

Brucelosis: una revisión práctica*

► Hugo Abel Castro¹, Sofía Raquel González², María Inés Prat³

-
1. Licenciado en Bioquímica. Profesor Adjunto Ordinario.
 2. Licenciada en Bioquímica. Jefa de Trabajos Prácticos.
 3. Dra. en Bioquímica. Ayudante de Docencia.

* Cátedra de Inmunología. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670. 8000, Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires.

Resumen

La brucelosis es una enfermedad zoonótica causada por bacterias pertenecientes al género *Brucella* que ocasiona problemas de salud importantes entre los individuos que ingieren alimentos contaminados o mantienen un estrecho contacto con el ganado. En el presente trabajo se describen, brevemente, algunas características de las bacterias de este género, la patología que producen, la respuesta inmune que desencadenan y se destaca la metodología empleada en el diagnóstico de la enfermedad, tanto en el hombre como en los animales. Se profundiza además en los aspectos presentes y futuros de las vacunas preventivas. Finalmente, se considera en particular a la brucelosis humana, describiendo su cuadro clínico, los métodos directos e indirectos de diagnóstico y la interpretación de sus resultados con el objeto de contribuir a esclarecer aspectos relevantes que deben tenerse en cuenta para un correcto seguimiento de la infección.

Palabras clave: brucelosis* brucelosis en el hombre* métodos de diagnóstico* interpretación de pruebas diagnósticas

Summary

BRUCELLOSIS: A PRATICAL REVIEW

*Brucellosis is a zoonotic disease caused by organisms belonging to the genus *Brucella* that provoke health troubles in humans ingesting contaminated food or with a close contact with cattle. This work briefly summarizes some characteristics of the genus, the pathogenesis, and the immune response generated, and it emphasizes the methods carried out for its diagnosis in human beings as well as in animals. Present and future vaccine aspects are also explored. Finally, human brucellosis is specially considered, and its clinical features, direct and indirect diagnosis methods and results interpretation described in order to know the main aspects to be considered for an adequate infection following process.*

Key words: brucellosis * brucellosis in man * diagnostic methods * diagnostic tests interpretation

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Introducción

La brucelosis es una patología antropozoonótica de distribución mundial, conocida desde hace muchos años que, sin embargo, continúa siendo un problema sanitario y económico de envergadura.

La diversidad de animales portadores de la bacteria responsable complica en gran medida las acciones de lucha contra esta infección, en especial las preventivas, ya que aún hoy no existe un panorama real de su prevalencia ni de los posibles vectores que colaboran con su diseminación. No obstante, los animales aceptados hasta el momento como portadores tienen, en muchos casos, íntimo contacto con el hombre, lo que agregado a las vías conocidas de infección explica la dimensión del problema que plantea esta zoonosis.

Además, los productos derivados de los citados animales son objeto de una intensa manipulación por parte del hombre, frecuentemente carente de un adecuado cuidado y prevención.

Por otra parte, la brucelosis no presenta un cuadro clínico característico que permita una detección precoz del infectado, lo que favorece la evolución a la cronicidad, complicando las alternativas terapéuticas y la curación definitiva.

Este artículo procura efectuar un resumido repaso de los principales aspectos de la infección con el género *Brucella*, tanto en el hombre como en los animales reconocidos como portadores. Además, presta especial atención a los aspectos inmunológicos, así como a los métodos para investigar sus marcadores, y al manejo e interpretación de sus resultados.

Etiología

El género *Brucella* está constituido por bacilos gram negativos pequeños, inmóviles y aerobios estrictos, de crecimiento lento que no poseen cápsulas ni forman esporas. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos (1). Tienen un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa y oxidasa positivos, no atacan la gelatina ni modifican la leche y en general no fermentan los azúcares (2).

El género *Brucella* incluye seis especies diferentes: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. maris* (3). De ellas, las cuatro primeras pueden infectar al hombre. En la Tabla I se encuen-

Tabla I. Especies que integran el género *Brucella*, hospedadores conocidos y características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades. A y M : configuraciones alternativas del PSO, R: LPS de las cepas rugosas.

Especie	Hospedador	Biovariedad	Producción de H ₂ S	Necesidad de CO ₂	Sensibilidad a los colorantes		Aglutinación con sueros monoespecíficos		
					Tionina	Fucsina	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	Cabras, bovinos, ovino, cánidos, hombre	1	-	-	+	+	-	+	-
		2	-	-	+	+	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	Bovinos, cánidos, hombre	1	+	+	-	+	+	-	-
		2	+	+	-	-	+	-	-
		3	+	+	+	+	+	-	-
		4	+	+	-	+	-	+	-
		5	-	-	+	+	-	+	-
		6	-	-	+	+	+	-	-
		7	+	-	+	+	+	+	-
		8	-	+	+	+	+	+	-
		9	+	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	Cerdos, cánidos, hombre	1	-	-	+	-	+	-	-
		2	-	-	+	-	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	-	-
		4	-	-	+	-	+	+	-
		5	-	-	+	-	-	+	-
<i>B. canis</i>	Cánidos, hombre		-	-	+	-	-	-	+
<i>B. neotomae</i>	Roedores		+	-	-	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	Ovinos		-	+	+	-	-	-	+
<i>B. maris</i>	Focas, leones marinos, delfines, ballenas.								

tran detalladas las especies de *Brucella*, sus hospedadores conocidos y las características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades.

En base al aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella* se clasifican habitualmente como lisas (S) o rugosas (R). Dentro de las primeras se encuentran *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* y dentro de las segundas *B. ovis* y *B. canis*. El aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión del lipopolisacárido LPS en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas, aunque durante su crecimiento en los medios de cultivo pueden experimentar mutaciones que afectan la expresión del LPS (4).

Las cepas de *Brucella* en fase lisa son las más virulentas y su ultraestructura es semejante a la de algunas enterobacterias (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Iandau*, *Pseudomonas maltophilia*, *Escherichia coli*) (5), aunque presenta ciertas diferencias en las características de su membrana externa (ME).

Estructura y composición química

ESTRUCTURA EXTERNA:

La ME de *Brucella* es rica en fosfatidilcolina a diferencia de la perteneciente a las enterobacterias relacionadas con ella, que es rica en fosfatidiletanolamina.

Su componente más abundante y mejor estudiado es el LPS, que se conoce también con el nombre de endotoxina. En él se distinguen tres regiones: el lípido A, inserto en la hoja externa de la membrana, un oligosacárido intermedio, llamado núcleo, y el polisacárido O (PSO), también conocido como cadena O, ausente o presente con pocos residuos en el LPS-R (Fig. 1).

El lípido A es un glicolípido que contiene glucosamina y diaminoglucosa. En sus grupos amino e hidroxilos presenta sustituciones por ácidos grasos de variada longitud de cadena. El núcleo contiene glucosa, manosa y ácido 3, deoxi-D-mano-2 octulosónico (KDO) y no contiene ni heptosas ni fosfatos. La quinovosamina está presente en el núcleo del LPS-S pero no en el del LPS-R. El PSO es la porción más distal del LPS. Es un homopolímero lineal compuesto por n-residuos de N-formil perosamina (4,6 dideoxi-4-formamido- α -D-manopiranosilo). La unión entre estos residuos puede ser de dos tipos: α 1-2 o α 1-3, lo que permite diferenciar dos configuraciones alternativas, la A y la M, de mucha importancia en la determinación de las biovariedades, y que se establecen a partir de la alternancia de las uniones entre residuos en el PSO (Tabla I).

Las *Brucellas* contienen otro polisacárido denominado hapteno nativo (HN), que es químicamente idéntico a la cadena O, pero no está unido al núcleo (6). Se ha descrito un tercer polisacárido conocido como poli B, que se obtiene a partir de la cepa mutante en fase rugosa *B. melitensis* 115, por tratamiento con ácido tricloroacético 0,2 M y que para algunos autores sería químicamente equivalente al HN (7).

Las proteínas de membrana externa (PME u OMPs) se asocian estrechamente con los LPS. Dentro de éstas se encuentran las denominadas proteínas mayores, que se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares: grupo 1 (89-94 kDa), grupo 2 (36-38 kDa) y grupo 3 (25-27 y 31-34 kDa) (8) (9) y se encuentran expuestas en la membrana externa, pero son menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico ocasionado por las cadenas O del LPS de las primeras. Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales se han identificado otras proteínas de membrana menos abundantes que se de-

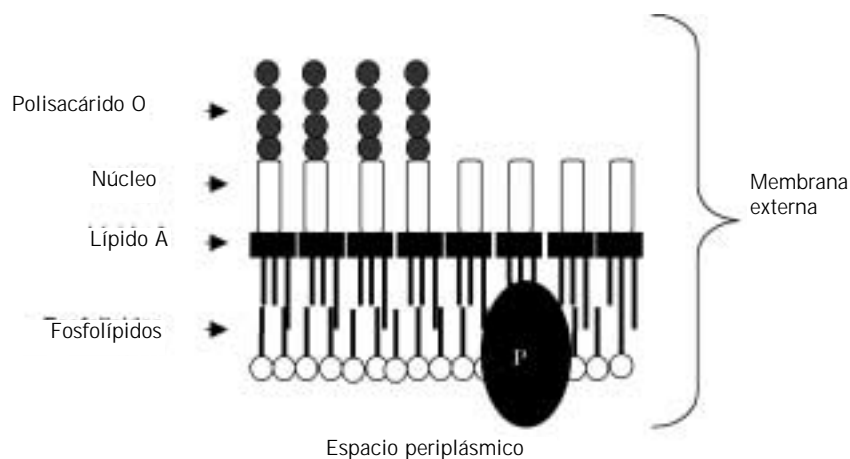


Figura 1: Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de *Brucella*.

El LPS-S de las formas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO). El LPS-R de las formas rugosas carece de cadena O o está reducida a muy pocos residuos.

P: proteínas

nominan proteínas menores, siendo algunas de ellas lipoproteínas (10).

ESTRUCTURA INTERNA:

Las proteínas citoplasmáticas de las bacterias del género *Brucella* son específicas de ese género y la mayoría son compartidas por todas las especies (11). Algunas de estas proteínas son de interés diagnóstico, como por ejemplo la glicoproteína A2 termorresistente (12), una proteína de 17 kDa, involucrada en la síntesis de riboflavina, que aparece en la fase activa de la infección (13) y la proteína periplásmica BP26 (14). Todas estas proteínas forman parte de un antígeno denominado CP, empleado en pruebas de ELISA.

Epidemiología

La incidencia y prevalencia de la brucelosis tienen importantes variaciones geográficas. Las zonas de mayor prevalencia corresponden a la región del Mediterráneo, Asia occidental, algunas partes de África y América (Estados Unidos, México, Brasil, Perú, Colombia y Argentina) (15). *B. melitensis* es la especie más difundida seguida de *B. abortus* y *B. suis*. En Argentina una de las principales especies responsable de la brucelosis en el hombre es *B. suis* (16), aunque la verdadera situación epidemiológica de la brucelosis en cerdos, portadores de esta especie, es desconocida (17).

La fuente de infección la constituyen los animales infectados que excretan gran cantidad de bacterias junto con los tejidos y productos de abortos, en la leche, y en menor medida en las secreciones genitales,

contaminando de esta forma el suelo, los corrales, la paja de las camas, el agua de arroyos, canales y pozos. *Brucella* es capaz de sobrevivir en el medio ambiente, fuera del hospedador, por períodos relativamente largos (Tabla II).

La relación entre especies de *Brucella*, vías de transmisión y patogenia, tanto en el hombre como en los animales, se detalla en la Tabla III.

Patogenia

Las especies de *Brucella* son patógenas intracelulares facultativas, propiedad que las mantiene protegidas de la acción de los antibióticos, y de los mecanismos efectores dependientes de anticuerpos; esto justifica la naturaleza crónica de la infección ya que son capaces de adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células eucariotas tanto fagocíticas como no fagocíticas.

Cuando estas bacterias ingresan al organismo pueden ser fagocitadas por los polimorfonucleares (PMN) y macrófagos como parte de la inmunidad innata. Si no son eliminadas llegan por vía linfática a los ganglios regionales correspondientes pudiendo desde allí invadir el torrente sanguíneo, donde son fagocitadas por los PMN y macrófagos circulantes y transportadas, de esta manera, a los diversos órganos donde pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de las vacuolas de los fagocitos circulantes y tisulares (18). Los mecanismos de ingreso de la bacteria a estas células no están suficientemente aclarados aunque se presume que el LPS y las proteínas de la membrana externa podrían participar en los mismos, mediante receptores tipo manosa o integrinas, respectivamente. Las células de la placenta

Tabla II. Supervivencia de *Brucella* en el medio ambiente.

Material	Tiempo de supervivencia
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15-40 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Fluidos y secreciones en verano	10-30 minutos
Lanas de depósitos	110 días
Agua a 37 °C y pH 7,5	menos de 1 día
Agua a 8 °C y pH 6,5	más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6-8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Manteca a 8 °C	1-2 meses
Cuero manchado con excremento de vaca	21 días
Paja	29 días
Grasa de ordeño	9 días
Heces bovinas naturales	1-100 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días.

Tabla III: Huéspedes, especies de *Brucella*, vía de transmisión y patogenia.

Huésped	Especie de <i>Brucella</i>	Vías de transmisión	Patogenia
Bovinos	<i>B. abortus</i>	Oral, nasal y conjuntival.	Abortos. Orquitis. Epididimitis. Ocasionalmente artritis.
Cerdos	<i>B. suis</i>	Oral y genital.	Aborto. Esterilidad. Orquitis.
Ovinos	<i>B. ovis</i>	Genital.	Abortos (poco frecuentes). Epididimitis.
Perros y otros cánidos	<i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. canis</i> , <i>B. suis</i>	Oral y genital.	Abortos. Esterilidad. Epididimitis. Dermatitis escrotal
Hombre	<i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. canis</i> , <i>B. suis</i>	Inoculación conjuntival. Inhalación. Cutánea. Digestiva.	Fiebre aguda e intermitente. Adenopatías. Hepatoesplenomegalia Complicaciones osteoarticulares,

son ricas en receptores de manosa (19) y en un factor de crecimiento conocido como eritritol, presente en tejidos placentarios animales, lo que explica la avidez de *Brucella* por los mismos (20).

La supervivencia de *Brucella* dentro de las células se ha asociado con la síntesis de enzimas antioxidantes (21) y a la producción de GMP (guanosa 5' monofosfato) y adenina, que inhiben la fusión fagosoma-lisosoma, la desgranulación, la activación del sistema mieloperoxidasa-haluro y la producción del TNF- α (22).

El cuadro clínico y la evolución de la infección varían en función de la especie animal afectada. En los mamíferos rumiantes y en el ganado porcino la manifestación clínica es el aborto. En el hombre presenta una gran tendencia a la cronicidad y se caracteriza por fiebre y localización de las bacterias en distintos tejidos (articulaciones, hueso, endocardio, sistema nervioso).

Respuesta inmune

El ingreso de *Brucella* en el organismo induce la activación de los mecanismos de defensa que se inician con la participación de algunos componentes de la inmunidad innata, como el complemento (C), los neutrófilos y los macrófagos.

La activación del C por las vía clásica y alterna juega un rol muy importante en la resistencia contra bacterias gram negativas. Existen controversias en cuanto a la capacidad que posee el LPS de *Brucella* de activar la vía alterna del C (23) (24), sin embargo, la activación de la vía clásica puede iniciarse con la presencia de bajas concentraciones de IgM e IgG anti-LPS, lográndose de esta forma la lisis bacteriana (25).

Los neutrófilos son las primeras células del huésped que se ponen en contacto con *Brucella*. La opsonización de las bacterias por anticuerpos y complemento facilita su fagocitosis. Como ya se ha mencionado, *Brucella* es

capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de los neutrófilos durante el curso de la infección y de esta forma ser transportada a los tejidos linfoides. Para que se produzca la muerte de las bacterias intracelulares es necesaria la desgranulación de los gránulos de los neutrófilos, con la consiguiente liberación de mieloperoxidasa. Se ha demostrado que *Brucella* posee mecanismos que inhiben esta desgranulación y evitan así su destrucción (21). Los neutrófilos de las distintas especies animales reaccionan en forma diferente ante *Brucella*. Así, los neutrófilos de los cobayos no son capaces de destruir las cepas lisas, mientras que la actividad bactericida de los neutrófilos bovinos frente a estas cepas es mayor que la de los neutrófilos humanos, no registrándose diferencias entre los dos últimos frente a las cepas rugosas.

Otras células que reaccionan ante la presencia de *Brucella* son los macrófagos. El ingreso de la bacteria a los mismos se produce a través de la interacción entre la molécula CD14 y el LPS. Esta interacción induce también la producción de IL-12 que estimula las células NK y los linfocitos T colaboradores o *helper* (LTH) CD4+, que secretan IFN- γ , favoreciendo el desarrollo de una respuesta inmune predominantemente mediada por LTH1 (26). Este subgrupo de linfocitos T estimula fundamentalmente la respuesta de tipo celular y participa en forma directa en la protección contra microorganismos intracelulares, ya que su amplio patrón de citoquinas incluye IL 2, 3, 6, 12, TNF- α y sobre todo IFN- γ (27), esencial para la activación de macrófagos. Una vez fagocitada la bacteria, los macrófagos poseen la capacidad de destruirla inmediatamente, pero del mismo modo que ha sido descrito para los neutrófilos, *Brucella* es capaz de inhibir estos mecanismos de destrucción. El hierro presente en los macrófagos tiene un papel preponderante en la eliminación de los microorganismos ya que cataliza una reacción metabólica destinada a incrementar la producción de inter-

mediarios reactivos del oxígeno, fundamentales en la eliminación de patógenos intracelulares (28).

Los linfocitos también son impactados por distintos antígenos de *Brucella*. Las proteínas de las bacterias son procesadas dentro de la célula presentadora de antígenos y sus péptidos asociados a moléculas CMH clase I y II son presentados a los LTH CD4+ y LT citotóxicos (LTC) CD8+. Estos últimos son capaces de lisar macrófagos y otras células infectadas con *Brucella*.

El LPS es considerado un antígeno T independiente, capaz de activar a los linfocitos B (LB) sin la participación de los LTH. Los primeros anticuerpos que se generan en el curso de una infección son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA, dependiendo de la especie animal. Pueden aparecer, dentro de la clase IgG, anticuerpos bloqueantes o no aglutinantes, también llamados asimétricos (29) (30), en especial en infecciones crónicas, donde suelen alcanzar títulos elevados. Estos anticuerpos se diferencian de los anticuerpos completos en ciertas propiedades tanto *in vitro* como *in vivo* como, entre otras, la incapacidad de activar complemento por cualquiera de las vías o dar adecuadas reacciones de aglutinación (31) (32). Para clarificar el rol de los anticuerpos que se originan durante la infección se han realizado numerosos ensayos experimentales en ratones, demostrándose que anticuerpos anti LPS inyectados en forma pasiva han logrado protegerlos contra infecciones posteriores (33). Por su parte, estudios efectuados en bovinos han demostrado que una elevada concentración de IgG durante una infección activa resulta perjudicial ya que inhibe la lisis complemento dependiente, promueve la fagocitosis de los microorganismos e incrementa la localización intracelular y la diseminación hacia los distintos tejidos (25).

La participación de las citoquinas en el control de la brucelosis ha sido investigada mediante la inyección de citoquinas recombinantes o la inhibición de su actividad con anticuerpos monoclonales específicos. La IL-1, IL-12, y el TNF- α participan en las etapas tempranas de la infección. El IFN- γ es una de las citoquinas más importantes en la resistencia contra la infección. El TNF- α parece contribuir a la formación de los granulomas que se observan en los tejidos infectados. Se ha detectado tanto en brucelosis humana como en ratones infectados experimentalmente un incremento en la producción de IL-6, aunque su rol no está completamente definido (34).

Diagnóstico

El diagnóstico de certeza se establece aislando al microorganismo a partir de cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos. Los métodos serológicos sólo aportan un diagnóstico presuntivo.

Procedimientos de laboratorio

MÉTODOS DIRECTOS:

Se basan en evidenciar la presencia de la bacteria o de sus componentes en los tejidos de los animales o del hombre. El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de la bacteria, frecuentemente a partir de hemocultivos. La técnica más utilizada para realizarlos es la de Ruiz Castañeda (35), que consiste en la inoculación de sangre en frascos herméticamente cerrados que contienen, simultáneamente, un medio líquido (caldo triptosa) y un medio sólido (agar triptosa). Los cultivos deben mantenerse en incubación un tiempo no menor a 30 días debido a que las bacterias del género *Brucella* son de crecimiento lento. En los últimos años se han desarrollado sistemas de hemocultivo automático o semiautomático entre los que se destaca el Bactec, que permite detectar más del 95% de los cultivos positivos antes del séptimo día de incubación.

A medida que progresa la enfermedad disminuye la probabilidad de positividad de los hemocultivos, por lo que se hace necesario el aislamiento a partir de ganglios linfáticos, hígado o bazo.

Para estudiar la presencia de antígenos de *Brucella* en distintos tejidos pueden emplearse los métodos de ELISA, inmunofluorescencia directa, hemaglutinación reversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En particular, se ha diseñado una técnica de PCR ampliamente utilizada en la búsqueda de *Brucella* en alimentos (36), pero que registra muchos casos de falsos positivos debido a la presencia de la bacteria *Ochrobactrum anthropi*, muy relacionada genéticamente con *Brucella*. Recientemente se ha descrito otra técnica denominada PCR-ELISA que se emplea en el diagnóstico de brucelosis humana (37).

MÉTODOS INDIRECTOS:

Las dificultades propias de la implementación del aislamiento de *Brucella* a partir de los distintos tejidos hacen que los métodos indirectos sean el recurso diagnóstico más utilizado.

Existen numerosas pruebas que están destinadas a detectar no sólo el mayor número de individuos infectados sino al mismo tiempo diferenciar entre infectados y vacunados, así como detectar las reacciones cruzadas.

La mayoría de las pruebas de laboratorio utilizan como antígenos suspensiones de *Brucella* en fase S o R, según la cepa bacteriana. Las cepas recomendadas por los organismos internacionales en la elaboración de los mismos son *B. abortus 1119-3* ó *99S*. Estos antígenos permiten detectar anticuerpos anti *B. abortus*, *suis* y *melitensis*, mientras que para anticuerpos anti *B. canis* y *B. ovis* se necesitan antígenos específicos de especie.

Dentro de las pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico se encuentran:

a) Aglutinación lenta en tubo de Wright (SAT): es la más antigua (1897) y la más utilizada aún para el diagnóstico de brucelosis animal y humana.

Bases metodológicas: se realizan diluciones crecientes del suero a investigar que se enfrentan con cantidades constantes de antígeno observándose la presencia o no de aglutinación luego de un período de incubación. De esa forma se determina el título como la máxima dilución aglutinante.

Antígeno: suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5%.

Anticuerpos: IgM, IgG₁ e IgG₂.

Título significativo: no existe consenso en cuanto al título que indica una infección activa, por lo que debe establecerse regionalmente.

b) Prueba de aglutinación con y sin 2-mercaptuetanol (2-ME): es una variante de la anterior que emplea el tratamiento previo con 2-ME como agente reductor que inactiva los anticuerpos de clase IgM.

Bases metodológicas: se realizan simultáneamente las pruebas de aglutinación en tubo con y sin tratamiento del suero con 2-ME.

La diferencia de título obtenida entre ambas pruebas corresponde a los anticuerpos IgM.

Antígeno: suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5%.

Anticuerpos: IgG e IgM.

Título significativo: mayor de 1:20.

c) Reacción de Huddleson: es una reacción de aglutinación rápida en placa.

Bases metodológicas: se enfrentan cantidades decrecientes del suero a investigar con cantidades constantes de antígeno y se observa la presencia o no de aglutinación. Existe una escala de títulos, establecida por convención, que permite la expresión de resultados.

Antígeno: suspensión de *B. abortus* al 3-10% de gérmenes en fenol, con verde brillante y cristal violeta.

Anticuerpos: IgM, IgG₁, IgG₂ e IgA.

Título significativo: mayor de 1:40. En ocasiones se observa el fenómeno de prozona, donde puede estar ausente la aglutinación en los títulos más altos a causa de un exceso de anticuerpos (38). Este hecho debe tenerse en cuenta para evitar falsos resultados negativos por esa causa.

d) Prueba de Rosa de Bengala: es una prueba rápida en placa utilizada como tamiz.

Bases metodológicas: se pone en contacto una alícuota del suero (30µL) con 30µL de antígeno y se observa la presencia de aglutinaciones.

Antígeno: suspensiones de *B. Abortus* al 8,5%, ajustadas a pH ácido, con el agregado del colorante Rosa de Bengala.

Anticuerpos: IgM e IgG₁.

Se informa como positiva o negativa.

e) Antígeno Tamponado en Placa (BPA): es otra de las pruebas tamices que se realiza en placa.

Bases metodológicas: se ponen en contacto 80 µL de suero con 30 µL de antígeno y se observa la presencia de aglutinación.

Antígeno: suspensión de *B. abortus* al 11% con cristal violeta y verde brillante.

Anticuerpos: IgM e IgG₁.

Se informa como positiva o negativa según el resultado de la aglutinación.

f) Prueba de Coombs: es una prueba de aglutinación en tubo que permite detectar tanto anticuerpos completos como incompletos.

Bases metodológicas: se realizan diluciones seriadas del suero a investigar, que se incuban con una suspensión antigénica de *B. abortus* para que se produzca la aglutinación mediada por los anticuerpos completos. Las suspensiones correspondientes a las diluciones mayores se lavan adecuadamente y se agrega suero antiespecie (Coombs) para detectar de esta forma la aglutinación mediada por los anticuerpos incompletos.

Antígeno: suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5%.

Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes de la clase IgG.

Título significativo: el título obtenido es, como mínimo el de la aglutinación de la primera etapa y frecuentemente mucho más elevado.

Este incremento es tanto mayor cuanto mayor es la concentración de anticuerpos no aglutinantes o incompletos.

g) Fijación de complemento: es una prueba altamente específica y es la prueba de referencia internacional.

Bases metodológicas: en la primera etapa de la reacción se incuban diluciones del suero inactivado con el antígeno y el complemento. En la segunda etapa se agrega el sistema hemolítico y se compara la hemólisis con los estándares correspondientes a 0, 25, 50, 75 y 100% de lisis.

Antígeno: puede utilizarse una dilución 1:200 del antígeno empleado en la reacción de Huddleson, o un antígeno soluble denominado HS que se prepara a partir de una suspensión bacteriana tratada con solución salina caliente.

Anticuerpos: IgG₁.

Título significativo: mayor de 1:20 .

h) Inmunofluorescencia indirecta: es una prueba de interacción primaria.

Bases metodológicas: se incuban diluciones crecientes del suero a investigar sobre una impronta de *Brucella*. Se agrega luego el anticuerpo anti-especie marcado

con una sustancia fluorescente y se observa en un microscopio de fluorescencia, determinándose el título.

Antígeno: suspensión de bacterias fijadas a un portaobjeto.

Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes.

Título significativo: mayor de 1:80 (39).

i) ELISA: es una técnica altamente sensible, específica y versátil (40), emplea muy pequeña cantidad de suero (41) y da muy buenos resultados aun en presencia de hemólisis.

* *ELISA indirecto (ELISA-I):*

Bases metodológicas: el antígeno se fija a placas de poliestireno, luego se incuba con el suero a investigar, posteriormente con un anti-especie conjugado con una enzima, se agrega el sustrato correspondiente y se mide el color desarrollado a la longitud de onda determinada. Pueden usarse conjugados que reconozcan las distintas clases de inmunoglobulinas.

Antígeno: los antígenos pueden ser particulados o solubles, LPS u otras proteínas bacterianas. Se ha obtenido un antígeno libre de LPS (antígeno CP), que es altamente eficaz en detectar la respuesta a IgG durante una infección activa evitando al mismo tiempo las reacciones cruzadas debidas al LPS (42).

Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes.

La interpretación de esta prueba debe ser aún convalidada.

* *ELISA competitivo (ELISA-C):*

Bases metodológicas: se emplea un anticuerpo monoclonal que reconoce el epítopo O del LPS-S, que compete con los anticuerpos del suero por la unión al antígeno fijado en la placa. El revelado se efectúa con un anticuerpo anti-ratón conjugado con una enzima.

Antígeno: LPS-S.

Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes.

Se consideran positivos aquellos sueros con un porcentaje de inhibición mayor del 28% (43).

j) Polarización de fluorescencia (FPA): esta técnica puede realizarse en sangre entera y leche.

Bases metodológicas: los anticuerpos al unirse al antígeno cambian la velocidad de rotación de la molécula. Si se hace incidir un haz de luz fluorescente polarizada, el ángulo de difracción cambia en función del anticuerpo unido. Este cambio es medido por un detector que lo traduce en una señal (44).

Antígeno empleado: PSO de *B. abortus* conjugado con isotiocianato de fluoresceína (45) (46).

La interpretación de esta prueba es similar al ELISA-I.

k) Prueba de inmunodifusión en agar (IDAG): es una técnica de doble difusión en geles.

Bases metodológicas: se efectúa la reacción de doble difusión del suero a investigar frente a un suero control observando las reacciones de identidad.

Antígeno: antígeno soluble HS.

Anticuerpos detectados: IgG e IgM.

Los métodos sugeridos por la OIE (Organización Mundial de la Salud Animal) para el estudio de brucelosis en las distintas especies animales son:

- *en bovinos:* BPA, Rosa de Bengala, fijación de complemento, ELISA-I, ELISA-C, FPA.
- *en caprinos:* Rosa de Bengala, fijación de complemento.
- *en ovinos:* fijación de complemento, ELISA-I, IDAG.
- *en porcinos:* BPA, fijación de complemento, ELISA-C, ELISA-I, FPA.
- *en caninos:* Huddleson, aglutinación con y sin 2-ME, aglutinación lenta en tubo, ELISA-I, IDAG.

Para el diagnóstico de brucelosis humana se emplean habitualmente como pruebas tamices BPA, Rosa de Bengala o Huddleson y como pruebas confirmatorias aglutinación lenta en tubo con y sin 2-ME, Coombs y fijación de complemento.

Interpretación de las pruebas diagnósticas

Cuando se utilizan los métodos serológicos de diagnóstico deben tenerse en consideración la reactividad cruzada, y el tipo de anticuerpo que predomina en cada etapa. En la etapa aguda se generan anticuerpos aglutinantes. La secuencia de producción de los distintos isotipos de inmunoglobulinas depende de la especie del hospedador. La IgM e IgA irán descendiendo progresivamente hasta negativizarse antes de los 6 meses, mientras que la IgG podrá permanecer detectable durante 2 ó 3 años. Estos anticuerpos completos o aglutinantes son capaces de reaccionar con antígenos de la superficie bacteriana y pueden detectarse mediante reacciones de aglutinación en placa, lenta en tubo y fijación de complemento. Los títulos de las reacciones de aglutinación son elevados desde las primeras semanas de la infección. La prueba de aglutinación con 2-ME se correlaciona con la evolución clínica de la infección. En el comienzo de la misma la diferencia entre los títulos de aglutinación con y sin 2-ME puede ser importante debido a la presencia mayoritaria de anticuerpos IgM, que se inactivan con 2-ME.

Los anticuerpos de clase IgG permiten seguir el curso de la infección. No obstante, a medida que ésta se torna crónica comienzan a incrementarse, en forma progresiva, los anticuerpos de la clase IgG incompletos o no aglutinantes, que no son capaces de dar positivas las reacciones de aglutinación directa ni activar adecuadamente el sistema complemento. Cuando la con-

centración de anticuerpos no aglutinantes en el suero investigado alcanza valores relativos importantes, estas reacciones pueden arrojar resultados de bajo título y aún negativos.

Para lograr un diagnóstico inicial correcto se recomienda efectuar pruebas que evidencien la presencia de anticuerpos totales, tanto completos como incompletos. La prueba de Coombs puede ser reemplazada por los métodos de IFI y ELISA que cumplen con este requisito y permiten discriminar además los isotipos de inmunoglobulinas involucrados.

Vacunación

Desde el año 1906 se investiga el desarrollo de vacunas humanas inocuas y eficaces. La aplicación en el hombre de vacunas a gérmenes muertos o vivos atenuados se ha dejado de lado por su baja eficiencia y por las reacciones colaterales que producen (47). Las vacunas elaboradas con complejos de proteínas y polisacáridos extraídos con ácido acético de la pared de *B. abortus* cepa S19 (48) no han demostrado ser eficaces. Otro tanto ocurre con las fracciones antigénicas insolubles en fenol de *B. melitensis* cepa M15 y *B. abortus* cepa S19 (49). Debe, además, investigarse previamente si el individuo tuvo una primoinfección con el germen, ya que en este caso las citadas vacunas producen diversas reacciones adversas (dolor local, fiebre, eritema, mialgias).

En cuanto a las vacunas para animales, las más ampliamente utilizadas se obtienen a partir de cepas vivas atenuadas. En muchos países el control de la brucelosis en pequeños rumiantes se basa en el uso de la vacuna viva Rev 1, obtenida a partir de *B. melitensis* (50). Esta vacuna, cuando se administra en forma subcutánea, induce la producción de una intensa y prolongada respuesta de anticuerpos, en cambio, su administración en la conjuntiva, reduce significativamente la intensidad y duración de estas respuestas postvacunales (51). En Argentina, hasta el año 1998 sólo se aplicaba en bovinos la vacuna elaborada a partir de *B. abortus* cepa

S19. Esta cepa fue aislada en el año 1923 a partir de leche de vaca, como cepa virulenta, y se mantuvo a temperatura ambiente durante un año en el laboratorio para obtener bacterias atenuadas. Es incapaz de crecer en presencia de eritritol, y aunque es de baja virulencia, la vacunación subcutánea en hembras preñadas puede ocasionar abortos. La principal desventaja de esta vacuna es que los anticuerpos generados interfieren en las pruebas diagnósticas más comúnmente utilizadas, que emplean antígenos con LPS-S. La semejanza antigénica, a nivel de esta molécula entre las cepas que se utilizan en vacunación y las cepas salvajes puede explicar la similitud de respuesta inmune que existe entre un animal vacunado y otro infectado. La mayoría de los animales con una infección activa presentan niveles elevados de anticuerpos anti-LPS. Estos anticuerpos también son producidos en los animales inmunizados con vacunas constituidas por bacterias vivas atenuadas en fase lisa, por ello resulta tan difícil discriminar entre ganado infectado y ganado sano vacunado.

Para resolver este inconveniente se han desarrollado diversas estrategias. Una de ellas fue la de inmunizar con bacterias en fase rugosa, que no poseen polisacárido O en su LPS. La primera cepa bacteriana usada con este fin fue *B. abortus* 45/20, obtenida a partir de la cepa *B. abortus* 45 por 20 pasajes sucesivos en cobayos, que dejó de aplicarse ya que tendía a volverse lisa y virulenta. Otra cepa utilizada fue *B. abortus* RB51, seleccionada a partir de la cepa *B. abortus* 2308 en presencia de rifampicina. Es una cepa atenuada que no produce abortos cuando se inmunizan hembras preñadas, parecería ser de baja virulencia para el hombre, se aplica en una sola dosis y genera protección aún aplicada en forma oral (52). Esta vacuna es usada actualmente en los Estados Unidos como vacuna oficial y desde 1998 comenzó a aplicarse también en este país. En la Tabla IV se detallan algunas características diferenciales de las vacunas S19 y RB51.

Por otra parte se han obtenido mutantes que carecen del gen que codifica para la enzima involucrada en la síntesis del polisacárido O del LPS (53), a partir de

Tabla IV. Características diferenciales entre las cepas bacterianas más comúnmente utilizadas en vacunación.

S19	RB51
Cepa lisa.	Cepa rugosa, más atenuada que S19.
Posee la cadena O en su LPS.	No posee la cadena O en su LPS.
Genera anticuerpos que interfieren en las pruebas diagnósticas, impidiendo diferenciar entre un animal vacunado y otro enfermo.	Los anticuerpos que genera no interfieren en las pruebas diagnósticas.
Administrada en vacas en gestación puede provocar abortos en el 1,4% de los casos.	En vacas gestantes provoca abortos en el 0,1% de los casos.

B. melitensis y *B. suis* que fueron muy eficaces en generar protección, particularmente en ovejas, cabras y cerdos.

Se están realizando estudios que tienden a identificar proteínas que pudieran usarse en el diagnóstico para luego anular su expresión en bacterias vivas atenuadas. Las mutantes así obtenidas no inducirían la producción de anticuerpos contra esta proteína, que podría ser empleada como antígeno en las distintas pruebas diagnósticas. De todas las proteínas investigadas hasta este momento la que ha logrado resultados más alentadores es la proteína periplásmica BP26 (Omp28). Se han obtenido mutantes de *B. abortus* S29 que no expresan BP26 y se ha demostrado que generan protección en ratones (54).

Por último se deben mencionar los ensayos de inmunización con plásmidos portadores de genes bacterianos que codifican para las proteínas L7/L12 (55) y lumazina sintética (56) que permiten obtener buenos resultados, aunque aún debe establecerse si este tipo de vacunación genera una protección prolongada (57).

Por lo expuesto, el gran capítulo de la vacunación, tanto en el hombre como en animales, se encuentra en intenso estudio y el futuro dirá si es posible disponer de una vacuna protectora y específica para el género, económica y de masiva disponibilidad y que permita diferenciar entre individuos vacunados e infectados.

Brucelosis en el hombre

En la Tabla V se resumen los mecanismos de transmisión de la enfermedad en el hombre.

PATOGENIA

Una vez introducidas en el organismo las bacterias pasan con rapidez de la linfa a los ganglios linfáticos regionales y a la sangre, donde son transportadas por los polimorfonucleares neutrófilos y monocitos a los sinusoides de hígado, bazo, médula ósea y ganglios lin-

fáticos. Los microorganismos se multiplican y son fagocitados por los macrófagos fijos de estos tejidos. La aparición de la enfermedad depende de la capacidad del huésped para restringir esta multiplicación (58). La supervivencia intracelular de *Brucella* condiciona el curso ondulante de la enfermedad y la tendencia a la recaída y evolución crónica.

Como se ha explicado anteriormente, la principal respuesta inmune protectora contra este tipo de bacterias intracelulares es la inmunidad mediada por células, que ejerce su acción a través de dos mecanismos: la muerte de los microorganismos fagocitados y la lisis de las células infectadas por acción de los LTC.

La activación que ocurre en respuesta a los microorganismos intracelulares es también capaz de causar injuria en los tejidos mediante una reacción de hipersensibilidad tipo IV de Gell y Coombs (59). La resistencia intracelular de *Brucella* conduce a una estimulación antigénica crónica y activación de células T y macrófagos. La respuesta tisular a estos eventos consiste en un infiltrado de células mononucleares con células epitelioides y formación de granulomas necrosantes, especialmente en bazo y huesos. Cuando el microorganismo infectante es *B. suis* o *mellitensis* pueden aparecer, además, abscesos (60).

CUADRO CLÍNICO

Es una enfermedad que se autolimita o se vuelve crónica. Muchos pacientes padecen infecciones asintomáticas.

El período de incubación varía entre 10 y 20 días, aunque la sintomatología puede aparecer varios meses después. La brucelosis humana ha sido clasificada en forma arbitraria en varias categorías: subclínica, subaguda, aguda, recurrente y crónica, según las manifestaciones clínicas. La mayoría de los autores consideran el desarrollo de dos fases en la enfermedad: la aguda y la crónica.

Tabla V. Mecanismos de transmisión de la infección.

Vía de infección	Puerta de entrada	Fuente de infección	Población de riesgo
oral	mucosa digestiva	leche cruda, derivados lácteos	población en general
por contacto	piel erosionada, conjuntiva, mucosa nasal	productos animales contaminados: placenta, heces, secreciones vaginales	trabajadores en contacto con animales infectados o sus productos (veterinarios, matarifes, cuidadores), personal de laboratorio
respiratoria	mucosa nasal	aerosoles en laboratorios con muestras contaminadas, vacunas vivas, aerosoles en establos, lanas	personal de laboratorio, trabajadores de la lana, personal de limpieza de los establos.
parenteral	inoculación accidental, transfusiones	vacunas vivas, material biológico contaminado	personal de laboratorio, veterinarios, población en general.

La etapa aguda se manifiesta con fiebre elevada, escalofríos, sudoración de olor característico, dolores musculares y articulares. Es difícil la identificación de la enfermedad en esta etapa, ya que los signos y síntomas pueden ser comunes a otras enfermedades como la salmonelosis, fiebre tifoidea, tuberculosis y leptospirosis. Debido al empleo de los antibióticos ya no se registra el clásico patrón de fiebre ondulante. La tercera parte de los pacientes presenta tos seca o productiva, el 30% estreñimiento, el 5-10% diarreas. En el 50% de los casos se produce hepatomegalia ligera o moderada y esplenomegalia y en el 25% adenopatías. Más del 5% de los pacientes presentan lesiones cutáneas: erupciones papulonodulares en el tronco y extremidades, de las que puede aislarse el microorganismo. Es característico el desarrollo de localizaciones específicas como la osteoarticular, respiratoria, genitourinaria y neuronal.

El término brucelosis crónica debe reservarse a pacientes cuya enfermedad lleve un período de evolución mayor de seis meses. Las recaídas o recidivas se presentan en el 15% de los casos, luego de 2 a 3 meses de terminado el tratamiento.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El hallazgo de la bacteria por los métodos directos es obviamente el diagnóstico de certeza. No obstante, pueden ser sustituidos por los indirectos que son los de uso masivo por su mayor simpleza y accesibilidad. La fase bacteriémica de la enfermedad induce la producción de niveles importantes de anticuerpos. Los primeros anticuerpos que se generan son de tipo IgM. En seguida en forma progresiva aparecen los de clase IgG e IgA. Estos anticuerpos también están presentes en individuos que cursaron infecciones subclínicas (61). Transcurridos los primeros meses se observa una disminución de la IgM aun en los enfermos no tratados. Muchos autores han demostrado la persistencia de anticuerpos aglutinantes específicos hasta por períodos de cuatro años después de la primoinfección. Esta respuesta prolongada permite el empleo de métodos sencillos de aglutinación en la búsqueda de anticuerpos con fines epidemiológicos.

La mayoría de las pruebas usadas para el diagnóstico detectan anticuerpos que reconocen la cadena O del LPS de la membrana externa. Si bien estas pruebas son de elevado valor diagnóstico no permiten determinar si se trata o no de una infección actual. Para medir anticuerpos aglutinantes se utilizan la prueba del Rosa de Bengala y la aglutinación en tubo que tienen una estrecha correlación.

En la cronicidad se incrementa la producción de anticuerpos no aglutinantes de la clase IgG, que alcanzan en ciertos casos al 80 % de los anticuerpos totales. La prueba de Coombs indirecta es la más importante en la detección de este tipo de anticuerpos. En la eta-

pa de curación de la enfermedad el título de anticuerpos medido por pruebas de aglutinación desciende lentamente y se negativiza entre los 6 y 12 meses posteriores, mientras que la prueba de Coombs puede mantenerse positiva aún por más tiempo.

Para un correcto diagnóstico serológico de brucelosis humana es recomendable efectuar por lo menos una prueba de aglutinación y una prueba de Coombs, o alguna prueba de interacción primaria (IFI o ELISA), que permita la detección de los distintos tipos de anticuerpos presentes (62), y así poder estimar el período de la infección. Para mayores detalles remitirse a la interpretación de pruebas serológicas.

Principales conceptos

La brucelosis es una zoonosis que continúa generando grandes pérdidas económicas tanto en la industria pecuaria como en la salud pública. Actualmente, los principales trabajos de investigación en el tema están destinados a lograr vacunas más efectivas y a optimizar los métodos de diagnóstico.

El diagnóstico de brucelosis humana es difícil. Además de considerar la historia clínica, es recomendable realizar un estudio bacteriológico complementado con el análisis de los anticuerpos séricos.

Al no disponer aún de una adecuada vacuna para humanos es fundamental el incremento de medidas de prevención.

En Argentina la brucelosis humana es una enfermedad que persiste en las regiones donde la infección animal no está controlada; sin embargo se están realizando esfuerzos importantes para proveer asistencia, diagnóstico y vacunación en todas las provincias argentinas (17).

Glosario

BP26: proteína periplásmica.

C: complemento.

CD14: molécula de membrana de los macrófagos.

CMH clase I y II: complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II.

CP: antígeno citoplasmático libre de LPS.

ELISA: ensayo inmunoenzimático.

Eritritol: alcohol de cuatro átomos de carbono, factor de crecimiento para *Brucella*

HN: hapteno nativo, químicamente idéntico al PSO pero libre.

HS: antígeno para fijación de complemento, obtenido por calentamiento de una suspensión de *Brucella*.

IFN- γ : citoquina producida por los linfocitos TH1, células NK y LTC, participa en la formación de granulomas, en la activación de macrófagos e induce la expresión de CMH clase I y II.

IL: interleuquina.

LPS: lipopolisacárido, componente más abundante de la membrana externa de las bacterias del género *Brucella*.

LPS-R: lipopolisacárido de las cepas rugosas.

LPS-S: lipopolisacárido de las cepas lisas.

LTC: linfocito T citotóxico.

LTH: linfocito T colaborador o *helper*.

NK: células *natural killer*, linfocitos con actividad citotóxica o citolítica natural.

OMP (outer membrane protein): proteína de membrana externa estrechamente asociada al LPS.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PMN: polimorfonuclear neutrófilo.

PSO: porción más distal del LPS, también conocida como cadena O.

TNF- α : citoquina producida por macrófagos, LTH1, NK, mastocitos y hepatocitos. Participa en la inflamación y activación del endotelio.

CORRESPONDENCIA

LIC. HUGO ABEL CASTRO

Witcomb 1749

8000 BAHÍA BLANCA - Provincia de Buenos Aires - Argentina

Referencias bibliográficas

1. Michaux-Charachon S, Bourg G, Jumas-Bilak E, Guigue-Talet P, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, *et al.* Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J Bacteriol* 1997; 179 (10): 3244-9.
2. Wilfert CM. *Brucella*. En: Zinsser, Microbiología. Joklik WK, Willet HP, Amos AB. 18 Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1986, p. 764-71.
3. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, *et al.* Classification of *Brucella spp.* isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect* 2001; 3(9): 729-38.
4. Ariza Cardenal J. Brucelosis. En: Ferreras-Rozman, Medicina Interna. 13ra Edición. Barcelona: Mosby-Doyma libros S.A.; 1995, p. 2312-7.
5. Corbel MJ, Stuart FA, Brewer RA. Observations of serological cross reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. *Dev Biol Stand* 1983; 56: 341-8.
6. Moreno E, Speth SL, Jones LM, Berman DT. Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. *Infect Immun* 1981; 31(1): 214-22.
7. Aragón V, Díaz R, Moreno E, Moriyó 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 (4): 1070-9.
8. Cloeckaert A, Vizcaino N, Paquet J, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of *Brucella spp.*: past, present and future. *Vet Microbiol* 2002; 90(1-4): 229-47.
9. Salhi I, Boige grain RA, Machold J, Weise C, Cloeckaert A, Rouot B. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella spp.* *Infect Immun* 2003; 71(8): 4326-32.
10. Cloeckaert A, Tibor A, Zygmunt MS. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6 (4): 627-9.
11. Baldi PC, Wanke MM, Loza ME, Fossati CA. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. *Vet Microbiol* 1994; 41(1-2): 127-34.
12. Stemshorn B, Nielsen K. The bovine immune response to *Brucella abortus* IV. Studies with a double immunodiffusion test for antibody against A2. *Can J Comp Med* 1981; 45(2): 147-53.
13. Goldbaum FA, Velikosky CA, Baldi PC, Mörtl S, Bacher A, Fossati CA. The 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella spp.*, an antigen useful for diagnosis, is a lumazine synthase. *J Med Microbiol* 1999; 48: 833-9.
14. Seco-Mediavilla P, Verger JM, Grayon M, Cloeckaert A, Marin CM, Zygmunt MS, *et al.* Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(4): 647-51.
15. Adams G. Brucellosis: an overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses. *Emerging Infect Dis* 1997; 3: 1-12.
16. Lucero NE. Diagnóstico microbiológico y redes de laboratorio. II Congreso Argentino de Zoonosis y I Congreso Latinoamericano de enfermedades emergentes. Temas de Zoonosis y Enfermedades Emergentes; 1998, abril 13-17; Buenos Aires. Argentina: Asociación Argentina de Zoonosis. Ideográfica, 1998: 68-71.
17. Samartino LE. Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol* 2002; 90: 71-80.
18. Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, *et al.* *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 1998; 66(12): 5711-24.
19. Pontow S, Kery V, Stahl D. Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 1992; 137: 221-41.
20. Aréstegui MB, Gualtieri CS, Domínguez J, Scharovsky G. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. *Vet Mex* 2001; 32(2): 131-9.
21. Teixeira-Gomes A, Cloeckaert A, Zygmunt MS. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 2000; 68(5): 2954-61.
22. Canning PC, Roth JA, Deyoe BL. Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. *J Infect Dis* 1986; 154(3): 464-70.
23. Hoffmann EM, Houle JJ. Failure of *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. *Vet Immunol Immunopathol* 1983; 5: 65-76.
24. Corbeil LB, Blau K, Inzana TI, Neilsen KH, Jacobson RH, Corbeil RR *et al.* Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect Immun* 1988; 56: 3251-61.
25. Hoffmann EM, Houle JJ. Contradictory roles for antibody and complement in the interaction of *Brucella*

- abortus* with its host. Crit Rev Microbiol 1995; 21(3): 153-63.
26. Zhan Y, Cheers C. Endogenous Interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. Infect Immun 1995; 63(4): 387-9.
 27. Ahmed K, Al-Matrouk KA, Martínez G, Oishi K, Rotimi VO, Nagatake T. Increased serum levels of Interferon- γ and Interleukin-12 during human brucellosis. Am J Trop Med Hyg 1999; 61(3): 425-7.
 28. Jiang X, Baldwin C. Iron augments macrophage-mediated killing of *Brucella abortus* alones and in conjunction with interferon γ . Cell Immunol 1993; 148: 397-407.
 29. Parma EA, Santisteban G, Margni RA. Analysis and in vivo assay of cattle anti *B-abortus* agglutinating and non-agglutinating antibodies. Veter Microbiol 1984; 9: 391-8.
 30. Margni RA, Binaghi RA. Nonprecipitating asymmetric antibodies. Anual Review of Immunology 1988; 6: 535-34.
 31. Margni RA, Hajos S. Biological and physicochemical properties of purified anti-DNP guinea-pig non-precipitating antibodies. Immunology 1973; 24(3): 435-43.
 32. Margni RA, Binaghi RA. Purification and properties of non-precipitating rabbit antibodies. Immunology 1972; 22(4): 557-63.
 33. Ko J, Splitter G. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccines development for mice and humans. Clin Microbiol Rev 2003; 16(1): 65-78.
 34. Saunders BM, Liu Z, Zhan Y, Cheers C. Interleukin-6 production during chronic experimental infection. Immunol Cell Biol 1993; 71: 275-80.
 35. Ruiz de Castañeda M. Laboratory diagnosis of brucellosis in man. Bull WHO 1961; 24: 73.
 36. Da Costa M, Guillow JP, Gari Bastuji B, Thiébaud M and Dubray G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genes *Brucella* by DNA amplification. J Appl Bacteriol 1996; 81: 267-75.
 37. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, García Ordoñez MA; Cardenas A, Colmenero JD. Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 144-8.
 38. Bennett CW. Serología Clínica. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana; 1976. p.131-8.
 39. Navarro Rodríguez A, Betton Díaz J, Torronteras SR, Cuello Contreras J, Viciano Fernández P, López Contreras L, et al. Utilidad del test de inmunofluorescencia indirecta y la prueba de la «rosa de Bengala» en el diagnóstico de la brucelosis. Rev Clin Esp 1984; 175(1): 27-32.
 40. Ruelas CD, Rosadio RA. Desarrollo y estandarización de una prueba de ELISA indirecta para brucelosis bovina. Rev Inv Vet Perú 1999; 10(2): 43-55
 41. Spencer TL, Burges GW. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. Res in Vet Science 1984; 36: 194-8.
 42. Golbaum F, Rubbi C, Wallach J, Miguel S, Baldi P, Fossati C. Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring antiprotein humoral immune response. J Clin Microbiol 1992; 30(3): 604-7.
 43. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Silva Paulo P, Nielsen K. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. J Medic Microbiol 2003; 52: 883-7.
 44. Nakamura RM. Análisis por inmunofluorescencia de antígenos y anticuerpos en fase líquida. En: Rose-Friedman. El laboratorio en Inmunología Clínica. 2da edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1984. p.484-90.
 45. Dajer A, Luna-Martinez E, Zapata D, Villegas S, Gutierrez E, Pena G, et al. Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. Prev Vet Med 1999; 14; 40(1): 67-73.
 46. McGiven JA, Tucker JD, Perrett LL, Stack JA, Brew SD, MacMillan AP. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. J Immunol Methods 2003; 278(1-2): 171-8.
 47. Gestal G, Cortina P, Delgado M. Vacunas de aplicación no sistemática de uso poco frecuente. En: Vacunaciones preventivas. Principio y aplicaciones. Barcelona: Masson; 1998: 491-506.
 48. Roux J. Vaccination humaine contre les brucelloses. Bull Acad Natl Med 1986; 170 (2): 289-92.
 49. López Merino A, Asselineau J, Serre A, Roux J, Basocul S, Lacave C. Immunization by an insoluble fraction extracted from *Brucella melitensis*: immunological and chemical characterization of the active substances. Infection and Immunology 1976; 13: 311-21.
 50. Garin-Bastuji B and Benkirane A (eds). FAO/WHO/OIE Round Table on the use of Rev 1 vaccine in small ruminants and cattle; 1995 sept 21-22. Centre National d'études vétérinaires et alimentaires (CNEVA), Maisons-Alfort. CNEVA, Maisons-Alfort, 1996: 61-107.
 51. Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Siranganthan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. Vet Microbiol 1991; 28 (2): 171-88.
 52. Elzer PH, Enright FM, Colby L, Hagins SD, Walker JV, Fatemi MB, et al. Protection against infection and abortion induced by virulent challenge exposure after oral vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. Am J Vet Res 1996; 59(12): 1575-8.
 53. Winter AJ, Schurig GG, Boyle SM, Sriranganathan N, Bevins JS, Enright FM, et al. Protection of Balb/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. Am J Vet Res 1996; 57: 677-83.
 54. Boschiroli ML, Cravero SL, Arese AI, Campos E, Rossetti OI. Protection against infection in mice vaccinated with *Brucella abortus* mutant. Infection and Immunology 1997; 65: 798-800.

55. Kurar E, Splitter GA. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine* 1997; 15: 1851-7.
56. Velikovsky CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein S, Bowden RA, *et al.* A DNA vaccine encoding the lumazine-synthase gene from *Brucella abortus* induces protective immunity in Balbc/mice. *Infect Immun* 2002; 70(5): 2507-11.
57. Ko J, Splitter GA. Molecular host pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Reviews* 2003; 16(1): 65-78.
58. Drutz DJ, Graybill JR. Enfermedades Infecciosas. En: Funderberg HH, Stites DP, Cladwell JL, Wells VJ. Manual de Inmunología Clínica, 2da Edición, México; Editorial El Manual Moderno; 1980, p-695-6.
59. López-Merino A, López Santiago R. Immunology of Brucellosis in humans. En: Madkour MM, ed. Brucellosis. Cambridge: Butterworths; 1989; p.45-58.
60. Ramanna BC, Srisvastava L, Suri JC, Sharma RS, Dutta KK. A seroepidemiological study of brucellosis in rural and urban population of North India. *J Com Dis* 1982; 14(4): 281-5.
61. Buchanan T, Sulzer C, Frix M, Feldman R. Brucellosis in the United States 1960-1972. An abattoir-associated disease. Part II. Diagnostic Aspect *Medicine* 1974; 53(6): 415-25.
62. Margni RA, Gentile MT, Miranda SE. Los anticuerpos ¿beneficiosos o perjudiciales para el huésped? Importancia de su identificación y dosaje. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2002; 36(1): 113-21.

Aceptado para su publicación el 29 de abril de 2005