

## Brucelosis en pequeños rumiantes: etiología, epidemiología, sintomatología, diagnóstico, prevención y control

Adosinda Coelho<sup>1</sup>, Juan García Díez<sup>2\*</sup>, Ana Cláudia Coelho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Direcção Geral de Veterinária, Direcção de Serviços Veterinários da Região Norte, Núcleo do Corgo, Lugar de Codeçais – 5000-421 Vila Real, Portugal

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Veterinárias, CECAV-Centro de Ciência Animal e Veterinária Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 202, 5001-801 Vila Real Codex, Portugal. [www.utad.pt](http://www.utad.pt)

\*Corresponding author:

Juan García Díez, DVM, MSc

Departamento de Ciências Veterinárias, CECAV-Centro de Ciência Animal e Veterinária Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 202, 5001-801 Vila Real Codex, Portugal. [www.utad.pt](http://www.utad.pt)

E-mail address: [juangarciadiez@gmail.com](mailto:juangarciadiez@gmail.com)

### 1. Introducción

La brucelosis es una enfermedad infecciosa, muy contagiosa causada por microorganismos del género *Brucella*. Afecta a numerosas especies animales causando en estas principalmente problemas de carácter reproductivo. *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) es el agente etiológico de la brucelosis ovina y caprina. Se caracteriza por ser altamente patógena para el hombre siendo responsable por una de las zoonosis más graves en el mundo (Cutler *et al.*, 2005; Benkirane, 2006) y además es responsable por elevadas pérdidas económicas (Cloetlaert *et al.*, 2004; Blasco, 2006). Esta enfermedad presenta una distribución mundial (Aldomy *et al.*, 1992; Radostits *et al.*, 2000) con diferente presentación en función de las medidas de lucha que se vienen aplicando desde hace años. En los países de la cuenca mediterránea (Portugal, España o Francia entre otros) la presentación de la brucelosis en pequeños rumiantes presenta un carácter enzoótico.

### 2. Etiología

El agente etiológico responsable por la brucelosis ovina y caprina es *B. melitensis* si bien en el caso de los ovinos puede también ser causada por *B. ovis* aunque en menor medida. Raramente, se han descrito casos de brucelosis en pequeños rumiantes causados por *B. abortus* o *B. suis* (Grilló *et al.*, 1999; Kirovski *et al.*, 2005).

Taxonomicamente, el género *Brucella* pertenece al Reino Bacteria, Filum Proteobacteria, Clase Alphaproteobacteria, Subdivisión  $\alpha 2$  (alfa 2), Orden Rhizobiales, Familia Brucellaceae (Garrit, 2001; Moriyón *et al.*, 2002). El género *Brucella* incluye las subespecies *B. melitensis* con sus tres biovars, *B. abortus* con 7 biovars, *B. suis* con 5 biovars, *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae*, estas últimas divididas en función de sus

características metabólicas, antigénicas y culturales (Blasco, 2001b). Si bien, en función de los tests de hibridación de DNA/DNA, el género puede ser monoespecífico (Gándara *et al.*, 2001), no obstante, y a efectos prácticos, se sigue utilizando la anterior denominación. Actualmente el género *Brucella* incluye seis especies siendo *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae*. Las 4 primeras son patógenas para el hombre (Pessegueiro *et al.*, 2003). Además, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. neotomae* se encuentran normalmente en la forma lisa mientras que *B. ovis* y *B. canis* solo se han encontrado en la fase rugosa (Fox *et al.*, 1998). Recientemente se han aislado nuevas especies en mamíferos marinos (*B. maris*, *B. cetaceae*, *B. pinnipediae*) que además pueden presentar características zoonóticas (Clavareau *et al.*, 2002, Aleixo *et al.*, 1999, Cloeckert *et al.*, 2001b).

### 3. Características microbiológicas

*Brucella* puede presentarse de forma cocoide, cocobacilar o en forma de un pequeño bacilo ligeramente curvado de 0,6 a 1,5  $\mu\text{m}$  de largo y entre 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$  de ancho (Alton *et al.*, 2002). Normalmente aparecen aisladas aunque de forma poco frecuente se pueden encontrar en pares o en pequeños grupos (Holt *et al.*, 1994).

*Brucella* spp. Es una bacteria gram-negativa, inmóvil, la cual no forma, esporos, flagelos o pili (Redkar *et al.*, 2001) además de no producir cápsulas verdaderas (Holt *et al.*, 1994). Desde el punto de vista de su coloración, poseen cierta resistencia a la tinción con ácidos débiles. Adquieren un color rojo cuando son teñidas por el método de Ziehl-Neelsen modificado por Stam *et al.* (1950), por el método Macchiavello o por el método modificado de Köster, constituyendo en este último caso una excepción para *B. ovis* (Corbel *et al.*, 1984; O.I.E, 2008). A pesar de la ultraestructura de bacterias del género *Brucella* ser muy parecida a otras bacterias gram-negativas, existen diferencias muy significativas con la familia de las Enterobacteriaceae (Moriyón *et al.*, 1998).

#### 3.1 Cultivo

En medio sólido específicos, las colonias de *Brucella* son visibles en 48 horas. Después de 4 días de incubación, las colonias son redondas con 1 a 2 mm de diámetro, con márgenes lisos (S) translúcidas de color amarillo pálido o convexas y de color perla blanco (Dokuzoguz *et al.*, 2005). Posteriormente se vuelven mayores y ligeramente más oscuras. Las formas no lisas pueden ser rugosas (R) o mucosas (M), presentándose como colonias ligeramente mayores que las formas S, con una superficie más granulosa y viscosa. El color cambia de blanco-mate o blanco amarillento a marrón, a la luz reflexiva o transmitida. Las colonias M son generalmente mucho más transparentes que las colonias S, siendo semejantes en el color y la opacidad a las colonias R, pero con textura pegajosa. Su crecimiento es lento, particularmente en cultivos recientes, no siendo visible antes de los dos o tres días (Dokuzoguz *et al.*, 2005).

#### 3.2 Características de crecimiento

Las bacterias del género *Brucella* son aeróbicas aunque algunas cepas requieren una atmósfera que contenga entre un 5 y un 10% de dióxido de carbono para su crecimiento, principalmente en el primer aislado. El pH óptimo de crecimiento varía de 6,6 a 7,4, siendo la temperatura ideal entre 36 °C a 38 °C aunque la mayoría de las cepas pueden crecer en un rango situado entre los 20°C y los 40 °C (Holt *et al.*, 1994).

### 3.3 Antígenos

El antígeno principal de la pared celular es el lipopolisacárido (LPS) responsable por la respuesta humoral. En las cepas rugosas de *Brucella*, el LPS es semejante al de las cepas lisas pero no posee la cadena O, o posee solo alguno de sus residuos (Fernandez-Prada *et al.*, 2001). El LPS comprende la mayor superficie de antígenos de la correspondiente fase de la colonia asociada a la aglutinación.

### 3.4 Bioquímica

El metabolismo de *Brucella* es oxidativo siendo que no poseen la capacidad de acidificar medios de cultivo con carbohidratos en los test convencionales (excepto para *B. neotomae*). Las especies de *Brucella* son catalasa positiva, generalmente oxidasa positiva, e reducen nitratos a nitritos (excepto *B. ovis* y algunas cepas de *B. canis*).

La producción de H<sub>2</sub>S y la actividad ureasa es variable. Para su crecimiento, *Brucella* necesita de biotina, tiamina e nicotiamida. El crecimiento es mejorado con la adición de suero o sangre, aunque la hemina (factor X) y la adenina-nicotiamida dinucleótido (NAD) no son necesarios. El crecimiento de la mayor parte de las cepas de *Brucella* son inhibidas en medios que contengan sales biliares, telurito e selenito. *Brucella* no produce indol ni acetilmetil-carbinol. Presenta una reacción negativa al rojo metilo y no libera *o*-nitrofenol de *o*-nitrofenol β-D-galactosa (Collins *et al.*, 1985). No crece en medio de citrato y lo hace escasamente en medios líquidos, a no ser que estos sean vigorosamente agitados (Holt *et al.*, 1994).

### 3.5 DNA y síntesis proteica

Relativamente a la composición del DNA, todos los miembros del género tienen un contenido homogéneo de bases, entre un 55% a un 58% moles de guanina y citosina (Moriyón *et al.*, 2002). En el genoma no existen plasmídeos ni fagos y no se verifican evidencias de transferencia de material genético *in vivo* pudiendo, aun así, mantener una amplia gama de plasmídeos del hospedador (Michaux-Charachon *et al.*, 2002).

### 3.6 Diferenciación de especies e biotipos

Los test diferenciales incluyen la exigencia de dióxido de carbono, producción de sulfuro de hidrógeno, test de la ureasa, tolerancia a los colorantes (fucsina básica y teonina) y aglutinación con sueros monoespecíficos (Marín *et al.*, 2002). Otros test incluyen la tolerancia a antibióticos, la lisotipia o tipificación fágica (Corbel *et al.*, 1984). En cultivos frescos, *Brucella* es sensible *in vitro* a la gentamicina, tetraciclinas y rifampicina. Además, la mayoría de las cepas también es sensible a los siguientes antibióticos: ampicilina, cloranfenicol, cotrimoxazole, eritromicina, canamicina, novobiocina, espectinomina y estreptomina aunque la sensibilidad puede ser variable según la especie, biotipo y/o estirpe (Baykam *et al.*, 2004, Marín *et al.*, 1996a).

La mayoría de las cepas son resistentes a β-lactámicos, cefalosporinas, ácido nalidíxico, anfotericina B, bacitracina, clindamicina, lincomicina, nistatina y vancomicina en concentraciones terapéuticas (Xiu-li *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta su gana de hospedadores, pueden clasificarse en 6 grupos, aunque algunos autores solo consideren 5 (Corbel *et al.*, 1984).

## 4. Epidemiología

### 4. 1 Especies susceptibles

El género *Brucella* infecta a las siguientes especies: bovinos, ovinos, caprinos, suínos, caballos, mula, perros, gatos, conejos, alces, búfalos, venados, corzos, renos, llamas, javalis, cabras montesas, zorros, hurones, gacelas, liebres, ratones, hamsters, osos, lobos, caribus y un grande número de aves como perdizes, codornizes y especies migratorias (Ocholi *et al.*, 2004; Zarnke *et al.*, 2006). *Brucella melitensis* puede afectar a la mayoría de los animales domésticos aunque los ovinos y los caprinos, especialmente los de explotaciones lecheras, son los mas susceptibles. Los ovinos, al contrario que en los caprinos, presentan una receptividad variable de acuerdo con las razas. Los caprinos son los hospedadores clásicos de *B. melitensis* mientras que los ovinos son los hospederos preferenciales (Garín-Bastuji, 1993).

Los ovinos son sensibles principalmente a *B. melitensis* aunque tambien a *B. ovis*. Si bien, han sido descritos casos esporádicos de brucelosis en ovinos y caprinos por *B. abortus* e *B. suis* (Estein *et al.*, 2003; O.I.E., 2008). Los perros utilizados en el pastoreo de rebaños de pequeños rumiantes infectados, también se encuentran frecuentemente infectados (Memish, 2001) Así, los perros, gatos y otros carnívoros salvajes, como zorros o lobos, pueden ser importantes diseminadores mecánicos de la infección, transportando material infectado, como los fetos o las placentas procedentes de abortos y/o fetos de rebaños de pequeños rumiantes infectados. Los cerdos son sensibles a la infección por *B. melitensis* transmitida por los pequeños rumiantes presentando cierta importancia en explotaciones suínas donde ambas especies son criadas en extensivo (Paolicchi *et al.*, 1993).

Además, cualquier rumiante salvaje en contacto directo o indirecto con ovinos y/o caprinos infectados, podrá infectarse por *B. melitensis*, manteniendo la infección en el ambiente natural (Godfroid, 2002).

### 4. 2 Distribución de la brucelosis

La situación de la brucelosis de los pequeños rumiantes es diferente según la zona considerada. A continuación se describe la situación en distintas regiones del mundo En Europa, países como Bélgica, Republica Checa, Dinamarca, Alemania, Irlanda, Luxemburgo, Hungría, Holanda, Austria, Polonia Rumania, Eslovenia, Eslovaquia, Finlandia Suécia y Reino unido son considerados oficialmente indemnes de *B. melitensis* (European Union, 2009). Aunque tradicionalmente *B. melitensis* se ha considerado endémica en los países Mediterráneos, algunas regiones y/o zonas de países como España, Portugal o Italia también son consideradas como oficialmente indemnes de *B. melitensis* (European Union, 2009)

En la península ibérica, la brucelosis de los pequeños rumiantes ha disminuido en los últimos años (Blasco, 2004). En el caso de España, la prevalencia en rebaños ha disminuido desde un casi 29% en 1991 hasta poco más del 1,5% en 2009 mientras que la prevalencia en animales lo ha hecho desde el 2,35% hasta el 0,11% durante el mismo periodo.

En Portugal, la prevalencia ha disminuido progresivamente aunque en comparación con España, los valores son mas elevados. Así, la prevalencia en rebaños disminuyó del 31,63% hasta el 7,77% entre el año 1999 y el 2010 mientras que la prevalencia en animales disminuyó de un 7,28% hasta el 0,94% ([Portugal, 2012](#)).

En Estados Unidos la brucelosis ovina y caprina es muy rara siendo detectados casos esporádicos asociados a la importacion de pequeños rumiantes. Además, Estados Unidos fue el primer país que consiguió en el año 2000 el control de la enfermedad sin que se detectara ningún ([Ragan, 2002](#)). Canada es oficialmente indemne de brucelosis por *B. melitensis* desde el año 1989 ([OIE 2010](#)).

En el caso de america central y america del sur la situación es mas complicada. En Argentina, [Samartino \(2002\)](#) indica que la prevalencia en caprinos ronda el 20% mientras que en determinadas zonas, la prevalencia individual en ovinos ronda el 25%. En otros países de América Latina como Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá, la presencia de *B. melitensis* en el ganado bovino y caprino ha sido detectada ([Moreno, 2002](#)).

En Asia, la ausencia de datos dificulta el conocimiento real de la prevalencia de la brucelosis. Según algunos estudios, en la India la enfermedad está difundida por todo el país, estimándose que el 5% del ganado vacuno y el 3% de los búfalos están infectados. También se ha detectado la enfermedad en ovejas, cabras y cerdos ([Renukaradhya et al., 2002](#)).

En el caso de Australia y Nueva Zelanda son considerados como zonas libres o con prevalencias extremadamente bajas ([Alton et al., 2002](#); [O.I.E., 2010](#)).

#### **4. 3 Factores de riesgo**

##### **4. 3. 1 Factores asociados al hospedador**

Aunque los pequeños rumiantes sean hospedadores específicos de *B. melitensis*, también son infectados por *B. abortus* e *B. suis* aunque la enfermedad clínica es rara ([Garin-Bastuji et al., 1997](#)). A partir del momento en que los ovinos son infectados por *B. abortus*, se convierten en portadores y pueden excretarla hasta 40 meses después. Los jóvenes son bastante resistentes a la infección, mientras que los animales gestantes son los mas susceptibles (debido a la producción de eritrol en la placenta) ([Okoh, 1980](#); [Henriques, 1990](#)).

Cuanto mayor es la edad, mayor es la susceptibilidad, de tal forma que la brucelosis es considerada una enfermedad de animales adultos. Esto puede ser debido a que el porcentaje de animales enfermos aumenta con la edad, una vez que, cuanto mayor tiempo pasa un animal en un ambiente contaminado, mayor es la probabilidad de él mismo se infecte ([León, 1993](#)). Los animales jóvenes pueden ser infectados y aunque no presentan sintomatología clínica, presentan normalmente una respuesta serologica de una semana de duración. La susceptibilidad aumenta después de la madurez sexual, ocurriendo principalmente, durante la gestación. La susceptibilidad de los ovinos a *B. melitensis* varia en funcion del tipo de raza, siendo las razas lecheras más susceptibles que las de aptitud cárnica. Las razas de rabo ancho son mas susceptibles ([Alavi-Shoushtari et al., 1995](#)) mientras que las razas ovinas maltesas y sudamericanas parece

que presentan una mayor resistencia a la brucelosis. Por el contrario, las razas de ovejas del sudoeste de Asia y del Mediterraneo, como la raza Awassi, son muy sensibles a la brucelosis (Corbel *et al.*, 1984; Alton, 1987).

La brucelosis se centra en la mayoría de los países de la zona mediterránea así como en los países del Sudoeste Asiático mientras que en la región de América Latina el problema se centra en la brucelosis caprina (Alton, 1987). La excreción vaginal en caprinos es superior y más prolongada que en los ovinos durando de 2 a 3 meses. Además, la brucelosis en caprinos conduce a una mayor reducción de la producción lechera que en los ovinos (Alton, 1985a). El fenómeno de la brucelosis latente en los ovinos se observa en corderos nacidos de madres infectadas y amamantados con leche contaminada por *Brucella*. Los corderos son seronegativos hasta la edad adulta mientras que en las hembras, la latencia de la brucelosis se mantiene hasta la primera gestación, período en el cual se desarrolla el proceso patológico (Young *et al.*, 1989). Así, las hembras infectadas presentan un elevado número de abortos con especial importancia en hembras primíparas (León, 1993). *B. melitensis* afecta tanto a machos como a hembras. En machos provoca orquitis y epididimitis principalmente mientras que en hembras no gestantes, la brucelosis se cronifica, caracterizándose por la colonización del sistema monocito-macrofágico. Este hecho presenta importantes repercusiones epidemiológicas, dado que, después de una respuesta inmune inicial, desaparecen los anticuerpos y los síntomas, pudiendo convertirse en portadores asintomáticos de difícil detección mediante técnicas serológicas habituales (León, 1993). Además, en las regiones donde existe *B. melitensis* en ovinos y caprinos, los bovinos pueden infectarse con esta bacteria (Muma *et al.*, 2006).

Todavía no ha sido determinado si *B. melitensis* se puede mantener por sí solo en una población de bovinos en ausencia de pequeños rumiantes. *B. melitensis* provoca aborto en los bovinos de forma semejante a *B. abortus*. La colonización de la ubre es frecuente y la excreción en leche puede prolongarse meses o años pudiendo causar surtos de brucelosis en ganaderos.

#### **4. 3. 2 Factores asociados al ambiente**

El manejo y las condiciones ambientales influyen en la transmisión de la infección. Así, los partos y la cría en locales oscuros, cerrados y con elevada densidad de animales son factores de riesgo (Al-Talafhah *et al.*, 2003).

La infección entre los rebaños se favorece por la utilización de pastos comunes y/o agrupamiento de animales infectados. En muchos países, existe una fuerte correlación entre la prevalencia de la brucelosis en pequeños ruminantes y la práctica de la trashumancia. (Reviriego *et al.*, 2000) El principal riesgo de la introducción de la enfermedad en una explotación indemne de brucelosis pasa por el préstamo de un macho infectado para la cubrición. (Amador *et al.*, 2000; Kabagambe *et al.*, 2001). La capacidad de supervivencia de *Brucella* fuera de los hospedadores mamíferos es relativamente grande en comparación con otras bacterias patógenas no esporuladas en iguales circunstancias (Garin-Bastuji, 1993b). Las condiciones favorables son un pH superior a 4, temperatura baja, ausencia de luz directa y humedad elevada. *Brucella* puede persistir varios meses en agua, abortos, placentas, heces, abono, lana, instalaciones, equipamientos y ropa (Ferron, 1989) *Brucella* puede sobrevivir 40 días en suelo seco y 60 días en suelos húmedos, 144 días a 20°C y 40% de humedad relativa,

durante varios meses en agua de consumo de 4°C a 8°C e dos años y medio a 0°C., 30 días en orina, 75 días en fetos abortados, mas de 200 días en secreciones uterinas y varios años en tejidos o medios congelados. La supervivencia de brucela en abono es duradera desde que no se produzcan fermentaciones acidas (Moreno, 1976). La resistencia de brucela a las diferentes condiciones ambientales se incrementa en presencia de abundante materia orgánica (Louzã, 1993).

La supervivencia de *Brucella* en leche y en productos lácteos esta relacionada con aspectos como el tipo de cura, humedad, temperatura y/o alteraciones del pH. En el caso de la leche, la supervivencia de brucela en inversamente proporcional al pH del producto (El-Daher et al., 1990). *Brucella* es termosensible, siendo destruída através de la pasterización mediante el hervido durante 10 minutos (Davies et al., 1973). No resiste a la cura de los quesos desde que esta dure de cerca de 3 meses (Nicoletti, 1989) si bien en los quesos de pasta blanda acidificados y secos, su sobrevivencia es superior. De esta forma, la legislación europea obliga a que todos los quesos fabricados con leche cruda devam ser submetidos a un periodo de cura nunca inferior a 60 días (Reglamento CE 853/2004).

Al contrario de los productos lácteos, el tiempo de supervivencia de brucela en la carne es menor, exepcto en las congeladas donde el microorganismo puede sobrevivir durante varios años (Pessegueiro et al., 2003).

#### **4. 4 Transmisión**

Generalmente, la trasmision de la brucelosis ocurre en los rumiantes através de la excrecion de los materiales contaminados del aparato genital femenino, constituyendo la principal forme de trasmision a otros animales y al hombre. De esta forma, en la mayoría de las circustancias, las principales vías de diseminación de la *Brucella* son la placenta, líquidos fetales, descargas vaginales expelidas después del parto o aborto, siendo en ese momento donde son liberadas un gran número de brucelas (O.I.E., 2008).

En caprinos, la excreción de los microorganismos por vía vaginal es prolongada y abundante (generalmente 2 o 3 meses). En las ovejas es generalmente menor, cesando normalmente en 3 semanas despues del parto/aborto. También es comun que ocurra la excreción através de la leche del semen. Además, brucela puede ser aislada en varios tejidos, tales como en los ganglios linfáticos de la cabeça, aquellos asociados al aparato reproductor y/o a lesiones artríticas (Blasco, 2001b).

La persistencia de la infección de la ubre y de los ganglios linfáticos supramamarios conduce a una constante e intermitente excreción de los microorganismos en leche y en lactaciones sucesivas. Este hecho constituye una importante fuente de infección para el hombre y para los animales jóvenes (Henriques, 1990). La eliminación de las brucelas por la leche és generalmente intermitenete e solo aparece, generalmente, pasados 6 a 12 días después del aborto. En caprinos, la eliminación es mas abundante y mas prolongada por lo existe un mayor riesgo de infección por consumo de leche de esta especie (Ferreira et al. 1990; Louzã, 1993).

La época de partos constituye, en los rebaños infectados, el momento decisivo para la propagación de la enfermedad. En esta fase, existe una excreció elevada del agente que puede durar hasta 18 semanas, através de la secreción vaginal (Bathke, 1981). Los

roedores y los perros pastores pueden introducir el microorganismo en la población ovina, pudiendo los cánidos funcionar como vectores mecánicos y biológicos. Sobre todo en la Asia meridional y central, todavía se junta la diseminación mediante insectos hematófagos. Las fuentes contaminadas (ex: pastos, establos, medios de transporte, etc) adquieren una gran importancia epidemiológica, debido a la gran resistencia de *B. melitensis* (Ferreira *et al.*, 1990).

El semen puede actuar como vehículo del agente. La excreción transitoria del agente por la orina y por la heces debe solo ser considerada en la época del parto y/o aborto y en los jóvenes alimentados con leche de madres infectadas (Louzã, 1993). El pus y las secreciones provenientes de las articulaciones afectadas, también puede constituir una fuente de contagio cuando son abiertas (Louzã, 1993).

La movimentación de los carneros para cubrición tanto infectados como de explotaciones infectadas es un factor de riesgo en la diseminación de la enfermedad aunque el agente también puede ser transmitido para explotaciones indemnes a través del uso de pastos comunes (Blaha, 1989; Kabagambe *et al.*, 2001). La entrada del agente en territorios libres de *Brucella* ocurre casi exclusivamente, debido a la movimentación/comercio de animales con infección latente para cría (Blaha, 1989).

Las vías de infección pueden ser directas o indirectas. En general, el contagio de los ovinos y caprinos ocurre fundamentalmente a través de las mucosas y serosas del aparato digestivo y/o del aparato respiratorio, así como a través de la mucosa conjuntival, siendo menos frecuente la infección por el contacto directo a través de la piel en caso de existencia de pequeñas erosiones (Crespo-León, 1994; Kabagambe *et al.*, 2001).

El contagio directo mediante inhalación de aerosoles contaminados constituye una de las principales puertas de entrada del agente, teniendo especial importancia en las zonas secas, donde el paso de los animales levanta nubes de polvo (Crespo-León, 1994).

*Brucella melitensis* puede ser transmitida verticalmente de las madres para las crías. Una pequeña proporción de corderos y cabritos puede ser infectado por vía uterina aunque la mayoría de las infecciones son probablemente adquiridas por el consumo de calostro y/o leche (Grilló *et al.*, 1997).

El número de *Brucella* excretados en la leche es relativamente bajo aunque este puede ser transmitido indirectamente por las manos del ordeñador. En el macho, debido a la localización de las brucelas en el órgano reproductor, generalmente excreta este microorganismo a través del semen.

La infección de los caprinos puede ocurrir por el contacto con heridas o cortes, con fluidos infectados. Aunque se admita de forma general que el tipo de transmisión iatrogénica sea consecuencia de la contaminación de instrumentos y/o por la introducción de agentes patogénicos contaminantes, a través de productos profilácticos o terapéuticos, debe darse particularmente importancia a la vacunación de las hembras gestantes, una vez que esta, por sí sola, puede dar origen a un proceso nosológico semejante al provocado por las cepas patogénicas (Ferreira *et al.*, 1990; Crespo-León, 1994).

Relativamente a los insectos hematófagos, estos han sido referidos como difusores de la brucelosis. Fueron aisladas brucelas a partir de contenido del estómago de *Stomoxys calcitrans* e *Ornithodoros*. *Musca autumnalis* (mosca de los establos) es un díptero que

contacta con los rumiantes. La hembra deposita los huevos en las heces de estos animales y se alimenta de su sangre, secreción lagrimal y secreciones placentarias. Se piensa que estos insectos así como las garrapatas contribuyen para la transmisión de la enfermedad (Ferreira *et al.*, 1990; Crespo-León, 1994).

## 5. Patogenia

*Brucella* spp. desarrolla una patogénesis fundamentalmente semejante a los parásitos intracelulares, en la medida que las principales vías de entrada varían desde la orofaringe al aparato genital. De igual modo, el tropismo para los tejidos y células varía como por ejemplo, los trofoblastos de la placenta, los pulmones fetales, los macrófagos del sistema monocito-macrófico y los aparatos reproductores masculinos y femeninos (Adams, 2002).

En la evolución de la infección se puede distinguir 4 fases: 1) penetración y migración local y regional; 2) fase de diseminación septicémica; 3) fase secundaria o estado de adaptación y 4) fase de autocura o de enfermedad latente o persistencia (Bossery, 1992a,b).

En la primera fase, las formas bacterianas son captadas por las células, inmunológicamente competentes, a partir de la puerta de entrada, que puede ser aerógena, conjuntival, digestiva o cutánea, siendo transportadas, libres o en el interior de células fagocitarias, para los ganglios linfáticos más próximos del lugar de entrada, donde ocurre la multiplicación (Blasco, 2001a; Barberán *et al.*, 2002). En esta fase producen infección y dan inicio a la respuesta inmunitaria pero con una relación serológica ausente o muy débil (Mauricio *et al.*, 1998).

Si el agente se acantona, provoca una hiperplasia linforreticular, que puede durar varias semanas y persistir durante meses (Blasco, 2001a; Barberán *et al.*, 2002). Si el agente no se acantona en esta fase, se dirige primero por vía linfática y después por vía hematogénica (bacteriemia transitoria), localizándose en casi todos los órganos, incluyendo el sistema monocítico-macrófico (hígado, bazo, ganglios linfáticos y médula ósea), y órganos reproductores (útero gestante, testículos, vesículas seminales, glándula mamaria, etc.) (Alton *et al.*, 2002; Barberán *et al.*, 2002), provocando sucesivas ondas septicémicas coincidentes con períodos febriles que en las hembras están directamente relacionados con la infección placentaria y fetal, causando frecuentemente aborto (Clockaert *et al.*, 1995; Mauricio *et al.*, 1998).

En esta fase, los mecanismos inmunitarios capaces de disminuir la bacteriemia tanto en su cantidad como en su duración (o en ambos), podría reducir la probabilidad de colonización brucélica uterino-placentaria (Crespo-León, 1994). Además, en las hembras gestantes, la invasión y multiplicación uterino-placentaria es significativamente grande, considerándose que en estos órganos no ofrece resistencia inmunitaria de forma adecuada (Alton, 1984). La especial afinidad que *B. melitensis* tiene por el endometrio gestante y por la placenta fetal provoca la principal manifestación clínica de la infección en ovinos y caprinos, el aborto durante el último tercio de la gestación o el nacimiento de animales prematuros con poca viabilidad (Blasco, 2001a; Barberán *et al.*, 2002).

En la tercera fase, fase secundaria o fase de adaptación, la evolución de la infección es variable dependiendo de la susceptibilidad del hospedador, siendo caracterizada por una

localización aislada de la bacteria, que puede ser placenta, tejido mamario, testículos, articulaciones, etc. acompañada de la sintomatología correspondiente (Garín-Bastuji, 1993a). También puede ser infectada la glándula mamaria, siendo los microorganismos excretados en la leche (Alton, 1984). Esta fase es caracterizada por la eliminación de *Brucella* o más frecuentemente, por la infección persistente en la glándula mamaria, glándulas linfáticas supramamarias y genitales, con excreción constante o intermitente de los microorganismos en la leche y en las secreciones genitales (Fensterbank, 1987b).

Los animales generalmente abortan una vez, en el segundo tercio de la gestación, aunque la reinvasión del útero ocurre en las gestaciones subsecuentes con la excreción en fluidos y membranas. La proporción de hembras infectadas por la primera vez que abortan, varía con las circunstancias pudiendo llegar hasta el 40%. Las hembras que han nacido en ambientes infectados, generalmente abortan en menor medida que las otras. Esto explica el elevado número de abortos en explotaciones recientemente infectadas cuando se compara con las explotaciones en que la enfermedad es enzoótica.

En los pequeños rumiantes el periodo de infección no es aparente, evolucionando para un periodo secundario con dos alternativas biológicas: la infección latente o la cura espontánea o autocura, que en los ovinos y en los caprinos es frecuente hasta los dos años de edad (Louzã, 1993; Crespo-León, 1994). Cuando la bacteria es eliminada totalmente de los tejidos del hospedador, se denomina "autocura absoluta", mientras que la incapacidad del hospedador para diseminar brucela en el ambiente, se denomina "autocura funcional", lo que en la realidad corresponde al estado de infección latente, cuya trascendencia epidemiológica es extremadamente importante como anteriormente referido (Blasco *et al.*, 1990).

Aunque el fenómeno de autocura en los ovinos es discutible, estando oculto por una baja tasa de abortos en las hembras infectadas y por su disminución progresiva a lo largo de la vida reproductora de los animales (Blasco *et al.*, 1990). De cualquier forma, desde el punto de vista epidemiológico, la autocura es un fenómeno de carácter individual, dudoso y no valorable en la práctica que no debe ser considerado en las estrategias de los programas de control de la enfermedad por las implicaciones sanitarias nocivas e imprevisibles que pueden producir (Lithg-Pereira, 2001). *Brucella* es un microorganismo intracelular que infecta tanto a las células fagocitarias como a las no fagocitarias (Corbel, 1997; Aleixo *et al.*, 1999). En las células fagocitarias mononucleares y polimorfonucleares, sobreviven dentro del fagosoma y se evaden a la destrucción por una serie de mecanismos todavía no descritos en su totalidad (Mujer *et al.*, 2002). Si no son destruidas por los mecanismos microbicidas de los macrofagos, *brucella* destruye algunas células del hospedador e infecta otras (Hoover *et al.*, 2002).

La base del establecimiento de una infección crónica parece ser la sobrevivencia dentro de los macrófagos (Celli *et al.*, 2004). La presencia de lipopolisacárido es importante para la sobrevivencia de *B. melitensis* porque previene la muerte de los macrófagos, evitando así que estas sean eliminadas (Fernandez-Prada *et al.*, 2003).

Para que las bacterias sean destruidas, tienen que ser ingeridas por los fagocitos y estar localizadas en el interior de los fagosomas, hecho que ocurre con la mayoría de las brucelas. Aun así, existen evidencias de que la verdadera ingestión no siempre ocurre y que algunas brucelas poseen procesos de internalización diferentes de los de la

fagocitosis. Se piensa hasta el momento, que no existen diferencias entre la fagocitosis de la brucela y de otras bacterias extracelulares.

*Brucella* spp. no posee cápsulas antigafocitarias aunque desarrolla mecanismos de adhesión a las células (Orduña-Domingo *et al.* 2001; Rocha-Gracia *et al.* 2002). Mediante interacciones tipo lecitina, son capaces de adherirse a los polimorfonucleares neutrófilos siendo esta adherencia estabilizada por lípidos bacterianos. La brucela, así adsorbida, promueve la internalización, probablemente sin formar verdaderos fagosomas. Algunas de las lecitinas identificadas en la superficie de *B. melitensis* y *B. abortus* no se encuentran, o su concentración es mínima en las brucelas no patogénicas para el hombre como *B. neotomae*. La eficacia de este mecanismo de internalización y su significado patogénico es hasta el momento una incógnita (Orduña-Domingo *et al.*, 2002).

La opsonización con complemento o anticuerpos favorece la fagocitosis y la destrucción de *Brucella* spp. Debido, muy probablemente, al englobamiento de *Brucella* en verdaderos fagosomas y la activación de los sistemas bactericidas celulares. A pesar de todo, la opsonización por sí misma no parece resolver la infección, ya que la existencia de elevados títulos de anticuerpos no es suficiente para eliminar la infección, por lo menos en el hombre (Orduña-Domingo *et al.*, 2001).

En los fagocitos se observa un vacuolo que interacciona con el primer paso de la vía clásica endocítica, llamado endosoma maduro. Después, el vacuolo que contiene la brucela, reacciona con los últimos compartimentos endosómicos donde *Brucella* spp. es destruida. O por el contrario, el vacuolo que contiene *Brucella* spp. reacciona con un fagosoma vacuolar e después con el retículo endoplasmático rugoso para formar un único compartimento en el cual la multiplicación de *Brucella* spp. se produce en elevada cantidad (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998; Méresse *et al.*, 1999). *Brucella* spp. también se puede multiplicar en el medio extracelular de los tejidos del hospedador. Histológicamente, la respuesta del hospedador se manifiesta por la formación de un absceso, infiltración linfocitaria y formación linfocitaria con necrosis caseosa (Hoover *et al.*, 2002).

Las especies rugosas de *B. canis* y *B. ovis*, raramente asociadas a la brucelosis humana, no tienen capacidad de multiplicarse en los macrófagos (Caron *et al.*, 1994). La supervivencia de las cepas lisas parecen estar relacionadas con la composición de la pared celular y se ha demostrado por microscopía electrónica, la presencia de un invólucro externo en las especies de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*. Además, parece ser que las cepas lisas tienen la capacidad de prevenir o limitar la fusión lisosoma-fagosoma, necesaria a la eliminación de las bacterias, y de resistir las enzimas lisosómicas, después de la fusión (Thoen *et al.*, 1993).

Se demostró en 1950, que el eritritol era un glucido que soportaba el crecimiento de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*. La estirpe B19 de *B. abortus* atenuada, perdió la capacidad de utilizar el eritritol, y es la única cepa de *Brucella* pasible de inhibición en la presencia de este componente en el medio (McCullough *et al.*, 1951). Según Smith *et al.* (1962), este glucido se encuentra presente en la placenta de las hembras bovinas, ovinas, caprinos y suinos y se encuentra ausente en los roedores y en la mujer. De acuerdo con Jawetz *et al.* (1973; 1989) y Hoover *et al.*, (2002), la presencia de eritritol en la placenta de los rumiantes puede favorecer el crecimiento de las brucelas.

## 6. Inmunidad

Generalmente, la infección por *Brucella* conduce a la inducción de la respuesta inmunitaria, tanto de tipo humoral, como celular. Son constituyentes de esta inmunidad las células T  $\alpha\beta$  CD4+, CD8+ e  $\gamma\delta$ T, las células B y las citoquinas (Corbel, 1997). La amplitud y duración de esta respuesta puede variar en función de factores como virulencia de la cepa, dosis de inóculo, especie, edad, sexo, fase de gestación o estado inmunitario del hospedador (Golding *et al.*, 2001).

La respuesta de la inmunidad adquirida en la brucelosis puede ser clasificada en tres mecanismos. Primero, el IFN- $\gamma$  producido por las células T CD4+, CD8+ y  $\gamma\delta$ T, activa la función bactericida de los macrófagos e impide la supervivencia intracelular de *Brucella*. En segundo lugar, la citotoxicidad de las células CD8+ e  $\gamma\delta$ T destruyen los macrófagos infectados. En tercer lugar, los isótopos de los anticuerpos de tipo Th1 tales como a IgG2a y IgG3 opsonizan los agentes patogénicos para facilitar la fagocitosis (Golding *et al.*, 2001)

Los constituyentes de la pared celular de las bacterias tales como el peptidoglicano, el LPS y los glucolípidos, son reconocidos por el sistema inmunitario como señales no específicas que desencadenan la actividad inmunológica (Tizard, 1996).

El LPS tiene un gran impacto en la activación de los macrófagos. Esto favorece el desarrollo de la virulencia de *Brucella* previniendo la síntesis de inmunomediadores importantes para la defensa del hospedador. La cadena O parece ser una molécula clave para la invasión, desarrollo de la bacteria y de protección contra la apoptosis (Fernandez-Prada *et al.*, 2003).

También protege las bacterias de los metabolitos del oxígeno y de la lisis mediada del complemento (Fernandez-Prada *et al.*, 2001). Aun así, el LPS de brucela es menos activo que el LPS de otras bacterias gram-negativas.

Comparando con estas últimas, el LPS de brucela es un activador débil del complemento por vía alternativa y presenta una capacidad muy baja de activar las funciones y actividades de las células fagocitarias, siendo su capacidad para inducir una “explosión oxidativa” o la producción de óxido nítrico cerca de cien veces menor que la del LPS de *E. coli*, lo que puede implicar la rara aparición del shock endotóxico como síntoma clínico en la brucelosis humana, al contrario de la elevada frecuencia con que esta sintomatología aparece en las bacteriemias por enterobacterias (Orduña-Domingo *et al.*, 2001), pudiendo igualmente explicar la larga sobrevivencia intracelular de *Brucella* (López-Urrutia *et al.*, 2000).

Sin embargo, el LPS de *Brucella* se comporta como un buen inductor de la producción de mediadores celulares de la respuesta inmune y de la activación policlonal de los linfocitos B. Su capacidad es igual o mayor que la de los LPS de las enterobacterias (Orduña-Domingo *et al.*, 2001). Durante la infección por *Brucella* se produce una fuerte respuesta inmunitaria humoral, con elevados títulos de anticuerpos contra el polisacárido de LPS y una fuerte respuesta celular caracterizada por hipersensibilidad retardada, siendo esta desarrollada principalmente por las citocinas inducida por el LPS. Sin embargo, a pesar de los altos títulos de anticuerpos resultantes de la reacción al polisacárido O, la respuesta inmune es ineficiente desde el punto de vista de la protección, al menos, en el

caso del hombre. Contrariamente, en el caso del ratón ratón, los anticuerpos protegen al animal de la reinfección (Orduña-Domingo *et al.*, 2001).

### 6. 1 Respuesta Humoral

La respuesta humoral por anticuerpos consiste es un aumento inicial de IgM durante 3 a 4 semanas, seguido de un incremento gradual de IgG e IgA, comenzando entre 7 a 14 días después de la infección. Posteriormente, estas disminuyen en el momento de la recuperación (Young, 1995)

La respuesta inmunitaria humoral contra brucela, es relativamente ineficaz, ya que *Brucella* spp. lisa consigue inhibir la fusión de los lisosomas con los fagosomas, aumentando la posibilidad de multiplicarse dentro de los macrófagos en un ambiente libre de anticuerpos (Tizard, 1996). En lugar de los linfocitos transferidos de forma pasiva de un animal a otro (inmunidad adaptativa / adquirida), los sueros hiperinmunes transferidos de esta manera no confieren una protección significativa contra *Brucella* (Tizard, 1996).

### 6. 2 Inmunidad Celular

La defensa de la infección por brucelosis es asumida principalmente por la respuesta inmunitaria celular, concretamente, por los macrófagos activados (Golding *et al.*, 2001). La inmunidad adquirida contra las bacterias intracelulares es dependiente de células T (Wyckoff, 2002). En los primeros días después de la infección, se produce una activación inespecífica del sistema inmune que podría llegar a ser decisivo en la limitación o diseminación del proceso (Zhan *et al.*, 1996). Aunque los neutrófilos representan una primera línea de defensa contra la brucelosis, los fagocitos mononucleares son el factor más importante de defensa celular contra la infección (Baldwin *et al.*, 1994). Estos, después de entrar en contacto con los microorganismos, inducen la producción del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1) y de interleucina 12 (IL-12), siendo esta última responsable de la activación de las células "natural killer "(NK), con la subsecuente producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Zhan *et al.*, 1995, Zhan *et al.*, 1996). *Brucella* induce fuertemente la producción de IL-12 (Caron *et al.*, 1994; Zhan *et al.*, 1995). Tanto las células T auxiliares (CD4 +), como las T citotóxicos (CD8 +), producen IFN- $\gamma$  (Zaitseva *et al.*, 1995; Tizard, 1996). Por otra parte, las células T son también responsables por la producción de IL-2 e IL-10. La IL-2, producida por linfocitos T helper, inicia y mantiene la proliferación de linfocitos T citotóxicos, linfocitos B (en menor medida) y macrófagos (Tizard, 1996). Aunque los macrófagos de animales sensibilizados sean en condiciones normales incapaces de destruir estos microorganismos, estos pueden adquirir esta capacidad después de 10 días de la infección (Tizard, 1996). En ese momento, el IFN- $\gamma$  tiene la capacidad de activar macrófagos, causando aumento en el tamaño, la movilidad y la actividad metabólica produciendo metabolitos activos con carácter bactericida. Los lisosomas, al aumentar de tamaño, disponen de mayorer cantidades de enzimas hidrolíticas, segregando mayores cantidades de IL-1. Esta citocina liberada por los macrófagos, es capaz de activar las células T auxiliares y, en menor medida, los linfocitos B. Todos estos acontecimientos conducen a un aumento significativo en la actividad bactericida de estas células, que conduce a la destrucción de los microorganismos alojados en el interior (Tizard, 1996).

La fase de declive de la brucelosis coincide con el inicio de la inmunidad celular. En esta etapa, la inmunidad del antígeno es específica y termina con la eliminación del

microorganismo o con la infección activa, iniciándose así la fase de latencia. De hecho, la destrucción de brucelas depende de la activación de los macrófagos y requiere el desarrollo de una respuesta celular Th1 contra los antígenos de la proteína, cuya respuesta está mediada por el IFN- $\gamma$ , liberada por las células T sensibilizadas, cuando se exponen a ribonucleoproteína bacterianas.

La respuesta Th1, asociada a la producción de IFN-gamma e IL-12, es por una parte, mediadora de la resistencia celular adquirida por la activación específica de las células fagocitarias y por la implementación de su actividad bactericida. Por otro lado, la hipersensibilidad retardada, considera importante en la formación de granulomas, limita así la diseminación del microorganismo (Aleixo *et al.*, 1999).

Sin embargo, las células Th2 que secretan IL-4, IL-5 e IL-10, estimulan la respuesta policlonal de células B e inhiben algunas de las respuestas celulares protectoras lo que limita la citotoxicidad de los macrófagos y de la producción de IFN-gamma, haciéndose huéspedes susceptibles a la progresión de la enfermedad (Divisor *et al.*, 1996).

Hay diferencias naturales entre brucellas relativamente a la respuesta de los macrófagos de cara a la infección. El LPS-S esta probablemente involucrado en la resistencia ya que las cepas lisas sobreviven más eficientemente que las rugosas, siendo un potente inductor de la mitosis para las células esplénicas, lo que parece ser importante en la inducción de la inmunidad celular. Por otro lado, es también un potente inductor de IL-10, aunque el IFN- $\gamma$  disminuye significativamente la producción de IL-10. Aunque, por sí sola no es capaz de inducir la expresión de IL-12 en las células CD4+. Sin embargo, el IFN- $\gamma$  aumenta el porcentaje de células CD4+ y de IL-12. En conclusión, el LPS de *Brucella* es un potente inductor de IL-10 siendo que la inducción de IL-12 necesita condiciones más favorables (Kariminia *et al.*, 2002). Dentro de los macrófagos, las brucelas inhiben la fusión del fagosoma con el lisosoma, evitando la desgranulación, inhibiendo la producción de TNF- $\alpha$  y eventualmente inhibiendo la producción de SOD-Cu/Zn (Liautard *et al.*, 1996). Se considera que la respuesta protectora del huésped frente a *B. melitensis* esta mediada por las células Th1 (López-Santiago *et al.*, 1997).

## 7. Cuadro clínico y lesional

El período de incubación de la brucelosis varía de algunos días a meses, siendo esta variabilidad asociada a la susceptibilidad del hospedador (Memish *et al.*, 2004).

### 7. 1 Brucelosis aguda

Las principales manifestaciones clínicas en ovinos y caprinos son los abortos y/o partos prematuros (Rekiki *et al.*, 2004). El aborto ocurre generalmente durante los dos últimos meses de gestación y, en algunos casos, seguido de retención placentaria (Lithg-Pereira, 2001; Barberán *et al.*, 2002) y metritis, aunque más evidentes, ocurren en un porcentaje muy bajo en animales infectados (Lithg-Pereira, 2001). Otros síntomas como la menor producción de leche, baja infertilidad o la alta mortalidad de las crías son más generalizada, tanto a nivel de los rebaños como de los animales (Radostits *et al.*, 2000; Barberán *et al.*, 2002) La infección aguda puede manifestarse con fiebre, diarrea y una rápida pérdida de la condición corporal (Buxton *et al.*, 1977). Otros síntomas como el mal estado de la capa, lesiones óseas y artritis (Maurice *et al.*, 1998). Otra sintomatología son los episodios intermitentes de fiebre y conjuntivitis mucopurulenta si bien estos síntomas

son poco evidentes en la práctica clínica veterinaria (Beer, 1981; Lithg-Pereira, 2001). En los machos, la sintomatología característica es la epididimitis y orquitis aguda pudiendo desembocar en una infertilidad. Por último, no hay evidencia de que la sintomatología clínica sea diferente en función de los biotipos (Fensterbank, 1987a).

## **7. 2 *Brucelosis crónica***

Los animales generalmente abortan una vez, aunque la reinvasión del útero ocurre en gestaciones posteriores siendo las brucelas excretadas con las placentas y descargas vaginales. Los animales gestantes expuestos a un pequeño número de bacterias pueden desarrollar una inmunidad autolimitante transformándose en portadores latentes. La infección persistente de las glándulas mamarias y ganglios linfáticos supramamarios es común en caprinos donde se produce la excreción de brucela en las lactancias sucesivas. Sin embargo, fue observado en ovinos que en el caso de una infección autolimitante, raramente existe excreción de brucela en la leche (Alton, 1990; Duran-Ferrer, 1998). En el caso de los machos tanto ovinos como caprinos, la epididimitis y la orquitis conducen generalmente a la infección crónica (Edmonson *et al.*, 2012).

## **7. 3 *Lesiones macroscópicas e microscópicas***

La brucelosis se caracteriza por no presentar lesiones de carácter patognomónico (Blood *et al.*, 1976). Si bien, el cuadro lesional que presente es muy variable como por ejemplo, placentitis necrótica, cambios testiculares palpables, orquitis y epididimitis necrosante, vesiculite seminal necrótica y prostatitis. Los animales pueden desarrollar lesiones inflamatorias granulomatosas, que generalmente se localiza en los tejidos linfáticos, ganglios linfáticos de la ubre (incluyendo el supramamario) útero, articulaciones y las membranas sinoviales (Radostits *et al.*, 2000). Las lesiones más frecuentes son metritis purulenta hembras con exudado hemorrágico en las carúnculas y endometrio (Crespo *et al.*, 1994).

Relativamente a las lesiones existentes en los fetos abortados, destacan las bronconeumonía catarrales y fibrinopurulenta, donde observamos un infiltrado alveolar difuso, infiltración intersticial, edema interlobular y pleural, y congestión vascular. En el bazo, se observa hiperplasia reticuloendotelial difusa y multifocal. De forma ocasional, los abortos pueden presentarse de color amarillento así como hemorragias en las cavidades internas (Beer, 1981).

## **8. Diagnóstico**

La importancia económica de la brucelosis requiere el uso de métodos de diagnóstico rápido y sensible (Romero *et al.*, 1999). La ausencia de síntomas patognomónicos de la infección para confirmar el diagnóstico clínico de la enfermedad, requiere un examen laboratorial, que puede ser directo (bacteriológica) o indirectos (serológicos) (Garin-Bastuji, 1993a, Crespo-León, 1994).

El diagnóstico de la brucelosis se basa tradicionalmente en la detección de anticuerpos circulantes, seguido del aislamiento bacteriano (Cassataro *et al.*, 2004; O'Leary *et al.*, 2006). Debido a la poca variación entre las especies de *Brucella*, su diferenciación en biotipos se basa en las características biológicas y fisiológicas.

### **8. 1 Tomas de muestras**

Las muestras mas recomendables para la identificación de *Brucella* a partir del animal vivo, son las secreciones vaginales y/o leche. La secrecion de *B. melitensis* vaginal ocurre de forma masiva durante los 15 días después del parto o aborto, pudiendo alcanzar hasta los 60 días (Marín *et al.*, 2005).

En el caso de la leche, la muestra debe ser recogida y centrifugada a baja velocidad (4000 rpm) durante quince minutos siendo utilizando el sedimento para el cultivo en placa. El aislamiento de la bacteria a partir de de muestras de placenta, abortos o de órganos como hígado, bazo o pulmones es posible. Sin embargo, la recogida de secreciones vaginales con hisopos estériles es el más práctico, higiénico y seguro además de proporcionar una mayor sensibilidad (puede existir excreción vaginal sin infección fetal) (Blasco *et al.*, 1990; Marín *et al.*, 2002). En cadáveres, el aislamiento se realiza a partir de ganglios linfáticos (retromamários, ilíacos, prefemoral, submaxilares y retrofaríngeos), bazo, glándula mamaria, útero, epidídimo y las glándulas sexuales accesorias (Blasco *et al.*, Marín, 1990; Marin, 1994).

### **8. 2 Examen microscópico del agente**

El diagnóstico de la brucelosis por *B. melitensis* puede ser realizado a partir del examen microbiológico de secreciones vaginales, membranas fetales, vísceras de los fetos, cotiledones, contenido de los fetos y semen mediante la utilización de la técnica de Stamp. Con esta técnica de tinción, *Brucella* spp. Aparece en forma de coccobacilli de color rojizo.

Sin embargo, cuando se utiliza este método, *Brucela* spp. puede confundirse con *Chlamydia* spp. o *Coxiella* spp. (Crespo *et al.*, 1994; Bastuji-Garin *et al.*, 1997).

### **8. 3 Diagnóstico bacteriológico**

El diagnóstico bacteriológico basa en el aislamiento, posterior identificación y tipificación de *Brucella* spp. en medios de cultivo adecuados. A pesar de ser un método de diagnóstico definitivo, no es práctico ya que requiere una cierta sensibilidad y no es económicamente aceptable en un gran escala (Weynants *et al.*, 1996).

En los aislamientos primarios, la mayoría de las cepas de *Brucella* poseen un crecimiento lento por lo que los medios de cultura tienen que ser suplementados con sangre, suero o extractos de tejidos, el acelerar su crecimiento (Corbel *et al.*, 1984). La mayoría de las cepas muestran un buen crecimiento en medio rico, no suplementado, a base de peptona, debiendo mantenerse una ventilación adecuada para obtener un crecimiento satisfactorio (Corbel *et al.*, 1984; Alton *et al.*, 1987). Los medios de triptona de soja, *Brucella* agar y Albini *Brucella* agar también mantienen el crecimiento de la mayoría de las cepas sin suplementación con suero (Alton *et al.* 1990; Gomes, 1983).

El medio de cultura “potato infusion agar” sustenta el crecimiento de la mayoría de las cepas de *Brucella* y se utiliza principalemnte como medio de selección para la producción de vacunas o antígenos ya que favorece la disociación de colonias (Corbel *et al.*, 1984).

El medio de Farrel es uno de los medios más sensibles para el aislamiento de *Brucella* spp. (Garin-Bastuji *et al.*, 2006), siendo el medio Thayer-Martin modificado el más eficaz para el aislamiento de *B. ovis*, pudiendo ser utilizados en el aislamiento de *B. melitensis*.

El medio líquido Brodie y Sinton, desarrollado por Brodie y Sinton en 1975, se utiliza para enriquecer *Brucella* spp. cuando se desea aislar el microorganismo de materiales contaminados. El medio de Ruiz Castañeda es recomendado para aislamiento de *Brucella* spp. A partir de sangre y otras muestras líquidas (Moreno, 1981; Corbel *et al.*, 1985). Consiste en utilizar tubos que contienen medio sólido y líquido. Permite el enriquecimiento de inóculos pequeños en la fase líquida, siguiéndose de una transferencia a medios sólidos para la formación de colonias sin necesidad de realizar inoculaciones sucesivas. Este método no es recomendado para aislar *Brucella* spp. en materiales muy contaminados (Corbel *et al.*, 1985).

Los medios sólidos son preferibles a los líquidos ya que facilitan el aislamiento y la identificación. Además, limitan la aparición de disociación y también el crecimiento de microorganismos contaminantes a excepción del hemocultivo cuya inoculación puede ser efectuada inicialmente en medio líquido o en un medio especial constituido por una fase líquida y otra sólida como el medio bifásico de Ruiz Castañeda (Gomes, 1983; Alton *et al.*, 1988).

#### **8. 4 Hemoculturas automáticas comerciales**

Existen varios métodos de hemocultivos, entre los cuales, los sistemas automatizados que incluye la detección radiométrica de *Brucella* spp., tales como el BACTEC 460, el sistema de detección de infrarrojos como el BACTEC NR, y sistemas de monitorización continua como el Bact/Alert, BACTEC 9120 y BACTEC 9240. La ventaja que ofrecen estos equipos es la rapidez en la obtención del resultados de estos (Lepe *et al.*, 2001).

#### **8. 5 Reaccion en cadena de la polimerasa (PCR)**

El diagnóstico de la brucelosis por PCR consiste en detectar la presencia de DNA brucélico en una muestra (Bricker, 2002). Existen varias técnicas de diagnóstico por PCR como la PCR combinatoria, PCR en tiempo real o PCR múltiple (Amoroso, 2011, Mirnejad *et al.*, 2012, Gupta, 2012,). Las ventajas de la técnica de PCR frente al diagnóstico serológico, son su rapidez, menor peligrosidad, mayor sensibilidad y mayor especificidad.

Aun así, pueden existir falsos negativos asociados a factores como la escasa cantidad de muestra procesada (mayor cantidad de muestra en las pruebas de serodiagnóstico), ausencia de DNA en la muestra debido a la intermitencia en la excreción de *Brucella* spp. en los animales o asociado a interferencias en el aislamiento del DNA directamente de muestras de origen animal.

#### **8. 6 Diagnóstico serológico**

El diagnóstico serológico se basa en la reacción antigénica entre *Brucella* spp. y los anticuerpos producidos por el huésped en respuesta a la infección por *Brucella* spp. El objetivo de las pruebas de diagnóstico serológico consiste en calcular la inmunidad

humoral del huésped a partir de muestras de sangre, la leche entera, suero de la leche, plasma seminal y/o exudado vaginal (Alton *et al.*, 1988).

Actualmente, las pruebas serológicas son el principal método de diagnóstico de la brucelosis, a pesar de las deficiencias que presentan tanto en la sensibilidad como en la especificidad, principalmente en ovejas y cabras vacunadas con cepas atenuadas de *Brucella*, o animales procedentes de zonas de baja prevalencia (Alton *et al.* 1988; Bercovich *et al.*, 1999).

Debido a la similitud del antígeno de *Brucella* con otros microorganismos, en particular *Yersinia enterocolitica* O:9 (Kittelberger *et al.*, 1995), hay un problema de diagnóstico (Cutler *et al.*, 2005). Debido a las limitaciones del diagnóstico directo, la serología se convierte en la herramienta más útil de diagnóstico (Serra *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2005). Las pruebas laboratoriales más importantes utilizadas en el diagnóstico serológico de la brucelosis son el Rosa de Bengala (RB), fijación del complemento (FC), inmunodifusión en agar (IGDA), inmunodifusión radial en gel (RID) y ELISA (Nielsen, 2002).

El Rosa de Bengala y la fijación del complemento son las pruebas más utilizadas en el diagnóstico de la infección por *B. melitensis* (Kirovski *et al.*, 2005; Garin-Bastuji *et al.*, 2006). El RB se utiliza como prueba de "screening" mientras que la FC se utiliza como test de confirmación. Son las pruebas reconocidas internacionalmente por la OIE (2008).

#### **8. 6. 1 Test del Rosa Bengala (RB)**

El rosa Bengala es una prueba de fácil realización y bajo costo que permite procesar un elevado número de muestras. Es una prueba de carácter cualitativa que clasifica los animales como positivos o negativos. El RB es una prueba con elevada sensibilidad aunque su especificidad no es tan elevada principalmente en la diferenciación entre animales infectados de forma natural o aquellos vacunados con Rev-1 (Bercovic *et al.*, 1998).

#### **8. 6. 2 Prueba de fijación de complemento (FC)**

La prueba de FC es el más utilizado para el diagnóstico confirmatorio de la brucelosis en diferentes especies animales, especialmente la causada por *B. melitensis* en pequeños rumiantes (Blasco *et al.*, 1994a). Esta prueba es de gran utilidad para confirmar los casos de animales positivos a la prueba del RB (Crespo *et al.*, 1994; Blasco *et al.*, 2002b). La sensibilidad de la prueba de FC ronda el 88% con una alta especificidad (100%) (Garin-Bastuji, 1993b). Los inconvenientes de esta prueba son: 1) subjetividad en la interpretación de títulos bajos, 2) compleja variabilidad de los reactivos, 3) dificultad técnica, 4) no funciona correctamente con sueros hemolizados que puede coagular durante la inactivación, 5) necesidad de una elevada cantidad de reactivos, 6) la actividad anticomplementaria de algunos sueros (ausencia de hemólisis en el pozo correspondiente al determinando control, frecuente en sueros de ovinos y caprinos), 7) dificultad para distinguir animales infectados de vacunados recientemente con la vacuna Rev-1, ya que detecta IgM y IgG1 y 8) existencia del fenómeno de pre-zona, caracterizado por reacciones negativas en las diluciones más bajas de suero (por exceso de anticuerpos) (Blasco, 2001b, 2002b). Este fenómeno parece depender de la

concentración de suero de IgG2, que tiene una baja capacidad para fijar el complemento (McNaught *et al.*, 1977).

### **8. 6. 3 Ensaiois Imunoenzimáticos - ELISA**

La técnica de ELISA se caracteriza por su elevada sensibilidad y especificidad. Emplea una pequeña cantidad de suero y da buenos resultados aún en presencia de hemólisis. Existen varios tipos de ELISA para el diagnóstico de *Brucella* spp. como son el ELISA indirecto o el ELISA competitivo (Jaques *et al.*, 1998). Para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp. en suero o la técnica ELISA indirecta para la detección de anticuerpos Anti *Brucella abortus* en leche, también denominada prueba del anillo (PA) (en inglés, ring test). La PA es un método eficaz y poco costoso para la detección de brucelosis en rebaños lecheros, sin embargo, la principal limitación es el factor de dilución que ocurre en los grandes rebaños lecheros con grandes cantidades de leche que se almacenan en los tanques de recolección y las reacciones falsas positivas como resultado de vacunaciones con cepa 19, período de lactación, condiciones ambientales o infecciones no específicas (Nicoletti, 1994).

### **8. 6. 4 Prova de inmunodifusión en agar (AGID)**

Esta prueba se basa en la utilización del lipopolisacárido (LPS) y del hapteno nativo (NH) de la pared celular de las cepas lisas de *Brucella* como antígenos. Permite la detección de anticuerpos en sueros de animales con infección activa los cuales representan un potencial de riesgo epidemiológico, permitiendo la diferenciación de los animales infectados de los vacunados con Rev-1 (Blasco *et al.*, 1984; Poeta, 2002b). En el caso de los animales infectados, las líneas de precipitación aparecen en duplicado (línea de precipitación para LPS y NH) mientras que en los animales vacunados sólo muestra la precipitación en línea de los LPS (Aragón *et al.*, 1996).

### **8. 6. 5 Inmunodifusión radial**

Esta prueba utiliza el hapteno nativo (NH) y el polisacárido B como antígenos los cuales son colocados en gel de agarosa. El suero problema es colocado en pozos realizados en el mismo gel. La reacción positiva se verifica en el caso de aparecer una línea de precipitación alrededor de los pozos, entre las 2 a 6 horas de incubación a temperatura ambiente (Jiménez Bagüés *et al.*, 1990).

## **8. 7 Diagnóstico alérgico**

La detección de una reacción de hipersensibilidad mediada por células, o de tipo retardado (tipo IV) que se produce en los animales infectados después de la inoculación de un alérgeno brucélico se puede utilizar en el diagnóstico de la brucelosis ovina con un éxito relativo (Blasco *et al.*, 1994b). El diagnóstico se debe utilizar como una prueba adicional para pruebas serológicas, siendo recomendados como útil para la confirmación de los rebaños no infectados (Bercovich, 1999; Garin-Bastuji *et al.*, 1997).

### **8. 7. 1 Test de la brucelina**

Los antígenos citoplasmáticos de *Brucella* spp., también conocidos como brucelinas fueron utilizados con éxito variable en el diagnóstico de la brucelosis ovina y caprina

(Blasco *et al.*, 1994b;. Deonel *et al.*, 1997). Los brucelinas más importantes utilizados en la actualidad son "brucellina INRA", producido por la estación patológica de la reproducción ("Station de Pathologie de la reproducción") en Francia, preparado a partir de la cepa B-115 de *B. melitensis*. Esta esta constituida por proteínas monosacáridos, y el alérgeno F (que consiste en un extracto celular de fracciones proteicas de bajo peso molecular, polipéptidos, aminoácidos y polisacáridos), desarrollado en la República Checa por el Instituto Veterinario Central de Praga ("Instituto Veterinario Central de Praga ") (Deonel *et al.*, 1997; Pouillot *et al.*, 1997).

### **8. 8 Test del gamma-interferón**

La detección *in vitro* de células mediadoras inmunitarias (ensayos de transformación y proliferación de linfocitos) no es muy eficaz para ser aplicado para el diagnóstico de rutina de brucelosis. Sin embargo, en la última década, el reconocimiento del papel de algunas citoquinas como gamma-interferón en la inmunidad contra agentes intracelulares permitió el desarrollo de test *in vitro* para el diagnóstico (Nicoletti *et al.*, 1990).

## **9. Control y erradicación de la brucelosis en pequeños rumiantes**

En la Unión Europea así como en otras partes del mundo, el mecanismo esencial para garantizar la conservación y fomento de la cabaña de ovinos y caprinos pasa por la elaboración de programas de control y erradicación de la brucelosis por parte de las entidades gubernamentales. El objetivo principal de estos planos es la erradicación de la brucelosis para garantizar amplias zonas libres de esta enfermedad así como mejorar de la productividad de las explotaciones. Generalmente, estos programas cuentan con ayudas gubernamentales tanto para su ejecución como para la compensación a los ganaderos afectados por los animales infectados. Además, el hecho de la brucelosis ser una zoonosis, la aplicación de estos programas permite controlar y/o reducir los casos de brucelosis en humanos. Cabe destacar que esta prohibida toda intervención terapéutica para tratar la brucelosis ovina y/o caprina

### **9. 1 Profilaxia sanitaria**

Se puede considerar como profilaxia sanitaria al conjunto de medidas que tienen como objetivo la erradicación de la brucelosis. Estas medidas incluyen el registro de la explotación ganadera, identificación animal, control de la movimentación animal, métodos de diagnóstico, sistema de almacenamiento de los datos, servicios laboratoriales, clasificaciones sanitarias de los rebaños, política de vacunación o eliminación de los animales positivos entre otras (Minas, 2006).

La profilaxia sanitaria se basa en la aplicación de planos de erradicación los cuales consisten en el diagnóstico serológico a partir de una una muestra de sangre de toda la cabaña de pequeños ruminantes. Los métodos de diagnóstico oficiales utilizados son los test de Rosa de Bengala y de Fijación de Complemento. En el caso de aparición de animales positivos, estos son sacrificados de forma obligatoria siendo el ganadero indemnizado. Posteriormente, en el matadero, se procede a la observación del animal para verificar la existencia de lesiones características así como a la toma de muestras para identificación del agente.

Relativamente a las explotaciones ganaderas con animales positivos, son efectuadas un conjunto de medidas tanto para determinar el origen de la infección como para evitar su

diseminación a otras explotaciones. Estas medidas son: abate de los animales positivos lo más rápidamente posible, información al ganadero de la presencia de la enfermedad en la explotación, restricción de la movimentación del ganado, realización de una encuesta epidemiológica para averiguar las causas de la infección y realización de varias pruebas serológicas en un intervalo legalmente definido hasta la obtención de dos o más resultados negativos consecutivos. Además de estas medidas, en el caso de rebaños positivos, debe ser determinada la hipótesis de realizar un vacío sanitario de la explotación.

Como medidas preventivas y/o complementarias, los ganaderos deben aislar las hembras durante la época de partos, efectuar una correcta higienización de las instalaciones ganaderas así como mantener una elevada higiene personal para disminuir la probabilidad de diseminación de la enfermedad y/o disminuir el riesgo de infección zoonótica (Alton, 1985a; 1990; Garín-Bastuji, 1993a). En resumen, el agricultor debe estar informado de las ventajas y/o obligatoriedad de las campañas de saneamiento bien como de los beneficios económicos y eliminación del riesgo de infección para el ganadero (Reviriego *et al.*, 2000). Una de las principales barreras de los planes de erradicación es la asociada al hecho de que muchos de los ganaderos poseen un nivel cultural bajo y poca sensibilidad para las pérdidas económicas causados por la enfermedad (Lithg-Pereira, 2001). Así, la formación de los ganaderos para la correcta aplicación de buenas prácticas y medidas de bioseguridad sería ideal (WHO, 1986).

## **9. 2 Profilaxia médica**

A pesar de la aplicación de los planes de erradicación son una herramienta fundamental en la disminución de la brucelosis en los pequeños rumiantes, su aplicación y eficacia disminuye en condiciones de elevada prevalencia de la brucelosis. De esta forma, es necesario implementar un programa vacunal, junto al diagnóstico serológico, que permita disminuir la prevalencia de la brucelosis.

A pesar de existir varios tipos de vacunas (Banai, 2002), la vacunación con Rev-1 es considerada como uno de los métodos más eficaces para controlar la brucelosis de los pequeños rumiantes (Nicoletti 1990, Zinsstag *et al.*, 2007). Actualmente, la vacuna *B. melitensis* Rev-1 es la mejor vacuna disponible contra la brucelosis aunque presenta varios efectos adversos como son: interferencia con el diagnóstico serológico a través del test de rosa bengala y del test de la fijación de complemento, secreción en la leche cuando es aplicada en animales adultos y por último, es infectante para las personas (Blasco 1997, Garín-Bastuji *et al.*, 1998). Según Blasco (2001), la vacunación de la totalidad de la cabaña de pequeños rumiantes es la medida más acertada para combatir la brucelosis en áreas y/o países con elevadas tasas de prevalencia. Sin embargo, la reducción en la prevalencia asociada a la vacunación con Rev-1 depende de las diferentes características del rebaño (Coelho *et al.*, 2013).

## 10. Referencias

1. Adams, L.G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and *Brucella* genome. *Vet Microbiol* 2002, 90, 553-561.
2. Alavi-Shoushtari, S.M., Zeinali, A. Responses of female lambs to Rev-1 vaccination. *Prev Vet Med* 1995, 21, 289-297.
3. Aldomy, F.M., Jahans, K.L., Altarazi, Y.H. Isolation of *Brucella melitensis* from aborting ruminants in Jordan. *J Comp Path* 1992, 10, 239-242.
4. Aleixo, M.J., Ferreira, M.L., Antunes, F. Brucelose. *Acta Médica Portuguesa*, 1999, 12, 323-330.
5. Al-Talafhah, A., Lafi, S.Q., Al-Tarazi, Y. Epidemiology of ovine brucellosis in Awassi sheep in Northern Jordan. *Prev Vet Med* 2003, 60, 297-306.
6. Alton, G.G., Forsyth, J.R.L. *Brucella*. Acceso: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch028.htm>. (27-09-2002)
7. Alton, G.G. Control of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats – A review. *Trop Anim Health Prod* 1987, 19, 65-74.
8. Alton, G.G. *Brucella melitensis*. In: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Eds.). *Animal Brucellosis*. CRC Press, Boca Raton, 1990, pp. 383-410
9. Alton, G.G. The epidemiology of *Brucella melitensis* in sheep and goats. In: Verger, J.M., Plommet, M. (Eds.). *Brucella melitensis*. Martinus Nijhoff, Publishers Group for CEC, 1995, 187-196.
10. Amador, R., Valentim, R. Brucelose. *Direcção de Serviços de Saúde Animal – Direcção Geral de Veterinária*. Lisboa, 2000, Portugal.
11. Amoroso, M.G., Salzano, C., Cioffi, B., Napoletano, M., Garofalo, F., Guarino, A., Fusco, G. Validation of a Real-time PCR assay for fast and sensitive quantification of *Brucella* spp. in water buffalo milk. *Food Control* 2011, 22, 1466-1470
12. Aragón, V., Diaz, R., Moreno, E., Moriyón, I. Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 1996, 178, 1070-1079.
13. Baldwin, C.L., Winter, A. Macrophages and *Brucella*. *Immunol Ser* 1994, 60, 363-380.
14. Banai, M., Adams, L.G., Dangott, L.J., Frey, M., Ficht, T.A. *Brucella* attenuation and relevance to vaccine properties. *Small Rumin Res* 2002, 45, 129-137.
15. Barberán, M., Blasco, J.M. Epidemiología, patogenia y cuadro clínico y lesional. *Ovis* 2002, 82, 39-53.
16. Bathke, W. Brucellosis. In: Beer, J. (Ed.) *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos*. Editorial Acribia, Zaragoza, 1981, pp. 142-165
17. Baykam, N., Esener, H., Ergönül, O., Eren, S., Çelikbas, AK., Dokuzoguz, B. In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 23, 405-407.
18. Beer, J. *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos*. Editorial Acribia, Zaragoza, 1981,
19. Benkirane, A. Ovine and caprine brucellosis: world distribution and control/eradication strategies in West Asia/North Africa region. *Small Rumin Res* 2006, 62, 19-25.

20. Bercovich, Z., Güler, L., Baysal, T., Schreuder, B.E.C., van Zijderveld, F.G. 1998. Evaluation of the currently used diagnostic procedures for the detection of *Brucella melitensis* in sheep, 1998, 31, 1-6
21. Bercovich, Z., Muskens, A.M. The efficacy of the skin Delayed-Type Hypersensitivity using a Brucellin prepared from a mucoid strain of *Brucella abortus* to detect brucellosis. Vet J, 1999, 157, 61-67.
22. Bercovich, Z. The use of skin Delayed-Type Hypersensitivity as an adjuvant test to diagnose brucellosis in cattle: a review. Vet Quart, 2000, 22, 123-130.
23. Blaha, T. Applied Veterinary Epidemiology. Elsevier, Amsterdam, 1989, pp. 157-161
24. Blasco, J.M. Diagnóstico de la brucellosis ovina y caprina. Jornadas Internacionales sobre Brucellosis, 1994, Madrid: Faculdade de Veterinária.
25. Blasco, J.M., Barberán, M. Brucelosis. Epidemiología, patogenia y cuadro clínico. Ovis 1990, 8, 25-32.
26. Blasco, J.M., Jiménez de Bagüés, M.P. Brucelosis. Diagnóstico serológico. Ovis, 1990, 8, 15-22.
27. Blasco, J.M., Marín M. Brucelosis. Epidemiología y cuadro clínico. Ovis, 1990, 8, 51-64.
28. Blasco, J.M. A Review of the use of *B. melitensis* Rev. 1 vaccine in adult sheep and goats. Prev Vet Med 1997, 31, 275-283.
29. Blasco, J.M. Brucellosis animal: la enfermedad y medidas para su control y erradicación. In: Manual de Brucellosis, Junta de Castilla León, 2001a, pp. 31-43
30. Blasco, J.M. Control and eradication programmes of brucellosis in small ruminants and cattle. Implementation of Control and Eradication Programs in Animals, 2001b, Zaragoza, Curso de Epidemiologia.
31. Blasco, J.M. Diagnóstico inmunológico. Ovis 2002a, 82, 73-85.
32. Blasco, J.M. Estrategias de control. Vacunas actuales y de nueva generación. Ovis, 2002b, 82, 87-101.
33. Blasco, J.M. Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. Small Rumin Res 2006, 62, 33-37.
34. Blasco, J.M., Díaz, R., Moriyón, I., Salvo, M.D. Evaluation of a Radial Immunodiffusion test for diagnosing brucellosis in sheep and its possible value for differentiating infected from *Brucella melitensis* Rev-1 vaccinated sheep. Develop Biol Standard 1994, 56, 507-511.
35. Blasco, J.M., Garin-Bastuji, B., Marín, C.M., Gerbier, G., Fanlo, J., Jiménez De Bagüés, M.P., Cau, C. Efficacy of different Rose-Bengal and Complement Fixation antigens for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and goats. Vet Rec 1994a, 134, 415-420.
36. Blasco, J.M., Marín, C.M., Jiménez de Bagüés, M.P., Barberán, M., Hernández, A., Molina, L., Velasco, J., Díaz, R., Moriyón, I. Evaluation of allergic and serological test for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep. J Clin Microbiol 1994b, 32, 1835-1840.
37. Blood, D.C., Henderson, J.A. Médecine Vétérinaire (2<sup>a</sup> ed.). Nancy: Vigot Frères Éditeurs, 1976
38. Bosseray, N. (1992a). Control methods and thresholds of acceptability for antibrucella vaccines. Dev Biol Stand 1992a, 79, 121-128.
39. Bosseray, N. Le vaccine Rev. 1: derive des caracteres de immunogenicite et de virulence independante des arqueurs classiques. In: Plommet, M. (Ed.) Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries. Wageningen: Pudoc Scientific Publishers. The Netherlands, 1992b, pp. 182-186

40. Bricker, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol* 2002, 90, 435-446.
41. Buxton, A., Fraser, G. *Animal Microbiology*. London: Blackwell Scientific Publications, 1997, pp. 133-140.
42. Caron, E., Liautard, J.P., Kohler, S. Differentiated U937 cells exhibit increased bactericidal activity upon LPS activation and discriminate between virulent and avirulent *Listeria* and *Brucella* species. *J Luk Biol* 1994, 56, 174-181.
43. Cassataro, J., Pasquevich, K., Bruno, L., Wallach, J.C., Fossati, C.A., Baldi, P.C. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucellae*. *Clin and Diagn Lab Immunol* 2004, 11, 111-114.
44. Celli, J., Gorvel, J.-P. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmatic reticulum. *Curr Opin Microbiol* 2004, 7, 93-97.
45. Clavareau, C., Tryland, M., Wellemans, V., Michel, P., Boelaert, F., Walravens, K., Letesson, J.-J., Godfroid, J. Isolation of *Brucella* spp. in a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). 2002. Acceso: <http://www.nadc.ars.usda.gov/virtconf/submabs/abstracts/H00003.html>. 27-09-2002.
46. Cloeckaert, A., Jacques, I., Grilló, M.J., Marín, C.M., Grayon, M., Blasco, J.M. Verger, J.-M. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev. 1 single and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine* 2004, 22, 2827-2835.
47. Cloeckaert, A., Jacques, I., Limet, J.N., Dubray, G. Immunogenic properties of *Brucella melitensis* cell-wall fractions in BALB/c mice. *J Med Microbiol* 1995, 42, 200-208.
48. Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Paquet, J.Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G., Godfroid, J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect* 2001b, 3, 729-738.
49. Coelho, A.M., García-Díez, J., Coelho, A.C. Brucellosis en pequeños rumiantes: efecto de la aplicación de un programa especial de vacunación en masa con REV-1. *Redvet* 2013, 12, 1-16
50. Collins, C.H., Grange, J.M. Isolation and identification of micro-organisms of medical and veterinary importance. The Society for Applied Bacteriology Technical Series nº 21. Academic Press, London, 1985,
51. Corbel, M.J., Brinley-Morgan, W.J. Genus *Brucella*. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Williams e Wilkins, London, 1994, pp. 377-388.
52. Corbel, M.J., Hendry, F.D. Brucellas. In: Collins, C.H., Grange, J.M. (Eds.) *Isolation and Identification of Microorganisms of Medical and Veterinary Importance*. Academic Press, Florida, 1985, pp. 53-82
53. Corbel, M.J. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 1997, 3, 213-221.
54. Crespo-León, F. (1994). *Brucellosis ovina y caprina*. Paris, 1994, France: O.I.E., pp. 451
55. Cutler, S.J., Whatmore, A.M., Commander, N.J. Brucellosis – new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol* 2005, 98, 1270-1281.
56. Davies, G, Casey, A. The survival of *Brucella abortus* in milk and milk products. *Brit Vet J* 1993, 129, 345-353.
57. Deonel, P.A., Crawford, R.M., Zygmunt, M.S., Tibor, A., Weynants, V.E., Godfroid, F., Hoover, D.L., Letesson, J.-J. Survival of a bacterioferritin deletion

- mutant of *Brucella melitensis* 16M in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 1997, 65, 4337-4340.
58. Dokuzoguz, B., Ergonul, O., Baykama, N., Esenera, H., Kılıcb, S., Celikbasa, A., Rena, S., Esen. B. Characteristics of *B. melitensis* versus *B. abortus* bacteraemias. *Journal of infection* 2005, 50, 41-45
  59. Durán-Ferrer, M. Comparación entre métodos inmunológicos de diagnóstico de la brucelosis ovina por *Brucella melitensis* y eficacia de la inmunización de ovejas adultas con la vacuna Rev. 1 por vía conjuntival. PhD Thesis, 1998, University of Murcia, Spain.
  60. El-Daher, N., Náwas, T. e al-Qderi, S. The effect of the pH of various dairy products on the survive growth of *Brucella melitensis*. *Ann Trop Med Parasitol* 1990, 84, 523-528.
  61. Edmondson, M.A., Roberts, J.F., Baird, A.N., Bychawski, S., Pugh, D.G. Theriogenology of Sheep and Goats In: Pugh, DG., Baird, AN. (Eds.) *Sheep and goat medicine*, Elsevier, Missouri, 2012, pp. 158-238
  62. Estein, S.M., Cassataro, J., Vizcaíno, N., Zygmunt, M., Cloeckert, A., Bowden, R.A. The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in BALB/c mice. *Microbes Infect* 2003, 5, 85-93.
  63. European Union - Working Document On Eradication of Bovine, Sheep and Goats Brucellosis in the EU accepted by the "Bovine" and "Sheep and Goats" Brucellosis subgroups of the Task Force on monitoring animal disease eradication. SANCO/6095/2009. Bruxelles. 2009
  64. Fensterbank, R. Brucellose des bovins, ovins et caprins, diagnostic, prophylaxie, vaccination. *Série Technique*, N. 6. OIE, Paris, 1987a, pp. 9-36
  65. Fensterbank, R. Some aspects of experimental bovine brucellosis. *Ann Rech Vét* 1987, 18, 421-428.
  66. Fernandez-Prada, C.M., Nikolich, M., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Boyle, S.M., Schurig, G.G., Hadfield, T.L., Hoover, D.L. Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 2001, 69, 4407-4416.
  67. Fernandez-Prada, C.M., Zelazowska, E.B., Nikolich, M., Hadfield, T.L., Roop II, R.M., Robertson, G.L. Hoover, D.L. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun* 2003, 71, 2110-2119.
  68. Ferreira, A., Ferreira, C. Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1990, pp. 125-142
  69. Ferron, A. *Bactériologie Médicale à l'usage des étudiants en médecine*. La Madeleine: Editions, 1989
  70. Fox, K.F., Fox, A., Nagpal, M., Steinberg, P., Heroux, K. Identification of *Brucella* by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation of *Brucella canis* from other *Brucella* spp. pathogenic for humans by carbohydrate profiles. *J Clin Microbiol* 1998, 36, 3217-3222.
  71. Gándara, B., Merino, A.L., Rogel, A., Martínez-Romero, E. Limited genetic diversity of *Brucella* spp.. *J Clin Microbiol* 2001, 39, 235-240.
  72. Garín-Bastuji, B. Brucelloses bovine, ovine et caprine: contrôle et prevention. *Point Vet* 1993a, 25, 15-22.

73. Garín-Bastuji, B. (1993b). Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés. Les cas des sérologies atypiques en brucellose bovine. *Point Vet* 1993b, 25, 23-32.
74. Garín-Bastuji, B., Blasco, J.M., Marín, C., Albert, D. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. *Small Rumin Res* 2006, 62, 63-70.
75. Garrit, C. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag, Berlin, 2001
76. Godfroid, J. Brucellosis in wildlife. *Rev Sci Tech* 2002, 21, 277-286.
77. Golding, B., Scott Dorothy, E., Scharf, O., Huang, L-Y., Zaitseva, M., Lapham, CH., Eller, N., Golding, H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and Infection* 2001, 3, 43-48.
78. Gomes, J.F. Brucelose: Colheita de Material, Diagnóstico Laboratorial e Profilaxia. 1983. Laboratório Nacional de Investigação Veterinária – Direção Geral de Veterinária. Lisboa LNIV.
79. Grilló, M.J., Barberán, M., Blasco, J.M. Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lambs. *Vet Rec* 1997, 140, 602-605.
80. Grilló, M.J., Marín, C.M., Barberán, M., Blasco, J.M. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Vet Rec* 1999, 15, 555-558.
81. Gupta, V.K., Shivasharanappa, N., Kumar, V., Kumar, A. 2012. Diagnostic evaluation of serological assays and different gene based PCR for detection of *Brucella melitensis* in goat. *Small Rum Res* 2014, 117, 94-102
82. Henriques, H.S. Epidemiologia da brucelose em pequenos ruminantes. Sociedade Portuguesa de Ovinotecnia e Caprinotecnia, 1990, 21-28.
83. Holt, J.G, Krieg, N., Sneath, P.H.A., Williams, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams e Wilkins, London, 1994, pp. 137-138
84. Hoover, D.L., Friedlander, A.M. Brucellosis. *Virtual Naval Hospital*, 2002. Iowa: The University of Iowa.
85. Jacques, I., Olivier-Bernardin, V., Dubray, G. Efficacy of ELISA compared to conventional tests (RBPT and CFT) for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Vet Microbiol*, 1998, 64, 61-73
86. Jiménez de Bagüés, M.P., Marín, C.M., Barberán, M., Blasco, J.M. (1989). Responses of ewes to *B. melitensis* Rev. 1 vaccine administered by subcutaneous or conjuntival routes at different stages of pregnancy. *Ann Rech Vét* 1989, 20, 205-213.
87. Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A. *Microbiologie Médical*. Les Presses de l'Université Laval, Paris, 1973, pp. 263-266
88. Kabagambe, E.K., Elzer, P.H., Geaghan, J.P., Opuda-Asibo, J., Scholl, D.T., Miller, J.E. Risk factors for *Brucella* seropositivity in goat herds in Eastern and Western Uganda. *Prev Vet Med* 2001, 52, 91-108.
89. Kariminia, A., Kavoossy, G., Khatami, S., Zowghi, E., Ardestani, S.K. Study of interleukin-10 and interleukin-12 productions in response to lipopolysaccharides extracted from two different *Brucella* strains. *Com Immunol Microbiol Infect Dis* 2002, 25, 85-93.
90. Kirovski, M., Ruzica, A., Lako, B. Comparison of sensitivity and specificity of Rose Bengal tests prepared from different *Brucella* strains in the diagnosis of ovine and caprine brucellosis. (pp. 51). International Research Conference for Brucellosis in Small Ruminants, 2005, Skopje. Macedonia.
91. Kittelberger, R., Bundesen, P.G., Cloeckert, A, Greiser-Wilke, I., Letesson, J-J. Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica*

- O:9 - IV Evaluation of the M- and C-epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. *Vet Microbiol* 1995, 60, 45-57.
92. León, F. Brucellosis ovina y caprina. 1993. España. Office International des Epizoties.
93. Lepe, J.A., Guerrero, F.J., Garrido, A. e Perea, R. Detección de *Brucella melitensis* por el sistema BACTEC 9050. *Enf Inf Microbiol Clin* 2001, 19, 267-269.
94. Liautard, J-P., Gross, A., Dornand, J., Köhler, S. Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia Sem* 1996, 12, 197-206.
95. Lithg-Pereira, P.L. .Epidemiología de Brucelosis Ovina y Caprina en la Provincia de León. 2001. PhD Thesis León. Spain.
96. López-Santiago, R., López-Mérino, A., Olvera-Martínez, E., Uribe-Tapia, A.R., Estrada-Aguilera, A., Moreno-Lafont, M.C. Immunoglobulin isotypes in human brucellosis. *Immunity to parasites*, 1997, pp. 428.
97. López-Urrutia, L., Alonso, A., Nieto, M.L., Bayón, Y., Orduña, A. e Crespo, M.S. Lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages. *Infect Immun* 2000, 68, 1740-1745.
98. Louzã, A.C. Brucelose - Modelo de zoonose de impacto sócio-económico – Parte I. *Veterinária Técnica* 1993, 43, 21-28.
99. Marín, C. Diagnóstico directo de la brucellosis. Jornadas Internacionales sobre Brucellosis, 1994. Madrid. España.

100. Marín, C.M., Alabart, J.L., Blasco, J.M. Effects of antibiotics container in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. J Clin Microbiol 199a, 34, 426-428.
101. Marín, C.M., López-Goñi, I., Blasco, J.M. Etiología, diagnóstico bacteriológico y molecular. Ovis 2002, 82, 19-38.
102. Mauricie R., Cost, P. A brucelose animal. Revisão bibliográfica. Veterinária Técnica 1998, 8, 46-52.
103. McCullough, N.B., e Beal, G.A. Growth and manometric studies on carbohydrate utilization of *Brucella*. J Infect Dis 1951, 89, 266-271.
104. McNaught, D.J., Chappel, R.J., Allan, G.S., Bourke, J.A., Rogerson, B.A. The effects of IgG2 and of antigen concentration on prozoning in the Complement Fixation Test for bovine brucellosis. Res Vet Sci 1977, 22, 194-197.
105. Memish, Z. Brucellosis control in Saudi Arabia: prospects and challenges. J Chemoterapy 2001, 13, 11-17.
106. Memish, Z.A., Balkhy, H.H., Hanan, H. Brucellosis and international travel. J Travel Med, 2004, 11, 1195-1202.
107. Méresse, S., Steele-Mortmer, O., Moreno, E., Desjardins, M., Finlay, B., Gorvel, J.P. Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. Nat Cell Biol 1999, 1, 183-188.
108. Michaux-Charachon, S., Jumas-Bilak, E., Alladet-Servent, A., Bourg, G., Boschiroli, M.L., Ramuz, M., O'Callagan, D. The *Brucella* genome at the post-genomic era. Vet Microbiol 2002, 90, 581-585.
109. Minas, A. Control and eradication of brucellosis in small ruminants. Small Rumin Res 2006, 62, 101-107.
110. Mirnejad, R., Mohamadi, M., Piranfar, V., Mortazavi, SM., Kachuei, R. A duplex PCR for rapid and simultaneous detection of *Brucella* spp. in human blood samples. Asian Pac J Trop Dis 2013, 6, 453-456
111. Moreno, E., Moriyón, I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. P Natl Acad Sci USA 2002, 99, 1-3.
112. Moreno, E., Speth, S.L., Jones, L.M., Berman, D.T. Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. Infect Immun 1981, 31, 214-222.
113. Moreno, L.S. Las Zoonosis – Aspectos Sanitarios, Económicos y Sociales, Etiologia, Epidemiologia, Diagnostico y Profilaxis. Editorial AEDOS, Barcelona, 1976, pp. 149-165
114. Moriyón, I., López-Goñi, I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Int Microbiol 1998, 1, 19-26.
115. Mujer, C.V., Wagner, M.A., Eschenbrenner, M., Horn, T., Kraycer, J.A., Redkar, R., Hagiús, S., Elzer, P., DelVecchio, V.G. Global analysis of *Brucella melitensis* proteomes. Ann N Y Acad Sci 2002, 969, 97-101.
116. Muma, J.B., Samui, K.L., Siamudaala, V.M., Oloya, J., Matope, G., Omer, M.K., Munyeme, M., Mubita, C., Skjerve, E. Prevalence of antibodies to *Brucella* spp. and individual risk factors of infection in traditional cattle, goats and sheep reared in livestock-wildlife interface areas of Zambia. Trop Anim Health Pro 2006, 38, 195-206.
117. Nicoletti, P. Relationship between animal and human disease. In: Young, E.J., Corbel, M.J. (Eds.) Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects. CRC Press, Boca Raton, 1989.

118. Nicoletti, P., Winter, A.J. (1990). The immune response to *B. abortus*. The cell mediated response to infections. In: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Eds.). Animal Brucellosis. CRC Press, Boca Raton, 1990, pp. 83-95
119. Nicoletti, P. Epidemiología, patogenia y cuadro clínico. *Bovis* 1994, 57, 17-25
120. Nielsen, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol* 2002, 90, 447-459.
121. Nielsen, K., Gall, D., Smith, P., Bermudez, R., Moreno, F., Renteria, T., Ruiz, A., Aparicio, L., Vazquez, S., Dajer, A., Luna, E., Samartino, L. e Halbert, G. (2005). Evaluation of serological tests for detection of caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Small Rumin Res* 2005, 56, 253-258.
122. OIE World Organisation for Animal Health. Caprine and Ovine brucellosis. In Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals, 2008, pp. 974-982
123. Oficina Internacional de Epizootias (OIE), 2010. Base de datos del Sistema mundial de información zoonosaria (WAHID) – Versión: 1.4. Disponible en: <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home> (15-03-2012).
124. O'Leary, S., Sheahan, M. e Sweeney, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res Vet Sci* 2006, 81, 170-176.
125. Ocholi, R.A., Kwaga, J.K., Ajogi, I., Bale, J.O. Phenotypic characterization of *Brucella* strains isolated from livestock in Nigeria. *Vet Microbiol* 2004, 103, 47-53.
126. Okoh, A.E.J. Abortion in sheep near Kano, Nigeria. *Trop Anim Hlth Prod*, 1980, 12, 11-14.
127. Orduña-Domingo, A., López-Urrutia, L., Miguel-Gómez, M.A., Gutiérrez-Rodríguez, P., Fernández-Fernández, J.M., Rodríguez-Torres, A. Patogenia de la brucelosis humana. In: Manual de Brucellosis. Junta de Castilla y León, 2001, pp. 99-112
128. Paolicchi, F.A., Terzolo, H.R. e Campero, C.M. (1993). Isolation of *Brucella suis* from the semen of a ram. *Vet Rec* 1993, 132, 67.
129. Pessegueiro, P., Barata, C., Correia, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. *Medicina Interna* 2003, 10, 91-100.
130. Pizarro-Cerdá, J., Méresse, S., Parton, R.G., Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goñi, I., Moreno, E., Gorvel, J-P. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 1998, 66, 5711-5724.
131. Poeta, P. A Técnica de imunodifusão em gel de agar no diagnóstico da brucelose em pequenos ruminantes. Relatório de um Trabalho Prático. Vila Real: UTAD, 2002b
132. Portugal 2012. Brucelose dos pequenos ruminantes. Programa de erradicação para o ano 2012. Direção Geral de Veterinária. Lisboa
133. Pouillot, R., Garín-Bastuji, B., Gerbier, G., Coche, Y., Cau, C., Dufour, B., Moutou, F. The Brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet Res* 1997, 28, 365-374.
134. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D., Hinchcliff, K.W. Medicina Veterinaria — Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 2000.
135. Redkar, R. Rose, S., DelVecchio, V. (2001). Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol Cell Probes* 2001, 15, 43-52.
136. Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal

137. Rekiki, A., Rodolakis, A. Diagnosis of abortion in small ruminants. *Point Vet* 2004 35, 24-31.
138. Renukaradhya, G.J., Isloor, S., Rajasekhar, M., Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. *Vet Microbiol* 2002, 90, 183-195.
139. Reviriego, F.J., Moreno, M.A. e Domínguez, L. (2000). Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. *Prev Vet Med* 2000, 44, 167-173.
140. Rocha-Gracia, R.C., Castañeda-Roldán, E.I., Giono-Erezo, S. e Girón, J.A. (2002). *Brucella* sp. sialic acid residues on human and animal red blood cells. *FEMS Microbiol Lett* 2002, 213, 219-224.
141. Romero, C., López-Goñi, I. Improved method for purification DNA of bacterial from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65, 3735-3737.
142. Sanmartino, L.E. Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol* 2002, 90, 71-80.
143. Serra, J., Viñas, M. Laboratory diagnosis of brucellosis in a rural endemic area in Northeastern Spain. *Int Microbiol* 2004, 7, 53-58.
144. Smith, H., Williams, A.E., Pearce, J.H., Keppie, J., Harris-Smith, P.W., Fitzgeorge, R.B., Witt, K. Foetal erythrol: a cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion. *Nature* 1962, 193, 47-49.
145. Thoen, C.O., Enright, F. e Cheville, N.F. *Brucella*. In: Gyles, C.L., Thoen, C.O. (Eds). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Iowa. State University Press, 1993, pp. 236-247
146. Tizard, I.R. *Veterinary Immunology – An Introduction*. W.B. Saunders Company. USA, 1996, pp. 121-140
147. Weynants, V., Gilson, D., Cloeckert, A., Denoel, P.A., Tibor, A., Thiange, P., Limet, J.N., Letesson, J-J. Characterization of a monoclonal antibody specific for *Brucella* smooth lipopolysaccharide and development of a competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to improve the serological diagnosis of brucellosis. *Clin and Diagn Lab Immun* 1996, 3, 309-314.
148. WHO. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, Technical Report 1981, 740, 86-88. WHO, Geneva.
149. Xu, X-L., Chen, X., Yang, P-H., Liu, J-Y., Hão, X-K. In vitro drug resistance of clinical isolated *Brucella* against antimicrobial agents. *Asian Pac J Trop Dis* 2013, 6, 921-924
150. Wyckoff, J.H., Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 2002, 90, 395-415.
151. Young, E.J., Corbel, M.J. *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. Boca Raton. CRC Press, Florida, 1989
152. Young, E.J. *Brucella* species. In: Mandell, G.L., Bennet, J.E., Dolin, R. (Eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, New York, 1995, pp. 2053-2060
153. Zaitseva, M.B., Golding, H., Betts, M., Yamauchi, A., Bloom, E.T., Butler, L.E., Stevan, L., Golding, B. Human peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells express Th1-like cytokine mRNA and proteins following in vitro stimulation with heat-inactivated *Brucella abortus*. *Infect Immun* 1995, 63, 2720-2728.
154. Zarnke, R.L., Ver Hoef, J.M., DeLong, R.A. (2006). Geographic pattern of serum antibody prevalence for *Brucella* spp. in caribou, grizzly bears and wolves from Alaska, 1975-1998. *J Wild Dis* 2006, 42, 570-577.

155. Zhan, Y., Cheers, C. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 1995, 63, 1387-1390.
156. Zhan, Y., Liu, Z., Cheers, C. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infect Immun* 1996, 64, 2782-2786.