

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

VOLUMEN I

Bacterias de Importancia Clínica

Editores

HORACIO A. LOPARDO

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría
"Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas.
Universidad Nacional de La Plata

Miembro de la Comisión Directiva de SADEBAC,
Asociación Argentina de Microbiología

SILVIA C. PREDARI

Jefa del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Médicas
Alfredo Lanari. Universidad de Buenos Aires

Directora de la Revista Argentina de Microbiología, publicación científica oficial de la
Asociación Argentina de Microbiología

Coordinadora del Comité de Emergencias Biológicas de la Red de Hospitales e
Institutos de la Universidad de Buenos Aires

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias, SADEBAC, Asociación
Argentina de Microbiología

CARLOS VAY

Profesor Asociado de Microbiología Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Jefe Laboratorio de Bacteriología Departamento de Bioquímica Clínica. Hospital de
Clínicas "Gral. José de San Martín"

Director Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica. Facultad de Farmacia y
Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.



INDICE GENERAL

Parte I. Temas generales de Microbiología Clínica

Parte Ia. Taxonomía bacteriana

Parte Ib. Métodos generales de identificación bacteriana

Partell. Microorganismos aerobios y anaerobios facultativos

Parte IIa. Cocos gram positivos

Parte IIa.1. Cocos gram positivos, catalasa positivos

Capítulo IIa.1.1. *Staphylococcus* spp.

Capítulo IIa.1.2. Otros géneros

Apéndice I. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIa.2. Cocos gram positivos, catalasa negativos

Capítulo IIa.2.1. Estreptococos β -hemolíticos

Capítulo IIa.2.2. *Streptococcus pneumoniae*

Capítulo IIa.2.3 Estreptococos del grupo viridans

Capítulo IIa.2.4. *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus*

Capítulo IIa.2.5. *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Aerococcus* y bacterias relacionadas

Apéndice II. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIb. Bacilos gram positivos

Parte IIb.1. Esporulados

Parte IIb.2. No esporulados

Capítulo IIb.2.1 *Corynebacterium* spp. y bacterias relacionadas

Capítulo IIb.2.2. *Listeria*

Capítulo IIb.2.3. *Nocardia*

Capítulo IIb.2.4. Bacilos gram positivos, catalasa negativos

Capítulo IIb.2.5. Micobacterias

Apéndice III. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIc. Bacilos gram negativos

Parte IIc.1. Enterobacterias

Capítulo IIc.1.1. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* diarregénico

Capítulo IIc.1.2. *Shigella* spp.

Capítulo IIc.1.3. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Cronobacter*, *Raoultella* y *Serratia*.

Capítulo IIc.1.4. *Salmonella*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*

Capítulo IIc.1.5. *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*

Capítulo IIc.1.6. *Yersinia* y otras enterobacterias.

Apéndice IV. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.2. Bacilos gram negativos no fermentadores

Capítulo IIc.2.1. *Pseudomonas*

Capítulo IIc.2.2. *Acinetobacter*

Capítulo IIc.2.3. *Burkholderia*

Capítulo IIc.2.4. *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* y *Elizabethkingia*

Capítulo IIc.2.5. *Stenotrophomonas*
Apéndice V. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.3. Bacilos gram negativos oxidasa positivos y fermentadores de lactosa
Capítulo IIc.3.1. *Vibrio*
Capítulo IIc.3.2 *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Chromobacterium*
Capítulo IIc.3.3 *Pasteurella*
Apéndice VI. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.4. Bacilos gram negativos exigentes
Capítulo IIc.4.1. *Haemophilus*
Capítulo IIc.4.2 Bacilos gram-negativos del grupo HACEK (ACEKS)
Capítulo IIc.4.3 *Bordetella*
Capítulo IIc.4.4. *Brucella*
Capítulo IIc.4.5 *Helicobacter*
Capítulo IIc.4.6 *Campylobacter*
Apéndice VII. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte II d. Cocos gram negativos
Apéndice VIII. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte II e. Bacterias atípicas
Capítulo IIe.1 *Bartonella* y *Afipia*.
Capítulo IIe.2 *Legionella* Parte III.3.
Parte IIe.4. *Chlamydia*
Parte IIe.5 Micoplasmas
Parte IIe.6 Rickettsias y otras bacterias relacionadas
Apéndice IX. Métodos de identificación: fundamento y método.

Parte II f. Espiroquetas
Capítulo II f.1 *Treponema*
Capítulo II f.2 *Borrelia*
Capítulo II f.3 *Leptospira*

Parte III Microorganismos anaerobios

Parte IIIa. Métodos de cultivo e identificación de microorganismos anaerobios
Parte IIIb. Cocos gram positivos anaerobios
Parte IIIc. Bacilos gram positivos anaerobios esporulados
Parte III d. Bacilos gram positivos anaerobios no esporulados
Parte III d. Bacilos gram negativos anaerobios
Parte III e. Cocos gram negativos anaerobios

Apéndice X. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo II.c.4.4

Género *Brucella*

NIDIA E. LUCERO

Servicio de Brucelosis, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS

“Dr. Carlos G. Malbrán”, Ciudad Autónoma de Buenos Aires

MARTA A. ALMIRON

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín-

CONICET, San Martín, Provincia de Buenos Aires

SILVIO L. CRAVERO

Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INTA, Castelar,

Provincia de Buenos Aires

MARCOS D. TRANGONI

Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INTA, Castelar,

Provincia de Buenos Aires

Introducción

La brucelosis también llamada fiebre de Malta, fiebre ondulante o del Mediterráneo es una enfermedad zoonótica, conocida desde fines del siglo XIX, que afecta a especies animales de sangre caliente. Es de difusión mundial y aunque ha sido erradicada en algunos países industrializados continúa siendo un problema difícil de resolver en países del área del Mediterráneo, del oeste de Asia, de África y de América Latina^{28, 46}. En nuestra región se la conoce desde principios del siglo XX, se cree que fue introducida con los animales ingresados por los españoles durante la conquista, aunque es difícil precisar dónde apareció por primera vez. Algunos autores afirman que en 1898 fue diagnosticada en Venezuela, también ha sido asociada a una epidemia descrita como fiebre de larga duración, ocurrida en Perú entre 1906 y 1907³⁹. Su persistencia se puede explicar por las particularidades geográficas de los países, la práctica de criar distintas especies de animales compartiendo pasturas y abrevaderos y la permanente interacción del medio rural con el urbano para adquirir insumos y comercializar productos. Los animales domésticos, en algunos lugares, son faenados sin control sanitario y sus múltiples derivados son manufacturados de manera artesanal, se expenden en la vecindad y en las rutas de acceso a las ciudades.

Los países de la región con mayor prevalencia son Argentina, México y Perú⁷⁸. Los esfuerzos que realizan algunos países para controlar la infección en los animales suelen ser de baja efectividad por la epidemiología compleja de la brucelosis ya que no siempre se cuenta con recursos suficientes para asegurar la continuidad de los programas de control. En las últimas décadas, el aumento de las urbanizaciones y la explotación animal poco planificada favoreció su desarrollo. La

situación en la región y su impacto en la Salud Pública solo se conoce parcialmente, aunque podría disponerse de información certera mejorando los sistemas de información, estandarizando los métodos de diagnóstico y estimulando la cooperación entre los países.

Agente causal

El término brucelosis se aplica a un grupo de enfermedades infecciosas estrechamente relacionadas, causadas por patógenos bacterianos gram negativos del género *Brucella*, llamado así en honor de David Bruce, quien en 1887 identificó *B. melitensis* como causa de la enfermedad de los militares británicos destinados a la isla de Malta. Sin embargo, Temístocles Zammit demostró en 1905 el carácter zoonótico de la brucelosis al comprobar que la fuente de infección era la leche de cabra que consumían los soldados. Bernhard Bang (Dinamarca) en 1897 aisló *B. abortus* de ganado bovino, Jacob Traum (EE.UU.) en 1914, *B. suis* de cerdos, Malcom Buddle (Nueva Zelanda) en 1956, *B. ovis* de ovejas, H. G. Stoener (EE.UU.) en 1957, *B. neotomae* de ratas del desierto de Utah y Leland Carmichael (EE.UU.) en 1968, *B. canis* de perros ^{21, 27}. En 1994 se describieron dos nuevas especies aisladas de mamíferos marinos ²⁵: *B. pinnipedialis* de focas y *B. ceti* de ballenas y delfines, que alertaron sobre la posible emergencia de otras especies que se podrían adaptar a los cambios sociales y a las modernas prácticas de producción de alimentos ³⁷. En 2008 fueron aceptadas *B. microti*, aislada del roedor *Microtus arvalis* ⁹⁴ y *B. inopinata* aislada de un implante mamario (Tabla 1) ²⁹.

Actualmente se encuentra en estudio B.BO2, aislada de la biopsia de pulmón de un paciente con neumonía crónica¹⁰¹.

Tabla 1: Especies y biovariedades del género *Brucella* y sus principales hospederos
28, 41, 74

Especies	biovar	Patogenicidad para el hombre	Hospedero preferido
<i>B. melitensis</i>	1, 2, 3	Alta	Cabras y ovejas
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	Moderada	Bovinos
<i>B. suis</i>	1, 3	Alta	Cerdos
	2	SD	Liebres, cerdos
	4	Moderada	Renos
	5	Alta	Roedores
<i>B. ovis</i>		SD	Ovinos
<i>B. canis</i>		Baja	Perros
<i>B. neotomae</i>		SD	Ratas
<i>B. pinnipedialis</i>		Moderada	Focas
<i>B. ceti</i>		Moderada	Delfines, ballenas
<i>B. microti</i>		SD	Roedores
<i>B. inopinata</i>		SD	SD

SD: sin datos

Aspectos taxonómicos

El género *Brucella* comparte la familia III *Brucellaceae*, junto a los géneros *Mycoplana* y *Ochrobactrum* del orden Riziohobiales, clase Alphaproteobacteria, phy-

lum Proteobacteria. Algunos miembros de la clase Alphaproteobacteria incluyen a microorganismos que son patógenos o que viven en simbiosis con mamíferos o plantas como los integrantes de los géneros *Bartonella*, *Rickettsia* y *Ehrlichia*, que afectan a mamíferos y se transmiten por vectores. En condiciones de temperatura y humedad adecuadas, *Brucella* puede sobrevivir en el suelo largos períodos de tiempo debido a su habilidad de metabolizar moléculas de origen vegetal^{70, 81}. El aislamiento de *Brucella microti* del suelo sugiere un nicho ambiental compartido con los 3 géneros de la familia⁹⁴. El tamaño del genoma del género *Brucella* indica que podría adaptarse a diferentes ambientes y hospederos. La habilidad para invadir células de mamíferos pudo haber sido adquirida en parte por ambos géneros, *Brucella* y *Bartonella*. Es posible que los genes comprometidos con la invasión de células de mamíferos estuvieran presentes en el microorganismo ancestral y se hayan perdido en los patógenos de las plantas. Los genomas de algunas especies del género *Brucella* presentan pseudogenes, indicando que durante la adaptación al estilo de vida intracelular se podría haber perdido la función de esos genes. La transferencia horizontal asociada con determinantes de virulencia estaría relacionada con la adaptación intracelular³⁶. El genoma de *Brucella ovis*, considerada hasta ahora una especie no zoonótica, tiene inactivados algunos genes relacionados con la adquisición y utilización de nutrientes, con la estructura de la membrana celular y con la presencia de ureasa, que explicarían su limitación en el rango de hospederos. Se ha postulado una evolución conjunta de las especies de *Brucella* con sus hospederos, sin embargo esto no explicaría la limitada variación entre las especies del género y la gran variación observada en ellos. Usando un reloj molecular basado en el polimorfismo de un nucleótido en 13 diferentes genomas de las 6 especies clásicas del género, se ha demostrado que la mayoría de ellas

proceden de un ancestro común de 86.000-296.000 años ^{13,38}. Sin embargo, ese período fue anterior a la domesticación de los animales; es decir que las divergencias entre las especies de *Brucella* no coevolucionaron con los hospederos, sino que se adaptaron a sus preferencias ¹³. No obstante, las especies pueden infectar en condiciones naturales o experimentales a animales que no son sus preferidos. Aunque esas infecciones se autolimitan, la transmisión puede ocurrir por contacto directo o por exposición.

Se ha pensado que el ancestro fue un organismo que evolucionó en un parásito animal pero ese proceso no se ha podido probar. Todos esos cambios pueden estar reflejados en el genoma por eso la importancia de la secuenciación. Hasta ahora los genomas secuenciados de distintas especies de *Brucella* muestran muy alta homología. En el genoma de *B. melitensis* 16M se ha identificado la presencia de dos cromosomas independientes que sugieren la modificación de un megaplásmido o la separación del cromosoma original en unidades separadas ³⁰. Esta organización genómica se ha observado también en géneros vecinos del subgrupo de las Alfabroteobacterias. Esta hipótesis se apoya en el hecho que *B. suis* biovar 3 tiene un solo cromosoma. Sin embargo, la caracterización de las funciones de replicación del plásmido y el origen de la replicación en el cromosoma II indicarían que el origen fue a partir de un plásmido. La presencia de un solo cromosoma en *B. suis* biovar 3 se explicaría mejor por una recombinación entre *loci* del rRNA. A pesar del origen plasmídico del cromosoma más pequeño, los genes esenciales se encuentran en ambos cromosomas y su distribución entre ambos es similar en las especies secuenciadas. El origen plasmídico del cromosoma II también se puede encontrar en los géneros relacionados en los cuales los plásmidos lineales y los megaplásmidos tienen igual localización genómica. Los genomas

comparten un contenido similar de CG, proporción similar de regiones de codificación y distribución equivalente de genes entre los cromosomas. La presencia de numerosos transposones, elementos de inserción y restos de fagos, son indicadores de la evolución. Se ha demostrado que *B. suis* tiene numerosas funciones metabólicas accesorias en el cromosoma II, incluyendo su capacidad para utilizar compuestos derivados de plantas. Esta es una característica conservada en las especies de *Brucella* y se relaciona con su capacidad para sobrevivir en el retículo endoplasmático del hospedero. A pesar de la adaptación específica al hospedero, las características relacionadas con la virulencia no parecen haber experimentado un cambio sustancial en el género. No se han podido demostrar algunos eventos mediados por fagos y de inserción/delección que podrían explicar las diferencias en la especificidad al hospedero y la virulencia.

Para identificar las especies y biovars del género, la taxonomía se ha basado en la caracterización fenotípica y en el hospedero del cual fueron aisladas las cepas, método que resultó de gran utilidad epidemiológica ⁷. No obstante, hoy es difícil conciliar la tipificación tradicional con la amplia diversidad genética encontrada en estudios biomoleculares ⁶⁹. La primera evidencia molecular demostró que las especies y biovars eran indistinguibles y presentaban homologías de ADN superiores al 95%. En 1985 Verger y col.¹⁰³ realizaron estudios de hibridación de ADN y demostraron que *Brucella* es un género monoespecífico, sugiriendo simplificar la nomenclatura y llamarlo *Brucella melitensis*, compuesto por seis biovars (*melitensis*, *abortus*, *suis*, *canis*, *ovis* y *neotomae*). A pesar de la exactitud de la publicación, la nueva nomenclatura no fue bien recibida ya que la anterior había resultado beneficiosa para estudios epidemiológicos y la nueva propuesta daba lugar a confusiones. Además, este nuevo esquema de clasificación parecía

sobreestimar la importancia de la divergencia genética con respecto a la preferencia del hospedero y a la evolución. Por esta razón, en 2003, durante la reunión del Subcomité Internacional de Taxonomía y Nomenclatura del género *Brucella* del Comité Internacional de Sistemática de Procariotas (ICN-SCT genus *Brucella*) que tuvo lugar durante la Conferencia Internacional de Brucelosis en Pamplona, España, se acordó volver a la nomenclatura tradicional.

Con el advenimiento de la secuenciación genómica se comenzó a develar la naturaleza de la divergencia genética. Los estudios de VNTR (número variable de repeticiones en tándem, del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*) demostraron que seis *loci* eran suficientes para determinar la designación de las especies y el análisis de un mayor número de *loci* permitiría discriminar el origen geográfico de las cepas y trazar el inicio de la infección ¹⁰⁸. Thomas Fitch ³⁶, sugirió que antes de aceptar una nueva especie se la debería tipificar aplicando técnicas tradicionales ⁷, realizar un análisis de VNTR con no menos de 15 *loci*, secuenciar no menos de 9 *loci* y enviar los resultados a por lo menos dos miembros del Subcomité de Taxonomía.

Habitat y epidemiología

Las especies de *Brucella* causan infecciones generalizadas en los animales con una fase bacteriémica seguida por localización. Generalmente se observa predilección por la placenta, las glándulas mamarias, los órganos sexuales, las articulaciones y las bolsas sinoviales. Su crecimiento *in vivo* es intracelular y puede ingresar y multiplicarse en una variedad de células incluyendo las epiteliales, trofoblastos de placenta, células dendríticas y macrófagos ⁴³. La enfermedad rara

vez es letal, aunque se puede localizar en diferentes órganos y producir una variedad de lesiones ²⁷. La transmisión sexual ocurre principalmente en cerdos, ovejas y perros. Puede cursar de manera subclínica, en esos casos el síntoma visible es el aborto mediante el cual se libera gran cantidad de microorganismos que contaminan el medio ambiente (pastizales, agua y/o tierra), aunque cuando el animal se encuentra infectado, el parto natural produce la misma contaminación. De esa forma se completa el ciclo infeccioso, al permitir el contagio de otros animales y la persistencia de la bacteria en la naturaleza. La transmisión puede ser por vía conjuntival, digestiva, respiratoria, genital o por contacto. Las mucosas, por ser barreras fácilmente franqueables, constituyen la principal puerta de entrada. Luego de la parición las vacas infectadas excretan *Brucella* en el calostro y en la leche hasta la tercera semana, aunque en presencia de mastitis intersticial la excreción es permanente. También se eliminan aunque en menor número por heces y orina. Todas las especies de *Brucella* pueden infectar a animales de experimentación como cobayos, ratones y conejos en los cuales la gravedad de la infección varía según la cepa inoculada ⁵⁰.

Situación en la Argentina

En la Argentina la brucelosis bovina es conocida desde fines del siglo pasado. En 1966 se comenzó a desarrollar un programa de inmunización en algunas regiones y a partir de 1980 se hizo extensivo a todo el país. En 1993 el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) creó la Comisión Nacional de Lucha contra Brucelosis y Tuberculosis que en 1996 elaboró un plan de control (Ley 24696). La primera etapa del Plan Nacional entró en vigencia en marzo de 1999 y en la

actualidad se ha logrado bajar la prevalencia al 2 - 6%. Las pérdidas económicas que produce se deben a la disminución en la producción de leche, muerte o pérdida de peso de los animales. La enfermedad limita las posibilidades de comercialización internacional del sector pecuario, afecta el consumo y la Salud Pública. Sobre la situación de la brucelosis en otras especies de animales, solo se dispone de datos parciales basados en estudios regionales. En ovinos se ha demostrado la existencia de epididimitis producida por *B. ovis* y, en perros, se ha comprobado la infección por *B. canis*⁹¹. Se estima que la prevalencia de la brucelosis caprina, es superior al 5%, la brucelosis en cerdos está localizada en las áreas de explotación intensiva y en grandes establecimientos de cría y no se dispone de información sobre la prevalencia nacional.

Salud Pública

Aunque la población puede contraer brucelosis al consumir alimentos contaminados, desde 1932 se la considera como una enfermedad profesional que afecta a quienes se encuentran en contacto con animales o sus productos. En la década del 70 algunos estudios estimaban 20.000 enfermos nuevos cada año, de los cuales el 30% trabajaba en frigoríficos y el 70% en el área rural. La incidencia actual de brucelosis en el hombre es difícil de estimar, debido a la subnotificación de los casos. Los datos proporcionados por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), correspondientes al período 1987-1997, indicaban 4.055 casos y en el período 1998-2007 se registraron 3.073. En 2008 se implementó un sistema de notificación único, integrando el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud (SNVS) en su módulo clínico con el de laboratorio (SIVILA) y en el período 2008-

2011 se notificaron 1.342 casos. Sin embargo, por tratarse de una enfermedad controlada en sangre a transfundir, existe información del período 2000-2006, correspondiente a todas las provincias, que registra 20.875 individuos reactivos. Durante el período 1994-2013 en el Servicio de Brucelosis del INEI-ANLIS se recuperaron 595 cepas de *Brucella* procedentes de pacientes de 22 provincias (Tabla 2). En general la distribución de las cepas de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* coincide con la especie animal que es explotada en cada región^{58, 61}. En cambio, la brucelosis humana causada por *B. canis* es una zoonosis urbana emergente, poco frecuente probablemente por las limitadas posibilidades de diagnóstico. Las técnicas serológicas que se emplean de rutina en los laboratorios solo detectan anticuerpos anti-*Brucella* en fase lisa y *B. canis* tiene morfología rugosa⁶⁷. El hombre adquiere la infección a través de los perros infectados o de sus secreciones.

El contagio con *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* es por consumo de alimentos contaminados, por contacto directo o indirecto con animales infectados o por accidentes de laboratorio. *B. melitensis* y *B. suis* son altamente patógenas, *B. abortus* y *B. canis* son moderadamente patógenas, mientras que *B. ovis* y *B. neotomae* parecen no afectar al hombre.

La incidencia de la enfermedad en el hombre está en relación directa con la infección en los animales domésticos. Hay un marcado aumento de casos coincidente con la época del año en que paren las ovejas, las cabras y los cerdos, aunque el período de riesgo es mayor con las vacas, por ser más larga la duración de la lactancia²⁸.

Las bacterias del género *Brucella* penetran en el organismo por vía digestiva, respiratoria, cutánea y/o conjuntival¹¹³. En el primer caso el ingreso es a través de

las membranas del tracto intestinal, aunque también puede atravesar las mucosas del estómago. El riesgo al consumir leche cruda está relacionado con el estado del animal ya que la mayor cantidad de *Brucella* se libera al comienzo de la lactancia. El consumo de derivados lácteos contaminados como quesos cremosos, manteca, crema y helados es la forma más común de transmisión. Los quesos duros, el yogur y los productos lácteos ácidos son menos riesgosos debido a la fermentación láctica.

La infección por vía respiratoria ha sido comprobada en lugares donde se liberan aerosoles como laboratorios, frigoríficos, corrales de encierro de cabras o mataderos. Los accidentes por vía conjuntival han sido descritos al manipular vacunas de cepas vivas atenuadas, al realizar necropsias, asistir en partos o por llevar las manos contaminadas a los ojos. La infección a través de la piel con abrasiones se ha mencionado en casos de contacto con animales infectados, sus tejidos o durante la manipulación de cepas sin protección. Las tres últimas son las formas de infección más frecuentes en veterinarios, trabajadores rurales, operarios de frigoríficos o de mataderos ⁷⁷. En estos casos las actividades de mayor peligro son las relacionadas con la asistencia en los partos, la faena de animales y la limpieza de los utensilios, máquinas y vertederos donde se procesan. Se han descrito infecciones en áreas administrativas de plantas donde faenan animales atribuidas a la contaminación del aire.

La brucelosis puede ser adquirida por transfusión sanguínea y por trasplante de médula, cuando el dador es asintomático con bacteriemia ^{2, 34}. Esta forma de infección debe ser tomada en cuenta sobre todo en áreas endémicas. En el hospital, los pacientes constituyen un riesgo mínimo, sin embargo las muestras de sangre, secreciones y tejidos deben ser manipuladas siguiendo protocolos de bioseguridad. Difícilmente se transmite de una persona a otra por vía sexual, aunque se ha

confirmado la presencia de *Brucella* en exudado vaginal y semen⁶⁸. También se ha informado la infección congénita y la transmisión a través de leche materna^{20, 76}. La susceptibilidad a la infección depende del estado inmunitario y nutricional individual, del tamaño y la vía de penetración del inóculo y de la especie de *Brucella*.

Tabla 2. Cepas de *Brucella* aisladas de humanos en la Argentina entre 1994 y 2013
INEI-ANLIS “Dr.Carlos G. Malbrán

Provincia	n	<i>B. abortus</i>			<i>B. melitensis</i>					<i>B. suis</i>		<i>B. canis</i>
		1	2	C19	1	1a	2a	2	3	1	1a	
Buenos Aires	329	73	5	9	38	6			2	108	82	6
Catamarca	19				18	1						
Córdoba	47	7	1		12		1			19	7	
Corrientes	1									1		
Chaco	2				2							
Formosa	2				2							
Entre Ríos	4									3		1
Jujuy	4				1	3						
La Pampa	17	1								13	2	1
La Rioja	25				24					1		
Mendoza	52				51					1		
Misiones	1									1		
Neuquén	5				3					2		
Rio Negro	3					1				1		1
San Juan	9				9							
San Luis	7				7							
Santa Cruz	1				1							
Santa Fe	24	1			3					10	9	1
Sgo. del										1		
Estero	2					1						
Salta	37				30	1		1		2	3	
Tierra del												1
Fuego	1											
Tucumán	3				1	2						
Subtotal		82	6	9	202	15	1	1	2	163	103	11
Total	595	97			221					266		11

Impacto clínico

La enfermedad puede cursar en forma subclínica o con los síntomas descritos en la Tabla 3, que se exteriorizan 2-3 semanas posteriores a la infección aunque se han observado períodos de incubación más largos. Ocasionalmente, predomina el compromiso de algún órgano en particular y es cuando la enfermedad se considera localizada o complicada. Las complicaciones osteoarticulares, ocurren en el 30-40% de los casos e incluyen artritis, sacroileítis, bursitis y espondilitis ¹⁴.

Tabla 3. Signos y síntomas observados en 500 pacientes (290 del sexo masculino) con brucelosis causada por *B. melitensis* ²⁸

Signos y síntomas	Número de pacientes (%)
Fiebre	464 (93)
Escalofríos	410 (82)
Sudoración	437(87)
Malestar	457(91)
Falta de energía	473(95)
Dolores articulares y de espalda	431(86)
Artritis	202(40)
Sensibilidad espinal	241 (48)
Cefaleas	403 (81)
Pérdida de apetito	388 (78)
Pérdida de peso	326 (65)
Constipación	234 (47)
Dolores abdominales	225 (45)
Diarrea	34 (7)
Tos	122 (24)
Dolor testicular/epidimitis/orquitis	62 (21)*
Erupción	72 (14)
Disturbio del sueño	185 (37)
Palidez	110 (22)
Linfadenopatías	160 (32)
Esplenomegalia	125 (25)
Hepatomegalia	97 (19)
Ictericia	6 (1)
Anormalidades del SNC	20 (4)
Soplo cardíaco	17 (3)
Neumonía	7 (1)

La tomografía computada, más sensible que la radiografía, es especialmente útil en el diagnóstico de espondilitis ⁵⁷. Cuando ésta es causada por *Brucella* generalmente afecta vértebras lumbares, mientras que la tuberculosis produce abscesos paraespinales.

Las complicaciones hepáticas se observan con frecuencia en infecciones por *B. melitensis*, aunque los valores de las pruebas funcionales suelen ser levemente anormales ¹⁰. Algunas veces, los valores de las transaminasas están aumentados y hacen sospechar de alguna hepatitis de origen viral.

Los abscesos hepáticos y las lesiones supurativas crónicas se asocian con la infección por *B. suis* ^{1,3} (Fig.1).

Las complicaciones neurológicas ocurren en menos del 2% de los casos y la meningitis aguda o crónica es el síndrome más común ³³. En esos casos el líquido céfalo-raquídeo (LCR) presenta una elevada concentración de proteínas, una reducida concentración de glucosa y pleocitosis linfocítica. *Brucella* se aísla muy raramente de LCR, aunque el nivel de anticuerpos es alto, lo mismo que en el suero. El síndrome de Guillain Barré ha sido asociado con brucelosis causada por *B. melitensis* y con *B. canis* ^{67, 107}.

Otras complicaciones aunque poco frecuentes son las cardiovasculares, que se relacionan a los casos de muerte e incluyen miocarditis, pericarditis y aneurisma de aorta ^{67, 92}.

También se han descrito complicaciones genitourinarias, gastrointestinales y pulmonares ^{52, 72, 78}. Cuando los síntomas persisten por más de un año, la enfermedad se define como crónica y se suele explicar por la presencia de lesiones supurativas localizadas ¹.

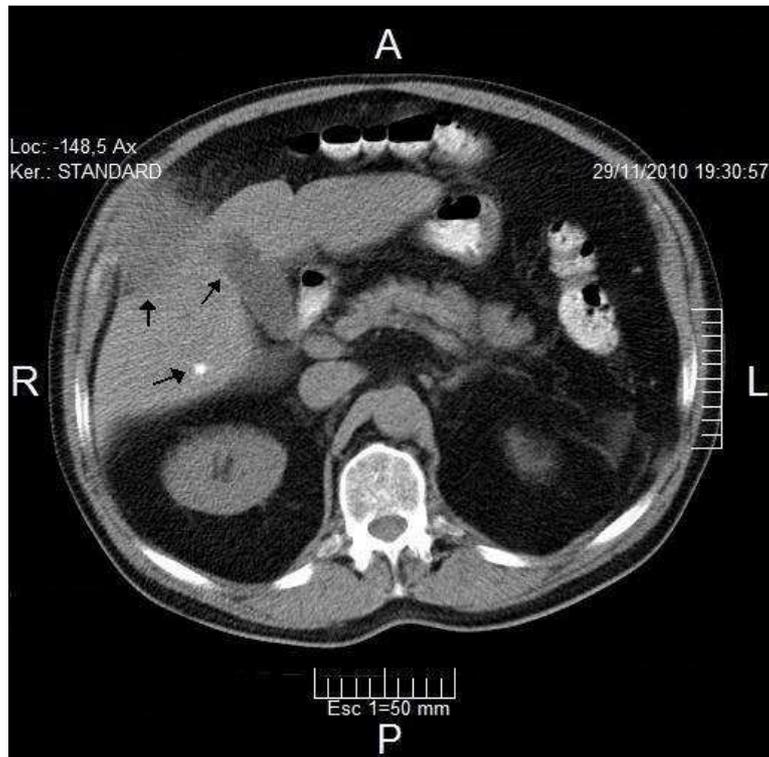


Figura 1. Tomografía axial computada de la zona abdominal de un paciente con brucelosis. Las flechas muestran una masa calcificada y un absceso en el lóbulo derecho del hígado.

Definición de casos y clasificación

En la Argentina se han aislado de humanos cepas de *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* y *B. canis* (Fig. 2). Los casos se definen y clasifican de acuerdo a la “Guía para el equipo de salud, N° 12, Brucelosis”, Ministerio de Salud, 2013 ⁴⁵.

Caso sospechoso: Fiebre de comienzo agudo o insidioso y uno o más de los siguientes signos y síntomas: transpiración nocturna, fatiga, anorexia, pérdida de peso, cefalea, artralgia, mialgia, artritis, espondilitis, meningitis o afectación local de órganos (endocarditis, orquitis/epididimitis, hepatomegalia, esplenomegalia) y uno o más de los siguientes antecedentes epidemiológicos: contacto ocupacional con

animales, consumo de productos de origen animal contaminados, exposición de laboratorio, hijo de madre positiva, contacto con perros.

Caso probable. Caso sospechoso con una o más pruebas de tamizaje positivas [aglutinación con antígeno tamponado (BPA), Rosa de Bengala (RB), aglutinación en placa (Huddleson) o microaglutinación para *B. canis* (RSAT)].

Caso confirmado. Caso probable con uno o más de los siguientes criterios: estudios bacteriológicos positivos (aislamiento de *Brucella* sp. del espécimen clínico, hemocultivo, mielocultivo, biopsias, etc.), estudios serológicos positivos (prueba de Wright y otras que permiten la detección de isotipos IgG específicos en suero del paciente como fijación de complemento, cELISA o IELISA) o nexo epidemiológico con un caso confirmado.

Caso descartado. Dos muestras de suero con 30 días de diferencia en las cuales no se detectan anticuerpos anti-*Brucella* spp.

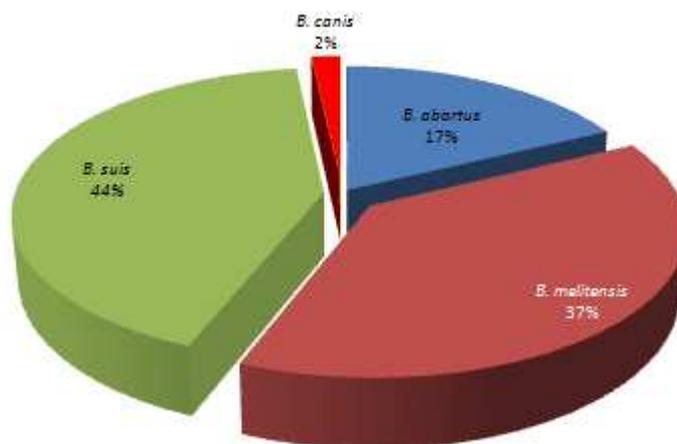


Figura 2. Especies de *Brucella* aisladas de humanos en la Argentina entre 1994 y 2013 (datos del INEI-ANLIS “Dr Carlos G. Malbrán”)

Factores de virulencia

A las especies del género *Brucella* se las denomina patógenos silenciosos porque no poseen los factores de virulencia bacterianos clásicos como toxinas, proteasas, fimbrias o *pili*, ni demuestran una activación fuerte de la inmunidad innata.

Brucella ingresa al huésped a través de mucosas, principalmente de la vía digestiva o inhalatoria. Primero debe adherirse a la superficie de dichas mucosas a fin de no ser arrastrada por corrientes de aire o líquido, naturales en dichas vías. Luego, la bacteria debe colonizar las mucosas y penetrar en los tejidos hasta alcanzar los nódulos linfáticos para lograr una diseminación a través de fagocitos profesionales y así afectar a una gran variedad de tejidos y órganos. Queda establecida de esta manera la brucelosis.

Dentro de los fagocitos, *Brucella* es capaz de escapar de la vía endocítica para establecerse en una vacuola que deriva del retículo endoplásmico, denominada BCV (*bacteria-containing vacuole*) y allí replicar intensamente. También se ha observado por ensayos *in vitro* que *Brucella* es capaz de infectar, replicarse y sobrevivir en varios tipos celulares distintos de los fagocitos profesionales^{19, 93}.

No se han encontrado para esta bacteria factores que le otorguen virulencia por sí mismos, es decir, que resulten ofensivos para el hospedero. En cambio, su patogenicidad se basa en la capacidad de sobrevivir intracelularmente. Todo esto hizo que los estudios de investigación científica se centraran en entender, a nivel molecular, los mecanismos utilizados por *Brucella* para poder replicarse y mantenerse viable dentro de las células eucarióticas. Así, teniendo en cuenta lo que se conoce hasta el momento, podemos decir que para esta bacteria es más

apropiado hablar de mecanismos estratégicos de patogenicidad en lugar de factores de virulencia.

Los estudios sobre estos mecanismos consisten generalmente en infectar *in vitro* con *Brucella* células provenientes de líneas celulares o de cultivos primarios obtenidos por ejemplo de ratón y evaluar a distintos tiempos el número de bacterias adheridas o internalizadas, así como también la respuesta inflamatoria de la célula hospedera infectada. El modelo de infección *in vivo* más usado es el de ratón, al cual se infecta por vía intraperitoneal u oral con las cepas en estudio y luego a distintos tiempos se les evalúa la carga bacteriana que hay en órganos como el hígado y el bazo. De este modo se establece el poder patógeno de la bacteria al invadir y colonizar estos órganos y se le confiere un grado de virulencia determinado en relación a otras cepas bacterianas.

La comparación entre los fenotipos, es decir los comportamientos observados en ensayos de laboratorio, de las cepas salvajes (cepas de referencia) y de los mutantes obtenidos a partir de ellas por técnicas de ADN recombinante, son los que permiten identificar distintos genes cuyos productos de expresión son los que participan directa o indirectamente en esos mecanismos estratégicos de sobrevivencia.

Por lo expuesto, lo que más se conoce en términos de moléculas que se asocian al poder patógeno de *Brucella* es su comportamiento individual frente a células eucarióticas. En este capítulo mencionaremos aquellas claramente identificadas hasta el momento, teniendo en cuenta las distintas etapas que definen un proceso infeccioso bacteriano.

Adherencia

Un estudio realizado por Castañeda-Roldán y colaboradores ²² mostró que tanto *B. melitensis* como *B. abortus* son capaces de unirse a la superficie de células epiteliales y macrófagos, y formar microcolonias. En esta interacción hay un reconocimiento por parte de las bacterias de residuos con ácido siálico en la superficie de las células eucarióticas. También estos autores demostraron que las bacterias son capaces de unirse a la matriz extracelular eucariótica, contactando principalmente con fibronectina y vitronectina ²². Las proteínas Sp41, BmaC y BtaE cumplen con estas características. SP41 es una proteína de superficie, codificada por el gen *ugpB*, que podría unirse al glicerol-fosfato ²³; mientras que BmaC y BtaE son proteínas que pertenecen a la familia de los autotransportadores de tipo I y tipo II respectivamente. BtaE reconoce al ácido hialurónico ⁸³. Para los mutantes en dichas proteínas tanto la adhesión como la invasión a las células eucarióticas se vio disminuida.

Cabe destacar que si bien se han descrito muchos genes que al ser mutados provocan una atenuación en la adherencia e invasión a las células eucarióticas, el producto de los mismos no está directamente involucrado en estos procesos sino que la mutación produce además una alteración en la superficie bacteriana. Son ejemplo de ello los genes que codifican para los reguladores transcripcionales BvrR y VjbR, para el glucano cíclico o el LPS ⁸⁹. Queda por investigar si existen también alteraciones en las moléculas expresadas en la superficie bacteriana cuando son mutados genes de vías metabólicas que brindan el mismo fenotipo. Un ejemplo es el de la enzima ferroquelatasa que participa del último paso en la vía de síntesis del grupo hemo ⁵.

Invasión

El LPS de *Brucella* es necesario para que la entrada de la bacteria a la célula sea a través de las balsas lipídicas (*lipid rafts*) que son microdominios de la membrana de macrófagos ricos en colesterol. El producto del gen *BMEI0216*, que parecería ser una proteína de membrana asociada a la transglucosidasa, es necesario para la entrada a las células epiteliales pero no a los macrófagos. No obstante falta evaluar su función biológica¹⁰⁶. Contiguo a este gen se encuentra *invA* que codificaría para una invasina cuya función está también implicada en la invasión intracelular afectando también el establecimiento de la infección⁸.

Aunque aún no están identificados, no podemos dejar de mencionar los productos de los genes regulados por el sistema de dos componentes BvrR/BvrS dado que los mutantes en este sistema son menos invasivos, replican menos y no pueden escapar a la unión al lisosoma para ser degradados. Este sistema regula más de 120 genes entre los cuales se encuentran varios reguladores de la transcripción como *VjbR*, genes que participan del sistema de secreción de tipo IV, de la biosíntesis de ácidos grasos, lipoproteínas, metabolismo de carbono y nitrógeno, y varias proteínas de membrana externa como Omp25^{24, 104}. Esto significa que las mutaciones tanto en *bvrR* como en *bvrS* resultan pleotrópicas y no permiten por sí solas la identificación de los factores que participan en cada paso de la invasión celular. Mutaciones en genes de otros sistemas de dos componentes como por ejemplo *FibS/R* y *TceS/R* también han demostrado su participación en el proceso de invasión^{56, 90}.

Muchas veces se ven descritos en la bibliografía ensayos de infección, en los que se observa que la entrada de *Brucella* a la célula eucariótica está disminuida.

Sin embargo, faltan datos experimentales que permitan determinar si la discapacidad estuvo en la adhesión, en la invasión o en ambas.

Si bien se había demostrado anteriormente que cepas de *Brucella* podían adherirse a los glóbulos rojos tanto de sangre humana como animal, recientemente se ha reportado que *B. melitensis* es capaz de internalizarse en eritrocitos murinos y permanecer viable por varias semanas ¹⁰⁵. Este hallazgo implica que *Brucella* tendría otra estrategia para la diseminación sistémica y para la evasión ante el sistema inmune y agentes antimicrobianos.

Resistencia y evasión

La membrana externa bacteriana es rica en fosfatidilcolina. Esta molécula junto al LPS están involucradas en la resistencia al complemento y a los péptidos antimicrobianos.

B. abortus tiene la capacidad de autoagregarse y producir *biofilms* adhiriéndose tanto a superficies celulares como abióticas y resistiendo al estrés por desecación ⁶. Este hecho está indicando que esta bacteria es capaz de usar otra estrategia, compartida por otros microorganismos de vida extracelular, para resistir situaciones de estrés y evitar el contacto con anticuerpos y antibióticos. Falta aún identificar los componentes de la matriz extracelular que produce *Brucella* en estas circunstancias y evaluar si cumplen alguna función durante el ciclo de vida intracelular.

Establecimiento en nicho

Más extenso es el trabajo realizado en torno al tráfico intracelular de cepas de *Brucella* al cual se lo complementó evaluando la respuesta molecular de la célula eucariótica al ser invadida. Se han realizado ensayos de transcriptomas y proteomas, aportando una gran cantidad de datos que deberán ser evaluados y confirmados para su correcta interpretación. En general se considera importante en esta etapa al LPS al que se supone interaccionando y modulando la membrana de la vacuola (BCV). El glucano cíclico β 1-2, el cual se encuentra en el periplasma, también juega un rol importante en esta etapa aunque todavía no esté bien definido. Se han identificado algunos efectores del sistema de secreción de tipo IV como son VceA, VceC, RicA, BPE123, BPE043, BPE05, BPE275 y se supone que junto a otros, aún no identificados, estarían participando activamente en el tráfico intracelular⁵³. Por último también están implicados los reguladores transcripcionales BvrR y VjbR¹⁰⁶.

Adaptación al estrés y replicación bacteriana intracelular

Para poder hacer frente a las situaciones de estrés dentro de una célula eucariótica como la falta de oxígeno o la presencia de especies reactivas y poder replicarse, *Brucella* expresa aquellos genes que también le permiten resistir ese tipo de estrés durante su ciclo de vida extracelular. Esto surge de los estudios que permitieron la identificación de los genes inducidos intracelularmente o del análisis de la infectividad de mutantes^{12, 31, 89}. Si bien son las mismas moléculas, estos resultados han servido para caracterizar el compartimento donde *Brucella* se replica.

Además del ambiente reducido en oxígeno, debe resistir la acidez y la falta de algunos nutrientes. La lista entonces de estas moléculas relacionadas con la estrategia de supervivencia intracelular es larga y podría involucrar a muchas otras que tampoco son exclusivas de esta etapa del ciclo de vida bacteriano. Además, la expresión de los genes codificantes puede variar de acuerdo al tipo de célula eucariótica que habite. Por esto no deberían ser consideradas como factores de virulencia.

Ataque y diseminación

Existen moléculas de *Brucella* aún no identificadas que evitan la muerte programada celular. También se supone la existencia de otras que resultan citotóxicas para macrófagos y que utilizan el sistema de secreción de tipo IV¹⁹. Se desconoce si *Brucella* se disemina únicamente por vía intracelular¹⁰⁶.

Salida del hospedero

No se conocen los mecanismos por los cuales *Brucella* sale de la célula fagocítica para invadir otro tipo celular. Recientemente, se ha demostrado tanto en macrófagos como en células epiteliales, que la BCV de *B. abortus* madura hacia formas semejantes a las denominadas autofagosomas para dar lugar a lo que los autores denominan aBCV (vacuolas autofágicas que contienen bacterias). Lo que observan es que las BCV se rodean de una capa membranosa que adquiere algunos de los marcadores de la vía autofágica y que las bacterias mantienen su viabilidad. Esto podría significar una vía de escape de la célula¹⁰⁰. Otra vía descrita

estaría mediada por el aumento de la citotoxicidad de *B. melitensis* al disociarse dentro del macrófago. Esto le permitiría salir del hospedero e infectar a las células contiguas⁸².

Diagnóstico microbiológico

Identificación a nivel de género y especie

El diagnóstico bacteriológico aporta una valiosa información epidemiológica ya que es indicador de la fuente de infección y de la probable localización geográfica. Las cepas se pueden recuperar del paciente a partir de sangre, médula ósea, LCR, líquido articular, biopsias u otros materiales⁹⁶.

Se recomiendan tres muestras de hemocultivo en medio de cultivo monofásico en un período de 24 h, preferentemente durante la etapa febril del paciente. La incubación se realiza a 35-37 °C en atmósfera con 5-10% de CO₂ para asegurar el crecimiento de todas las cepas. Las muestras en medios de cultivo para sistemas automatizados como BACTEC o BacT/ALERT se manejan de acuerdo a las instrucciones del equipo¹¹⁰. Cuando se emplean medios de cultivo líquidos estáticos se requieren pasajes periódicos a medio de cultivo sólido para evitar la disociación de las colonias. Sin embargo, con los medios de cultivo bifásicos se evitan estos pasajes. Generalmente los hemocultivos requieren un período de incubación prolongado, por esa razón no se descartan como negativos antes de los 30 días. Las colonias, pequeñas, translúcidas y de bordes lisos, se pueden visualizar en un medio de cultivo sólido a partir de las 48 h de incubación. En la tinción de un extendido a partir del cultivo se presentan como pequeños cocobacilos gram

negativos de 0,5-0,7 x 0,6-1,5 μm que eventualmente pueden estar en pares o en pequeños grupos ²⁷ (Fig. 3).

Las coloraciones (Gram, Koster, Ziehl Neelsen) y la observación de la morfología de las colonias, ayudan a excluir otros gérmenes. No se observa coloración bipolar, no presentan cápsula, no son móviles ni forman esporas. Resisten la decoloración con ácidos débiles y se tiñen de rojo en la coloración de Ziehl Neelsen modificada. Las colonias tienen apariencia estable pero cuando los cultivos envejecen, pueden aparecer formas pleomórficas. No producen indol, no licúan la gelatina, no producen acetilmetilcarbinol, no lisan glóbulos rojos y son negativas a la prueba de rojo de metilo. Son catalasa positivas y a excepción de *B. ovis* y *B. neotomae*, son oxidasa positivas. No producen ácidos en medios con carbohidratos (excepto *B. neotomae*) y en el medio de MacConkey no fermentan la lactosa. El género *Brucella* puede ser confundido con otras bacterias gram negativas. Las más comunes son *Bordetella bronchiseptica*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Acinetobacter* spp., *Oligella ureolytica*, *Campylobacter fetus* y *Yersinia enterocolítica* O9. Algunas de sus características diferenciales están detalladas en la Tabla 4.

Cuando se utilizan equipos comerciales para identificar microorganismos gram negativos, el género *Brucella* puede ser confundido en el API 20NE (sistema para identificar gérmenes no entéricos) con *Psychrobacter phenylpyruvicus*, en el MicroScan Negative COMBO tipo 5, con especies de *Psychrobacter* y en el panel HNID (identificación de *Haemophilus* y *Neisseria*) con *Haemophilus influenzae* biotipo IV. Un ensayo preliminar que orienta en la identificación consiste en suspender una colonia en 30 μl de solución salina normal colocada en un portaobjetos, agregar 30 μl de suero policlonal anti-S-*Brucella*, rotar lentamente y

observar si hay aglutinación. Para complementar el estudio se usa suero anti-R-*Brucella*.

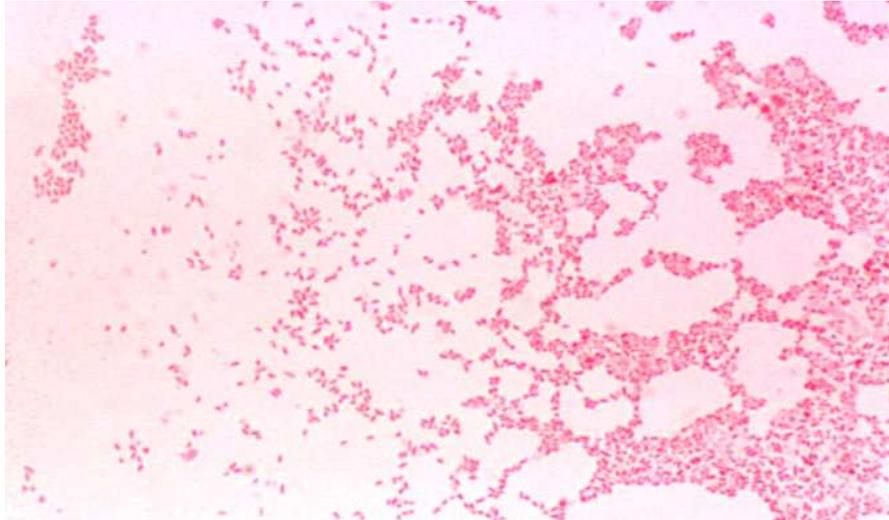


Figura 3. Coloración de Gram de colonias de *Brucella* spp.

Características del cultivo

La mayoría de las especies de *Brucella* cuyo aislamiento es reciente crecen muy lentamente. Sus requerimientos nutricionales son complejos y necesitan que el medio de cultivo contenga aminoácidos, tiamina, biotina, nicotinamida, hierro y magnesio. Muchas especies necesitan también pantotenato de calcio y meso-eritritol pero en general la adición de suero o sangre al medio de cultivo favorece el crecimiento de todas.

Son bacterias aerobias pero algunas especies crecen mejor en condiciones de microaerobiosis con una temperatura y pH óptimos de 37 °C y 6,6 a 7,4 respectivamente. Al metabolizar las proteínas o peptonas del medio de cultivo, la

mayoría de las especies producen álcalis y esa característica actúa como factor limitante del crecimiento. La presión osmótica adecuada es entre 2 y 6 atmósferas, equivalente a NaCl 0,05-0,15M. El medio de cultivo comercial deshidratado *Brucella* Agar BBL™ (BD) es el indicado para el crecimiento de la mayoría de las especies aunque el agregado de 3-5% de suero equino descomplementado (BDS) facilita el crecimiento de todas.

Si el material está contaminado se recomienda utilizar un medio de cultivo básico adicionado de antibióticos como el descrito por Kuzdas Morse (KM), sin embargo las cepas de *Brucella* muy sensibles pueden ser inhibidas. Por eso se siembra el material por duplicado en el medio básico y en el medio suplementado con antibióticos. El citrato de sodio al 2,5% adicionado al medio de cultivo líquido resulta un anticoagulante que no interfiere en el aislamiento de *Brucella*, mientras que los medios de cultivo sólidos son apropiados para la observación de la morfología de las colonias.

Aunque puede haber variaciones dentro de una misma especie en general *B. suis* biovar 1, *B. suis* biovar 3 y *B. canis* son de crecimiento rápido mientras que *B. ovis*, *B. melitensis* y *B. suis* biovar 2 son más lentas; las otras especies tienen velocidad de crecimiento intermedia. Las colonias pueden ser visibles a partir de las 48 h con un tamaño de 0,5 a 1,0 mm de diámetro (Fig. 4). De acuerdo a la morfología se pueden distinguir las cepas lisas con superficie convexa y brillante (L) (Fig. 4) de las intermedias (I) con un halo tenue de diámetro variable, las rugosas (R) de apariencia opaca levemente granular y las mucoides (M) de textura viscosa. La variación de la morfología de las colonias puede suceder por disociación de las formas lisas ante condiciones adversas para su crecimiento, como la falta de humedad, de nutrientes, de temperatura adecuada o de oxígeno en condiciones

estáticas.

Algunas especies como *B. ovis* y *B. canis* son rugosas estables por falta de la cadena O, del LPS de la pared celular probablemente debido a una deleción genética. Si bien las especies de *Brucella* no son hemolíticas, en los cultivos envejecidos puede verse alrededor de las colonias una cierta decoloración que podría explicarse por la formación de álcalis. Todas las especies son inactivadas por calor a ≥ 85 °C.

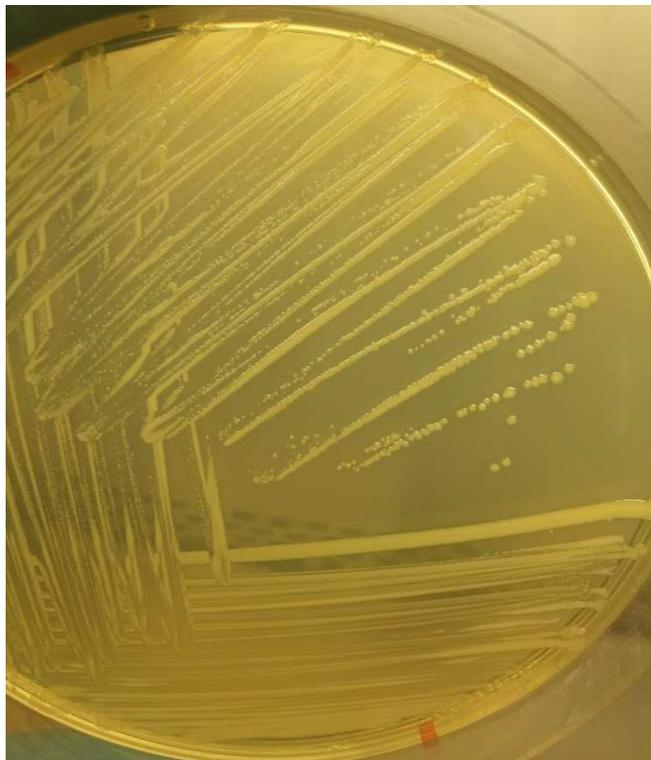


Figura 4. Colonias de *Brucella* con 96 h de incubación en medio de cultivo agar triptosa

Identificación y tipificación

Cuando se sospecha que la cepa aislada puede pertenecer al género *Brucella*, luego de diferenciarla de otros gérmenes gram negativos (Tabla 4), es

conveniente enviarla al laboratorio Nacional de Referencia para su confirmación ⁶¹. El género, especie y biovariedades se definen realizando los ensayos indicados en la Tabla 5 ^{7, 27, 74} incluyendo como control cepas de referencia: *B. abortus* biovar 1, 544; *B. melitensis* biovar 1, 16M y *B. suis* biovar 1, 1330. Cuando la cepa investigada pertenece a otra biovariedad o especie, se incluye la cepa de referencia correspondiente (Tabla 6). Los estudios se realizan en cultivos puros. Cuando se encuentran mezcladas colonias lisas y rugosas se deben aislar las colonias lisas antes de efectuar los ensayos⁷.

Necesidad de CO₂

El CO₂ es utilizado por *B. abortus* y *B. ovis* para disminuir el pH, bajar la tensión de O₂ y como nutriente para la síntesis de alanina, glicina y pirimidina. Las cepas se siembran por duplicado en tubos de BD y se incuban a 36 °C +/- 1 °C, en atmósfera normal y enriquecida con 5-10% v/v de CO₂ para diferenciar las dependientes de CO₂. La lectura se realiza a las 48 h.

Requerimiento de suero

B. abortus biovar 2 y *B. ovis* necesitan para crecer el agregado de 3-5% de suero equino o de conejo al medio de cultivo básico. Estas cepas son muy sensibles a los factores inhibidores de algunas peptonas que se encuentran en los medios de cultivo. El suero interviene neutralizando los componentes inhibidores y también aportando nutrientes. Para observar esta característica se siembra la cepa por duplicado en medio de cultivo básico (BD) y en medio de cultivo básico con suero (BDS). Los tubos se incuban a 36 °C +/- 1°C en atmósfera que contenga 5-10% de

CO₂. La lectura se realiza a las 48 h.

Producción de sulfuro de hidrógeno

Algunas cepas del género *Brucella* producen H₂S a partir de aminoácidos azufrados contenidos en el medio de cultivo. Para detectarlo se utilizan tiras de papel de filtro que contienen solución de acetato de plomo (10% p/v), las cuales se colocan en la boca de los tubos sin que toquen el medio de cultivo. Se cambian diariamente durante 4 días, utilizando una pinza estéril y observando el ennegrecimiento producido por el sulfuro de plomo que se compara con el liberado por las cepas de referencia. *B. suis* produce H₂S, *B. abortus* y *B. neotomae* lo hacen con moderación, en cambio *B. canis*, *B. melitensis* y *B. ovis* no lo producen.

Actividad de la ureasa

La mayoría de las cepas de *Brucella* hidrolizan la urea pero *B. suis*, *B. neotomae* y *B. canis* tienen mayor actividad. Para visualizar esta prueba se utiliza el método de Bauer que emplea un sustrato libre de sustancias promotoras de crecimiento. Se trata de una solución de fosfato monosódico (NaPO₄H₂) 0,125 M y rojo de fenol al 0,0015 % en agua destilada, se ajusta el pH a 4,00 con HCl 1N y se agrega urea al 5%. Se distribuye en cantidades de 1 ml en tubos con tapa de rosca y se suspende en ellos la cepa problema y los patrones de referencia. Se incuba a 36 °C +/- 1 °C y se lee a los 15, 30, 60 y 90 minutos. El ensayo es positivo cuando el color del indicador vira al púrpura.

Crecimiento en presencia de sustancias bacteriostáticas

Un criterio que se utiliza para diferenciar cepas de *Brucella* es su habilidad para crecer en medios de cultivo con sustancias bacteriostáticas, en varias diluciones. También se emplean medios de cultivo que contengan alcohol polihidroxiado y antibióticos. Los bacteriostáticos preparados al 0,1% en agua destilada y esterilizados por calentamiento a 100 °C durante una hora, se pueden conservar en frascos color ámbar hasta tres meses. El alcohol polihidroxiado, en solución acuosa concentrada, se esteriliza por filtración y se conserva a -20 °C +/- 4 °C en alícuotas que se descongelan en el momento del uso. Los antibióticos preparados en solución concentrada, en agua destilada estéril, se pueden conservar durante una semana a 5 °C ± 2 °C. En todos los casos el medio básico es el BD, al cual luego de esterilizado y enfriado a 56°C, se le agregan los colorantes, antibióticos o alcohol polihidroxiado de acuerdo a las concentraciones finales indicadas en la Tabla 5.

Fagotipificación

Se utilizan tres fagos, Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb) y RC (propagado en R-*Brucella*). Se emplean en la dilución habitual de la prueba (RTD, del inglés, *routine test dilution*) que es la menor concentración de fagos que produce lisis completa en su cepa de propagación ²⁶.

Mantenimiento de los cultivos

Para evitar las variaciones que se producen con los pasajes sucesivos en los

medios de cultivo, las cepas de *Brucella* se conservan a $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en nitrógeno líquido o liofilizadas. En todos los casos la suspensión, de cultivos puros en fase logarítmica de crecimiento, se hace en un vehículo protector que contiene 5% de sacarosa, 2,5% de Bacto Casitone® (Difco), 1% de glutamato de sodio y 15% de leche descremada. Se utilizan criotubos, ampollas dobles de liofilización o viales dobles para nitrógeno líquido respectivamente. Las cepas liofilizadas no deben sobrepasar los $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante el proceso, se debe mantener una humedad residual de 1-3% y conservarse a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante el almacenamiento.

Tabla 4. Características que diferencian al género *Brucella* de otros microorganismos gram negativos

Pruebas	<i>Brucella</i> spp.	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Yersinia enterocolíptica</i>
Morfología	Cocobacilos	Cocobacilos	Bacilos en forma de coma	Cocobacilos	Diplococos, cocobacilos y bacilos	Bacilos
Movilidad a 37 °C	-	+	+	-	-	-
Movilidad a 20 °C	-	-	-	-	-	+
Fermentación de lactosa	-	-	-	± ⁽¹⁾	±	-
Fermentación de glucosa	- ⁽²⁾	-	-	-	±	+
Hemólisis en agar sangre	-	+	-	±	±	-
Catalasa	+	+	+	±	+	+
Oxidasa	+ ⁽³⁾	+	+	+	-	-
Ureasa	+ ⁽⁴⁾	+	-	±	±	+
Reducción de nitratos	+ ⁽⁵⁾	+	+	±	±	+
Utilización de citrato	-	+	-	-	-	-

⁽¹⁾ En el género hay especies positivas y negativas

⁽²⁾ *B. neotomae* puede fermentar la glucosa

⁽³⁾ *B. ovis*, *B. neotomae* y algunas *B. abortus* son negativas

⁽⁴⁾ *B. ovis* y algunas *B. abortus* son negativas

⁽⁵⁾ *B. ovis* es negativa

Tabla 5. Características diferenciales de las especies del género *Brucella*^{28, 41, 74}

Cepa/biovar	Morfología de la colonia	Requiere suero	CO ₂	H ₂ S	Medio de cultivo con:				Aglutinación con suero (d)			Lisis por fagos (e)		
					Tionina	Fucsina	Ureasa	Oxidasa	A	M	R	Tb	Wb	RC
					(a)	básica (a)	(b)							
<i>B. melitensis</i> 1	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>B. abortus</i> 1	L	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+/-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
2	L	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+/-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
3	L	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+/-)	(+) c	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
4	L	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+/-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
5	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
6	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
9	L	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
<i>B. suis</i> 1	L	(-)	(-)	(++)	(+)	(-)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
2	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
3	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
4	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
5	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
<i>B. ovis</i>	R	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>B. neotomae</i>	L	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(++)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+/-)	(+)	(-)
<i>B. canis</i>	R	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>B. ceti</i>	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+/-)	(+)	(-)
<i>B. pinnipedialis</i>	L	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+/-)	(+)	(-)
<i>B. microti</i>	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
<i>B. inopinata</i>	L	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+/-)	(-)	(-)

Con el agregado al medio de cultivo de 1 mg/ml de m-eritrol crecen todas las especies

(a): 20 µg/ml; (b): método de Bauer; (c): excepto algunas cepas

(d): A: antisuero monoespecífico A; M: antisuero monoespecífico M; R: antisuero anti (R) *Brucella*

(e): A 1 RTD, dilución habitual de la prueba

(-): negativo; (+/-) positivo débil; (+): positivo; (++): positivo fuerte

L: lisa R: rugosa

Tabla 6. Cepas de referencia de las especies y biovariedades del género *Brucella*²⁸, 41, 74

Especie	Biovar	Cepa	ATCC	NCTC
<i>B. melitensis</i>	1	16M	23456	10094
	2	63/9	23457	10508
	3	Ether	23458	10509
<i>B. abortus</i>	1	544	23448	10093
	2	86/8/59	23449	10501
	3	Tulya	23450	10502
	4	292	23451	10503
	5	B3196	23452	10504
	6	870	23453	10505
<i>B. suis</i>	9	C68	23455	10507
	1	1330	23444	10316
	2	Thomsen	23445	10510
	3	686	23446	10511
	4	40	23447	11364
	5	513	-	-
<i>B. neotomae</i>		5K33	23459	10084
<i>B. ovis</i>		63/290	25840	10512
<i>B. canis</i>		RM6/66	23365	10854
<i>B. ceti</i>		B1/94	-	-
<i>B. pinnipedialis</i>		B2/94	-	-
<i>B. microti</i>		CCM 4915	-	-
<i>B. inopinata</i>		B01	-	-

Métodos moleculares

La disponibilidad de técnicas basadas en el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas, en particular la tecnología de la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha incrementado la diversidad de metodologías útiles para el diagnóstico de laboratorio en brucelosis humana y animal¹¹⁴.

Los ensayos basados en PCR, adoptados como herramientas diagnósticas en microbiología clínica, han demostrado ser rápidos (los resultados son obtenidos en pocas horas), sensibles y específicos comparados a las técnicas microbiológicas y serológicas tradicionales ¹¹².

Debido a la plasticidad de la técnica de PCR, numerosos protocolos han sido desarrollados desde la primera descripción sobre la aplicación de PCR para la identificación de *Brucella* ³⁵.

La PCR se emplea en tres contextos de estudio de la brucelosis: la detección directa de *Brucella* en muestras clínicas, la identificación y tipificación de aislamientos y la trazabilidad epidemiológica de cepas actuantes.

Detección molecular de *Brucella* spp. en muestras clínicas

Para la ejecución de pruebas moleculares, el primer paso metodológico es la obtención del ácido nucleico a partir de la muestra en estudio. Esta etapa es muy importante ya que los parámetros de sensibilidad y especificidad de la reacción se ven afectados conformes al método de extracción empleado y a la muestra elegida. Así, la elección de la muestra biológica correcta es importante para obtener resultados confiables. En brucelosis, la técnica de PCR ha sido aplicada a material genético proveniente de muestras en matriz líquida (sangre, suero, leche, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido abomasal) y en matriz sólida, como diversos tejidos (bazo, hígado, placenta, epidídimo, testículo) ¹⁸. Para la obtención del ADN se pueden emplear métodos propios o comerciales, aunque a la fecha no se ha realizado ningún estudio que defina a un protocolo optimizado y estandarizado ⁸⁴. Debido a que en la PCR directa se detecta el ADN de *Brucella* y no requiere

manipular muestras biológicas con bacterias viables, se reduce el riesgo de infecciones para el laboratorista por procesar material inactivado. Es necesario tener presente que la PCR no detecta bacterias viables, con lo que un resultado positivo no indica una infección activa.

Las bacterias de la familia *Brucellaceae* poseen una alta homología a nivel de ADN ¹⁰³, lo que ha facilitado el diseño de protocolos útiles para la identificación del género empleando un único par de cebadores. Las regiones de interés a amplificar más empleadas comprenden a los *loci* *IS711* ⁷⁵, *bcs31*¹¹ y *16S rRNA*⁴⁸ (Tabla 7) que involucran secuencias específicas de *Brucella*.

Tabla 7. Iniciadores específicos para la detección de ADN de *Brucella* por PCR

Gen blanco	Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Referencia
Proteína de 31 KDa de <i>B. abortus</i> (<i>bcs31</i>)	B4	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA	11
	B5	CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG	
Proteína de membrana externa de <i>B. abortus</i> (<i>omp2</i>)	JPF	GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA	55
	JPR	ACCAGCCATTGCGGTCTGGTA	
16S rRNA de <i>B. abortus</i>	F4	TCGAGCGCCCGCAAGGGG	87
	R2	AACCATAGTGTCTCCACTAA	
16S rRNA de <i>B. abortus</i>	Ba148–167F	TGCTAATACCGTATGTGCTT	48
	Ba928–948R	TAACCGCGACCGGGATGTCAA	

La sensibilidad analítica de la PCR ha demostrado estar en el orden de los 50 fg por reacción ⁷¹, lo que equivale a la detección de cinco bacterias en el volumen de muestra evaluado. Esta alta sensibilidad corresponde a la situación óptima donde se titulan por amplificación diluciones de ADN purificado a partir de cultivos de *Brucella*.

Estos valores de sensibilidad pueden cambiar enormemente en función de la matriz clínica de donde proviene el ADN en estudio ¹⁵.

Aunque al presente no se han realizado estudios que involucren múltiples laboratorios con el objetivo de determinar la reproducibilidad del ensayo ni el metaanálisis de los datos generados sobre la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la PCR, se acepta que estas metodologías ofrecen una sensibilidad semejante o superior al aislamiento microbiológico y una especificidad superior a las pruebas serológicas ⁴.

Entre las limitaciones de la PCR se pueden mencionar la generación de resultados falsamente positivos y negativos ⁷¹.

Los resultados falsamente positivos pueden deberse a la contaminación entre muestras (durante el proceso de purificación del ADN en estudio), aunque la causa más frecuente se debe a la contaminación de reactivos o del instrumental con amplicones. Para minimizar resultados falsamente positivos es necesario adoptar conductas que reduzcan el riesgo de contaminación por aerosoles y disponer de una infraestructura edilicia que minimice la superposición entre el área de la preparación de la reacción y la de detección (observación del resultado en geles de agarosa coloreados con intercalantes fluorescentes expuestos a la luz ultravioleta).

Los resultados falsamente negativos se deben generalmente a la acción de inhibidores enzimáticos de la ADN polimerasa que pueden estar presentes en algunas muestras biológicas, como pueden ser el grupo hemo en muestras de sangre o de anticoagulantes como la heparina. La ingenierización molecular de la Taq ADN polimerasa permite disponer en la actualidad de enzimas más tolerantes a los inhibidores mencionados ¹¹⁵.

Un avance metodológico al diagnóstico molecular de brucelosis ha sido la introducción de la PCR en tiempo real (RT-PCR) ^{85, 86}. Mediante RT-PCR se mejora la sensibilidad y la especificidad de detección y además se minimizan los riesgos de contaminación, por reducción de la generación de amplicones ambientales.

Los ensayos moleculares pueden contribuir significativamente en el diagnóstico de pacientes con brucelosis, aunque será necesaria la optimización y estandarización de las técnicas para lograr consistencia y confiabilidad en los resultados antes de que las mismas puedan ser incorporadas en el laboratorio de diagnóstico de rutina.

Identificación, tipificación y trazabilidad de aislamientos bacterianos mediante PCR

La identificación de especies de *Brucella* es de gran importancia epidemiológica. La tipificación convencional de aislamientos de *Brucella* es una actividad especializada. Son pocos los laboratorios que cuentan con los recursos humanos y de infraestructura requeridos.

Las técnicas basadas en PCR para identificar especies de *Brucella* son rápidas, bioseguras y representan una alternativa respecto a las técnicas convencionales. La disponibilidad de las secuencias genómicas de las especies zoonóticas de *Brucella* ^{32, 47, 81} y el análisis bioinformático comparativo ⁴⁷ han servido de plataforma para el diseño de cebadores específicos para la identificación rápida de dichas especies. Las reacciones de identificación utilizan como templado ADN purificado proveniente de aislamientos microbiológicos de *Brucella*. Así, actualmente y en pocas horas se puede identificar la especie correspondiente de un aislamiento

40.

La epidemiología molecular contribuye en forma significativa al análisis y entendimiento de infecciones causadas por bacterias patógenas ¹⁰². En los estudios epidemiológicos, los métodos de tipificación molecular pueden ser utilizados para rastrear el origen de una infección y el modo en que se distribuye. Por lo tanto, en los programas de control y erradicación de la brucelosis es de utilidad contar con métodos rápidos y certeros de tipificación, aunque disponer de estas metodologías en *Brucella* no ha sido sencillo debido al alto grado de homología genética entre sus especies ¹⁰³.

La información generada por la secuenciación de genomas también ha sido esencial para el desarrollo de metodologías basadas en PCR que permitan identificar de manera certera el perfil genético de un aislamiento para poder subtipificarlo ³⁸. Estas metodologías, como MLST (*multiple locus sequencing typing*) ¹⁰⁹ o MLVA (*multiple locus variable tandem repeats analysis*) ^{17, 54} permiten discriminar entre aislamientos no relacionados de *Brucella* que no podrían ser diferenciados por métodos microbiológicos clásicos. Los perfiles resultantes de estos análisis pueden ser altamente discriminatorios ⁵⁴.

Actualmente MLVA es el método molecular más empleado para la subtipificación de *Brucella* ya que cumple los criterios de calidad recomendados para un ensayo de tipificación: reproducibilidad, estabilidad, poder discriminatorio, concordancia epidemiológica y concordancia con otros tipos de técnicas ¹⁶.

Diagnóstico serológico

Los métodos serológicos se emplean como prueba indirecta de la infección ya que la bacteriología no siempre es positiva. En este tipo de diagnóstico se debe

tener en cuenta que el género *Brucella* presenta una estructura antigénica compleja, que la inmunidad no es estimulada igualmente por los distintos antígenos y que las respuestas varían con el estado de la infección. Un resultado positivo puede indicar infección activa, anticuerpos que persisten después de la recuperación, contacto accidental con el germen no necesariamente seguido de enfermedad o exposición a un microorganismo que presente reacción cruzada con *Brucella*. Es por eso que mientras el aislamiento bacteriológico tiene una sola interpretación, los resultados serológicos deben estudiarse en conjunto con los datos clínicos y epidemiológicos.

Las células lisas de *Brucella* contienen en la membrana externa un lipopolisacárido (S-LPS) que la cubre casi totalmente y estimula la respuesta de anticuerpos. Además, se encuentran proteínas (OMP) y un polisacárido llamado hapteno nativo, polisacárido B o componente uno, de acuerdo al método de extracción. En el citoplasma se han identificado proteínas de significación diagnóstica, que están presentes en fracciones solubles de cepas lisas y rugosas. Las pruebas serológicas se pueden realizar con antígenos de células enteras, S-LPS, extractos celulares o proteínas purificadas. Los métodos clásicos para el diagnóstico de infecciones causadas por *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* emplean antígenos de células enteras de *B. abortus* en fase lisa, que detectan anticuerpos anti S-LPS. Pueden presentarse casos de reacción cruzada con algunas bacterias de importancia clínica como *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* grupo N y *Stenotrophomonas maltophilia*⁵². Las técnicas de aglutinación en placa (Huddleson), con antígeno tamponado (BPA), rosa de Bengala (RB), en tubo (Wright), 2- mercaptoetanol (2ME) y fijación de complemento (FC) continúan siendo útiles en el diagnóstico. Es importante usar antígenos estandarizados para asegurar la uniformidad de los resultados. La prueba de

aglutinación rápida en placa (Huddleson) se encuentra en desuso y en la actualidad ha sido reemplazada por BPA o RB. Estas últimas, por su bajo pH, privilegian la aglutinación de las inmunoglobulinas tipo IgG y reducen de este modo las reacciones inespecíficas. BPA es ligeramente más sensible que RB y se recomienda para el estudio de brucelosis en sangre a transfundir. La prueba de Wright detecta isotipos IgM, IgG e IgA en el suero, es de baja especificidad y no es recomendable en casos crónicos. La prueba de 2ME se realiza conjuntamente con la de Wright, utilizando el reactivo, que es tóxico, para reducir las IgM presentes en el suero. La FC es sensible y específica, detecta anticuerpos de tipo IgG que predominan en casos crónicos, pero tiene el inconveniente de ser muy laboriosa y poco apropiada para casos agudos. Con frecuencia en pacientes con brucelosis, se observan recaídas que se relacionan con un tratamiento inapropiado de antibióticos, virulencia de la cepa o respuesta inmunológica deficiente. Algunos investigadores han informado la aparición de un segundo pico de IgG e IgA, como indicadores de recaídas^{66, 98}. También se ha observado que a menudo se detectan bajos niveles de anticuerpos, varios meses después del tratamiento en pacientes que presentaron una evolución clínica satisfactoria. La significación de este hecho es difícil de establecer ya que no se puede definir con certeza el tiempo de la eliminación intracelular de *Brucella* y tampoco existe un criterio seguro de cura de la enfermedad. La continuidad del título de anticuerpos en el suero después del tratamiento, se debe principalmente a isotipos de IgG e IgA en la mayoría de los pacientes, independientemente del cuadro clínico⁴². La persistencia de IgG por sí misma, no parece ser indicador de infección crónica, aunque algunos autores señalan que lo es, cuando el paciente no presenta altos títulos al comienzo de la enfermedad. Las modernas pruebas de unión primaria tienen la ventaja de su alta

sensibilidad y especificidad, detectan anticuerpos incompletos, comunes en los pacientes crónicos y reducen la reacción cruzada con otros gérmenes gram negativos. cELISA es una prueba de ELISA de competición que utiliza un anticuerpo monoclonal específico para una porción de la cadena “O” del S-LPS de *Brucella*, que compite con los anticuerpos del suero por el antígeno fijo en el soporte sólido. Ha demostrado tener una sensibilidad del 98,3% y una especificidad del 99,7%. La prueba de cELISA detecta casos agudos y crónicos. El inmunoensayo de polarización fluorescente (FPA), tiene la ventaja de realizarse en tubos de vidrio de 12 x 75 mm, que se pueden volver a usar luego de su lavado, se realiza en pocos minutos, tiene una sensibilidad del 96,1% y una especificidad del 97,9%. Al igual que el cELISA detecta casos agudos y crónicos, pero tiene el inconveniente de dar resultados erróneos en sueros con alto contenido de lípidos. Requiere de un polarímetro para su lectura, mientras el cELISA puede utilizar cualquier lector de uso habitual en los laboratorios clínicos ⁶². Cuando se sospecha una infección por *Brucella canis*, el diagnóstico se realiza utilizando antígenos preparados con la cepa *B. canis* M⁺. La prueba de microaglutinación (RSAT) como tamiz y una ELISA indirecta (IELISA) como confirmatoria que utiliza una proteína recombinante como conjugado ⁵⁹ han demostrado ser eficaces en el caso de infecciones por *B. canis*.

Bioseguridad

El género *Brucella* es clasificado por el “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio” de la OMS⁶⁴, en el grupo de riesgo III. El peligro al manipularlo es alto para el operador, aunque escaso para la comunidad ya que no se transmite de un individuo a otro. En el laboratorio clínico las buenas prácticas incluyen medidas de

protección para el personal que manipula muestras de sangre, hemocultivos, biopsias, líquido cefalorraquídeo o material extraído de abscesos, desde donde habitualmente se intenta el aislamiento de *Brucella* spp.⁶⁰. El riesgo principal lo constituyen los aerosoles que se generan en la mayoría de las operaciones de rutina, por eso se debe tratar de reducirlas al mínimo. El médico que deriva muestras al laboratorio debería advertir sobre la posibilidad de encontrar este germen aunque la enfermedad suele presentar síntomas diversos e inespecíficos y a veces no se sospecha⁸⁸.

Se adquiere en el laboratorio con mucha frecuencia⁷³, a veces porque quien intenta identificar el aislamiento lo confunde con otro microorganismo y trabaja sin protección o porque sospechando su presencia no dispone de facilidades⁹³. La mayoría de los accidentes se deben a malas prácticas como oler los cultivos, trabajar en la mesada abierta, no usar equipo de protección personal o llevarse las manos contaminadas a la boca^{63, 65}. Cuando se derrama una suspensión que contenga *Brucella* se debe evacuar el laboratorio y proceder a su desinfección utilizando un equipo adecuado. El área de trabajo debe contar con equipos de protección personal, cabinas de seguridad biológica y un Manual de Bioseguridad donde se detallen los procedimientos para cada laboratorio en particular, el uso apropiado de los desinfectantes, el mantenimiento de las instalaciones, el transporte del material biológico⁴⁹, el control de acceso a visitantes e instrucciones para controlar emergencias.

Bioterrorismo

Algunas características del género *Brucella* como el bajo costo que implica

producirlo en gran escala, su fácil dispersión en el aire, la capacidad de generar una enfermedad infecciosa prolongada y con probabilidades de dejar secuelas, han sido consideradas de interés para el desarrollo de armas biológicas ⁴⁴. Se ha estimado que una dispersión empleando aerosoles, en condiciones favorables, podría causar 82.500 casos de brucelosis y 413 muertes ¹¹¹.

Los microorganismos que pueden ser utilizados como arma biológica, han sido divididos en tres categorías (A, B y C) teniendo en cuenta su capacidad para transformarse en una amenaza para la Salud Pública y un riesgo para la seguridad nacional. El género *Brucella* pertenece a la categoría B: gérmenes que son moderadamente transmisibles, que presentan tasa de morbilidad moderada y baja tasa de mortalidad. Se recomienda a los laboratorios revisar regularmente las políticas y procedimientos de seguridad, controlar los accesos a refrigeradores y *freezers*, mantener siempre cerradas las puertas de laboratorios y bioterios, custodiar los armarios que contengan cepas, material químico o radiactivo, llevar un registro de los ingresos de las visitas, abrir los paquetes que ingresen en cabinas de seguridad biológica y acondicionar el material que sale de acuerdo a normas nacionales e internacionales de seguridad biológica.

Tratamiento

El tratamiento de todas las formas de brucelosis humana se basa en la administración de antibióticos en la etapa más temprana posible bajo la supervisión médica, aún en los pacientes que demuestren una mejoría espontánea. Cuando la enfermedad presenta complicaciones, el tratamiento puede incluir la intervención quirúrgica. La forma aguda no complicada responde a la terapia y es posible la

recuperación clínica y bacteriológica. Algunos antimicrobianos que tienen actividad *in vitro* frente a especies de *Brucella* no siempre son clínicamente eficaces. Los pacientes tratados con β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) o con macrólidos (eritromicina), han presentado recaídas en pacientes con brucelosis. Aunque los nuevos macrólidos, como la azitromicina y claritromicina son más activos *in vitro* que la eritromicina, no se ha demostrado que tengan mayor eficacia que los tratamientos actuales ^{9, 28, 80, 97, 98, 99, 111}.

Tratamiento de la brucelosis en adultos ⁴⁵

Primera alternativa

Doxiciclina en dosis de 100 mg cada 12 horas, por vía oral durante 6 semanas. Para evitar recaídas el tratamiento se asocia durante las primeras 2 o 3 semanas a un aminoglucósido como estreptomina en dosis de 1 g diario IM o rifampicina (600-900 mg/día por vía oral), durante 6 semanas dividida en 2 o 3 tomas diarias o gentamicina 5 mg/kg IM en monodosis durante 2 semanas.

Segunda alternativa

Tetraciclina en dosis de 500 mg cada 6 horas por vía oral durante 6 semanas asociada a rifampicina (600-900 mg/día por vía oral), durante 6 semanas dividida en 2 o 3 tomas diarias o a estreptomina en dosis de 1 g diario IM durante 2-3 semanas.

Tratamiento de la brucelosis en niños mayores de 8 años⁴⁵

Primera alternativa

Doxiciclina en dosis de 2-4 mg/kg/día por vía oral durante 6 semanas asociada a estreptomicina en dosis de 1 g diario IM durante 2 semanas o a gentamicina 3-5 mg/kg/día IM o IV cada 8 h durante 1 semana.

Segunda alternativa

Doxiciclina en dosis de 2-4 mg/kg/día por vía oral durante 6 semanas asociada a rifampicina 15-20 mg/kg/día por vía oral, durante 6 semanas, cada 12 h.

Tratamiento de la brucelosis en niños menores de 8 años⁴⁵

Cotrimoxazol (trimetoprima-sulfametoxazol) 8 a 10 mg/kg/día c/12 h por vía oral, (máximo 480 mg de trimetoprima) durante 45 días, asociada a rifampicina 15 a 20 mg/kg/día por vía oral (máximo: 600-900 mg/día) durante 45 días.

Tratamiento de la brucelosis en embarazadas⁴⁵

Rifampicina 600 mg/día por vía oral durante 6 semanas sola o asociada a cotrimoxazol 160/800 (esta última solo si la paciente se encuentra entre la semana 13 y la 36 del embarazo).

Durante el embarazo es imprescindible hacer un análisis de riesgo-beneficio para definir la necesidad de tratamiento.

Tratamiento posexposición

La mayoría de los accidentes ocurren en los laboratorios clínicos, de investigación o de producción de vacunas y antígenos. El tratamiento profiláctico depende del criterio médico. En general se recomienda una combinación oral de 100 mg de doxiciclina 2 veces por día con 300 mg de rifampicina 3 veces por día, durante 3 semanas. En casos de embarazo es recomendable evaluar la posibilidad de suministrar trimetoprima-sulfametoxazol 2 veces por día durante 3 semanas¹¹¹.

Medidas preventivas

- Alertar a la población de áreas rurales sobre el riesgo de contraer la enfermedad.
- Evitar el consumo de lácteos elaborados con leche no pasteurizada.
- Controlar la adecuada inmunización de los animales y revisar el manejo de los infectados.

Control de expuestos al mismo riesgo

- Investigar los contactos y la fuente de infección.
- En caso de inoculación accidental, consultar al médico y realizar la notificación.

Medidas en caso de brote o epidemia

- Examinar los casos potencialmente expuestos.
- Buscar la fuente común de infección.
- Coordinar con SENASA (local y regional) el control del ganado.
- Coordinar con bromatología local el control de alimentos contaminados.

Medidas Internacionales

- Examinar los animales domésticos y los productos de origen animal destinados al transporte y comercio internacional.

Bibliografía

1. Agostinelli DA, Sánchez de Bustamante J, Grendene A, Barbon SM, Ayala SM, Lucero NE. *Brucella suis* biovar 1 isolated from a hepatic abscess drainage. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12: 616-8.
2. Akcacus M, Esel D, Cetin N, Kisaarslan AP, Kurtoglu S. *Brucella melitensis* in blood culture of two newborns due to exchange transfusion. *Turk J Pediatr.* 2005; 47: 272-4.
3. Akritidis N, Tzivras M, Delladetsima I, Stefanaki S, Moutsopoulos HM, Pappas G. The liver in brucellosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007; 5: 1109-12.
4. Al Dahouk S, Nöckler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9: 833-45.
5. Almirón M, Martínez M, Sanjuan N, Ugalde RA. Ferrochelataze is present in *Brucella abortus* and is critical for its intracellular survival and virulence. *Infect Immun.* 2001; 69:6225-30.
6. Almirón MA, Roset MS, Sanjuan N. The aggregation of *Brucella abortus* occurs under microaerobic conditions and promotes desiccation tolerance and biofilm formation. *Open Microbiol J.* 2013;7:87-91.
7. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Bacteriological and serological methods. En : *Techniques for the Brucellosis Laboratory.* Paris, Institut National de la Recherche Agronomique, 1988.
8. Alva-Pérez J, Arellano-Reynoso B, Hernández-Castro R, Suárez-Guemes F. The *invA* gene of *Brucella melitensis* is involved in intracellular invasion and is required to establish infection in a mouse model. *Virulence.* 2014; 5:563-74.
9. Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, Colmenero JD, Corbel MJ, Falagas ME, Memish ZA, Roushan MR, Rubinstein E, Sipsas NV, Solera J, Young EJ, Pappas G. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. *International Society of Chemotherapy; Institute of Continuing Medical Education of Ioannina.* PLoS Med. 2007;4:e317.
10. Ariza J, Pigrau C, Cañas C, Marrón A, Martínez F, Almirante B, Corredoira JM, Casanova A, Fabregat J, Pahissa A. Current understanding and management of chronic hepatosplenic suppurative brucellosis. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:1024-33.
11. Baily GG, Kranhn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg.* 1992; 95:271-5.
12. Barbier T, Nicolas C, Letesson JJ. *Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. *FEBS Letters.* 2011; 585:2929-34.
13. Blair Hedges S, Kumar S. Genomic clocks and evolutionary timescales. *Trends Genet.* 2003; 19: 200-6.
14. Bosilkovsky M, Krteva L, Caparoska S, Dimzova M. Hip arthritis in brucellosis: a study of 33 cases in the Republic of Macedonia (FYROM). *Int J Clin Pract.* 2004; 58:1023-7.
15. Bounaadja L, Albert D, Chénais B, Hénault S, Zygmunt MS, Poliak S, Garin-Bastuji B. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of *IS711*, *bcsp31* and *per* target genes. *Vet Microbiol.* 2009; 137:156-64.

16. Bricker BJ, Ewalt DR. Evaluation of the HOOF-print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: Results with four performance criteria. *BMC Microbiol.* 2005; 5: 37.
17. Bricker BJ, Ewalt DR, Halling SM. *Brucella* "HOOF-prints": Strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.* 2003; 3:15.
18. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 435-46.
19. Byndloss MX, Tsolis RM. *Brucella* spp. Virulence factors and immunity. *Annu Rev Anim Biosci.* 2016; 4:111-27.
20. Cacace ML, Claros EA, Erazu KA, Escobar GI, Lucero NE. Congenital brucellosis in infant. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13:513-5.
21. Carmichael LE, Bruner DW. Characteristic of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortion. *Cornell Vet.* 1968; 58: 579-92.
22. Castañeda-Roldán EI, Avelino-Flores F, Dall'Agnol, Freer E, Cedillo L, Dornand J, Girón JA. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol.* 2004; 6:435-45.
23. Castañeda-Roldán EI, Quahrani-Bettache S, Saldaña Z, Avelino F, Rendón MA, Dornand J, Girón JA. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2006; 8: 1877-87.
24. Cha SB, Rayamajhi N, Lee WJ, Shin MK, Jung MH, S SW, Kim JW, Yoo HS. Generation and envelope protein analysis of internalization defective *Brucella abortus* mutants in professional phagocytes, RAW 264.7. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012; 64: 244-54.
25. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, Godfroid J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect.* 2001; 3: 729-38.
26. Corbel MJ, Thomas EL. Use of phage for the identification of *Brucella canis* and *Brucella ovis* cultures. *Res Vet Sci.* 1985; 35: 35-40.
27. Corbel MJ, Banai M. Genus *Brucella*, Meyer and Shaw 1920, 173AL En: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* New York: Springer, 2005, vol. 2, p. 370-86.
28. Corbel MJ. Brucellosis in humans and animals. FAO/OIE/WHO, 2006. WHO/CDS/EPR/2006.7.
29. De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Helsel IO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Dasneshvar MI, Wilkins PP, Whatmore AM. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol.* 2008; 46 : 43-9.
30. Del Vecchio VG, Kapatral V, Elzer P, Patra G, Mujer CV. The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 587-92.
31. Delrue RM, Lestrade P, Tibor A, Letesson JJ, De Bolle X. *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 231:1-12.
32. Del Vecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpidis

- N, Overbeek R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 443–8.
33. Demiroğlu YZ, Turunç T, Karaca S, Arlier Z, Alışkan H, Colakoğlu S, Arslan H. Neurological involvement in brucellosis; clinical classification, treatment and results. Mikrobiyol Bul. 2011; 45:401-10.
 34. Ertem M, Kurekci AE, Aysev D, Unal E, İkinciogullari A. Brucellosis transmitted by bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 2000; 26 :225-6.
 35. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. J Appl Bacteriol. 1990; 69:216–27.
 36. Fitch T. *Brucella* taxonomy and evolution. Future Microbiol. 2010; 5: 859-66.
 37. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckert A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp.nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57: 2688-93.
 38. Foster JT, Beckstrom-Sternberg SM, Pearson T, Beckstrom-Sternberg JS, Chain PS, Roberto FF, Hnath J, Brettin T, Keim P. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. J Bacteriol. 2009;191: 2864-70.
 39. Garcia Carrillo C. La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana. OIE, Paris, 1987, 303 pág.
 40. García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Vizmanos JL, López-Goñi I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. Clin Chem. 2006; 52: 779-81.
 41. Garin-Bastuji B, Mick V, Le Carrou G, Allix S, Perrett LL, Dawson CE, Groussaud P, Stubberfield EJ, Koylass M, Whatmore AM. Examination of taxonomic uncertainties surrounding *Brucella abortus* bv. 7 by phenotypic and molecular approaches. Appl Environ Microbiol. 2014; 80:1570-9.
 42. Gazapo E, González Lahoz J, Subiza JL, Baquero M, Gil J, de la Concha EG. Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: importance for diagnosis and follow up. J Infect Dis. 1989; 159: 219-25.
 43. Gorvel JP. *Brucella*: a Mr “Hide” converted into Dr Jeckill. Microbes Infect. 2008; 10: 1010-3.
 44. Greenfield RA, Drevets DA, Machado LJ, Voskuhl GW, Cornea P, Bronze MS. Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. Am J Med Sci. 2002; 323: 299-315.
 45. Guía para el equipo de salud, N° 12, Brucelosis, Ministerio de Salud, Argentina, 2013.
 46. Gwida M, Al Dahouk S, Melzer F, Rösler U, Neubauer H, Tomaso H. Brucellosis - regionally emerging zoonotic disease? Croat Med J. 2010; 51:289-95.
 47. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J Bacteriol. 2005;187: 2715–26.

48. Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58: 2099–101.
49. IATA. Dangerous Goods Regulations, 53th edition, 2012.
50. Isayama Y, Azuma R, Tanaka S, Suto T. The pathogenicity and antigenicity of "*Brucella canis*" strain QE13 for experimental animals. *Ann Sclavo.* 1977;19:89-98.
51. Khan MY, Mah MW, Memish ZA. Brucellosis in pregnant women. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 1172-7.
52. Ko Ky, Kim JW, Her M, Kang SI, Jung SC, Cho DH, Kim JY. *Immunogenic proteins of Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. *Vet Microbiol.* 2012; 156:374-80.
53. Lacerda TL, Salcedo SP, Gorvel JP. *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16:45-51.
54. Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, France Denoeud F, Nöckler K, Neubauer H, Guilloteau LA, Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6: 9.
55. Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-Merino A, Martínez-Soriano JP. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 3087-90.
56. Li Z, Fu Q, Wang Z, Li T, Zhang H, Guo F, Wang Y, Zhang J, Chen C. TceSR two-component regulatory system of *Brucella melitensis* 16M is involved in invasion, intracellular survival and regulated cytotoxicity for macrophages. *Lett Appl Microbiol.* 2015; 60:565-71.
57. Lim KB, Kwak YG, Kim DY, Kim YS, Kim JA. Back pain secondary to *Brucella* spondylitis in the lumbar region. *Ann Rehabil Med.* 2012; 36:282-6.
58. Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Grayon M, Jacques I. A new variant of *Brucella melitensis*. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12: 593-6.
59. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Jacob N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol.* 2005; 54: 457-61.
60. Lucero NE, Siñeriz F. The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotechnol Dev Rev.* 2005; 8: 99-120.
61. Lucero NE, Ayala SM, Escobar G, Jacob NR. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol Infect.* 2008; 136:496-503.
62. Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR. The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *Am J Infect Dis.* 2007; 3:27-35.
63. Maley MW, Kociuba K, Chan RC. Prevention of laboratory- acquired brucellosis: significant side effects of prophylaxis. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: 433-4.
64. Manual de bioseguridad en el laboratorio. OMS, Ginebra, 2005.
65. Marianelli C, Petrucca A, Pasquali P, Ciuchini F, Papadopoulou S, Cipriani P. Use of MLVA-16 typing to trace the source of a laboratory-acquired *Brucella* infection. *J Hosp Infect.* 2008; 68: 274-6

66. Marrodan T, Nenova-Poliakova R, Rubio M, Ariza J, Clavijo E, Smits HL, Diaz R. Evaluation of three methods to measure anti-*Brucella* IgM antibodies and interference of IgA in the interpretation of mercaptan-based tests. *J Med Microbiol.* 2001; 50:663-6.
67. Marzetti S, Carranza C, Roncallo M, Escobar GI, Lucero NE. Recent trends in human *Brucella canis* infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012 Oct 4. doi:pii: S0147-9571(12)00102-6. 10.1016/j.cimid.2012.09.002.
68. Meltzer E, Sidi Y, Smolen G, Banai M, Bardenstein S, Schwartz E. Sexually transmitted brucellosis in humans. *Clin Infect Dis.* 2010; 51:e12-5.
69. Moreno E, Cloeckert A, Moriyon I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 209-27.
70. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol.* 1990; 171: 3569-76.
71. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol .* 2004; 4: 115-123.
72. Navarro-Martínez A, Solera J, Corredoira J, Beato JL, Martínez-Alfaro E, Atiénzar M, Ariza J. Epididymoorchitis due to *Brucella melitensis*: a retrospective study of 59 patients. *Clin Infect Dis.* 2001; 33: 2017-22.
73. Noviello S, Gallo R, Kelly M, Limberger RJ, De Angelis K, Cain L, Wallace B, Dumas N. Laboratory-acquired brucellosis. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 1848-50.
74. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Identification of the agent. In: (Chapter 2.4.3). Office International des Epizooties, 5th ed. Paris, 2009.
75. Ouahrani S, Michaux S, Sri Widada J, Bourg G, Tournebize R, Ramuz M, Liautard JP. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: Relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J Gen Microbiol.* 1993; 139: 3265-73.,
76. Palanduz A, Palanduz S, Guler K, Guler N. Brucellosis in a mother and her young infant: probable transmission by breast milk. *Int J Inf Dis.* 2000; 4: 55-6.
77. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. *N Engl J Med.* 2005; 352:2325-36.
78. Pappas G, Bosilkovsky M, Akritidis N, Mastora M, Krteva L, Tsianos E. Brucellosis and the respiratory system. *Clin Infect Dis.* 2003; 37: e95-9.
79. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6:91–9.
80. Pappas G, Seitaridis S, Akritidis N, Tsianos E. Treatment of brucella spondylitis: lessons from an impossible meta-analysis and initial report of efficacy of a fluoroquinolone-containing regimen. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 24:502-7.
81. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Gill RS, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM.

- The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99:13148–53.
82. Pei J, Kahl-McDonagh M, Ficht TA. *Brucella* dissociation is essential for macrophage egress and bacterial dissemination. Front Cell Infect Microbiol. 2014;4:23.
 83. Perry QL, Hagius SD, Walker JV, Elzer PH. Evaluating the virulence of a *Brucella melitensis* hemagglutinin gene in the caprine model. Vaccine. 2010;28 Suppl 5:F6-11.
 84. Queipo-Ortuño MI, Tena F, Colmenero JD, Morata PV. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of *Brucella* DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008; 27:109-14.
 85. Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Reguera JM, Garcia-Ordoñez MA, Pachon ME, Gonzalez M, Morata P. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. Clin Microbiol Infect. 2005; 11: 713-8.
 86. Redkar R, Rose S, Bricker B, Del Vecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. Mol Cell Probes. 2001; 15: 43-52.
 87. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez Goñi I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J Clin Microbiol. 1995; 3: 615-7.
 88. Robichaud S, Libman M, Behr M, Rubin E. Prevention of laboratory-acquired brucellosis. Clin Infect Dis. 2004; 38: 119-22.
 89. Rood RM, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin DW. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. Med Microbiol Immunol. 2009; 198: 221-38.
 90. Roset MS, Almiron MA. FixL-like sensor F1bS of *Brucella abortus* binds haem and is necessary for survival within eukaryotic cells. FEBS letters. 2013;587:3102-7.
 91. Samartino LE. Brucellosis in Argentina. Vet Microbiol. 2002; 90: 71-80.
 92. Sasmazel A, Baysal A, Fedakar A, Bugra O, Özkokeli M, Büyükbayrak F, Keles C, Göçer S, Sunar H, Zeybek R. Treatment of *Brucella endocarditis*: 15 years of clinical and surgical experience. Ann Thorac Surg. 2010; 89:1432-6.
 93. Sayin-Kutlu S, Kutlu M, Ergonul O, Akalin S, Guven T, Demiroglu YZ, Acicbe O, Akova M. Laboratory-acquired brucellosis in Turkey. Occupational Infectious Diseases Study Group. J Hosp Infect. 2012; 80:326-30.
 94. Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, Tomaso H, Vergnaud G, Le Flèche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, Krüger M, Lodri C, Pfeffer M. Isolation of *Brucella microti* from soil. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 1316-7.
 95. Scholz HC¹, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P, Neubauer H, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Göllner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, Nöckler K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int J Syst Evol Microbiol. 2008; 58(Pt 2):375-82.
 96. Shemesh AA, Yagupsky P. Isolation rates of *Brucella melitensis* in an endemic area and implications for laboratory safety. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31: 441-3.

97. Solera J, Geijo P, Largo J, Rodriguez-Zapata M, Gijón J, Martinez-Alfaro E, Navarro E, Macia MA. A randomized, double-blind study to assess the optimal duration of doxycycline treatment for human brucellosis. *Clin Infect Dis*. 2004; 39:1776-82.
98. Solera J. Update on brucellosis: therapeutic challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36 Suppl 1:S18-20.
99. Solís García del Pozo J, Solera J. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials in the treatment of human brucellosis. *PLoS One*. 2012; 7:e32090.
100. Starr T, Child R, Wehrty TD, Hansen B, Hwang S, López-Otin C, Virgin HW, Celli J. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbes*. 2012; 11:33-45.
101. Tiller RV, Gee JE, Lonsway DR, Gribble S, Bell SC, Jennison AV, Bates J, Coulter C, Hoffmaster AR, De BK. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiology*. 2010; 10:23.
102. van Belkum A. High-throughput epidemiologic typing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9: 86-100.
103. Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol*. 1985; 35: 292-5.
104. Viada C, Rodriguez MC, Sangari FJ, Gorvel JP, García-Lobo JM, Lopez-Goñi I. Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One*. 2010; 5:e10216.
105. Vitry MA, Hanot Mambres D, Deghelt M, Hack K, Machelart A, Lhomme F, Vanderwinden JM, Vermeersch M, De Trez C, Pérez-Morga D, Letesson JJ, Muraille E. *Brucella melitensis* invades murine erythrocytes during infection. *Infect Immun*. 2014;82:3927-38.
106. von Barge K, Gorvel JP, Salcedo SP. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36: 533-62.
107. Watanabe K, Kim S, Nishiguchi M, Suzuki H, Watarai M. *Brucella melitensis* infection associated with Guillain-Barré syndrome through molecular mimicry of host structures. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005; 45:121-7.
108. Whatmore AM. Current understanding of the genetics diversity of *Brucella* an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect Genet Evol*. 2009; 9:1168–84.
109. Whatmore AM, Shankster SJ, Perret L, Murphy TJ, Brew SD, Thirlwall RE, Cutler SJ, MacMillan AP. Identification and characterization of variable-number of tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 1982-93.
110. Yagupsky P, Nechama Peled, Press J. Use of Bactec 9240 blood culture system for detection of *Brucella melitensis* in synovial fluid. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 738-9.
111. Yagupsky P, Baron Ellen Jo. Laboratory exposure to brucellae and implications for bioterrorism. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11: 1180-5.
112. Yang, S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4:337-48.
113. Young EJ. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis*. 1995; 21: 283-9; quiz 290.

114. Yu WL, Nielsen K. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. Croat Med J. 2010; 51: 306-13.
115. Zhang Z, Kermekchiev MB, Barnes WM. Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq. J Mol Diagn. 2010; 12:152-61.