquisa de anticuerpos contra *Brucella* spp. y a los sueros positivos por esta técnica les aplica para su confirmación los sistemas ELISA-IgM y ELISA-IgG. Esta autora notifica que el 44 % (124/282) de sueros reactivos logran ser confirmados por uno o los dos sistemas ELISA aplicados.<sup>(39)</sup> Los resultados de la presente investigación (11 % de positividad) son inferiores a los obtenidos por esta autora, no obstante, ambos estudios ratifican la utilidad, sensibilidad y especificidad de los sistemas ELISA en el diagnóstico de la brucelosis humana. Por otra parte, Plascencia y cols. en el año 2020 realizan en Cuba una investigación en la que revisan las bases de datos de las muestras llegadas al laboratorio para el diagnóstico de brucelosis humana entre los años 2016 y 2019. Ellos comentan que de 1289 sueros a los que se les aplicaron los ELISA el 49 % resultó positivo y que de los positivos el 65 % presentaba inmunoglobulina M y el 11,5 % G.<sup>(49)</sup> Este resultado es superior al que se obtiene en la presente investigación y consideramos que la diferencia puede deberse a que durante el periodo de tiempo en el que Plascencia y cols. realizaron su investigación todos los estuches serológicos destinados para el diagnóstico de la enfermedad estaban disponibles en el laboratorio de referencia del IPK. No obstante, es de destacar la prevalencia de la detección de la inmunoglobulina M en ambas investigaciones, lo que indica que la mayoría de los casos sospechosos se diagnostican en la fase aguda de la enfermedad.

El análisis de la positividad por la PCR *bscp*, según muestras clínicas de los casos cubanos con brucelosis (2012-junio 2023), se muestra en la figura 3, donde se puede apreciar que el suero resultó ser la muestra clínica con mayor positividad [16 % (774/4959)], siguiéndole en orden decreciente la sangre total con 12 muestras positivas, así como el LCR y el tejido de hígado, con una muestra positiva, cada uno.



Años

Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

**Figura 3. Positividad mediante la PCR *bscp*, según muestras clínicas de los casos cubanos con brucelosis y años de estudio (2012-junio 2023).**

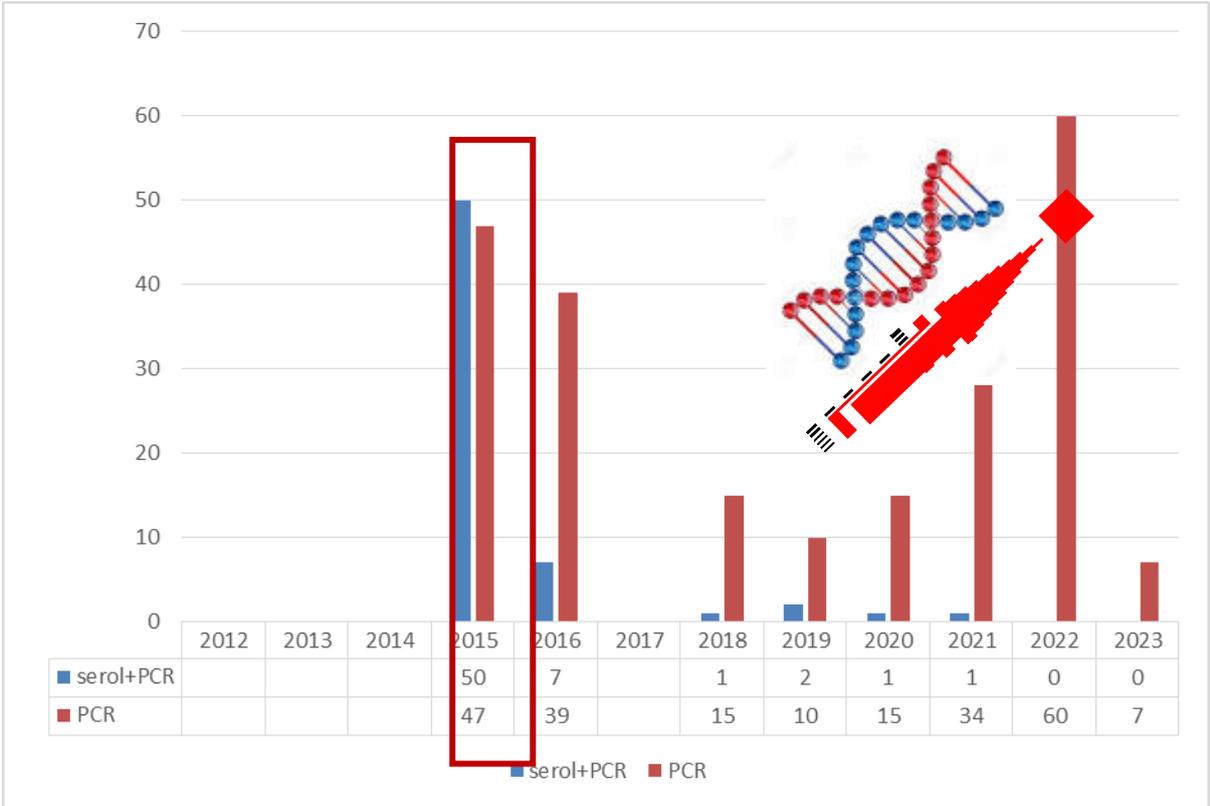
Según Gemechu y cols., en el 2011 en la India, la notificación temprana de casos es posible mediante pruebas rápidas como la PCR. Por tanto, esta herramienta de diagnóstico es prometedora para la investigación de rutina y en vigilancia de la brucelosis, que es el elemento clave para la gestión de programas de prevención y control. Pero para hacer un diagnóstico preciso es necesario considerar la muestra clínica óptima, el volumen a utilizar, y el protocolo de extracción de ADN. En su estudio, los resultados muestran que en ocho (7 %) la PCR es positiva (considerando un límite de detección de 715 ufc/ml). Esta PCR tiene una precisión del 51,3 %, una sensibilidad del 12,6 % y una especificidad del 100 %.<sup>(53)</sup> Los resultados de esta tesis superan a los descritos por este autor hindú, a pesar de la diferencia marcada en el número de muestras utilizadas en ambos estudios y de que los dos países son endémicos de la enfermedad, se comprueba la superioridad en los resultados de esta investigación lo que puede deberse a la disponibilidad de al menos de un método de laboratorio para el diagnóstico de enfermedad en Cuba.

En Venezuela (2015) Zambrano y cols., con el objetivo de evaluar el nivel de aplicación de las medidas establecidas en el Programa nacional de control de la brucelosis bovina en la provincia Manabí, aplican una encuesta epidemiológica en 20 unidades afectadas y 20 unidades no afectadas por brucelosis (todas seleccionadas al azar), en el periodo de noviembre de 2014 a marzo de 2015. Como resultado encuentran un 19,2 % de positividad mediante la PCR que utiliza los oligonucleótidos F4 y R2, los cuales amplifican la región 16S del ARNr de *Brucella* spp.<sup>(54)</sup> Los resultados de una y otra investigación están cercanos entre sí, lo que es de esperar porque las dianas moleculares de las dos PCR responden a la identificación del género *Brucella* con elevada sensibilidad y especificidad.

Álvarez-Ojeda y cols. en México, en el año 2015, Compararan, en cuanto a sensibilidad y especificidad, la prueba PCR, para la detección de *Brucella* spp., en muestras de sangre humana, con respecto al hemocultivo y las técnicas serológicas Rosa de Bengala (RB), aglutinación estándar en placa (MAP) y 2-mercaptoetanol (2-ME), todas establecidas en la NOM 022-SS2-1994. Ellos aplicaron la PCR que amplifica un fragmento de 223 pb de la secuencia que codifica para una proteína de 31 kDa específica del género *Brucella* en 92 sangres totales de pacientes de un brote epidémico que ocurre en los municipios de Anáhuac y Sabinas Hidalgo, Nuevo León y detectan 23 positivas, lo que representa un 25 % de las estudiadas, por lo que concluyen que la sensibilidad y la especificidad son bajas con respecto a las técnicas serológicas, situación contraria cuando se compara la técnica molecular con el cultivo microbiológico.<sup>(55)</sup>

Lugo y cols., en el año 2022 (Cuba), reportan la introducción de una PCR *bcsp* y su aplicación a los casos negativos serológicamente en Cuba. Sus resultados demuestran que de los 86 sueros negativos a las técnicas serológicas, (extraídos en los primeros 30 días de iniciado el cuadro clínico) un 85 % (73/86) resultan positivos por la PCR *bcsp*. Estos autores destacan que las técnicas moleculares, y en particular la PCR *bcsp* para la detección de ADN de *Brucella*, resultan más sensibles que el cultivo, y más específicas que las técnicas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad aguda. De igual manera, ofrecen resultados importantes en el diagnóstico de los pacientes con recaídas y de los que transitan a la enfermedad crónica.<sup>(56)</sup>

La figura 4 demuestra la positividad alcanzada al emplear combinadamente los métodos serológicos con la PCR *bscp*, en contraposición con el empleo únicamente de la tecnología molecular (PCR *bscp*), en las muestras clínicas de los casos con brucelosis (2012-junio 2023). Como se observa en el 2015, se alcanzaron altas cifras de muestras positivas tanto al usar los métodos serológico junto a la PCR *bscp* como cuando se usó únicamente el método molecular. Sin embargo, a partir del 2016, la situación diagnóstica varía y predomina el uso de la PCR *bscp* para la confirmación de los casos con brucelosis. Esta situación se mantuvo hasta inicios de enero del 2023.



Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

**Figura 4. Positividad mediante la serología y la PCR *bscp* vs. PCR *bscp* únicamente, en las muestras clínicas de los casos cubanos con brucelosis (2012-junio 2023).**

En sus inicios, el diagnóstico serológico de la brucelosis se realizaba mediante tres pruebas clásicas, conocidas como la prueba Rosa de Bengala, la prueba de seroaglutinación estándar en tubo (SAT) (o la prueba de Wright) y la prueba de Coombs anti-brucelas. Estas técnicas mostraron buenos resultados en pacientes con brucelosis aguda, pero presentan falsos negativos cuando el paciente cursa por la fase crónica de la enfermedad. Para el diagnóstico de los casos con brucelosis crónica es necesario contar con la Prueba de Coombs indirecta, la que demuestra la presencia de anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes, fundamentalmente de la clase IgG.<sup>(49)</sup>

Todas las pruebas serológicas mencionadas utilizan como antígeno células lisas de *B. abortus* 1119-3 y 99S, que permiten detectar anticuerpos dirigidos contra la cadena-O del LPS de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*. No obstante, se observa reacción cruzada con *Y. enterocolitica* O:9 pero también con *Franciscella tularensis*, *Afilia clevelandensis*, *Escherichia hermanni*, *E. coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Steanotrophomonas maltophilia*. Además, durante la epidemia del cólera en América Latina en 2013, se demostró reacción cruzada entre *Vibrio cholerae* y *Brucella* spp. de forma significativa y en los vacunados contra el cólera se observan reacciones falsas positivas en las técnicas serológicas que se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad.<sup>(49)</sup>

Por otro lado, a partir de los años 2000, se comercializan diferentes sistemas en forma de estuches para el serodiagnóstico de la brucelosis, que le brindan al laboratorista bondades dirigidas a una ejecución más homogénea de los procedimientos y a la obtención de resultados con mayor calidad. La detección de IgM o IgG frente a LPS de *Brucella* es adecuada para el diagnóstico en la fase aguda, subaguda y crónica de la brucelosis. Los ensayos inmunoenzimáticos de ELISA, pueden detectar anticuerpos IgM, IgG e IgA de forma rápida y con una alta sensibilidad y especificidad. Los ELISA son pruebas de elección cuando existe una alta sospecha clínica y otras técnicas resultan negativas.<sup>(49)</sup>

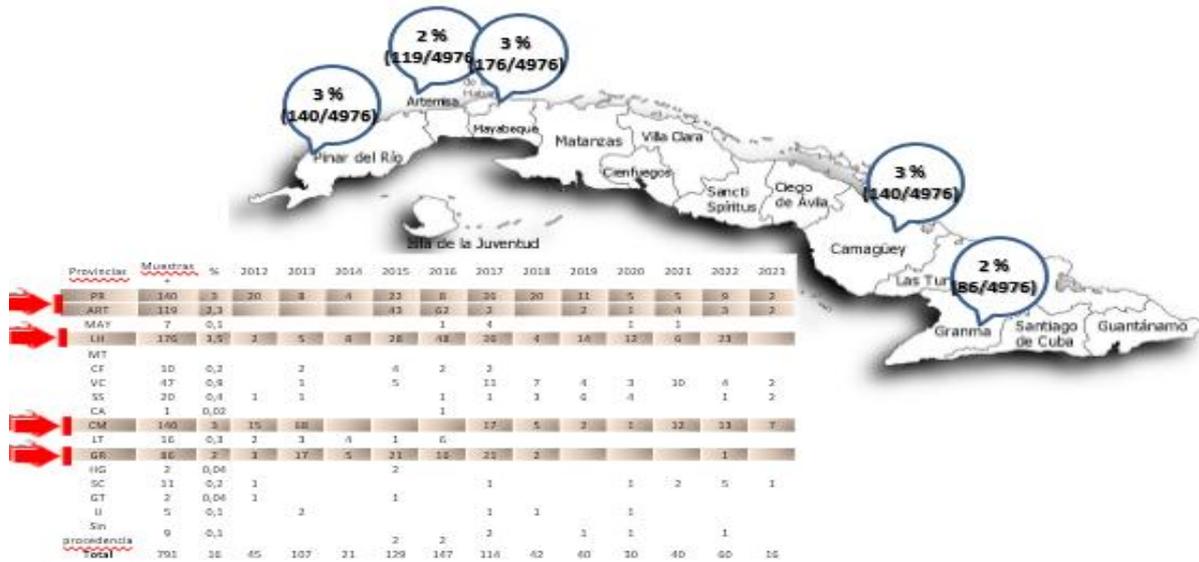
Los ELISA IgM e IgG anti-brucela, a pesar de que permiten conocer con una mayor precisión el perfil de las inmunoglobulinas en el curso de la enfermedad, no ofrecen el criterio para discernir entre curación y evolución a cronicidad. Tampoco los ELISA indican el lugar de la infección y no sustituyen el aislamiento de la bacteria. Los resultados obtenidos por los ELISA requieren de la lectura cuidadosa y la

comprensión correcta de las instrucciones ofrecidas por el productor. Es necesario seguir el protocolo para obtener resultados fiables, y tener mucha precaución con el pipeteo de muestras, reactivos y el tiempo de incubación. La ausencia de un aumento significativo en el nivel de anticuerpos (en los casos estudiados), no excluye la posibilidad de infección por *Brucella* spp.<sup>(49)</sup>

Numerosos estudios han demostrado que la PCR es una herramienta muy útil para el diagnóstico oportuno de la brucelosis aguda, para la detección precoz de recidivas y para el seguimiento de los pacientes luego de que culmina el tratamiento. Esta técnica permite la detección sensible, específica, rápida y precisa de ADN de *Brucella* spp. La primera prueba de PCR para el diagnóstico de brucelosis fue diseñada por Fekete y cols., en el año 1990. Ellos lograron amplificar con éxito un fragmento de 645 pb, de un gen que codifica para una proteína de la membrana externa de la cepa 19 de *B. abortus*. Los cebadores que tienen como blanco molecular el gen *bcsp* 31 son los que con mayor frecuencia se utilizan en las PCR implementadas para el diagnóstico de brucelosis. Esto se debe a que muestran mayor sensibilidad diagnóstica y permiten identificar todas las especies y biotipos de *Brucella* patógenos para el hombre.<sup>(9)</sup>

La PCR simple o convencional presenta con frecuencia variaciones en su sensibilidad y especificidad, lo cual depende en cierta medida de los cebadores que se utilicen. Entre los cebadores diseñados para amplificar secuencias dianas del genoma de *Brucella* se encuentran los que codifican para el ARNr 16S (F4R2), para la proteína de membrana externa omp2 (JP4/JPR), para la secuencia de inserción IS711, y para una proteína inmunogénica de membrana externa de 31 kDa de *B. abortus* que está presente en todas las especies de *Brucella* (BCSP 31) (B4B5), entre otros.<sup>(9)</sup>

La figura 5 muestra la distribución temporo-espacial de las muestras positivas a *Brucella* spp., según provincias cubanas (2012- junio 2023). Véase que resultaron positivas 791 muestras de 4976 estudiadas, lo que representó el 16 %. Las provincias que mayor porcentaje de positividad tuvieron fueron Pinar del Río con 140 muestras (3 %) siguiéndole Artemisa con 119 (2 %), La Habana con 176 (3 %), Camagüey con 140 (3 %), y Granma con 86 (2 %). El mayor número de muestras positivas se observó entre los años 2012 y 2018. A partir de este momento decreció el envío así como la cantidad de positivos.



Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

**Figura 5. Distribución temporo-espacial de las muestras positivas a *Brucella* spp., según provincias (2012- junio 2023)**

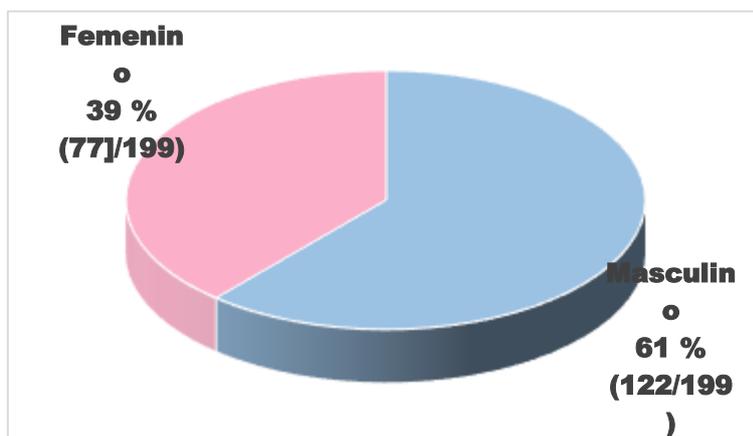
En Cuba, Plascencia y cols., 2020 realizan una investigación ambispectiva y paralelamente describe el comportamiento de la positividad y la distribución temporo-espacial de los anticuerpos IgM e IgG en sueros de casos con brucelosis, relacionando la presencia de estos anticuerpos con los períodos de las fases clínicas de la enfermedad y con los títulos de anticuerpos por BrucellaCapt®.<sup>(49)</sup>

Plascencia y su grupo de trabajo, analizan el comportamiento de las enfermedades por zonas geográficas, lo que es un elemento importante en la elaboración de estrategias para la vigilancia, la prevención y el control de esta enfermedad. En la región occidental obtienen que prevalece la detección de anticuerpos IgM, estando a niveles similares la detección de anticuerpos IgG y las muestras con resultados positivos a IgM+IgG. Donde la provincia de Pinar del Río presenta 50 muestras positivas a IgM, Artemisa 72, Mayabeque una, La Habana 37, Matanzas dos, e Isla de la Juventud una muestra. Mientras que la presencia de IgG se detecta en 19 sueros de Pinar del Río, 23 de Artemisa, ocho de La Habana y uno de Matanzas. La combinación de anticuerpos IgM+IgG, se constata en 47 muestras de Pinar del Río, 26 de Artemisa, tres de La Habana y una de Matanzas. La provincia Mayabeque no presenta muestras positivas a IgG, ni a la combinación IgM+IgG.<sup>(49)</sup>

En la región central prevalecen las muestras positivas a IgM en Camagüey (127), Villa Clara (25), Santi Espíritus (9) y Cienfuegos (2). La combinación de anticuerpos IgM+IgG, se evidenció en 47 muestras de Camagüey, 12 de Santi Espíritus, y cinco de Villa Clara. Camagüey y Villa Clara presentan 11 y cuatro sueros positivos a IgG, respectivamente. Existen provincias como Cienfuegos y Ciego de Ávila que no aportan muestras positivas a IgG, ni a la combinación IgM+IgG.<sup>(49)</sup>

Por último, en la región oriental prevalecen los anticuerpos IgM, siguiéndose de los del isotipo IgG y de la combinación IgM+IgG. Las Tunas (13), Granma (29), Holguín (7), Guantánamo (36) y Santiago de Cuba (1) son las provincias con muestras positivas a IgM. Los territorios de Granma (4) y Guantánamo (2) presentan muestras positivas a IgG. La combinación de anticuerpos IgM+IgG, se detecta en ocho muestras de Granma solamente. De igual manera, existen provincias como Las Tunas, Holguín, y Santiago de Cuba sin muestras positivas a IgG ni a la combinación IgM+IgG. Por último, la provincia de Guantánamo no presenta muestras positivas a la combinación de anticuerpos IgM+IgG.<sup>(49)</sup>

En la figura 6 se muestra la distribución, según sexo, de los 199 casos con brucelosis de Cuba en el periodo comprendido entre 2017-junio 2023. Obsérvese que predominó el sexo masculino para un 61% (122/199).



Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

**Figura 6. Distribución según sexo de los 199 casos cubanos con brucelosis (2017-junio 2023).**

En cuanto al sexo masculino, los resultados del presente estudio superan a lo que reportan Serra y Godoy en el año 2000 en España. Estos investigadores comentan que de 55 casos de brucelosis humana notificados en la provincia de Lleida, entre los años 1995 y 1998, el 18,2 % (10/55) pertenece al sexo masculino, con un predominio del sexo femenino.<sup>(57)</sup>

Otro estudio llevado a cabo por Oliveira y cols., en un municipio de Alagoas en Brasil, entre marzo y agosto de 2013, diagnostican 20 casos de brucelosis y detectan solo 3 pacientes (15 %) del sexo masculino.<sup>(58)</sup>

Por otra parte, Hasanjani y cols. describen que de 980 pacientes diagnosticados con brucelosis en un hospital iraní entre los años 1990 y 2014, el 58,1 % (570/980) resultan del sexo masculino.<sup>(59)</sup>

En ambos reportes sobresale el sexo femenino, lo que discrepa del resultado de la tesis, los autores de las investigaciones internacionales fundamentan sus hallazgos con el hecho de que en sus regiones existe una elevada implicación de las mujeres en el cuidado de los animales domésticos, principales reservorios naturales del agente etiológico de esta entidad.

Nuestro resultado es similar al reportado por Queipo-Ortuño y cols., en Málaga, España. Ellos encuentran que de 46 pacientes confirmados con brucelosis humana en un hospital de esa región, el 70 % (28/46) pertenece al sexo masculino.<sup>(60)</sup>

Otro trabajo lo presentan en Arzerbaiján, Karacalik y cols., quienes describen las tendencias epidemiológicas de la brucelosis en humanos en ese país, desde 1983 y hasta 2009. Estos autores encuentran que el 71 % de 11233 casos notificados (7945/11233) pertenece al sexo masculino.<sup>(61)</sup>

Jiang y cols. 2019-China, reporta un predominio del sexo masculino dentro de los los 850 pacientes, 633 (74,5%) son hombres.<sup>(48)</sup> Por su parte, Pila-Pérez y cols., en Cuba (1997), en su análisis de la brucelosis humana en la provincia de Camagüey, reporta que de 241 pacientes enfermos 220 son hombres, para un 91%.<sup>(62)</sup>

Obregón y cols., en 2023, en Cuba describe las principales variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas de 10 casos sospechosos, negativos por los ELISA-IgM y ELISA-IgG de *Brucella* y a la PCR convencional *bcsp* y encuentra que en cinco de los seis positivos por la PCR en tiempo real, el sexo predominante es el masculino (83,3%).<sup>(63)</sup>

También en Cuba, Lugo y cols. en 2022. reportan el predominio del sexo masculino con un 66 % (43/65), grupo genérico se vincula con mayor frecuencia a actividades laborales consideradas como de riesgo para contraer la infección por *Brucella* spp.<sup>(56)</sup>

Como se observa en los estudios que se realizan en Cuba, históricamente hay un predominio del sexo masculino lo que puede deberse a que en Cuba las actividades agropecuarias y agrícolas lo realizan fundamentalmente los hombres.

La tabla 4 describe la distribución según el color de la piel, en los casos cubanos con brucelosis en el periodo 2017-junio 2023. Como se aprecia, el color de la piel que predominó fue la blanca con un 35 %, seguido de la mestiza con un 12 % y la negra con el 7 %. No se precisó la información en el 46 % de los positivos.

**Tabla 4. Distribución, según el color de la piel, de los casos cubanos con brucelosis en el periodo 2017-junio 2023.**

Variable		Porcentaje % (n/N)
Color de la piel	Blanca	35 (69/199)
	Mestiza	12 (25/199)
	Negra	7 (13/199)
	No Precisado	46 (92/199)

Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

No es frecuente que se realice el análisis del color de la piel en los pacientes que sufren brucelosis humana. En la literatura internacional revisada no se aborda esta variable, sin embargo, en Cuba existe el reporte de Pila-Pérez y cols. (1997) quienes manifiestan que en su data de estudio de enfermos predomina el color de la piel blanca con un 83 % (200/241).<sup>(62)</sup> Este resultado puede deberse a que, según el último censo de población hecho en el año 2012 en Cuba, el 64,1 % de la población cubana es blanca y que, en particular, el 75,2 % de los que viven en Camagüey también lo son.<sup>(64)</sup>

La tabla 5 describe la distribución, según los grupos de edades, en los casos cubanos con brucelosis en el periodo 2017-junio 2023. Nótese un predominio en el grupo comprendido entre los 19 y 59 años con un 50 %, seguido por aquellos con edades mayores a los 60 años con un 5 % y por último los menores de 18 años con un 4 %. No fue precisada la información en el 41 % de los casos con brucelosis.

**Tabla 5. Distribución, según grupos de edades, de los casos cubanos con brucelosis en el periodo 2017-junio 2023.**

Variable		Porcentaje % (n/N)
Grupos de edades	≤ 18	4 (8/199)
	19 – 59	50 (99/199)
	≥ 60	5 (11/199)
	No Precisado	41 (81/199)

Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

Bosilkovski y cols. (2010), en Arabia Saudita, realizan durante 10 años, un estudio con pacientes con brucelosis en la Clínica Universitaria de Enfermedades Infecciosas y Condiciones Febriles, ubicada en Skopje, República de Macedonia. Ellos evalúan a un total de 550 pacientes tratados entre 1998 y 2007 y encuentran que la mediana de edad es de 34,5 años (rango, 1-82) y que los varones saudíes entre 15 y 44 son los más propensos a contraer la enfermedad.<sup>(65)</sup>

Khezzani y cols. en 2021, realizan un estudio retrospectivo durante veintiún años (1998-2018) para determinar las características epidemiológicas de la brucelosis humana en la provincia de El-Oued, perteneciente al sureste de Argelia. Durante el periodo de estudio se notificaron 1832 casos confirmados de brucelosis y se demuestra que las personas mayores de 65 años son las de mayor riesgo, con una tasa de incidencia de 22,32 por cada 100 000 habitantes.<sup>(66)</sup>

De igual modo, Jiang y cols., en 2019 en China encuentran que entre los 850 pacientes con brucelosis el 64 % (544/850) tiene edades comprendidas entre los 41 y los 65 años<sup>(48)</sup>.

Como se observa en los anteriores estudios internacionales, las edades laborales se reafirman como las prevalentes para adquirir la enfermedad porque los pacientes que están en riesgo desarrollan, en su mayoría, profesiones que constituyen riesgos epidemiológicos directos e indirectos para contraer esta bacteria.

Por otra parte, existen las publicaciones de varios autores cubanos quienes de igual manera destacan que las edades con mayor actividad laboral son las más proclives a asociarse con el desarrollo de la enfermedad. Uno de los primeros trabajos que se recogen en este sentido es el que realiza el grupo de Pila-Pérez y cols. (1997) en Camagüey, quienes manifiestan el predominio, con el 71,6 %) de pacientes entre los 35 y 44 años.<sup>(62)</sup> Asimismo, Obregón y cols., en el año 2023 refieren que el 50 % de sus casos tenían edades entre los 50 y 59 años.<sup>(63)</sup> Por su parte, Lugo y cols. en el 2022, en Cuba, al analizar las variables clínicas y epidemiológicas de 65 casos notificados con brucelosis, describen que la mayoría se encontraba entre los 35 y los 44 años, para un 66,1 %.<sup>(56)</sup>

La tabla 6 revela la distribución, según la actividad laboral y sus categorías en los casos cubanos con brucelosis en el periodo 2017-junio 2023. Como se observa, al analizar las categorías predominó el ser trabajador agropecuario (actividad asociada directamente al riesgo epidemiológico) con un 17,5 %. Prevalcieron además las categorías de ama de casa con un 4 %, el ser estudiante con un 3,5% y el realizar la profesión de veterinaria con un 2 %. Las restantes categorías fluctuaron sus porcentajes entre el 1,5 % y el 0,5 %, cifras relativamente bajas.

Jiang y cols., en 2019 en China encuentran que los 850 pacientes con brucelosis son agricultores y pastores, y que el 70,5% (599 enfermos) están expuestos a ganado u ovejas que pudieran estar infectados por *Brucella* spp.<sup>(48)</sup> Los resultados de la tesis concuerdan con los del mencionado autor, al realizarse ambas investigaciones en zonas geográficas altamente agrícolas y endémicas de la enfermedad.

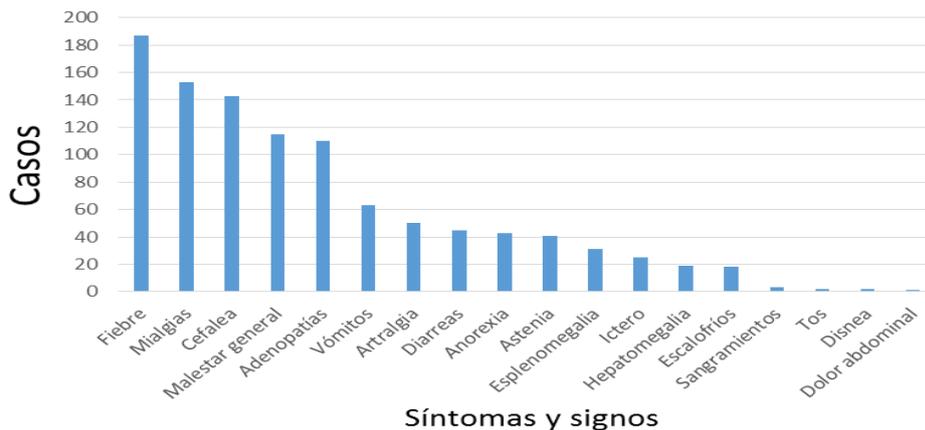
En nuestro contexto existen investigaciones que coinciden con los resultados de la tesis. Tal es el caso, la que realizan Pila-Pérez y cols. en la ciudad de Camagüey donde la condición de ser trabajador pecuario alcanza el 33 %.<sup>(62)</sup> Por su parte, Lugo y cols., halla el predominio de la variable de ser granjeros en el 52 %, la de ser veterinario en el 21 %, y el de ocuparse como trabajador de matadero o de vaquería con el 10 % cada una de ellas.<sup>(56)</sup> De igual modo, Obregón y cols., encuentra las categorías de tener contacto con los equinos, bovinos, porcinos y caninos en dos pacientes y el predominio de tener la ocupación de ser estudiante en el 50 % de los enfermos positivos por la técnica molecular.<sup>(63)</sup>

**Tabla 6. Distribución según la actividad laboral de los casos cubanos con brucelosis en el periodo 2017-junio 2023.**

Variable	Categorías	Porcentaje % (n/N)
Actividad laboral	Trabajador agropecuario	17,5 (35/199)
	Ama de casa	4 (8/199)
	Estudiante	3,5 (7/199)
	Veterinario	2 (4/199)
	Médico	1,5 (3/199)
	Enfermero	1,5 (3/199)
	Profesor	1,5 (3/199)
	Abogado	1 (2/199)
	Trabajador por cuenta propia	1 (2/199)
	Cocinero	0,5 (1/199)
	Bailarín	0,5 (1/199)
	Carnicero	0,5 (1/199)
	Custodio	0,5 (1/199)
	Guardabosque	0,5 (1/199)
	Aseguramiento	0,5 (1/199)
	Laboratorista	0,5 (1/199)
	Militar	0,5 (1/199)
	Pescador	0,5 (1/199)
	Informático	0,5 (1/199)
	No precisado	61 (122/199)

Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

La figura 7 incluye los signos y síntomas de los casos cubanos con brucelosis en el periodo 2017 hasta junio de 2023. Véase que la fiebre predominó con un 94% (178/199), seguido de las mialgias con 77 % (153/199), la cefalea con un 72% (143/199), el malestar general con un 58% (115/199), las adenopatías con un 55% (110/199), los vómitos con un 32% (63/199), las artralgias con un 25% (50/199), las diarreas con un 23 % (45/199), la anorexia con un 22% (43/199), la astenia con un 21% (41/199), la esplenomegalia con un 15% (31/199), el ictero con un 12% (25/199), la hepatomegalia y los escalofríos con un 9% cada uno (19/199). Por último y con los menores porcentajes, aparecieron el sangramiento con un 1,5% (3/199), la tos y la disnea con un 1% (2/199), para cerrar con dolor abdominal con un 0,5% (1/199).



Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

**Figura 7. Signos y síntomas de los 199 casos cubanos con brucelosis en el periodo 2017 hasta junio de 2023.**

En el mundo existen reportes que analizan los síntomas y signos más frecuentes en los casos con brucelosis. Uno de las investigaciones más relevantes, la realiza Bosilkovski y cols., en Arabia Saudita, quienes recalcan que dentro de los síntomas principales están la artralgia con el 80 % (438/546), la fiebre con el 76 % (419/546) y la sudoración profusa con el 72% (394/546). Por otra parte el signo más común es la hepatomegalia que se encuentra en el 50 % (273/546) de los enfermos.<sup>(65)</sup>

Por su parte Jiang y cols. en China destaca la presencia de fiebre (93,3 %), dolor articular (69,8 %), sudoración. (45,2 %), fatiga (38,6%) y esplenomegalia (34,0 %) como los síntomas y signos prevalentes entre los 850 pacientes en estudio.<sup>(48)</sup>

En Cuba se encuentra nuevamente el reporte de Pila-Pérez y cols., quienes relacionan como síntomas y signos sobresalientes a la fiebre [67 % (162/241)], la cefalea [50 % (121/241)], la artralgia [39 % (93/241)], los escalofríos [33 % (79/241)] y la sudoración [30 % (72/241)].<sup>(62)</sup> Posteriormente, en el 2022, Lugo y cols., describen al malestar general (58 %), los dolores articulares 57 %, la fiebre 55 % y la cefalea 47 %, como predominantes en su data de estudio,<sup>(56)</sup> mientras que, más recientemente, Obregón y cols. en el 2023, remarcan a la fiebre (88 %), el malestar general (50 %), y a la artralgia, la astenia y las linfadenopatias ( 33%) como los más destacados.<sup>(63)</sup>

En cuanto a la distribución temporo-espacial de los 199 casos cubanos con brucelosis, según lugar de residencia, durante los años de estudio (figura 8), se observó el mayor porcentaje habitaban en la provincia de Pinar del Río con un 26% (51/199), siguiéndole en orden decreciente los que pertenecían a la provincia de Camagüey con un 22 % (43/199), a La Habana con un 16 % (32/199), a Villa Clara con 13,5 % (27/199), a Granma con un 10 % (20/199) y por último, a Santiago de Cuba con un 4 % (8/199), Artemisa y Mayabeque con un 2,5 % (5/199) cada una, Santi Espíritus con un 2 % (4/199) e Isla de la Juventud con un 1 % (2/199). No fue precisada la información en un 0,5 % (1/199) dentro de los confirmados.



Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

**Figura 8. Distribución temporo-espacial de los 199 casos cubanos con brucelosis, según lugar de residencia (2017-junio 2023).**

Para discutir esta variable se consulta Internacionalmente la investigación que llevan a cabo Motta y cols., en Colombia. Estos autores plantean que la mayor prevalencia de casos con brucelosis resulta presentarse en el sur del departamento del Caquetá, zona endémica y con alta prevalencia de animales portadores de *Brucella* spp.<sup>(47)</sup>

En Cuba, Lugo y cols., llaman la atención sobre la existencia desde el año 2013, según reportes de Instituto de Medicina Veterinaria, de cerca de 160 focos de brucelosis bovina ubicados en las provincias de Camagüey, Ciego de Ávila, Las Tunas, Granma y Pinar del Río,<sup>(9)</sup> lo cual avala la dispersión de casos humanos y animales de brucelosis, ya que se reafirma que las provincias donde se encuentran

mayor número de casos humanos se corresponden con aquellas en las que la enfermedad es más frecuente en animales, quedando claro que la única herramienta eficaz en el control de la brucelosis humana es el control de la enfermedad en sus portadores naturales.<sup>(9)</sup>

Al analizar los principales antecedentes patológicos personales (APP) de los casos cubanos con brucelosis en el periodo 2017 hasta junio de 2023, se encontró, lamentablemente, que en el 96 % (192/199) de los confirmados, no se disponía de la información necesaria. A pesar de este fenómeno, en un 2,5 % (5/199) de los enfermos analizados se logró identificar la hipertensión arterial como antecedente de mayor incidencia, seguida, con el 0,5 % (1/199), correspondiente a la diabetes mellitus, la recaída por brucelosis y la condición de ser puérpera.

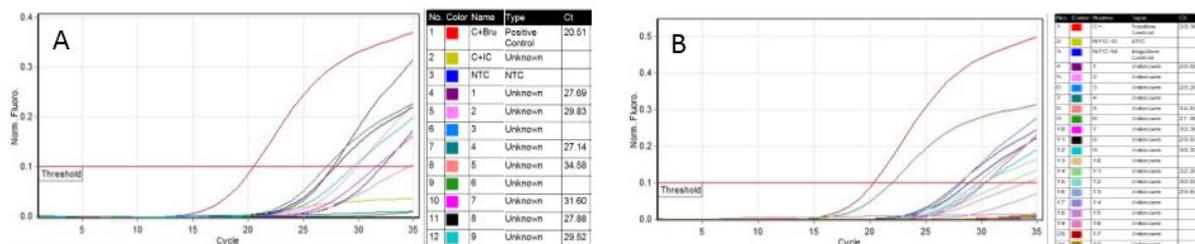
En México, en 2017 Gómez y cols. presentan un caso clínico con neurobrucelosis en un paciente masculino de 70 años, con antecedentes de alcoholismo ocasional, diagnosticado y tratado por infección por *Brucella* spp. en marzo 2016, pero sin completar el esquema de antibióticos adecuados.<sup>(67)</sup>

De igual modo, Múñiz y cols. (2020) en España realizan un reporte de caso que compete a un paciente de 79 años con un bruceloma renal y describen que sus enfermedades de base son hipertensión arterial, anemia normocítica, insuficiencia cardíaca e infecciones frecuentes del tracto urinario.<sup>(68)</sup>

Por otra parte, Huamán y cols., en Perú (2020), hacen referencia a una paciente de 85 años con antecedente de hipertensión arterial, proveniente de la ciudad de Lima y consumidora de queso fresco, en la que se constataron lesiones isquémicas probablemente asociadas a vasculitis en puente, bulbo y hemisferios cerebelosos, determinándose la presencia de una neurobrucelosis.<sup>(69)</sup>

La brucelosis en pediatría generalmente se presenta como un cuadro inflamatorio faríngeo con amígdala hipertrófica, congestiva y con exudado, que en un inicio, y quizá hasta que se agreguen otros síntomas y signos de la enfermedad, hacen que el médico no la tenga presente en el diagnóstico diferencial, y se trate como una infección respiratoria. Por otra parte, en los niños se reporta como vías de transmisión, además del contacto con animales enfermos y la ingestión de alimentos contaminados, la interhumana, la perinatal y la neonatal.<sup>(70)</sup>

La figura 9 muestra las curvas de amplificación obtenidas mediante la PCR en tiempo real de Sacase en los 22 casos pediátricos sugestivos de brucelosis, recibidos de enero a junio del 2023. Como se puede observar se obtuvieron 16 muestras positivas, lo que representó el 73 % de los pacientes estudiados.



**Figura 9. Curvas de amplificación de los sueros en estudio mediante la aplicación del sistema comercial *Brucella* Real-TM.**

Obregón y cols. en Cuba (2023) introducen en el LNRLB por vez primera la PCR en tiempo real del estuche comercial de Sacase y encuentran que el extracto de ADN de *Brucella abortus* S19 que se utiliza como control positivo adicional muestra una concentración de 93,8 ng/μL y un porcentaje de impureza de 0,08, resultado que respalda que al aplicarla a 10 sueros de casos sospechosos de brucelosis, negativos por los ELISA-IgM, ELISA-IgG para *Brucella* y la PCR convencional (PCR *bcs*) se obtenga que en seis de las muestras que se estudian los valores de fluorescencia sobrepasaron el umbral esperado ( $Ct \leq 33$ ) para una positividad del 60 %.<sup>(63)</sup>

En la literatura que se consulta no se hace referencia a esta tecnología de PCR en tiempo real. No obstante, nótese que los resultados que se obtienen en el LNRLB son semejantes a pesar de que el número de muestra es superior en la presente investigación. Esto permite reafirmar la utilidad de esta herramienta de laboratorio en el algoritmo diagnóstico de la enfermedad en Cuba.

En cuanto a la distribución espacial de los 16 casos pediátricos con brucelosis (según el algoritmo del LNRLB), en el periodo de enero a junio de 2023, según provincia de residencia (figura 10), se observó que el mayor porcentaje habitaba en la provincia de Pinar del Río con un 44 % (7/16), siguiéndole en orden decreciente los que pertenecían a la provincia de Camagüey con un 25 % (4/16), Villa Clara y La Habana con un 12,5 % (2/16), cada una, y Santi Espíritus, con un 6 % (1/16).



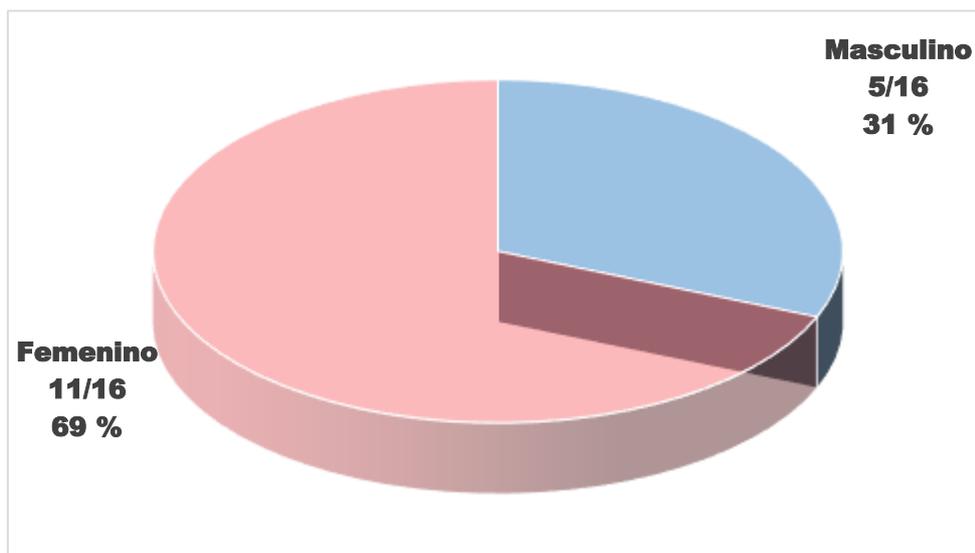
Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio

**Figura 10. Distribución temporo-espacial de los 16 pacientes pediátricos con brucelosis (enero-junio 2023).**

Como se puede observar, en esta data de estudio la mayoría de los niños que se confirman por la PCR en tiempo real proceden de provincias cubanas endémicas de la enfermedad porque en ellas se genera una elevada actividad ganadera y agrícola.

Según Dávila y cols. la mayor prevalencia de la enfermedad está asociada con la residencia en áreas rurales y el consumo de productos lácteos procesados localmente sin la debida esterilización, condiciones que son frecuentes en los niños que hemos estudiado.<sup>(71)</sup>

La figura 11 muestra la distribución por sexo de los 16 casos pediátricos con brucelosis, durante el periodo de enero a junio de 2023. Obsérvese, que predomino el sexo femenino con un 69% (11/16).



Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

**Figura 11. Distribución por sexo de los 16 casos pediátricos con brucelosis durante el periodo de enero a junio de 2023.**

Bosilkovski y cols. en 2010 en Macedonia, Arabia Saudita reportan que el 63,4 % de los pacientes pediátricos son del sexo masculino, resultado que discrepa con el de esta investigación. Estos investigadores opinan que la distribución por edad y sexo encontrada en su estudio es el resultado de hábitos regionales, principalmente debido a las prácticas ganaderas que hacen que los hombres, incluidos los menores de edad, sean más vulnerables a adquirir esta enfermedad. Sin embargo, también consideran que la brucelosis se puede encontrar en mujeres, debido al consumo de productos alimenticios de origen animal (por ejemplo, queso tierno de oveja o cabra) que, según sus costumbres, no procesan adecuadamente.<sup>(65)</sup>

La tabla 7 describe la distribución según color de la piel, de los 16 casos pediátricos con brucelosis (negativos serológicamente y por la PCR *bscp*), en el periodo de enero a junio de 2023. Véase que la raza predominante fue la blanca con un 56 % (9/16), seguido de la mestiza con un 25 % (4/16). No hubo casos con el color de piel negra y no se precisó la información en un 19 % de los positivos (3/16).

En la literatura consultada no se hace referencia a este aspecto en niños, pero consideramos que el predominio de la raza blanca corresponde, de igual manera, a los datos recogidos en el último censo de población que se realiza en Cuba en el año 2012, en el que la población con la piel de color blanca predomina con el 64,1 %.<sup>(64)</sup>

**Tabla 7. Distribución, según el color de la piel, de los 16 casos pediátricos con brucelosis durante el periodo de enero a junio de 2023.**

Variable		Porcentaje % (n/N)
Color de la piel	Blanca	56 (9/16)
	Mestiza	25 (4/16)
	Negra	0
	No Precisado	19 (3/16)

Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

La tabla 8 describe la distribución, según los grupos de edades, en los 16 casos pediátricos con brucelosis durante el periodo de enero a junio de 2023. Nótese un predominio en los grupos comprendidos entre los 6 y 10 años y entre los 11 y 15 años, con un 37% (6/16) respectivamente, seguido por aquellos con edades menores de los cinco años y los que tenían entre los 16 y 18 años con un 12% (2/16) cada uno de ellos.

**Tabla 8. Distribución, según edad, en los 16 casos pediátricos con brucelosis (negativos serológicamente y por la PCR *bscp*), en el periodo de enero a junio de 2023.**

Variable (años)		Porcentaje % (n/N)
Grupos de edades	≤ 5	12,5 (2/16)
	6 – 10	37,5 (6/16)
	11-15	37,5 (6/16)
	16-18	12,5 (2/16)

Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio

Al-Tawfiq y Abukhamsin (2009) en Arabia Saudita estudiando 913 pacientes con brucelosis en el sistema de salud de Saudi Aramco, determinan que 608 son hombres y 305 son mujeres con una proporción de hombres a mujeres de (2:1). En su investigación se plantea que la edad de los pacientes oscila entre 1 y 83 años, con una edad media de 35,8+/-17,9 años y una mediana de 36 años. Del total de pacientes, 195 (21%) y 155 (17%) casos ocurren en personas de entre 20-30 y 31-40 años, respectivamente. Los niños categoría que abarca desde el momento del nacimiento y hasta los 10 años de edad, constituyen el 5% de todos los pacientes.<sup>(72)</sup> El resultado de la tesis difiere al que se obtiene en el reporte citado. Esta discrepancia se puede deber a que los niños en nuestro país están de igual manera que los adultos sometidos a la exposición del riesgo de adquirir la enfermedad por la ingestión de leche o sus derivados de forma no pasteurizada, práctica muy común en nuestros días.

Bosilkovski y cols. en 2010 en Macedonia, Arabia Saudita describe que la frecuencia de brucelosis entre niños ( $\leq 14$  años) es similar a la reportada en otros estudios; de hecho, casi uno de cada cuatro pacientes pertenece a este grupo de edad. Estos investigadores citan que un estudio iraní, el 56% de los pacientes examinados son también menores de 14 años. De igual manera, este hallazgo difiere del encontrado en esta investigación y pudiera sugerirse similar explicación a la argumentada en el párrafo anterior.<sup>(65)</sup>

Tori y cols., en 2013, en Perú, enfatiza que en áreas endémicas con *Brucella mellitensis*, la casuística en niños representa entre un 20 y un 25% de los casos, siendo los menores de 10 años y específicamente los menores de 5 años, quienes presentan las tasas de enfermedad significativamente más bajas que los mayores. En otra serie de estudio, estos investigadores además, demuestran que el 15% de los casos ocurrieron entre los 2 y 4 años, el 43% entre los 5 y 9 años y el 42% entre los 10 y 14 años. No reportan ningún caso en menores de dos años.<sup>(70)</sup>

Elham E. Bukhari, haciendo una revisión actualizada sobre la brucelosis para el nuevo milenio en el 2018, describe que La prevalencia de brucelosis entre los menores de 14 años es menor que en otros grupos de edad. Los ciudadanos saudíes varones de entre 15 y 44 años tienen el mayor riesgo de contraer brucelosis y los menores de un año presentan la prevalencia más baja. Al-Qassim muestra el mayor número de casos y seguidos por Aseer en las fronteras del Sur, Hail y el Norte. La parte occidental tiene el menor número de casos en comparación con otras áreas geográficas.<sup>(20)</sup>

De manera general, la mayoría de los trabajos que se encuentran en la literatura no muestran las cifras que se obtienen en la tesis. Las diferencias acotadas para algunos de ellos, pueden servir para discutir los restantes. A juicio de la autora de la tesis, en nuestro medio, si está claro, la enfermedad puede afectar a cualquier ciudadano que ingiera los productos lácteos y sus derivados obtenidos de forma casera. Este riesgo es común para todos, y en nuestros días se observa con gran frecuencia.

La tabla 9 revela la distribución, según las categorías de preescolares o estudiante, los 16 casos pediátricos con brucelosis durante el periodo de enero a junio de 2023. Como se observa, predominó la condición de ser estudiante con un 94% (15/16).

**Tabla 9. Distribución según las categorías de preescolares o estudiante, los 16 casos pediátricos con brucelosis durante el periodo de enero a junio de 2023.**

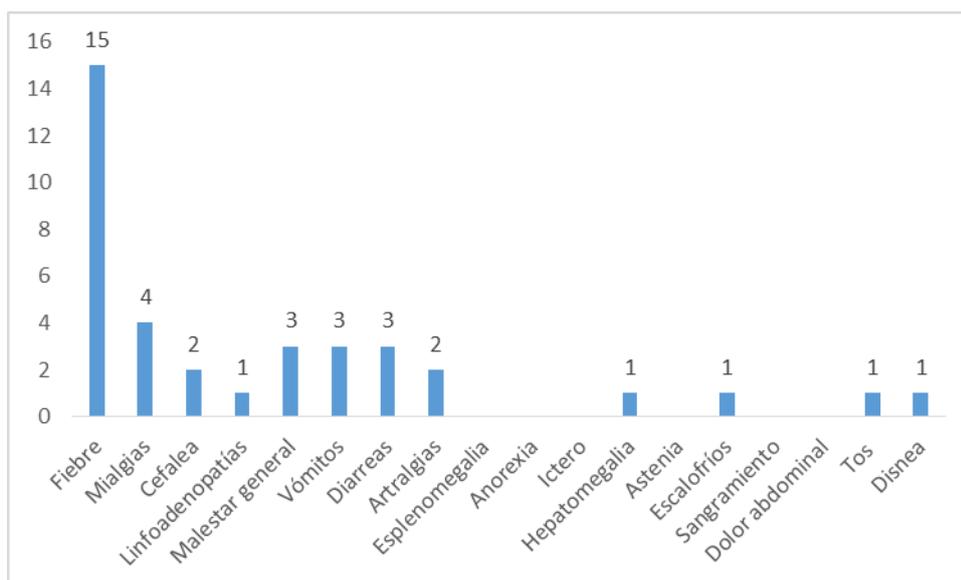
Categorías	Porcentaje % (n/N)
Preescolares	6 (1/16)
Estudiantes	94 (15/16)

Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

García y cols., en México en el 2014, al identificar los riesgos de la brucelosis en el estado de Tlaxcala, realiza el diagnóstico de tipo social en los municipios de Huamantla, Ixtenco y Teacalco, localizadas en la región oriente del estado y determina la seroprevalencia de brucelosis en cabras y humanos. Estos investigadores obtienen que los estudiantes representan el 16.53% de su data de estudio.<sup>(73)</sup>

Ambos resultados son similares. Se conoce que los estudiantes son una categoría ocupacional que puede relacionarse con las tareas agrícolas en la mayoría de los países de América Latina incluyendo Cuba. Además tener presente que esta enfermedad también tiene un patrón urbano alimentario y que esto también facilita la adquisición de la infección por esta vía de transmisión.

La figura 12 demuestra los principales síntomas y signos presentes en los 16 casos pediátricos con brucelosis (enero-junio de 2023). Véase que predominó la fiebre en 15 casos lo que representó un 94 %, siguiéndole en orden decreciente las mialgias con un 25 % (4/16) y el malestar general, los vómitos y las diarreas con un 19 % (3/16) cada uno. Las artralgias y la cefalea se vieron en dos casos con un 12,5% respectivamente. Los restantes síntomas y signos (hepatomegalia, linfoadenopatías, escalofríos, tos y disnea) solo estuvieron presentes en un paciente lo que representó el 6,2 %.



**Figura 12. Principales síntomas y signos presentes en los 16 casos pediátricos con brucelosis (enero-junio de 2023).**

Bosilkovski y cols en 2010 en Macedonia, Arabia Saudita, muestra que la fiebre y los síntomas constitucionales, consistentes en escalofríos, sudoración, fatiga, malestar general, anorexia, pérdida de peso, dolor abdominal, dolores de cabeza, mialgias y artralgias, se encuentran entre los síntomas más comunes en los niños. Las manifestaciones clínicas que predominan en su data de estudio, son la fiebre con un

78,2 % (248 niños), el dolor articular con un 71,9 % (228 niños) y la hepatomegalia con un 68,1 % (216 niños). Se informa también la artritis en 24 niños (para un 25 %) de los 96 pacientes infantiles diagnosticados con brucelosis en un centro médico infantil en Teherán. Se registra monoartritis en 15 pacientes (62,5 %) con afectación de rodilla (8, 45 %), cadera (5, 29 %) y tobillo (2, 8 %), mientras que 9 (37,5 %) pacientes tenían poliartritis.<sup>(65)</sup>

La tabla 10 muestra los porcentajes de positividad de los 16 casos pediátricos con brucelosis durante el periodo de enero a junio de 2023, según fases clínicas de la enfermedad. Como se aprecia, el 81% (13/16) de los pacientes cursaban por la fase clínica aguda, siguiéndole en orden decreciente los que transitaban por la fase sub-aguda con un 19% (3/16).

**Tabla 10. Porcentajes de positividad de los 16 casos pediátricos con brucelosis durante el periodo de enero a junio de 2023, según fases clínicas de la enfermedad.**

Categoría Fases clínicas	Porcentaje % (n/N)
Aguda (0-3 meses)	81(13/16)
Sub-aguda (3 – 12 meses)	19 (3/16)
Crónica (≥ 365 días)	0

Fuente: Historias clínicas o remisión para estudio de laboratorio.

Guzmán - Bracho y cols., en 2019, en Colombia, considera que la PCR es útil para el seguimiento pos-tratamiento con antimicrobianos en los pacientes con brucelosis.<sup>(51)</sup> Mientras que Picasso y Ortiz, en el 2020, muestran que los títulos de las inmunoglobulinas de la clase IgM decrecen entre el 8<sup>vo</sup> al 10<sup>mo</sup> mes de haberse desarrollado la sintomatología clínica y que en casos curados los anticuerpos de la clase IgG decrecen después de haber alcanzado los 30 meses posterior a la infección.<sup>(74)</sup> Estos investigadores reafirman que ambas inmunoglobulinas se mantienen estables, en elevadas concentraciones durante una reinfección o recaída por brucelosis.<sup>(51, 74)</sup>

Lugo y cols., en el 2022 en Cuba al realizar un estudio observacional descriptivo de corte transversal sobre brucelosis humana que incluye también una investigación de servicios y sistemas para implementar el diagnóstico temprano por la PCR *bscp*, en el periodo desde enero de 2013 y hasta junio de 2016, demuestran en un grupo de pacientes con brucelosis que la detección de los anticuerpos de las clases IgM e IgG producidos contra *Brucella* spp. por los sistemas ELISA-IgM y ELISA-IgG, se inicia a partir de los 21 días de establecido el cuadro clínico (lo que sucede durante la fase aguda de la enfermedad).<sup>(56)</sup>

Plascencia y cols., en 2020 en Cuba al presentar una investigación ambispectiva que describe el comportamiento de la positividad y la distribución temporo-espacial de los anticuerpos IgM e IgG en sueros de casos con brucelosis, y relaciona la presencia de estos anticuerpos con los períodos de las fases clínicas de la enfermedad y con los títulos de anticuerpos por BrucellaCapt.<sup>(49)</sup> Esta investigación demuestra que no existieron diferencias estadísticas significativas entre el uso de muestras pares y simples (Grupo II) en los casos en los que se utilizó el ELISA para el diagnóstico de brucelosis. El mayor porcentaje de IgM e IgG (Grupo III) se presentó durante las fases aguda y subaguda de la enfermedad. Se encontró que el mayor número de sueros positivos a IgM o IgG (Grupo IV) se correspondieron con titulaciones de 40 a 160 por BrucellaCapt®.<sup>(49)</sup>

#### **4.1 Discusión general**

La investigación que se realiza permite agrupar toda la información científica disponible sobre el confirmación serológica-molecular de la brucelosis humana en más de 10 años, en Cuba, ya que facilita la comprensión sobre la existencia de un 16 % de positividad en las muestras de los casos recibidos en el Laboratorio Nacional de Referencia, lo que habla a favor de la existencia de la enfermedad, a pesar de estar implementadas las medidas sanitarias para su control y prevención a nivel nacional.

De igual forma, los resultados han permitido describir el comportamiento de variables clínico-epidemiológicas de enfermos adultos y niños, lo que demuestra una vez más que la enfermedad existe y que hay que continuar pesando en su diagnóstico clínico temprano. Igualmente el genio epidemiológico de todos los casos incluidos en el estudio expresa que la epidemiología de la enfermedad es compleja y dinámica, y que hay que continuar fortaleciendo el programa y la implementación de sus medidas en aras de disminuir los casos en todo el territorio nacional.

El estudio contribuye a fortalecer no solo las capacidades humanas sino también el algoritmo de laboratorio para la detección directa e indirecta de *Brucella* spp. y poder así confirmar la enfermedad en etapas temprana, lo que contribuye por una parte a que los pacientes no transiten hacia las formas graves con complicaciones de la enfermedad y por la otra, a la reducción del subregistro de pacientes a nivel nacional.

Con la tesis, se ha demostrado de manera general, que la prevalencia de los anticuerpos de la clase IgM en los pacientes con brucelosis durante un amplio periodo de tiempo (2012-junio 2023), lo que habla a favor de la evolución del pensamiento clínico de los médicos de asistencia, al considerar la existencia probable de la enfermedad frente a la presentación de casos con síntomas y signos sugestivos.

El mismo panorama se presenta en los casos pediátricos con brucelosis, aun en la actualidad, donde se ha observado que una mayoría de ha diagnosticado durante la fase clínica aguda de la enfermedad. Aunque durante el periodo pre y post pandémico (2019-2022) el escenario se tornó ligeramente diferente, al dedicarse la totalidad de los recursos al diagnóstico de los casos positivos con Covid19 y direccionarse la asistencia medica hacia la prevención del virus SarsCov2 en el país.

Todos los resultados presentados permiten, por otro lado, realizar de forma más precisa la toma de decisiones efectivas desde el punto de vista clínico y epidemiológico de los casos, que habitan en las principales provincias donde la bacteria tiene un mayor potencial de transmisión. Destacar entonces, las provincias como Pinar del Río y La Habana del occidente del país, Camagüey y Granma pertenecientes al oriente y Villa Clara al centro del archipiélago cubano. Todas ellas han tributado en el tiempo el mayor número de muestras enviadas al LNRB-IPK y también el mayor porcentaje de positividad. Este resultado, en particular sugiere que las medidas de prevención y control en estas zonas en particular deben ser revisadas y re-direccionarlas, con el objetivo mejorar la calidad de la vigilancia nacional de la enfermedad.

## V. CONCLUSIONES

---

- ✓ La positividad serológica - molecular a *Brucella* spp., resulta ser discreta y es mayor en los sueros de los casos con brucelosis, lo que justifica sostener la vigilancia de laboratorio, avala la utilidad de esta muestra para el diagnóstico y ratifica la circulación directa e indirecta de esta bacteria, con potencial zoonótico y alto poder de transmisibilidad en el país.
- ✓ Predomina la detección de anticuerpos IgM contra *Brucella* spp., en los sueros de los pacientes con brucelosis, lo que indica que la mayoría son diagnosticados en las primeras etapas de la infección y habla a favor de un cambio en el pensamiento clínico con respecto a la enfermedad.
- ✓ El predominio de las variables socio-demográficas, clínico-epidemiológicas en los pacientes cubanos con brucelosis, se mantiene estable a través de los años de estudio, lo que coincide con lo descrito en la literatura cubana y es de utilidad para la vigilancia y el Programa Nacional de Zoonosis.
- ✓ Se detecta un alto porcentaje del gen *Wboa* (presente en las especies de *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella canis* y *Brucella suis*), en los casos pediátricos con brucelosis, lo que avala la introducción del sistema de PCR-RT, en el algoritmo del diagnóstico de laboratorio de la enfermedad en Cuba.

## VI. RECOMENDACIONES

---

- ✓ Incidir con los hospitales y CPHEM, para que las muestras de los casos sospechosos de brucelosis, lleguen al IPK, acompañadas de la información clínica y epidemiológica pertinente, lo que facilitaría la mejor interpretación de los resultados y el cumplimiento de las Buenas Prácticas de laboratorio.
- ✓ Insistir en la correcta extracción, envío y conservación de las muestras clínicas de los casos sospechosos de brucelosis, a nivel nacional, lo que permitiría conocer la prevalencia real de las brucelas en nuestro medio.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Bagheri H, Tapak L, Karam M, Hosseinkhani Z, Najari H, Karimi S, et al. Forecasting the monthly incidence rate of Brucellosis in west of Iran using time series and data mining from 2010 to 2019. PloS one [Internet].2020[citado 5 abr 2021];15(5):e0232910. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7217463/>
2. Amjadi O, Rafiei A, Mardani M, Zafari P, Zarifian A. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis. Infect Dis (Lond) [Interent].2019;51(5):321-33. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1568545>
3. Valle T, Lago Y, García I. Resultados de intervención educativa sobre Brucelosis humana en zonas de riesgo de enfermar en Argelia. Rev Ciencias Médicas [Internet].2018[citado 8 abr 2021];2018(4):804-14. Disponible en: [www.revcmpinar.sld.cu/index.php/publicaciones/article/view/3467](http://www.revcmpinar.sld.cu/index.php/publicaciones/article/view/3467).
4. Guerrero R, Vélez M, Cevallos K, Mendoza M. Causas, síntomas y tratamiento a los pacientes contagiados por brucelosis. RECIMUNDO [Internet]. 2020[citado 8 abr 2021];4(4):382-91. Disponible en: <https://recimundo.com/index.php/es/article/view/915>
5. Garshasbi M, Ramazani A, Sorouri R, Javani S, Moradi S. Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Iran. J Microbiol [Internet].2014;45(2):533-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000048>.
6. Mohamed Zahidi J, Bee Yong T, Hashim R, Mohd Noor A, Hamzah S, Ahmad N. Identification of *Brucella* spp. isolated from human brucellosis in Malaysia using high-resolution melt (HRM) analysis. SCI [Internet].2015[citado 5 abr 2021];81(4):227-33. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889314005239>
7. Lowe C, Showler A, Perera S, McIntyre S, Qureshi R, Patel S, et al. Hospital-Associated Transmission of em *Brucella melitensis* em outside the Laboratory. Emerging infectious diseases [Internet].2015[citado 10 nov 2023];21(1):150. Disponible en: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/1/14-1247\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/1/14-1247_article)
8. Padilla R, Montoya P, Carrillo P. Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella* sp. Rev Perú med exp salud pública [Internet].2003[citado 10 nov 2023];20(2):102-4. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342003000200007&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342003000200007&lng=es).
9. Lugo O. Abordaje clínico epidemiológico de brucelosis humana en Cuba. Implementación del diagnóstico temprano de laboratorio. IPK. 2015-2016. [Especialidad; impresa]. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"; 2016.
10. Baddour M. Diagnosis of *Brucellosis* in Humans: a Review. J Vet Adv [Internet].2012[citado 25 oct 2023];2:149-56. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Diagnosis-of-Brucellosis-in-Humans%3A-a-Review-Baddour/1265ca74b918cbd68462b7eae2b2c32e7c52cf1a>
11. About F, Pastre T, Boutrou M, Martinez AY, Melzani A, Peugny S, et al. Novel Species of *Brucella* Causing Human Brucellosis, French Guiana. Emerging infectious diseases [Internet].2023;29(2):333-40. Disponible en: <https://doi.org/10.3201/eid2902.220725>.
12. Barreto G, Rodríguez H, Barreto H. Brucelosis, aspectos que limitan la aproximación real a esta zoonosis; papel de las cabras. Rev prod anim [Internet].2020[citado 24 oct 2023];32(3):e3536. Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-79202020000300001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202020000300001&lng=es&tlng=es)

13. Flores S, Esthefany L, Tirado S, Paulina M. Brucelosis, revisión bibliográfica. *Ciencia Latina* [Internet].2023;7(1):6930-44. Disponible en: [https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v7i1.4936](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i1.4936)
14. Franc K, Krecek R, Häsler B, Arenas A. *Brucellosis* remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC Public Health* [Internet].2018[citado 20 sep 2023];18(1):125. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29325516/>
15. Laine C, Johnson V, Scott H, Arenas A. Global Estimate of Human Brucellosis Incidence. *Emerging infectious diseases* [Internet].2023;29(9):1789-97. Disponible en: <https://doi.org/10.3201/eid2909.230052>
16. Alharbi MGT, Alanazi AS, Alanazi NF, Alsaleh AK, Alanazi SJ, Alanazi SM, et al. Overview of Brucellosis: Simple Review Article. *Pharmacophore* [Internet].2022[citado 16 oct 2023];13(2):101-6. Disponible en: <https://pharmacophorejournal.com/article/overview-of-brucellosis-simple-review-article-bmamz5bfkmc6ft>
17. Moreno E, Blasco J, Moriyón I. Facing the Human and Animal Brucellosis Conundrums: The Forgotten Lessons. *PMID* [Internet].2022[citado 20 sep 2023];10(5):942. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35630386/>
18. Murray PR, Rosenthal K, Pfaller MA. *Microbiología médica*: Elsevier Health Sciences; 2021.
19. Głowacka P, Żakowska D, Naylor K, Niemcewicz M, Bielawska A. *Brucella* - Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. *Pol J Microbiol* [Internet].2018[citado 20 sept 2023];67(2):151-61. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30015453/>
20. Bukhari E. Pediatric Brucellosis. *Saudi Med J* [Internet].2018;39(4): 336-41. Disponible en: <https://doi.org/10.15537/smj.2018.4.21896>
21. Medscape [Internet].Brucelosis. Alemania: WebMD LLC; 2021[actualizado 2023; citado 11 jun 2023]. Disponible en: <https://emedicine.medscape.com/article/213430-overview>.
22. Zheng R, Xie S, Lu X, Sun L, Zhou Y, Zhang Y, et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiology and Clinical Manifestations of Human Brucellosis in China. *Biomed Res Int* [Internet].2018[citado 12 sep 2023];2018:5712920. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2018/5712920>
23. O'Callaghan D. Human brucellosis: recent advances and future challenges. *Infect Dis Poverty* [Internet].2020[citado 12 sep 2023];9(1):101. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00715-1>
24. Escobedo L, Falcón NP. Características epidemiológicas y clínicas de infecciones por *Brucella melitensis* en pacientes del Hospital Nacional «Daniel A. Carrión», Callao, Perú (2007-2014). *Rev investig vet Perú* [Internet].2018[citado 5 abr 2021];29(3):1018-24. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172018000300034&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000300034&nrm=iso)
25. Leclercq S, Cloeckert A, Zygmunt M. Taxonomic organization of the family *Brucellaceae* based on a phylogenomic approach. *Front Microbiol* [Internet].2020;10:3083. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03083>
26. Soares C, Teles JA, dos Santos AF, Silva S, Cruz M, da Silva-Júnior F. Prevalence of *Brucella spp* in humans. *Rev Lat Am Enfermagem* [Internet].2015[citado 16 jun 2023];23(5):919-26. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26487143/>

27. Elbehiry A, Aldubaib M, Marzouk E, Abalkhail A, Almuzaini AM, Rawway M, et al. The development of diagnostic and vaccine strategies for early detection and control of human Brucellosis, particularly in endemic areas. *Vaccines (Basel)* [Internet].2023[citado 21 sept 2023];11(3). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36992237/>
28. Barreto G, Rodríguez H, Barreto H. *Brucellosis*, aspectos que limitan su justa valoración. *Rev Salud Anim* [Internet].2021[citado 21 sept 2023];43(1):e07. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2021000100001&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2021000100001&lng=es)
29. Weinborn A, Zanelli M, Troncoso I, Opazo Á, Valenzuela K, Cárdenas S, et al. Brucellosis en personas con riesgo ocupacional en clínicas veterinarias de dos ciudades del centro sur de Chile. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* [2020];31. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172020000400035&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172020000400035&nrm=iso)
30. Sankarasubramanian J, Vishnu U, Khader L, Sridhar J, Gunasekaran P, Rajendhran J. *Brucella* Base: Genome information resource. *Infect Genet Evol* [Internet].2016[citado 21 sept 2023];43:38-42. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27164438/>
31. Rivas O. *Brucella abortus*: patogénesis y regulación génica de la virulencia. *Tecnol Marcha* [Internet].2015[citado 21sept 2023];28(2):61-73. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0379-39822015000200061&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0379-39822015000200061&lng=en&tlng=es)
32. Bohlin J, Snipen L, Cloeckeaert A, Lagesen K, Ussery D, Kristoffersen AB, et al. Genomic comparisons of *Brucella spp.* and closely related bacteria using base compositional and proteome based methods. *BMC Evol Biol* [Internet].2010[citado 21 sept 2023];10:249. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20707916/>
33. Castaño M. *Brucellosis crónica y persistencia de ADN de Brucella melitensis* [Doctorado; Internet]. España: Universidad Autónoma de Madrid; 2010 [citado 21 sept 2023].87 p. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10486/6156>
34. Yagupsky P, Morata P, Colmenero J. Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clin Microbiol Rev* [Internet].2019;33(1):e00073-19. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/cmr.00073-19>
35. Vera E, San Miguel M, Vera I, Domínguez K. Características epidemiológicas y diagnóstico de brucellosis en pacientes del instituto de medicina tropical, periodo 2017-2019. *An Fac Cienc Méd (Asunción)* [Internet].2020[citado 21 sept 2023];53:49-58. Disponible en: [http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1816-89492020000100049&nrm=iso](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1816-89492020000100049&nrm=iso)
36. Etemadi A, Moniri R, Neubauer H, Dasteh Goli Y, Alamian S. Laboratory Diagnostic Procedures for Human Brucellosis: An Overview of Existing Approaches. *Jundishapur J Microbiol* [Internet].2019[citado 21 sept 2023];12(5):e91200. Disponible en: <https://brieflands.com/articles/jjm-91200.html>
37. Centers for Disease Control and Prevention [Internet].Brucellosis reference guide:Exposures, testing, and prevention. Estados Unidos: CDC; 2017[actualizado 2023; citado 21 sep 2023]. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/46133>.
38. Kaltungo B, Saidu S, Sackey A, Kazeem H. A review on diagnostic techniques for brucellosis. *Afr J Biotechnol* [Internet].2014[citado 21 sep 2023];13(1):1-10. Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/116688>
39. Cuba Salud 2018 [Internet].Microtécnica del FAB para la pesquisa de anticuerpos contra *Bucella spp.* . La Habana: MINSAP; 2018[actualizado 2023; citado 11 oct 2023]. Disponible en:

- <http://www.convencional2018.sld.cu/index.php/convencional2018/paper/view/1488/564>.
40. Hadush A, Pal M. Brucellosis - An Infectious Re-Emerging Bacterial Zoonosis of Global Importance. *Int J Livest Res* [Internet].2013[citado 12 oct 2023];3:28-34. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Brucellosis-An-Infectious-Re-Emerging-Bacterial-of-Hadush-Pal/25830e870d0b87e7b5b9c8707d373ebccc764c92>
  41. Ortega M, Valdezate S, Sáez-Nieto J. Diversidad Genética de Brucella en España. *SEM@foro* [Internet].2013[citado 21 sep 2023];55(Junio):38-44. Disponible en: <https://www.semicrobiologia.org/revista-semaforo/junio-2013>
  42. Echevarría E. Desarrollo de una prueba molecular para la identificación de especies de brucella spp IPK. 2021-2020 [Maestría; impresa]. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2020.1-82 p.
  43. Suárez M, Chaves E, Moreno E, Guzmán C. Brucella Genomics: Macro and Micro Evolution. *Int J Mol Sci* [Internet].2020[citado 21 sep 2023];21(20):7749. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7589603/>
  44. Zeybek H, Acikgoz Z, Dal T, Durmaz R. Optimization and validation of a real-time polymerase chain reaction protocol for the diagnosis of human brucellosis. *Folia Microbiol (Praha)* [Internet].2020;65(2):353-61. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00731-1>
  45. Dal T, Kara S, Cikman A, Balkan C, Acikgoz Z, Zeybek H, et al. Comparison of multiplex real-time polymerase chain reaction with serological tests and culture for diagnosing human brucellosis. *J Infect Public Health* [Internet].2018;12(3):337-42. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.11.008>
  46. Baily G, Krahn J, Drasar B, Stoker N. Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification. *J Tro Me. Hyg.*1992; 95(4): 271-5.
  47. Motta J, Waltero I, Abeledo M, Fernández O. Estudio retrospectivo de agentes infecciosos que afectan la reproducción bovina en el departamento del Caquetá, Colombia. . *Rev Salud Anim* [Internet].2012[citado 11 oct 2023];34(3):159-64. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2012000300004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2012000300004&lng=es)
  48. Jiang W, Chen J, Li Q, Jiang L, Huang Y, Lan Y, et al. Epidemiological characteristics, clinical manifestations and laboratory findings in 850 patients with brucellosis in Heilongjiang Province, China. *BMC Infect Dis* [2019[citado 11 oct 2023];19(1):439. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31109292/>
  49. Plasencia A. Utilidad de los anticuerpos IgM e IgG para el diagnóstico serológico de la brucelosis humana. 2016-2019 [Especialidad; impresa]. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2020.94 p.
  50. Aranís J C, Oporto C J, Espinoza M, Riedel K I, Pérez C C, García C P. Utilidad de la determinación de anticuerpos IgG e IgM por ELISA e inmunocaptura en una serie clínica de brucelosis humana. *Rev chil infectol* [Internet].2008[citado 11 oct 2023];25(2):116-21. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182008000200006&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000200006&nrm=iso)
  51. Guzmán C, Salgado B, Beltrán L, Hernández I, Vargas F, Rodríguez D. Evaluation of serological diagnostic tests of human brucellosis for prevention and control in Mexico. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology [Internet].2019;39(3):1-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03760-3>
  52. Nannan X, Chunmei Q, Lintao S, Sai W, Lulu Y, Shanshan W, et al. Evaluating the efficacy of serological testing of clinical specimens collected from patients with suspected brucellosis. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet].2023[citado 11

oct 2023];17(2):e0011131. Disponible en:

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011131>

53. Gemechu M, Singh Gill J, Arora A, Ghatak S, Singh DK. Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Rapid Diagnosis and Its Role in Prevention of Human Brucellosis in Punjab, India. *Int J Prev Med* [Internet].2011[citado 11 oct 2023];2(3):170-7. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3143531/>

54. Zambrano M, Pérez M. Evaluación de la aplicación del programa de control de brucelosis bovina en la provincia Manabí, Ecuador. *Rev Salud Anim* [Internet].2016[citado 11 oct 2023];38(2):79-84. Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2016000200002&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2016000200002&nrm=iso)

55. Álvarez M, Saldaña C, Ballesteros M, Martínez I, López A, Briones E, et al. Comparación de las pruebas: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología y hemocultivo con respecto a sensibilidad y especificidad, para la detección de *Brucella* spp en muestras humanas *Gac Med Mex* [Internet].2015[citado 11 oct 2023];151(5):620-7. Disponible en:

<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=61975>

56. Lugo O, Obregón A, Echevarría E, Rodríguez Y, Soto Y. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la brucelosis humana en tres provincias cubanas (2013-2016). *Rev cuban med trop* [Internet].2022[citado 16 oct 2023];2(74):e784. Disponible en:

<https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/784>

57. Serra J, P. G. Incidencia, etiología y epidemiología de la brucelosis en una área rural de la provincia de Lleida. *Rev Esp Salud Pública* [2000[citado 16 jun 2023];74:45-53. Disponible en:

[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1135-57272000000100006&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272000000100006&lng=es)

58. Oliveira C, Almeida JA, Feitosa A, Oliveira S, Rocha MV, FF. dS-J. Prevalence of *Brucella* spp in humans. *Rev Latino-Am Enfermagem* [Internet].2015[citado 21 jul 2023];23(5):919-26. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4660415/>

59. Hasanjani M, M M, Smailnejad S, Soleimani M, Hajiahmadi M. Epidemiological features and clinical manifestations in 469 adult patients with brucellosis in Babol, northern Iran. . *Epidemiol Infect* [Internet].2004[citado 16 oct 2023];132(6):1109-14. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2870202/>

60. Queipo M, Colmenero J, Bravo M, García M, Morata P. Usefulness of a quantitative real-time PCR assay using serum samples to discriminate between inactive, serologically positive and active human brucellosis. *Clin Microbiol Infect* [Internet].2008;14(12):1128-34. Disponible en:

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02095.x>

61. Kracalik IT, Abdullayev R, Asadov K, IsmayilovaR, Baghirova M. Human Brucellosis Trends: Re-emergence and Prospects for Control Using a One Health Approach in Azerbaijan (1983–2009). *Zoonoses Public Health* [Internet].2016;63(4):294-302. Disponible en:

<https://doi.org/10.1111/zph.12229>

62. Pila R, Pila R, García J, Paulina M, Hernández O, Torres G. Estudio clínico de la brucelosis humana. *Rev Med Uruguay* [Internet].1997[citado 16 oct 2023];13(1):226-7. Disponible en:

<https://revista.rmu.org.uy/index.php/rmu/edicion/1997>

63. Obregón A, Lugo O, Echevarría E, Hernández D. Brucelosis humana: Una zoonosis con impacto en la salud pública cubana. *BOLIPK*

[Internet].2023;33(29):226-7. Disponible en: <https://files.sld.cu/ipk/2023/08/07/boletin-epidemiologico-del-ipk-no-29-2023/>

64. Cuba Gd. «El Color de la Piel según el Censo de Población y Viviendas». . [citado 9 oct 2023]:20-7.

65. Bosilkovski M, Krteva L, Dimzova M, Vidinic I, Sopova Z, Spasovska K. Human brucellosis in Macedonia - 10 years of clinical experience in endemic region. Croat Med J [Internet].2010[citado 16 jun 2023];51(4):327-36. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2931438/>

66. Khezzani B, Narimane Aouachria A, Khechekhouche EA, Djaballah S, Djedidi T, Bosilkovski M. Características epidemiológicas de la brucelosis humana en la provincia de El-Oued en el sureste de Argelia. Santé Publique [2021;33(2):275-84. Disponible en: <https://www.cairn-mundo.info/revue-sante-publique-2021-2-page-275.htm>

67. Gómez J, Dalton K, Cruz N, Hernández H. Neurobrucelosis: hallazgos por resonancia magnética. Arch Neurocién (Mex) [Internet].2017[citado 26 jun 2023];22(4):62-9. Disponible en:

<http://neurociencias.valoragregado.org/index.php/ADN/article/view/169/189>

68. Muñiz L. Bruceloma Renal: A propósito de un caso Renal Brucelloma. Rev mex urol [Internet].2020;80(4):1-5. Disponible en:

<https://doi.org/10.48193/revistamexicanadeurologia.v80i4.650>

69. Huamán J, Valencia V, Arangüena L, Vera S. Neurobrucelosis. Rev Soc Peru Med Interna [Internet].2020[citado 16 oct 2023];33(4):183-6. Disponible en:

<https://doi.org/10.36393/spmi.v33i4.569>

70. Tori C. Brucelosis en niños: Presentación inusual de dos casos. Rev Med Hered [Internet].2013[citado 11 oct 2023];6(2):93-5. Disponible en:

<http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1018-130X1995000200006&nrm=iso>

71. Dávila R, Velarde L, Ruiz J, Zuta N, Guanilo C, Tinoco C, et al. Prevalencia de Brucelosis en trabajadores de la industria cárnica en el Perú. Bol Malariol Salud Ambient [Internet].2022[citado 16 oct 2023];62(2):183-9. Disponible en:

<http://iaes.edu.ve/iaespro/ojs/index.php/bmsa/article/view/457>

72. Jaffar A, Abukhamsin A. A 24-year study of the epidemiology of human brucellosis in a health-care system in Eastern Saudi Arabia. J Infect Public Health [Internet].2009;2(2):81-5. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2009.03.003>

73. García G, Ramírez J, Hernández M, Hernández L, Díaz E, Orozco H. Análisis de riesgos de la brucelosis en el estado de Tlaxcala. Salud Publica Mex [Internet].2014[citado 16 oct 2023];56(4):355-62. Disponible en:

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10632372006>

74. Picasso A, P. O. Diagnóstico serológico de la brucelosis. Protocolo de Diagnóstico Serológico Clínico. Infectious Diseases [2020. Disponible en:

<http://coli.usal.es/web/abydl/biblioteca/bibelectro.alu/documentos/protocolos3/brucelosi.htm#brucelosis>

## VIII. ANEXOS

---

### ANEXO 1

#### **Procedimientos para la extracción de ADN mediante el empleo del estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania)**

##### **Protocolo de extracción de ADN para sueros y sangre total:**

- Atemperar los buffer y las muestras.
- Adicionar en el fondo de un vial de 1,5 mL 20 µL de Proteinasa K. Utilizar tantos viales como muestras sean.
- Añadir 200 µL de la muestra en el vial donde está la Proteinasa K. Si no se cuenta con esa cantidad de suero completar con PBS hasta que se obtenga el volumen requerido.
- Añadir 200 µL de Buffer AL a la muestra y mezclar mediante vórtex por 15 segundos.
- Incubar el vial a 56 °C durante 10 minutos.
- Dar golpe de centrifuga para que descendan las gotas que pudieron haber quedado suspendidas en la tapa.
- Adicionar 200 µL de etanol absoluto en frío (96 – 100 °C), mezclar en el vórtex durante 15 segundos y dar golpe de centrifuga.
- Cuidadosamente transferir toda la mezcla a una columna QIAamp DNA mini kit® y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
- Desechar el tubo con el filtrado y colocar un nuevo tubo colector.
- Añadir 500 µL de Buffer AW1, cuidando no tocar el borde de la columna, y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
- Desechar el filtrado, colocar un nuevo tubo colector y adicionar cuidadosamente 500 µL de Buffer AW2. Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos.
- Desechar el filtrado, colocar un nuevo tubo colector y centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto.
- Desechar nuevamente el filtrado, colocar un vial de 1,5 mL y añadir a la columna 200 µL de Buffer AE o agua bidestilada estéril.
- Incubar a temperatura de laboratorio (15 – 25 °C) durante 1 minuto y luego centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
- Guardar la extracción a – 20 °C hasta su uso.