

Detección de *Brucella* spp. por un sistema inmunocromatográfico comercial, en muestras ambientales cubanas

Detection of *Brucella* spp using a commercial system in enviroment cuban samples

Dra. Ana Margarita Obregón Fuentes;^I Lic. Ariana Cabrera Alvarado;^{II}
Tec. Eduardo Echevarría Pérez^I; Lic. Yaindrys Rodríguez Olivera^I; Lic. José Rodríguez Silveira^I

^I Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". La Habana, Cuba.

^{II} Universidad de la Habana. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: actualmente en Cuba se desconoce la circulación de las especies de *Brucella* en el medio ambiente, por la inexistencia de métodos de laboratorio que permitan su identificación.

Objetivos: detectar *Brucella* spp. en muestras ambientales cubanas aplicando un sistema inmunocromatográfico comercial.

Métodos: se estudiaron 59 muestras ambientales de una zona endémica de brucelosis bovina y 50 muestras ambientales de zonas controladas de la enfermedad, durante el período diciembre de 2011 y hasta febrero de 2012. Se utilizó el sistema inmunocromatográfico directo de flujo lateral para *Brucella* spp. comercializado en Cuba.

Resultados: el 52,5 % (31/59) de las muestras ambientales de la zona endémica resultaron positivas para *Brucella* spp. Las muestras ambientales que presentaron el mayor porcentaje de positividad fueron el estiércol (62,5 %) y las del suelo cementado (26,9 %). Predominaron las reacciones fuertemente positivas en un 74,1 % (23/31).

Conclusiones: el sistema inmunocromatográfico comercial detecta un elevado porcentaje de *Brucella* spp. en muestras ambientales de la zona endémica cubana, lo que pudiera avalar su implementación en la red de laboratorios de Salud Pública y del Instituto de Medicina Veterinaria de Cuba. Los resultados de esta investigación deben complementarse con los aislamientos de brucelas en el medio ambiente, pacientes humanos y en animales.

Palabras clave: *Brucella* spp.; detección de brucelas; medio ambiente; sistemas rápidos inmunocromatográficos.

ABSTRACT

Introduction: Information about the circulation of *Brucella* species in the Cuban environment is not currently available due to the lack of laboratory methods for their identification.

Objectives: Detect *Brucella* spp. in Cuban environmental samples using a commercial immunochromatographic system.

Methods: A study was conducted of 59 environmental samples from an endemic zone for bovine brucellosis and 50 environmental samples from areas where the disease has been controlled, from December 2011 to February 2012. Use was made of the direct lateral flow immunochromatographic system for *Brucella* spp. commercially available in Cuba.

Results: Of the environmental samples from the endemic zone 52.5% (31/59) tested positive for *Brucella* spp. The environmental samples showing the highest positivity were those taken from dung (62.5%) and cemented soil (26.9%). Strongly positive reactions predominated in 74.1% (23/31) of the samples.

Conclusions: The commercial immunochromatographic system used detected a high percentage of *Brucella* spp. in environmental samples from the endemic zone, which could justify its implementation in the Public Health laboratory network and the Institute of Veterinary Medicine of Cuba. The results obtained should be complemented with *Brucella* isolates from the environment, human patients and animals.

Keywords: *Brucella* spp., *Brucella* detection, environment, rapid immunochromatographic systems.

INTRODUCCIÓN

Se conoce con el término brucelosis al conjunto de enfermedades ocasionadas, tanto en el hombre como en los animales, por microorganismos del género *Brucella*. Esta zoonosis reemergente bacteriana, incluye, tanto las diferentes formas clínicas de la infección humana así como los diversos cuadros que se presentan en el ganado, sobre todo en forma de abortos epizooticos. La expresión "brucelosis humana", es más correcta que las denominaciones "fiebre ondulante" o "fiebre de Malta", que hacen referencia a una de sus características clínicas o a una localización geográfica. Esta enfermedad fue descubierta por Bruce en 1887 y se relaciona en los humanos con contactos con animales y productos lácteos o tejidos, infectados con brucelas. Desde el punto de vista médico, sanitario y económico, la brucelosis es un problema de primer orden para los países desarrollados donde es todavía endémica, presentando costos económicos muy elevados.^{1,2}

El género bacteriano *Brucella* es catalogado por muchos autores como monoespecífico, por tener en el material genético de las cepas que lo integran, solo un 5 % de divergencia.³ Sin embargo, desde el punto de vista bioquímico y

serológico existen 10 especies de brucelas clasificadas por pruebas bioquímicas y serológicas. Las tres especies principales responsables de la enfermedad en los humanos, con especificidad para algunos animales, distribución geográfica determinada y peculiaridades patógenas intrínsecas son *Brucella melitensis*, quién es la responsable de la gran mayoría de los casos, incluyendo los de mayor gravedad; *Brucella abortus* más frecuente en los bovinos, por utilizar la carne y la leche como sustento y nutrición para las poblaciones humanas; y *Brucella suis*, que es poco frecuente en los humanos pero sí afecta considerablemente al ganado porcino. Las restantes especies *Brucella ovis*, *Brucella canis*, *Brucella neotomae*, *Brucella maris*, *Brucella pinnipediae* y *Brucella cetaceae*, son menos conocidas.⁴ En el año 2008, se reportó la especie *Brucella microti*, aislada del suelo, la cual en 2010 demostró su virulencia en modelos murinos.^{3,5}

Brucella spp., posee una gran capacidad para sobrevivir y persistir en el medio ambiente bajo condiciones apropiadas de temperatura, humedad moderada, pH cercano a la neutralidad y protección contra el sol. En zonas endémicas, estas bacterias poseen un amplio espectro de hospederos, entre ellos a las especies rumiantes domésticas, las ovejas, las cabras, el ganado vacuno, los cerdos, los perros, los caballos, los camellos, los animales de vida libre (bisontes, búfalos, ciervos, alces, renos, liebres), e incluso se reportan datos sobre aislamientos en mamíferos marinos (cetáceos y focas), por lo que su trascendencia ecológica podría ser aún mayor.⁶

La identificación de las brucelas se puede realizar por la tinción de Gram, y la composición química-antigénica de los componentes de membrana externa, el espacio periplásmico y la membrana citoplasmática. También existen sistemas novedosos que permiten el cultivo e identificación de las brucelas de forma automatizada, entre ellos se encuentran los comercializados por las compañías de bioMérieux (bioMérieux, Durham, NC, USA) y Becton-Dickinson (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA). En el año 2011 aparece comercialmente un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral que detecta los antígenos de las especies *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* y *Brucella suis*, presentes en muestras ambientales.^{4,7-8}

En Cuba, existe un programa de prevención y control de la brucelosis editado desde el año 1998. En particular, durante las décadas de los años 80 y 90 del siglo XX, el diagnóstico bacteriológico de esta enfermedad, se realizaba por cultivo, tanto en animales como en humanos. A partir de este momento, se deprime la vigilancia de la enfermedad, quedando solo establecido el estudio serológico de los animales con interés económico dentro de los servicios veterinarios. Por otra parte, en estos años aparecieron dos fenómenos sociales, que influyeron en el incremento de la morbilidad de la brucelosis tanto en los animales como en los humanos, el incremento de las crías de animales para la alimentación humana y la producción casera de los derivados lácteos. (Comunicación personal de Madruga Galván Z. Instituto de Medicina Veterinaria, La Habana, Cuba.2012.)

Desde el año 2010, las autoridades del Ministerio de Salud Pública (MINSAP), junto a las del Instituto de Medicina Veterinaria (IMV), decidieron revitalizar el diagnóstico microbiológico de la brucelosis humana, y responsabilizaron con esta misión al Laboratorio Nacional de Referencia de Brucelas (LNRB), de la Vicedirección de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). Dentro de las prioridades inmediatas establecidas estuvieron encontrar nuevos métodos directos, que posibilitaran la detección de *Brucella* spp. tanto en el medio ambiente como en los casos reportados. Para ello se adquirió un nuevo sistema inmunocromatográfico directo de flujo lateral para la detección de *Brucella* spp. comercializado en Cuba. El objetivo del presente estudio fue aplicar el sistema

inmuncromatográfico directo de flujo lateral para *Brucella* spp., en muestras ambientales cubanas.

MÉTODOS

Se realizó un estudio analítico descriptivo que abarcó el período desde septiembre de 2011 y hasta mayo de 2012.

Muestras ambientales

Fueron estudiadas 59 muestras ambientales, en la Empresa Pecuaria de Punta de Palma de la provincia de Pinar del Río (zona endémica de brucelosis), donde habitan búfalos y ganado vacuno de importancia económica (tabla 1). De igual manera fueron incluidas 50 muestras ambientales de dos zonas controladas donde habitan animales "supuestamente sanos" dedicados a la investigación científica, los Bioterios del PK y del CENEDI. Las muestras ambientales fueron colectadas aleatoriamente.

Estuche comercial: *Brucella* test, para la detección de antígenos contra *Brucella* spp., a partir de las muestras ambientales.

La prueba es un ensayo inmuncromatográfico de flujo lateral, para la detección de los antígenos de *B. melitensis*, *B. abortus*, y *B. suis*, en muestras ambientales. El sistema puede detectar una concentración mínima de 10^5 UFC/ mL de estas bacterias.

Procedimiento del ensayo

1. Abrir el estuche y sacar cuidadosamente dispositivo plástico.
2. Tomar con un hisopo de algodón las muestras ambientales sólidas, líquidas y de superficie, y transferidas a los tubos de colección con 0,5 mL del diluyente que trae cada estuche comercial.
3. Remover el hisopo por 10 segundos dentro del diluyente, evitar formar espumas, y finalmente comprimir contra las paredes del tubo para dejar escurrir el residuo de muestra.
4. Añadir 4 gotas de la muestra (equivalente a 120 μ L), con el gotero desechable en el dispositivo plástico,
5. Incubar la reacción por 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Leer e interpretar los resultados.

Resultado negativo: toda muestra que no produce una banda de color púrpura en la zona de prueba.

Resultado positivo: toda muestra que produce una banda (débil o fuerte) de color púrpura en la zona de prueba.

En este ensayo, puede existir la reacción débil positiva cuya intensidad de la coloración púrpura es inferior a la encontrada en la zona de control y la reacción fuerte positiva cuya intensidad de coloración púrpura es igual o superior a la encontrada en la zona de control.

RESULTADOS

De las 59 muestras ambientales de la zona endémica, 31 resultaron positivas (52,5 %), por la prueba de *Brucella* test, mientras que las restantes (28) resultaron negativas para un 47,4 % . De las muestras ambientales tomadas en las zonas controles no fue detectada ninguna reacción positiva. Dentro de las 31 muestras positivas por el sistema inmunocromatográfico directo de flujo lateral para *Brucella* spp., pertenecientes a la zona endémica, 17 (71 %), 12 (46,1 %) y 2 (22,2 %) pertenecían a muestras sólidas, de superficies y líquidas, respectivamente (tabla 1).

Tabla 1. Distribución de muestras ambientales obtenidas de la zona endémica de brucelosis en Pinar del Río y de la zona controlada de los bioterios de La Habana

Muestras		Zona	
		endémica	control
Sólidas	Estiércol	18	15
	Tierra	3	5
	Pasto	2	0
	Fango	1	5
De superficie	Divisiones de hierro de los corrales	6	0
	Paredes del bebedero	2	0
	Suelo cementado	13	20
	Paredes de cemento	5	0
Líquidas	Agua del bebedero	8	5
	Agua de la laguna	1	0

La positividad encontrada por el sistema inmunocromatográfico directo para *Brucella* spp. en las muestras ambientales divididas en sólidas, de superficies y líquidas, se presenta en la tabla 2. Obsérvese, que de las 24 muestras sólidas 15 de estiércol resultaron positivas, para un 62,5 %, y una de tierra y fango respectivamente para un 4,1 % . Dentro de las muestras positivas de superficies predominaron las de suelo cementado (7/26) para un 26,9 % , siguiéndole en orden decreciente las muestras de las divisiones de hierro de los corrales para un 11,5 % (3/26), y las muestras de las paredes de cemento y de los bebederos, ambas con un 3,8 % (1/26). De las muestras líquidas se presentó un 22,2 % (2/9) de positividad correspondientes a las aguas de los bebederos.

Existió un 25,8 % de reacciones débiles positivas (8/31) y predominaron las reacciones fuertemente positivas (23/31), para un 74,1 % , mediante la aplicación del sistema inmunocromatográfico directo de flujo lateral para *Brucella* spp.

Tabla 2. Porcentaje de las muestras ambientales sólidas, de superficies y líquidas, por el sistema inmunocromatográfico directo para *Brucella* spp.

Muestras ambientales		Total	Positivas	Porcentaje
Sólidas (n=24)	Estiércol	18	15	62,5
	Tierra	3	1	4,17
	Pasto	2	0	0
	Fango	1	1	4,17
Superficies (n=26)	Divisiones de hierro de corrales	6	3	11,54
	Paredes del bebedero	2	1	3,85
	Paredes de cemento	5	1	3,85
	Suelo cementado	13	7	26,92
Líquidas (n=9)	Agua del bebedero	8	2	22,22
	Agua de la laguna	1	0	0
Gran Total		59	31	52,54

Leyenda: %: porcentaje, +: positivo

DISCUSIÓN

Según estimaciones realizadas por los especialistas del IMV, del Ministerio de la Agricultura, se plantea que existen más de seis mil búfalos (*Babalus bubalis*) portadores de brucelas, viviendo de forma salvaje en la zona de Punta de Palma, en la provincia de Pinar del Río, lo que constituye un factor de riesgo para contraer la infección por *Brucella* spp., a partir del medio ambiente. Epidemiológicamente el control de las brucelas resulta difícil. Por otra parte, es sabido que los búfalos son capturados por el hombre para incrementar sus crías, la calidad de las variedades genéticas y para fomentar la alimentación de las poblaciones humanas, lo que constituye un riesgo potencial de contraer la infección por estas bacterias. En este sentido, existen evidencias que revelan que los búfalos, son un fuerte reservorio de *Brucella abortus* en particular y que son los responsables de la alta incidencia de la enfermedad en muchos países del mundo.

La Empresa Pecuaria de Punta de Palma, tiene centros y áreas donde se reporta una alta incidencia de brucelosis animal, según cifras del IMV (2011). A esta empresa llegan los búfalos después de ser capturados en su hábitat salvaje y la mayoría tiene el diagnóstico positivo de brucelosis.⁹

Es sabido que las brucelas sobreviven en suelos, agua, estiércol, superficies, en condiciones apropiadas de bajas temperaturas, humedad moderada, pH cercano a la neutralidad y protección contra la incidencia de la luz solar; también permanecen por años en restos de animales congelados, y en materiales desecados con materia orgánica como las excretas de los búfalos.¹⁰ En la literatura revisada, no existen reportes sobre el uso de sistemas inmunocromatográficos directos de flujo lateral para *Brucella* spp. Este sistema es de nueva generación, y fue adquirido por Cuba en el año 2011, dirigido a la identificación rápida de estas bacterias usando en primera instancia las muestras ambientales tanto de una zona endémica de brucelosis así como una zona control libre de patógenos.

En esta investigación, más del 50 % de las muestras estudiadas de la zona endémica resultaron positivas por el sistema inmunocromatográfico directo de flujo lateral para *Brucella* spp. Este resultado confirma la utilidad del sistema, al ser capaz de detectar brucelas excretadas al medio ambiente, por reservorios de vida salvaje como son los búfalos. El 47,4 % de muestras negativas pudiera atribuirse a varios factores, entre ellos, la acción directa de la luz solar sobre los suelos, sobre las heces fecales o a la acción directa de desinfectantes para higienizar los corrales donde el ganado vacuno y los búfalos permanecen cuando están en cautiverio, acciones que se realizan según la normativa veterinaria.

Los porcentajes de positividad en las muestras líquidas son los más bajos al compararse con las restantes muestras estudiadas. Esto pudiera explicarse, entre otros factores, a que los bebederos están expuestos directamente a la acción de la luz solar y son limpiados diariamente por el personal especializado, acciones que conspiran con la viabilidad de las brucelas en el medio ambiente.^{8,11}

Resulta importante destacar, que las muestras de estiércol fueron mayoritariamente positivas, corroborando lo que reporta la literatura, de que las brucelas son excretadas al medio ambiente a través de las heces de los mamíferos portadores, y que en condiciones apropiadas esta bacteria puede sobrevivir largos períodos de tiempo.⁶ La mayoría de las muestras de estiércol se obtuvieron de ambientes bajo techo, donde era poca la incidencia de la luz solar y había cierto grado de humedad relativa. En la bibliografía consultada se reporta que el tiempo de sobrevivencia de las brucelas en el medio ambiente, se estima entre un día en verano y hasta 53 días en el invierno.¹⁰⁻¹²

Las muestras obtenidas del hisopado de suelo cementado presentaron un alto porcentaje de positividad, lo que habla a favor de que la bacteria también se excreta en los fluidos corporales de estos mamíferos y se adhiere a las superficies por largos períodos de tiempo en condiciones apropiadas. La persistencia de las brucelas en el cemento, la madera y otros materiales como el aluminio, utilizados para construir los corrales del ganado vacuno y de los búfalos, es alta y así lo reporta Earhart *et al.*, en el 2009.¹⁰

Fueron positivas además, las muestras de tierra, las que pudieron haberse infectado con brucelas excretadas en la orina de los búfalos. En un estudio realizado en la gran área de Yellowstone, Estados Unidos, se plantea que *Brucella abortus* puede permanecer en la tierra hasta 81 días, dependiendo del mes, la temperatura y la incidencia de la luz del sol.¹¹

Solo una muestra procedente de las paredes del bebedero, resultó positiva. En el reporte realizado por la Agencia de Protección Ambiental (APA) de los Estados Unidos aparece la repercusión negativa de la luz solar y del calor contra *Brucella suis* en aguas utilizadas para el ganado vacuno.¹¹

En este estudio no se realizó el cultivo bacteriológico de las brucelas, por no existir laboratorios con gabinetes de seguridad biológica III. El aislamiento de este agente etiológico continúa siendo la prueba de referencia para el diagnóstico de la enfermedad. Posteriores investigaciones deberán incluir este proceder, lo que fortalecerá la información epidemiológica entre los casos y las muestras ambientales.

En la literatura consultada, no encontramos publicaciones que realicen este tipo de investigación utilizando muestras ambientales similares. Existe el reporte de la APA, en Estados Unidos, donde se describe la supervivencia de *Brucella suis* en el medio ambiente y en materiales relacionados con éste. El informe refiere la persistencia

de la bacteria en superficies como el aluminio, concreto, vidrio, tierra y madera, expuestos al ambiente que las rodea. En este trabajo se demuestra que la supervivencia de las brucelas está influenciada por las condiciones propias ambientales y por los contactos que tengan estos materiales con los agentes biológicos o químicos.¹¹

El estudio del ecosistema es un indicador importante para medir la existencia de múltiples zoonosis bacterianas, fúngicas y virales emergentes hoy en día, y dentro de ellas, las transmitidas por animales silvestres. El incremento de contactos entre humanos o sus animales domésticos con la fauna silvestre que son potenciales hospederos de patógenos zoonóticos, puede ser resultado de la aparición de nuevas enfermedades infecto-contagiosas como es el caso de la brucelosis humana, la que invade a los animales y al hombre con sus biotipos y variedades genéticas. Esta transmisión suele ser frecuente cuando se realiza el consumo de carne de animales salvajes, que son prácticas de creciente intensidad en numerosos países. En un estudio realizado en Botswana se reporta la elevada incidencia de brucelosis en los habitantes de ese país, debido al consumo de carne y demás productos alimenticios (leche y sangre) de los búfalos salvajes de esa región. Los búfalos de Botswana también son un foco de transmisión de brucelas al medio ambiente y a otros animales incluyendo el ganado vacuno, lo que reporta serias pérdidas económicas en ese país africano.¹²

El riesgo de contraer brucelosis proveniente de la fauna salvaje es un tema bien discutido en los Estados Unidos donde los bisontes del Parque Nacional de Yellowstone han sido culpados por años de infectar al ganado vacuno que pasta en esa misma área causando el aborto de vacas preñadas. El método de contagio más probable es el consumo de los restos de fetos abortados que quedan en la pradera donde el ganado vacuno llega para pastar. También en La Florida, existen informes que revelan la presencia de la enfermedad en cazadores, transmitida por jabalíes.¹¹⁻¹²

En esta investigación, fueron tomados los criterios de reacción débil y fuertemente positiva, según recomienda el productor del estuche comercial, no pudiendo desglosar en otros grados la reacción inmunoenzimática. Las reacciones débiles (intensidad de coloración púrpura inferior a la encontrada en la banda de control) están relacionadas con concentraciones antigénicas que superan al valor de 10^5 UFC/mL pero no de igual manera que las que resultaron fuertemente positivas (intensidad de coloración púrpura igual o superior a la encontrada en la banda de control).⁸ Tanto las reacciones débiles como fuertemente positivas del sistema inmunocromatográfico directo de flujo lateral para *Brucella* spp., están en correspondencia con una menor o mayor concentración antigénica de las brucelas, pero todas siempre superando al valor límite de las 10^5 UFC/mL, según términos del productor.⁸

No se buscaron reacciones cruzadas en muestras ambientales contaminadas con *Vibrio cholerae* O1 y O139, o con *Yersinia pestis*, ya que no existían, en ese momento reportes de estas bacterias, ni en el medio ambiente ni en casos humanos cubanos. Bravo L. [comunicación personal 2]. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba. 2012. En sentido general, el número de muestras ambientales usadas como controles negativos, fue similar al número de las muestras tomadas de la zona endémica, sin embargo para realizar inferencias absolutas, debieran estudiarse un mayor número de éstas.

En la literatura consultada no hay descrito un sistema similar al usado en este trabajo. En general, todos los sistemas de pesquisa rápida descritos para diversas enfermedades infecciosas pueden ocasionar falsos biológicos negativos y positivos.

Estos métodos no se utilizan para la confirmación de la infección, su aplicación sirve para una mejor orientación clínica, epidemiológica y para un diagnóstico más rápido por parte del laboratorio.

El diagnóstico de laboratorio y el rigor científico de la vigilancia de la brucelosis animal y humana, se incrementa con el empleo de sistemas rápidos, como el utilizado en esta investigación. El ensayo introducido por primera vez en Cuba, para la detección rápida de *Brucella* spp., en muestras ambientales resulta sencillo, rápido, simple y no requiere de equipos sofisticados, ni personas altamente calificadas para su realización.

En el ámbito internacional existen pocos lineamientos o reglamentos que establezcan el uso de determinadas metodologías de laboratorio para abordar el estudio de la brucelosis de forma integral. En este sentido, cada país utilizará los sistemas disponibles, apoyados por la voluntad política y las estrategias incluidas en los programas de prevención y control existentes.

CONCLUSIONES

El sistema inmunocromatográfico directo de flujo lateral introducido en nuestro medio, permite la detección rápida de *Brucella* spp. a partir de muestras ambientales, lo que en primera instancia, incrementa la vigilancia microbiológica de estas bacterias en Cuba.

El sistema inmunocromatográfico directo de flujo lateral para *Brucella* spp. muestra un elevado porcentaje de positividad y de reacciones fuertemente positivas, en las muestras ambientales de la zona cubana endémica de brucelosis, lo que pudiera avalar su implementación en la red de laboratorios de Salud Pública y del Instituto de Medicina Veterinaria de Cuba.

La detección de *Brucella* spp. mediante el sistema inmunocromatográfico directo de flujo lateral, resulta superior en las muestras ambientales sólidas con respecto a las de superficies y las líquidas, lo que avalaría la hipótesis de que estas bacterias sobreviven más en este tipo de muestras, por lo que se sugiere incrementar las medidas higiénico sanitarias de estos hábitat y la vigilancia de estos reservorios de la zona estudiada.

Recomendaciones

Los resultados de esta investigación deben complementarse con estudios que relacionen la existencia de *Brucella* spp. en el medio ambiente y el cultivo de las brucelas a partir de muestras ambientales y de casos humanos y de animales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eales, K. M., R. E. Norton y N. Ketheesan: Brucellosis in northern Australia. Am J Trop Med Hyg. 2010;83(4):876-8.

2. World Health Organization: Brucellosis in humans and animals. 2012;WHO/CDS/EPR USA.
3. Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, Tomaso H, Vergnaud G, P Le Flèche AM, et al. Isolation of *Brucella microti* from soil. Emerg Infect Dis. 2008; 14(8): 1316-7.
4. Don J Brenner, Noel R Krieg, James T Staley, George M Garrity. The Proteobacteria. En: Bergey's Manual on Systematic Bacteriology. Second Edition. Vol 2.USA. 2005. p. 370-85.
5. Jiménez de Bagüés MP, Ouahrani - Bettache S, Quintana JF, Mitjana O, Hanna N, Bessoles S, et al. The new species *Brucella m icroti* replicates in macrophages and causes death in murine models of infection. J Infect Dis. 2010;202(1):3-10.
6. Ariza J. Brucelosis en el siglo XXI. Med Clin (Barc). 2002; 119(9):339-41.
7. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. International Journal of Antimicrobial Agents. 2010; 36: 12-17.
8. SD Standard Diagnostics, Inc. 2012. [Actualizado en 2012]. [Consultado: Enero 2015]. Disponible en: <http://www.standardia.com>.
9. Instituto de Medicina Veterinaria (IMV). La Habana: Ministerio de la Agricultura (MINAGRI); 2012.
10. Earhart K, Vafakolov S, Yarmohamedova N, Michael A, Tjaden J., Soliman A. Risk factors for brucellosis in Samarqan - Oblast, Usbekistan. Int J Infect Dis. 2009; 13(6): 749-53.
11. Aune K, Rhyan JC, Russell R, Roffe TJ, Corso B. Environmental persistence of *Brucella abortus* in the Greater Yellowstone Area. The Journal of Wildlife Management. 2012; 76(2):253-61.
12. Alexander KA, Blackburn JK, Vandewalle ME, Pesapane R, Baipoledi EK, Elzer PH (2012) Buffalo, Bush Meat, and the Zoonotic Threat of Brucellosis in Botswana. PLoS ONE 7(3):e32842. doi:10.1371/journal.pone.0032842

Recibido: 3 de febrero de 2015.

Aprobado: 25 de marzo de 2015.

Ana Margarita Obregón Fuentes. Licenciada en Microbiología. Master en Bacteriología Micología. Doctor en Ciencias de la Salud. Investigador Titular. Profesor Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Apdo 601. La Lisa. Habana. Cuba.
Correo electrónico: amobregon@ipk.sld.cu