

# Implementación en Cuba de un ensayo molecular para la detección de *Brucella* spp. en humanos



<https://cu-id.com/2248/v46e01>

## Implementation in Cuba of a molecular assay for the detection of *Brucella* spp. in humans

Odisey Lugo Suárez <sup>1\*</sup>, Ana Margarita Obregón Fuentes <sup>1</sup>,  
 Eduardo Echevarría Pérez <sup>1</sup>, Yaindrys Rodríguez Olivera <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Avenida Novia del Mediodía, Km 6 1/2, La Lisa, 11400, La Habana, Cuba.

**RESUMEN:** La brucelosis es una zoonosis que puede cursar con síntomas leves o con manifestaciones severas. Las técnicas moleculares son muy sensibles y específicas en la detección oportuna y precoz del ADN de *Brucella* spp., tanto al inicio de la infección como en las recidivas y en las fallas terapéuticas. El propósito de la presente investigación fue implementar una PCR convencional (*bcs*p) que permita el diagnóstico oportuno de la brucelosis humana en Cuba, y así contribuir a evitar la aparición de complicaciones que pueden provocar secuelas invalidantes en el paciente. Se realizó una investigación de servicios y sistemas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Brucelas del IPK para evaluar la PCR-*bcs*p. Se determinaron los parámetros de sensibilidad y especificidad analíticas, así como sensibilidad y especificidad diagnósticas. La PCR convencional se aplicó a 86 sueros de casos sospechosos de brucelosis humana que resultaron negativos a los ELISAs IgM e IgG para *Brucella*. La PCR-*bcs*p presentó un límite de detección de 6,403 fg/μL, la especificidad analítica fue del 100 %, mientras que la sensibilidad y la especificidad diagnósticas mostraron valores de 96,3 % y 100 %, respectivamente. Tras su aplicación en sueros de casos probables de brucelosis humana negativos por serología se alcanzó un 85 % de positividad. La presente investigación fortaleció el diagnóstico microbiológico de la brucelosis humana en Cuba porque quedó implementada una herramienta molecular que garantiza el diagnóstico temprano de la enfermedad en nuestro medio.

**Palabras clave:** Brucella, brucelosis humana, diagnóstico, diagnóstico molecular.

**ABSTRACT:** Brucellosis is a zoonosis that may cause mild symptoms or severe manifestations. Molecular techniques are very sensitive and specific in the timely and early detection of *Brucella* spp. DNA, both at the beginning of the infection and in relapses and therapeutic failures. The aim of the present research was to implement a conventional PCR-*bcs*p that would allow the timely diagnosis of human brucellosis in Cuba, and thus contribute to avoid the occurrence of complications that can lead to disabling sequelae in the patient. A service and system research was carried out at the National Reference Laboratory for Leptospira and Brucella at IPK to evaluate the PCR-*bcs*p. The parameters of analytical sensitivity and specificity, as well as diagnostic sensitivity and specificity were determined. Conventional PCR was applied to 86 sera from suspected cases of human brucellosis that were negative to the IgM and IgG ELISAs for *Brucella*. PCR-*bcs*p presented a detection limit of 6.403 fg/μL. Analytical specificity was 100 %, while the diagnostic sensitivity and specificity showed values of 96.3 % and 100 %, respectively. After its application to sera from serologically negative probable cases of human brucellosis, 85 % positivity was reached. The present research strengthened the microbiological diagnosis of human brucellosis since a molecular tool guaranteeing the early diagnosis of the disease in Cuban environment has been implemented.

**Keywords:** Brucella, human brucellosis, diagnosis, molecular diagnosis.

### INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una zoonosis bacteriana con impactos negativos en la salud pública y el sector veterinario. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera una enfermedad "desatendida" porque su prevalencia es superior en países pobres con servicios de salud escasos, deficientes o inexistentes (1). Las vías de transmisión que propician que el ser humano adquiera la enfermedad son el contacto de su piel escoriada o sus mucosas con secreciones o tejidos de animales infectados, y el consumo de alimentos procedentes de animales enfermos, como es el caso de las carnes semicrudas y la leche o sus derivados no pasteurizados (2).

El género *Brucella* está constituido por doce especies, pero solo *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* y *Brucella canis* pueden afectar al hombre, provocando cuadros clínicos que van desde la ausencia de síntomas hasta el desenlace fatal (1). El 30 % de los pacientes presentan focalizaciones o complicaciones en cualquier órgano o sistema, lo que puede conllevar a que aparezcan secuelas temporales o permanentes que afectan la calidad de vida de los enfermos. Estas complicaciones son más frecuentes cuando se retrasa el diagnóstico certero y temprano de la enfermedad, porque el paciente no recibe oportunamente el tratamiento antimicrobiano adecuado, lo que favorece el tránsito hacia la cronicidad (3,4).

\*Autor para la correspondencia: Odisey Lugo Suárez. E-mail: [odisey@ipk.sld.cu](mailto:odisey@ipk.sld.cu)

Recibido: 19/10/2023

Aceptado: 29/12/2023

El diagnóstico microbiológico se puede realizar mediante cultivo, pruebas serológicas y ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. El cultivo del microorganismo a partir de sangre, líquidos corporales o tejidos, es el estándar o “prueba de oro” para este propósito pero, debido a que las brucelas se propagan con facilidad a través de aerosoles, este proceder solo se pudo realizar en laboratorios con nivel de bioseguridad III (5). Por su parte, los métodos serológicos, aunque su especificidad es baja, son los más utilizados porque son baratos, rápidos y reproducibles (6). Siendo así, para el diagnóstico de brucelosis, los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés) brindan resultados más rápidos que el cultivo y más específicos y sensibles que las pruebas serológicas (7).

Las ensayos de PCR son herramientas muy útiles para el diagnóstico oportuno de la brucelosis aguda, para la detección precoz de recidivas y para el seguimiento de los pacientes luego de que culminan el tratamiento antimicrobiano. Entre los métodos moleculares que se utilizan con mayor frecuencia para detectar el ADN de las diferentes especies y biovariedades de brucelas se encuentran la PCR Convencional, la PCR en Tiempo Real, la PCR Anidada, la PCR Múltiple y la PCR de Amplificación de Secuencia Aleatoria. En este sentido se conoce que los genes más efectivos en la detección molecular de estas bacterias son los que codifican para las proteínas de la membrana externa (Omp25, Omp31, Omp2a, Omp2b, bcs31), la secuencia 16S del ARNr, las regiones espaciadoras 16S y 23S y las secuencias de inserción. El límite de detección que se obtiene al emplear estas dianas moleculares oscila entre 10 y 100 fg de ADN genómico bacteriano, lo que equivale a la detección de 10 a 7 000 células de brucelas por mililitro de sangre total o leche (8).

En Cuba, la brucelosis humana es una enfermedad de declaración obligatoria. En el país existe una red de laboratorios provinciales que garantizan la pesquisa activa en los trabajadores expuestos a riesgo, mientras que la confirmación de los pacientes sospechosos se realiza en el Laboratorio Nacional de Referencia de Brucelas (LNRB) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK). Esto se logra con el empleo de técnicas serológicas comerciales que permiten la pesquisa (*Febrille Antigen Brucella*) y la confirmación (ELISA IgM e IgG *Brucella*) de la enfermedad (9).

La vigilancia serológica nacional de Brucelosis humana entre los años 2012 y 2016 denota que un elevado número de casos con sospecha clínica y epidemiológica de la enfermedad resultan negativos a las técnicas serológicas existentes en el LNRB. Estos resultados pertenecen, en su mayoría, a pacientes en los que se estudia un único suero que es extraído pocos días después de iniciado el cuadro clínico y/o el tratamiento con antimicrobiano (registros del laboratorio). Es por ello que se requiere contar en el laboratorio con

un método que detecte la presencia de *Brucella* spp., con mayor sensibilidad, especificidad y oportunidad, en las muestras negativas por serología que procedan de pacientes con sospecha de la enfermedad.

El objetivo de la presente investigación fue implementar en el LNRB del IPK un ensayo de PCR a punto final que permita la amplificación de un fragmento de 223 pb del gen que codifica para la proteína de membrana externa *bcs31* de 31Kb, presente en todas las especies y biovars del género *Brucella* (10).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una investigación de servicios y sistemas, en el periodo comprendido entre junio de 2015 y junio de 2016, con el fin de implementar la PCR-*bcs31* (10) en el LNRB del IPK.

### Muestras

Como material genómico de referencia se utilizó extracto de ADN de *Brucella abortus* ATCC 1119-3 (donado por el Instituto Gorgas de Panamá), con 64,03 ng/μL de concentración y 1,93 grado de pureza ( $A_{260}/A_{280}$ ).

Además, se emplearon cepas de referencia y aislados de bacterias filogenéticamente relacionadas con *Brucella* spp. (*Escherichia coli* ATCC/25923, *Salmonella typhimurium* ATCC/14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC/27853, *Streptococcus pneumoniae* ATCC/49619, *Staphylococcus aureus* ATCC/25923, *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae* O1 y *Yersinia enterocolitica*), propiciados por los laboratorios del Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia (CIDR) del IPK (11).

De siete sueros controles que resultaron negativos a los ELISAs-IgM e IgG *Brucella* (cinco de pacientes “aparentemente sanos” y dos controles negativos del estuche comercial *Febrille Antigen Brucella*), se obtuvo una mezcla 3 500 μL (500 μL de cada uno) que se conservó a - 20°C.

Los sueros empleados en la evaluación y la aplicación de la PCR-*bcs31* se dividieron en tres grupos. El Grupo I incluyó 80 sueros (seroteca del LNRB) de pacientes con sospecha clínica, epidemiológica y resultados positivos al ELISA IgM *Brucella* o a los ELISAs IgM e IgG *Brucella*. El Grupo II contó con 160 sueros negativos a los ELISAs IgM e IgG *Brucella*, de ellos 60 eran de pacientes con síndromes febriles de etiología conocida [leptospirosis (14), toxoplasmosis (14), hepatitis B (10), hepatitis C (9), infección por citomegalovirus (10), infección por Epstein Barr (3)] y 100 de donantes de sangre aparentemente sanos. Por último, el Grupo III se conformó por 86 sueros de pacientes sospechosos, en los que la muestra se había tomado en los primeros 30 días de evolución de la enfermedad y había resultado negativa por los ELISAs IgM e IgG para *Brucella*.

Para testar los sueros controles y confirmar o no serológicamente la infección en los Grupos I, II y III se utilizaron los ELISAs IgM e IgG para *Brucella*, comercializados por la firma VIRCELL, S.L. de Granada, España, ([www.vircell.com](http://www.vircell.com)), y se siguieron las instrucciones del fabricante.

La extracción de ADN de las cepas de referencia y los aislados de las bacterias filogenéticamente relacionados con *Brucella* spp., así como de los sueros de los Grupos I, II y III se realizó con el estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit(12). La concentración y calidad del ADN se verificó por espectrofotometría (BioPhotometer plus (Eppendorf, Alemania).

La implementación de la PCR-*bcs*p incluyó la utilización de los cebadores B4 y B5, sintetizados en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, de La Habana, Cuba), descritos por Baily y cols. (B4: 5'-TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA-3' y B5: 5'-CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG-3'). Estos cebadores amplifican un fragmento de 223 pb del gen que codifica la producción de la proteína de 31 KDa, *bcs*p, que se encuentra conservada en todas las especies y biovares del género *Brucella* (13).

La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 25  $\mu$ L. Sus componentes fueron 2,5  $\mu$ L de tampón PCR 10X; 0,5  $\mu$ L de desoxinucleótidos-trifosfato al 10 mM; 2,5  $\mu$ L de colorante 10X; 1,25  $\mu$ L de cada cebador (10  $\mu$ M); 0,125  $\mu$ L de la enzima Taq polimerasa (5 U/  $\mu$ L); volumen suficiente de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril y 5  $\mu$ L de la muestra de ADN. El programa de amplificación de la PCR-*bcs*p consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 93°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización (90°C por 1 minuto), hibridación (60°C por 1 minuto), extensión (72°C por 1 minuto) y una extensión final a 72°C por 10 minutos. En cada ensayo se utilizó como control negativo agua ultra pura estéril y como control positivo extracto de ADN de *Brucella abortus* ATCC 1119-3.

Los productos de ADN fueron analizados en geles de agarosa al 2 %, mediante electroforesis submarina utilizando como tampón de corrida el Tris-Borato-EDTA (TBE) al 0,5X. La cámara electroforética OA 110 (EIEttRofoR, Italia) acoplada a la fuente de electroforesis EFD 300 (EIEttRofoR, Italia), se ajustó a una diferencia de potencial de 120 V con una intensidad de corriente de 90 mA durante 45 minutos. Los amplicones se visualizaron en un transiluminador Macro-Vue UV 25 (Hoefer, EUA), usando el patrón de peso molecular de escalera de 100 pb (PROMEGA, MADISON, WI, EUA), y Bromuro de Etidio (1  $\mu$ g/mL) como agente intercalante del ADN. Se consideró positivo cuando se observó una banda de amplificación a 223 pb.

Para demostrar la no inhibición de las muestras de los Grupos I, II y III que resultaron negativas a la PCR-*bcs*p se les aplicó la PCR a punto final de la  $\beta$ -globina, que amplifica un fragmento de ADN de

268 pb, del gen que codifica para la síntesis de la  $\beta$ -globina humana. Los cebadores utilizados (Pfl32: 5'-TAG AAT CAA GAT CCC AAA TCC TCC-3' y PC04: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') (14) fueron igualmente sintetizados en el CIGB.

La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 25  $\mu$ L, con los mismos volúmenes de los componentes descritos con anterioridad. Como control positivo se utilizó 5  $\mu$ L de extracto de ADN de células HeLa facilitadas por el Laboratorio de Cultivo de Células del IPK. El control negativo fue el H<sub>2</sub>O ultrapura estéril. El programa de amplificación de la PCR de la  $\beta$ -globina tuvo una desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización (95°C por 1 minuto), hibridación (60°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 1 minuto y medio), que finalizaron con 8 minutos de extensión final a 72°C. Para realizar el análisis de los productos de ADN amplificados se procedió de igual manera que en el caso de la PCR-*bcs*p, considerándose positivo el ensayo cuando se observó una banda a nivel de los 268 pb.

### Evaluación y aplicación de la PCR-*bcs*p

El límite de detección o sensibilidad analítica se determinó a partir de diluciones decimales y seriadas, en Tampón Tris-EDTA 1X (TE), del ADN de referencia de *B. abortus*, cuyas concentraciones oscilaron entre 64,03 ng/ $\mu$ L y 6, 403 x 10<sup>-1</sup>fg/ $\mu$ L. A las mezclas de reacción se adicionaron 5  $\mu$ L de cada una de las diluciones y se sometieron al programa de amplificación descrito con anterioridad. Para realizar el ensayo del efecto de la matriz, se repitió el proceder anterior usando como diluyente el extracto de ADN de la mezcla de los sueros controles. Los experimentos se hicieron por triplicado en días alternos (garantizando la reproducibilidad). Se consideró como límite de detección la menor dilución donde se observó amplificación en el 100 % de las réplicas.

Para el ensayo de especificidad analítica se utilizó el ADN de referencia de las cepas y aislados bacterianos relacionados filogenéticamente con *Brucella* spp. La no existencia de banda al nivel de los 223 pb fue el resultado esperado.

Para calcular los parámetros de sensibilidad y especificidad diagnósticas se utilizaron los extractos de ADN de los sueros de los Grupos I y II, tomando como referencia los sistemas ELISA-IgM y ELISA-IgG *Brucella*, mientras que la aplicación se evaluó a través del uso de la PCR-*bcs*p en los sueros del Grupo III.

### Procesamiento y análisis estadístico de la información

Para los cálculos de sensibilidad y especificidad, así como para el contraste de los grupos, se utilizó el paquete estadístico EPIDAT 3.1. con un intervalo de

confianza del 95 %. Los resultados fueron expresados en figuras.

### Aspectos éticos

Para la evaluación de la prueba diagnóstica propuesta se cumplió con los principios establecidos por la Regulación No.47-2007 del CECMED y con las medidas de bioseguridad dictadas por las Resoluciones 8-2000, 103-2002 y 38-2006 del CITMA. De igual modo, se contó con la autorización de los laboratorios y entidades correspondientes para trabajar con los extractos de ADN y con los sueros proporcionados para esta investigación.

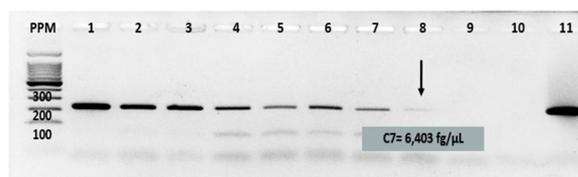
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inexistencia de síntomas y signos patognomónicos en la brucelosis humana, determina que durante la fase aguda de la enfermedad se confunda con otras enfermedades febriles que son típicas de las diferentes regiones endémicas (15). En este sentido, son numerosos los estudios que demuestran que la PCR es una herramienta útil para el diagnóstico oportuno de la brucelosis aguda, la detección precoz de recidivas y el seguimiento de los pacientes luego de que culminan el tratamiento antimicrobiano (16).

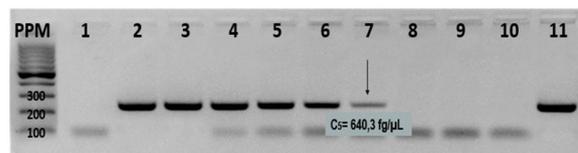
En esta investigación se implementa una PCR género específica que detecta un fragmento del gen que codifica para la proteína de membrana externa que está presente en todas las especies de brucelas (*bcs*). La PCR-*bcs* mostró una sensibilidad analítica de 6,403 fg/μL (Fig.1), pero al repetir el ensayo, tomando como matriz el ADN humano, el límite de detección disminuyó dos diluciones decimales (640,3 fg/μL) (Fig.2). Por otro lado, la Fig. 3 muestra que se constató un 100 % de especificidad analítica.

El límite de detección que se obtiene en esta investigación equivale al genoma de dos células de brucelas, número de microorganismos que se estima que cómo mínimo estarían presentes en 1 mL de sangre periférica de pacientes o animales con brucelosis (10). Sin embargo, investigadores en Grecia reportan que al utilizar los cebadores B4B5 obtienen valores superiores a los de este estudio. Ellos plantean que la posible causa de esta discrepancia puede ser la selección inadecuada del método de extracción de ADN, ya que se conoce que este es un punto crítico para garantizar la fiabilidad de los resultados en el diagnóstico molecular (16).

Por su parte, la disminución en dos diluciones decimales del límite de detección cuando se utiliza el ADN humano como matriz, indica que cuando la PCR-*bcs* es negativa en un paciente con sospecha clínica y epidemiológica de la enfermedad, puede deberse a que exista una baja carga bacteriana o a la presencia de sustancias inhibitoras de la PCR. De igual modo, el excelente resultado de especificidad analítica ratifica que la diana molecular escogida es la adecuada.



**Figura 1.** Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio que muestra la amplificación, mediante la PCR-*bcs*, de las diluciones del extracto de ADN de *B. abortus* en TE 1X. Línea PPM: patrón de peso molecular de 100 pb (Promega); línea 1:  $C_0 = 64,03 \text{ ng}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^6 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 2:  $C_1 = 6,403 \text{ ng}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^5 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 3:  $C_2 = 640,3 \text{ pg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^4 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 4:  $C_3 = 64,03 \text{ pg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^3 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 5:  $C_4 = 6,403 \text{ pg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^2 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 6:  $C_5 = 640,3 \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^1 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 7:  $C_6 = 64,03 \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 8:  $C_7 = 6,403 \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^0 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 9:  $C_8 = 6,403 \times 10^{-1} \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $0,2 \times 10^{-1} \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 10: control negativo; línea 11: control positivo. / Submarine electrophoresis in 2% agarose gel with ethidium bromides showing the amplification, by PCR-*bcs*, of dilutions of *B. abortus* DNA extract in 1X TE. PPM: 100 bp molecular weight marker (Promega); Line 1:  $C_0 = 64,03 \text{ ng}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^6 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 2:  $C_1 = 6,403 \text{ ng}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^5 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 3:  $C_2 = 640,3 \text{ pg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^4 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 4:  $C_3 = 64,03 \text{ pg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^3 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 5:  $C_4 = 6,403 \text{ pg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^2 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 6:  $C_5 = 640,3 \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^1 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 7:  $C_6 = 64,03 \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 8:  $C_7 = 6,403 \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^0 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 9:  $C_8 = 6,403 \times 10^{-1} \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $0,2 \times 10^{-1} \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 10: negative control; line 11: positive control.



**Figura 2.** Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio que muestra la amplificación, mediante la PCR-*bcs*, de las diluciones del extracto de ADN de *B. abortus* en la mezcla de extractos de ADN humano. Línea PPM: patrón de peso molecular de 100 pb (Promega); línea 1: control negativo; línea 2:  $C_0 = 64,03 \text{ ng}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^6 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 3:  $C_1 = 6,403 \text{ ng}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^5 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 4:  $C_2 = 640,3 \text{ pg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^4 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 5:  $C_3 = 64,03 \text{ pg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^3 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 6:  $C_4 = 6,403 \text{ pg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^2 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 7:  $C_5 = 640,3 \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^1 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 8:  $C_6 = 64,03 \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 9:  $C_7 = 6,403 \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^0 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 10:  $C_8 = 6,403 \times 10^{-1} \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $0,2 \times 10^{-1} \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); línea 11: control positivo. / Submarine electrophoresis in 2% agarose gel with ethidium bromide showing the amplification, by PCR-*bcs*, of dilutions of *B. abortus* DNA extract in the mixture of human DNA extracts. PPM: 100 bp molecular weight marker (Promega); line 1: negative control; line 2:  $C_0 = 64,03 \text{ ng}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^6 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 3:  $C_1 = 6,403 \text{ ng}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^5 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 4:  $C_2 = 640,3 \text{ pg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^4 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 5:  $C_3 = 64,03 \text{ pg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^3 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 6:  $C_4 = 6,403 \text{ pg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^2 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 7:  $C_5 = 640,3 \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^1 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 8:  $C_6 = 64,03 \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 9:  $C_7 = 6,403 \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^0 \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 10:  $C_8 = 6,403 \times 10^{-1} \text{ fg}/\mu\text{L}$  ( $0,2 \times 10^{-1} \text{ geq}/\mu\text{L}$ ); line 11: positive control.

En el LNRB del IPK no se dispone de un BSL 3 para diagnóstico rutinario de brucelosis. Esto ha propiciado que no se pueda contar con el cultivo como “estándar perfecto” en la evaluación de la tecnología molecular que se propone. No obstante, la Regulación No. 47-2007 del CECMED, referida a los requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnósticos, plantea que si al evaluar sensibilidad y especificidad se utilizan muestras de pacientes con estados clínicos bien definidos, corroborados por diagnóstico microbiológico y apoyados en los antecedentes epidemiológicos los resultados que se obtengan se consideraran como válidos (17).

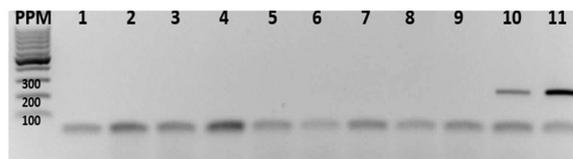
De los 80 sueros del Grupo I, 77 resultaron positivos por la PCR-*bcs*p, mientras que los 160 del Grupo II fueron negativos, para valores de sensibilidad y especificidad diagnósticas de 96,3 % y 100 %, respectivamente. Además, al aplicar la PCR-*bcs*p a las 86 muestras de suero pertenecientes al Grupo III se observó el amplicón a la altura de las 223 pb en 73 de ellas (85%) (Fig. 4). Por último, las 266 muestras de los grupos I, II y III que resultaron negativas a la PCR-*bcs*p fueron positivas a la PCR de la  $\beta$ -globina humana, lo cual indica que no contenían sustancias inhibitorias de la PCR.

El porcentaje de positividad de la PCR-*bcs*p en las muestras seleccionadas, se debe, entre otras razones, a la selección del tipo de muestra, ya que el suero, al no contener anticoagulantes, hemoglobina, ni elevadas concentraciones de ADN humano, es ideal para el diagnóstico molecular (18). Además, la toma de la muestra se realiza en el periodo en que ocurre la ruptura de las células fagocitarias que constituyen los nichos replicativos de *Brucella* spp. (entre la 1ra y 7ma semana post-infección), lo cual da lugar a la bacteriemia inicial en esta enfermedad (19).

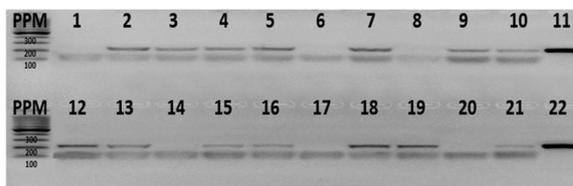
Es importante señalar que las técnicas serológicas disponibles en la red de laboratorios de Cuba, detectan anticuerpos producidos contra las cepas lisas, pero no contra las cepas rugosas, esto determina que serológicamente escapen los individuos infectados por *B. canis* en nuestro país. En este sentido, la aplicación de la PCR-*bcs*p (genérica) permite el diagnóstico y la confirmación de la infección en este grupo de enfermos.

De igual modo, consideramos que la selección de los cebadores B4B5 contribuyó a los resultados obtenidos. Ellos son altamente sensibles y específicos, han demostrado que permiten la amplificación de la bacteria incluso en muestras con baja carga bacteriana, son útiles en las diferentes técnicas de amplificación del ADN, y su aplicación es versátil, pues su rendimiento es adecuado tanto en muestras de humanos, como de animales y alimentos, como queso y leche (20).

La principal desventaja de la PCR radica en que no puede determinar si el ADN que se detecta pertenece a un microorganismo vivo o muerto, por esta razón el resultado que se obtenga debe incluir el análisis de los



**Figura 3.** Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio que muestra los resultados del ensayo de especificidad analítica. Línea PPM: patrón de peso molecular de 100 pb (Promega). Línea 1: control negativo; línea 2: extracto de ADN de la cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; línea 3: extracto de ADN de la cepa de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25923; línea 4: extracto de ADN de la cepa de referencia de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; línea 5: extracto de ADN de la cepa de referencia de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619; línea 6: extracto de ADN de la cepa de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; línea 7: extracto de ADN de un aislamiento de *Haemophilus influenzae*; línea 8: extracto de ADN de un aislamiento de *Vibrio cholerae* O1; línea 9: extracto de ADN de un aislamiento de *Yersinia enterocolitica*; líneas 10 y 11: controles positivos. /Submarine electrophoresis in 2% agarose gel with ethidium bromide showing the results of the analytical specificity test. Line PPM: 100 bp molecular weight marker (Promega); line 1: negative control; line 2: DNA extract from *Staphylococcus aureus* reference strain ATCC 25923; line 3: DNA extract from *Escherichia coli* reference strain ATCC 25923; line 4: DNA extract from *Salmonella typhimurium* reference strain ATCC 14028; line 5: DNA extract from *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 reference strain; line 6: DNA extract from *Pseudomonas aeruginosa* reference strain ATCC 27853; line 7: DNA extract from *Haemophilus influenzae* isolate; line 8: DNA extract from a *Vibrio cholerae* O1 isolate; line 9: DNA extract from *Yersinia enterocolitica* isolate; lines 10 and 11: positive controls.



**Figura 4.** Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio que muestra los resultados de la aplicación de la PCR-*bcs*p en muestras negativas por serología y con sospecha de brucelosis (Grupo III). Línea PPM: patrón de peso molecular de 100 pb (Promega). Línea 1: control negativo; líneas 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, y 21: muestras positivas; líneas 6, 8, 14, 17 y 20: muestras negativas; Líneas 11 y 22: controles positivos. / Submarine electrophoresis in 2% agarose gel with ethidium bromide showing the results of the application of PCR-*bcs*p in serologically negative samples and with suspicion of brucellosis (Group III). Line PPM: 100 bp molecular weight marker (Promega). Line 1: negative control; lines: 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, y 21: positive samples; lines 6, 8, 14, 17 y 20: negative samples; lines 11 and 22: positive controls.

datos clínicos y los antecedentes epidemiológicos del paciente porque un resultado negativo en un paciente enfermo no excluye el diagnóstico de la enfermedad. Además, este ensayo no permite conocer la especie que está ocasionando la infección.

El enfoque de “Una Salud” es una estrategia interdisciplinaria que reconoce la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental. En el control de la brucelosis humana esta perspectiva integral resulta fundamental debido a la naturaleza zoonótica de la enfermedad (21). Es por ello que las futuras investigaciones se proyectarán hacia la tipificación molecular de estas bacterias en humanos y animales, para que de esta manera se puedan aplicar medidas de control ambiental efectivas.

## CONCLUSIONES

Se implementa en el LNRLB-IPK la PCR-*bcs*p, metodología a punto final y se logran elevados valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica, lo cual fortalece la vigilancia y el control de brucelosis humana en Cuba. Su aplicación permite detectar una alta positividad en muestras de casos sospechosos que resultan negativas por serología. El diagnóstico temprano y certero, permite la oportuna aplicación del tratamiento efectivo contra la infección por *Brucella* spp.

## AGRADECIMIENTOS

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

## REFERENCIAS

1. Laine CG, Johnson VE, Scott HM, Arenas-Gamboa AM. Global Estimate of Human Brucellosis Incidence. *Emerg Infect Dis.* 2023; 29(9):1789-97. DOI: 10.3201/eid2909.23 0052. PMID: 37610167; PMCID: PMC1046 1652.
2. Alharbi MGT, Alanazi AS, Alanazi NF, Alsaleh AK, Alanazi SJ, Alanazi SM, et al. Overview of Brucellosis: Simple Review Article. *Pharmacophore.* 2022;13(2):101-6. Available in: <https://doi.org/10.51847/oSqu90fp0k>.
3. O'Callaghan D. Brucellosis humana: avances recientes y retos futuros. *Infect Dis Poverty.* 2020; 9(101). Available in: <https://idpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40249-020-00715-1>
4. Amjadi O, Rafiei A, Mardani M, Zafari P, Zarifian A. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis. *Infect Dis.* 2019; 51 (5): 321-33. DOI: 10.1080/23744235.2019.1568545
5. Yagupsky P, Morata P, Colmenero JD. Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clin Microbiol Rev.* 2019;33(1):e00073-19. DOI: 10.1128/CMR.00073-19.
6. Thakura S, Bedia J, Singha R, Gillb K, Arorac A, Kashyap N. Quantitative polymerase chain reaction based quantification of *Brucella* DNA in serum of pre- and post-therapeutic occupationally exposed infected human population. *Journal of Infection and Public Health* 2018;11(4): 514-20. DOI:10.1016/j.jiph. 2017.10.004
7. Projahn M, Hammerl JA, Dieckmann R, Dahouk SA. A Proof of Principle for the Detection of Viable *Brucella* spp. in Raw Milk by qPCR Targeting Bacteriophages. *Microorganisms.* 2020;8(9):1326. DOI: 10.3390/microorganisms 8091326.
8. Wang Y, Wang Z, Zhang Y, Bai L, Zhao Y, Liu C, et al.. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of human brucellosis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*2014; 13:31. DOI: 10.118 6/s12941-014-0031-7
9. Lugo O, Obregón AM, Echevarría E, Rodríguez Y, Soto Y. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la brucelosis humana en tres provincias cubanas (2013-2016). *Rev Cubana Med Trop*2022; 74(2):e784. Disponible en: [https:// revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/arti cle/view/784](https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/784).
10. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 1992; 95:271-5. PMID: 1495123.
11. Mukherjee F, Nagmani K, Surendra KSNL, Subramanian BM, Bahekar VS, Prasad A, et al.. Optimization and validation of a diagnostic real-time PCR for bovine brucellosis. *Adv Anim VetSci.* 2015; 3(11): 577-87. DOI:10.14737/ journal.aavs/2015/3.11.577.587.
12. QIAGEN. Manual de instrucciones de uso de QIASymphony DSP DNA 2015; 40 p. Disponible en: <http://www.qiagen.com>.
13. Al- Khater B, Al- Ouqaili M, Al- Anii S. In Term of Molecular Technique, Taxonomic and Diagnostic Aspects of Chronic Human Brucellosis in Ramadi City. *Anb Med J.* 2020; 12(1):1-12. DOI: 10.33091/AMJ.0101212015.
14. Talmaci R, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Coriu D, Colita D, Gavrilă L. Scanning of beta-globin gene for identification of beta-thalassemia mutation in Romanian population. *J Cell Mol Med.* 2004;8(2):232-40. DOI:10.1111/j.1582-49 34.2004.tb00278.x.
15. Ariza X. Brucellosis. En: Rozman C, Cardellach F, Agustí A, et al., editores. *Tratado de Medicina Interna Farreras-Rozman.* Vol 2. 19ª ed. España: Elsevier; 2020. p. 2045-7.
16. Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(4):1211-8. DOI:10.1128/JCM.00010-06
17. Cecmed. Regulación No. 47-2007: Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores. Disponible en: <http://www.ccc-med.cu/Pages/AmbReg-8.htm>.

18. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum Is the Preferred Clinical Specimen for Diagnosis of Human Brucellosis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39 (4): 1661-4. DOI:10.1128/JCM.39.4.1661-1664.2001.
19. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Brucella y Francisella*. En: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología médica*. 9<sup>na</sup> ed. España: Elsevier; 2021. p. 383-90.
20. Yu WL, Nielsen K. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *CroatMed J.* 2010; 51(4):306-13. DOI: 10.3325/cmj.2010.51.306.
21. Ibarra E, López E, López F, Silva J. (“Una sola salud”, (OneHealth): Estudio de caso brucelosis en Carchi - Ecuador. *Horizontes de Enfermería* 2021; (11), 70-80. DOI: <https://doi.org/10.32645/13906984.1085>.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

**Contribución de los autores:** Odisney Lugo Suárez: **Conceptualización, Investigación, Metodología, Software, Validación, Redacción del borrador original**. Ana Margarita Obregón Fuentes: **Conceptualización, Curación de datos, Análisis formal, Adquisición de fondos, Metodología, Administración de proyecto, Supervisión, Redacción, revisión y edición**. Eduardo Echevarría Pérez: **Conceptualización, Análisis formal, Investigación, Recursos, Supervisión, Visualización, Redacción, revisión y edición**. Yaindrys Rodríguez Olivera: **Análisis formal, Redacción, revisión y edición**.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)