

BRUCELOSIS EN LIEBRE EUROPEA

Risi, Ricardo¹; Medina, Albina²; Staskevich, Sandra²

- 1 Bromatología e Higiene de los alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam
- 2 Microbiología General e Inmunología Básica. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam

INTRODUCCION

ETIOLOGIA

En el género Brucella se reconocen actualmente seis especies: B. melitensis, B. abortus, B. suis, B. neotomae, B. ovis y B. canis

Las tres primeras especies (denominadas “brucelas clásicas”) se han subdividido a su vez en biovares, que se distinguen por diferentes características bioquímicas y/o comportamiento frente a los sueros monoespecíficos A. (abortus) y M. (melitensis). De esta manera, B. melitensis se subdivide en tres biovares (1-3). B. abortus en siete (1 –7), ya que se suprimieron los biovares 7 y 8, y el biovar 7 actual corresponde al 9 de la anterior clasificación y B. suis en cinco (1 – 5). Por otra parte, desde el punto de vista epidemiológico el sistema toxonómico del género Brucella ha permitido eliminar la confusión originada por las designaciones de nuevas especies o subespecies que no estaban de acuerdo con la realidad epidemiológica. Además, la tipificación en biovares constituye una herramienta útil en la investigación en ese campo. B. abortus tiene una gran plasticidad entre los caracteres que se determinan por los métodos convencionales, tales como requerimiento de CO₂ para el crecimiento, sensibilidad o tolerancia a los colorantes de anilina, producción de H₂S y otros. Menos plasticidad muestran B. melitensis o B. suis. En varias partes del mundo se han encontrado cepas de B. abortus y en menor grado de B. suis ó B. melitensis de difícil ubicación en el presente esquema, por diferir en algunos caracteres.

El genoma del género Brucella, sin embargo, es muy homogéneo como se demostró sobre la base de estudio de hibridación ADN – ADN los investigadores proponen una sólo especie B. melitensis, subdividida en 6 biogrupos, que serían las especies anteriores. Para todos los efectos prácticos y especialmente para fines epidemiológicos, el esquema anterior que divide el género en especies y biovares sigue vigente.

OCURRENCIA

La brucelosis bovina existe en todo el mundo pero, entre otros países, ha sido erradicada en Finlandia, Noruega, Suecia, Dinamarca, Países Bajos, Bélgica, Suiza, Alemania, Austria, Hungría, Checoslovaquia, Rumania y Bulgaria. La mayoría de los países europeos están actualmente libre de brucelosis bovina. Los grandes productores de carne como Francia, Gran Bretaña, Australia, Nueva Zelanda, Canadá, Estados Unidos de América entre otros, están libres de bucelosis bovina o están a punto de serlo.

Tres países ganaderos importantes, Argentina, Brasil y México siguen con programas de control limitados. En el resto del mundo, las tasas de infección son muy variables de un país a otro y en las diferentes regiones de un país. La prevalencia más alta se observa en el ganado lechero. En muchos países, incluida la mayoría de los de América Latina que no tienen programas de control, los datos no son fidedignos. Sin embargo, de acuerdo con la información disponible, se trata de una de las enfermedades más importantes del ganado bovino tanto en América Latina como en otras áreas de desarrollo preindustrial. Las estimaciones oficiales sobre las pérdidas anuales por brucelosis bovina en América Latina son de aproximadamente EUA \$ 600 millones, lo cual explica la prioridad otorgada al control de ésta infección en las actividades de los servicios de salud animal.

La brucelosis porcina es poco frecuente en gran parte de Europa, Asia y Oceanía, y se presenta con ocurrencia esporádica. En China, B. suis biovar 3 fue introducida con reproductores desde Hong Kong en 1954 y se difundió rápidamente por el sur del país. En muchos países europeos la brucelosis porcina tiene una relación epidémica con la brucelosis por B. suis, biovar 2 de la liebre (Lepus europaeus). Con la nueva tecnología de cría de cerdos, éstos tienen poco acceso a liebres y los estallidos han disminuido notablemente.

En América Latina la Brucelosis porcina es enzoótica en la mayoría de los países y, si bien los datos disponibles son de escaso valor estadístico, se considera que ésta es la zona con más alta prevalencia en el mundo. Sin embargo, sobre la bases de las encuestas realizadas últimamente en la Argentina y Río Grande do Sul, Brasil, en explotaciones de reproductores de pura sangre o puros por cruza, se demostró que el porcentaje de hatos infectados era bajo. Posiblemente, el problema radica en las explotaciones comerciales, donde se reúnen animales de distintos orígenes. Hasta ahora, en América Latina solo se pudo comprobar el biovar 1 – de B. suis, que predomina en la mayor parte del mundo. El biovar 2 está limitado a los cerdos y liebres de Europa central y occidental, mientras que el biovar 3 se aísla en el cinturón maicero de Estados Unidos y en algunas áreas de Asia y Africa.

La Brucelosis caprina y la ovina constituyen un problema de magnitud en la cuenca mediterránea de Europa y Africa, en el sudeste de la URSS, en Mongolia, en el Medio Oriente y Arabia Saudita. En América Latina la prevalencia de infección del ganado caprino por B. melitensis es alta en México, Perú y Argentina. La infección en ovinos por B. melitensis en la Argentina hasta ahora solo se ha comprobado en hatos que convivían con caprinos infectados en el norte del país.

La epididimitis del carnero por B. ovis está ampliamente difundida. Fue comprobada en Nueva Zelandia, Austria, Africa y Europa. Está presente en Argentina, Brasil (Río Grande do Sul), Chile, Perú, Uruguay y Estados Unidos, es decir en todos los países del continente donde la explotación ovina tiene importancia. La prevalencia es alta.

La infección de perros por B. canis se ha encontrado en prácticamente todos los países donde se la ha investigado. La prevalencia es variable según la región y el método de diagnóstico empleado. La infección constituye un problema en algunos criaderos de perros, por los abortos e infertilidad que ocasiona, pero también se la encuentra en perros de familia y callejeros; en éstos últimos la tasa de infección generalmente es más alta. Así, por ejemplo, en un estudio realizado en la ciudad de México, el 12 % de 59 perros callejeros resultaron positivos por el aislamiento del agente etiológico.

BRUCELOSIS EN EL HOMBRE:

El hombre es susceptible a la infección por B. melitensis, B. suis, B. abortus y B. canis. No se han comprobado casos humanos por B. ovis, B. neotomae o por el biovar 2 de B. suis. La especie más patógena e invasora para el hombre es B. melitensis, seguida en orden decreciente por B. suis, B. abortus y B. canis.

El período de incubación en general dura de una a tres semanas, pero a veces puede prolongarse por varios meses. Es una enfermedad septicémica, de principio repentino o insidioso, con fiebre continua, intermitente o regular. La sintomatología de la Brucelosis aguda, como la de muchas otras enfermedades febriles, consiste en escalofríos, sudores profusos y elevación de temperatura. Un síntoma casi constante es la astenia y cualquier ejercicio produce una pronunciada fatiga. La temperatura puede variar de normal en la mañana hasta 40°C en la tarde; los sudores se presentan durante la noche y se caracterizan por un olor particular. Los síntomas comunes son insomnio, impotencia sexual, constipación, anorexia, cefalalgia, artralgias y dolores generalizados.

La enfermedad produce un fuerte impacto sobre el sistema nervioso, que se traduce por irritación, nerviosismo y depresión. Muchos pacientes tienen los ganglios periféricos aumentados de volumen o esplenomegalia y con frecuencia hepatomegalia, pero raramente ictericia. Hepatomegalia o hepatosplenomegalia es especialmente frecuente en pacientes infectados por B. melitensis.

En áreas de Brucelosis enzoótica, en especial la bovina, hay muchas infecciones que transcurren de modo asintomático.

El tratamiento recomendado en Brucelosis aguda es de una dosis diaria de 600 a 900 mg. de rifampicina, combinada con 200 mg. diarios de doxiciclina, durante no menos de 6 semanas.

El hombre se infecta de los animales por contacto o indirectamente por ingestión de productos de origen animal, como también por la inhalación de aerosoles infectantes. La importancia relativa del modo de transmisión y de las puertas de entrada del agente etiológico varía con el área epidemiológica, los reservorios animales y los grupos ocupacionales expuestos al riesgo. Los quesillos frescos y la leche cruda de cabra u oveja infectada por B. melitensis son los vehículos más frecuentes de infección y pueden originar múltiples casos de brucelosis humana. A veces estos brotes se extienden por la mezcla de leche de cabra con la de vaca. También se conocen brotes epidémicos originados por leche de vacas infectadas por B. melitensis o B. suis. La leche de vaca y los productos lácteos que contienen B. abortus pueden dar origen a casos esporádicos. En leches acidificadas, cremas y mantequilla ácidas y quesos fermentados (y estacionados por más de tres meses) las brucelas rara vez sobreviven.

La Brucelosis humana es, en gran parte, una enfermedad ocupacional de obreros pecuarios, personal de mataderos, matarifes, carniceros y médicos veterinarios. La infección se contrae generalmente al manipular fetos y envolturas fetales o al entrar en contacto con secreciones vaginales, excrementos y canales de animales infectados. El microorganismo penetra por abrasiones de la piel, pero también puede ser llevado por la mano a la conjuntiva. En los mataderos, la tasa de casos de enfermedad es más alta en el personal obrero con poco tiempo de empleo.

En investigaciones epidemiológicas realizadas durante los últimos años también se han aportado pruebas de que la transmisión por aerosoles es muy importante en frigoríficos y mataderos, y quizás más frecuente por un contacto directo con tejidos infectados. El aire de la playa de matanza, diseminado en secciones contiguas, da lugar a altas tasas de ataque entre los operarios de esas áreas.

BRUCELOSIS EN ANIMALES SILVESTRES

La infección natural por Brucella ocurre en una amplia gama de especies silvestres. Hay focos naturales de infección, como por ejemplo entre las ratas del desierto de los Estados Unidos (Neotoma lepida), que son el reservorio de B. neotomae. En Kenia se ha aislado B. suis biovar 3 de dos especies de roedores (Arvicanthis niloticus y Mastomys natalensis). En Australia ocurren biovares de Brucella aún no clasificados en varias especies de roedores. En el Cáucaso, ex URSS, se encontraron roedores infectados por Brucella, que fue clasificada B. muris y luego reclasificada como B. suis, biovar 5.

En Europa la infección de la liebre (Lepus europaeus), que es el reservorio de B. suis biovar 2, se transmite a los cerdos domésticos.

El caribú (Rangifer caribou), que es el reservorio de B. suis biovar 4 en Alaska, puede transmitir la infección al hombre y a los perros de tiro. También ocurre a la inversa, que los animales domésticos transmitan la infección a animales silvestres. Tal es el caso, en Argentina, de la infección de los zorros (Dusicyon gymnocercus, D. Griseus) y del hurón por B. abortus biovar 1, de la liebre europea (Lepus europaeus) por B. suis biovar 1 y de la zarigueya (Didelphis azarae) por B. abortus biovar 1 y B. suis biovar 1.

En los carnívoros, la infección se adquiere por la ingestión de fetos y envolturas fetales. No se ha comprobado la transmisión de un individuo a otro entre estos carnívoros y es probable que la infección se extinga al controlarse la brucelosis en los animales domésticos. La situación es diferente cuando los animales domésticos transmiten la infección a bóvidos silvestres, tales como el antílope de las estepas (Saiga tatarica) o el bisonte americano (Bison bison), en los cuales la brucelosis se perpetúa.

Los animales cuya piel se usa en peletería, como los visones y los zorros plateados, pueden contraer la infección al ingerir vísceras de animales infectados y, a su vez, transmitir la infección al hombre.

El agente etiológico ha sido aislado de muchas especies de artrópodos. La garrapata puede albergarlo durante mucho tiempo y transmitir la infección por picadura; también elimina la bacteria por la secreción de las glándulas coxales. Sin embargo, el número de garrapatas que albergan brucelas es insignificante (en la ex URSS, en uno de los estudios se obtuvieron 8 aislamientos de Brucella spp de 20.000 garrapatas), y también el número de brucelas por garrapata es bajo. Las especies que se han aislado de artrópodos fueron B. melitensis y B. abortus. En Brasil se pudo aislar B. canis de especímenes de Rhipicephalus sanguineus que parasitaban una perra enferma de brucelosis. Hay consenso general de que los artrópodos desempeñan un papel insignificante, si es que tienen alguno, en la epidemiología de la brucelosis.

DIAGNOSTICO

En el hombre, el diagnóstico de la brucelosis basado sobre sintomatología y antecedentes epidemiológicos debe confirmarse siempre en el laboratorio. El aislamiento y tipificación del agente causal es una prueba definitiva y puede indicar además la fuente de infección. En el período febril del enfermo se recurre a la siembra de sangre, médula esternal o de la cresta ilíaca en medios de cultivos adecuados. También se puede usar material de ganglios, del líquido cefalorraquídeo y de abscesos.

Es recomendable repetir las siembras varias veces, sobre todo en áreas enzoóticas de B. abortus.

En los bovinos el diagnóstico se basa sobre todo en la serología. En la actualidad se dispone de un gran número de diferentes pruebas serológicas. Todas ellas pueden ser útiles cuando se emplean con criterio. Tanto la reacción de una prueba serológica como su utilidad en cada circunstancia se basan en la sensibilidad que tiene para los anticuerpos de las diferentes clases de inmunoglobulinas y por la concentración sérica del anticuerpo de cada clase. Las inmunoglobulinas mejor estudiadas en brucelosis bovina son IgM, e IgG. Si bien las pruebas disponibles no son cualitativas para reconocer una sola inmunoglobulina, dan la pauta del predominio de una de ellas. En el diagnóstico de la brucelosis bovina resulta de especial interés conocer la evolución de las inmunoglobulinas en la infección y en la vacunación; en ambas aparecen primero las IgM y luego las IgG. La diferencia es que mientras en la infección las IgG tienden a incrementarse y a persistir, en terneras vacunadas entre los 3 y 8 meses de edad, las IgG tienen a desaparecer alrededor de los seis meses después de la vacunación. Sobre este conocimiento se basan las pruebas complementarias para distinguir los títulos aglutinantes que pueden persistir después de la vacunación con la cepa 19 o también para distinguir reacciones heteroespecíficas, originadas por bacterias que tienen antígenos de superficie comunes con las brucelas y que originan anticuerpos que en general son de la clase IgM.

Según su uso en diferentes países, las pruebas serológicas se pueden clasificar como: 1) de rutina u operativa, 2) complementarias, 3) de vigilancia epidemiológica y 4) pruebas tamiz. Una misma prueba puede servir como operativa en un programa y ser definitiva para el diagnóstico o ser la prueba tamiz o complementaria en otro programa.

Las pruebas de seroaglutinación (en tubo y en placa) fueron y son muy usadas y contribuyeron grandemente a reducir las tasas de infección en Europa, Australia y las Américas.

La prueba de rosa de Bengala (con antígeno amortiguado) es rápida, de fácil ejecución, y permite el procesamiento de un gran número de muestras por día. Es una prueba cualitativa que clasifica los animales en positivos y negativos. En regiones de baja prevalencia de infección o donde se practica la vacunación sistemática de terneras, la de rosa de Bengala es poco específica, y produce muchos "falsos positivos", si se usa como prueba única y definitiva. En varios países, entre ellos Gran Bretaña y Australia, se usa como prueba previa o tamiz: los animales con resultado negativo son clasificados como tales y los de resultado positivo son sometidos a otras pruebas confirmatorias. En regiones de alta prevalencia da resultados muy satisfactorios. También puede ser usada a su vez como una prueba complementaria para animales que se clasifican como sospechosos por la prueba de aglutinación. De esta manera muchos sueros sospechosos resultan negativos a la rosa de Bengala y como esta prueba es muy sensible (deja pocos "falsos negativos") y precoz en detectar la infección, hay escaso riesgo de no detectar animales infectados.

Las principales pruebas complementarias son la de fijación del complemento, la 2-mercaptoetanol y la de rivanol. Ultimamente, se han desarrollado también nuevas pruebas, como la de hemólisis indirecta, inmunoenzimática (ELISA) para las diferentes clases de inmunoglobulinas y la de inmunodifusión radial con antígeno polisacárido. Todas ellas tienen por objeto distinguir anticuerpos debidos a la infección, de los que pueden persistir por la vacunación o por el estímulo de bacterias heteroespecíficas.

Se considera que la prueba de fijación del complemento es la más específica, pero resulta muy laboriosa, complicada, e intervienen muchos elementos y variantes. Además no está estandarizada a nivel internacional. Esta prueba puede suplantarse por otras más sencillas como la de 2-mercaptoetanol y la de rivanol, que miden los anticuerpos IgG.

En los laboratorios de salud animal en EUA y varios de América Latina ganó gran aceptación una prueba tamiz, que simplifica mucho el trabajo cuando hay que examinar un gran número de muestras de sangre. Nos referimos a la prueba de BAPA (buffered antigen plate agglutination) ó BPA (buffered plate antigen), que se ejecuta en placa con un antígeno amortiguado a un pH 3,65. La BAPA elimina las muestras negativas y gran parte de los sueros con reacciones inespecíficas. Los resultados de la prueba clasifican las muestras en negativas y gran parte de los sueros con reacciones inespecíficas. Los resultados de la prueba clasifican las muestras en negativas (que son definitivamente descartadas) y presuntamente positivas que son sometidas a una o más pruebas definitivas y/o complementarias, tales como aglutinación en tubos, fijación de complemento, 2-mercaptoetanol.

Los exámenes bacteriológicos son de uso más restringido. Los materiales que más se prestan para esos exámenes son los fetos, envolturas fetales, secreciones vaginales, leche y semen. Las vacas infectadas pueden abortar o no abortar, pero un alto porcentaje de ellas elimina brucelas del tracto genital desde unos días antes del parto hasta unos 30 días después. Se estima que un 85% de las vacas recientemente infectadas y más de 15% de las vacas crónicamente infectadas eliminan brucelas durante las pariciones. La eliminación de brucelas a través de la leche es constante o intermitente y esta secreción es un material excelente para el aislamiento de Brucella si los exámenes se repiten en varias ocasiones. En toros las pruebas serológicas deben hacerse con el suero sanguíneo y con el plasma seminal. El examen bacteriológico del semen debe repetirse si resulta negativo, ya que la eliminación puede ser intermitente.

En porcinos las pruebas serológicas no son indicadas para el diagnóstico individual, sino para revelar la presencia de la infección en la piara. Se pueden usar las pruebas de aglutinación (en tubo y en placa), fijación del complemento y antígeno ácido buferado (rosa de Bengala) o BAPA. Esta última es la preferida, pues tiene la ventaja de que en piaras donde hay solo títulos bajos e inespecíficos a la aglutinación (en tubo o en placa) los resultados sean negativos. Para clasificar una piara como positiva con la prueba de aglutinación (en tubo o en placa), debe haber uno o más animales con 100 UI o más.

En los caprinos las pruebas serológicas también son aplicables a todo el rebaño y no en forma individual. Cuando hay infección en el rebaño, se encuentra uno o más individuos con títulos de 100 UI o más; en tal caso es prudente adoptar títulos de 50UI como significativos de infección. Se considera que la prueba de fijación del complemento es superior a la aglutinación y es especialmente indicada para uso en rebaños vacunados con B. melitensis, donde los cuerpos aglutinantes pueden persistir largo tiempo. También la prueba de mercaptoetanol ha dado muy buenos resultados en hatos vacunados. La prueba con antígeno ácido buferado (rosa de Bengala) ha dado resultados promisorios, pero la experiencia es limitada y aún no permite llegar a conclusiones definitivas. Las mayores esperanzas están cifradas en el ensayo inmunoenzimático.

En ovinos, en el diagnóstico de la infección por B. melitensis, la prueba de Coombs (prueba de la antiglobulina) modificada por Hajdú, permite descubrir un 70% de animales infectados. Las otras pruebas (aglutinación, fijación del complemento) dan resultados inferiores. En las pruebas de aglutinación y de fijación del complemento se recomienda adoptar títulos más bajos que en otras especies animales. La prueba de electrosinéresis (contraímmunoelectroforesis) detectaría anticuerpos contra antígenos intracelulares, que aparecen tardíamente en la sangre, pero permanecen durante largo tiempo; por tanto, sería apropiada para ovinos con brucelosis crónica que dan reacciones negativas a las pruebas de aglutinación, rosa de Bengala y fijación del complemento.

Para el diagnóstico de la epididimitis del carnero por B. ovis se debe emplear antígeno elaborado con este agente; las pruebas preferidas son la difusión en gel, la de fijación del complemento y ELISA. El examen bacteriológico del semen es un método adecuado de diagnóstico, pero se debe tener en cuenta que la eliminación de brucelas puede ser intermitente.

En perros infectados por B. canis el diagnóstico más certero es el aislamiento del agente etiológico de la sangre, descargas vaginales, leche o semen o de tejidos fetales y placentas. La bacteriemia es de larga duración, de 1 a 2 años, pero después de la fase inicial puede volverse intermitente, por lo que un hemocultivo negativo no excluye la posibilidad de brucelosis.

Las pruebas serológicas de empleo más común son la de aglutinación en placa y tubos con antígeno de B. canis, la prueba de inmunodifusión en agar gel con antígenos extraídos de la pared celular, 2-mercaptoetanol (2 ME) aglutinación en placa y la prueba 2 ME modificada de aglutinación en tubos. Posiblemente la prueba más específica hasta ahora, pero la menos sensible sea la prueba de inmunodifusión en agar gel que utiliza antígenos extraídos del citoplasma de B. canis. Esta prueba, en menor o mayor grado, como todas estas pruebas sufren de reacciones inespecíficas. Se demostró que la prueba de inmunodifusión con antígenos sonicados (antígenos celulares internos) es satisfactoria al poco tiempo de iniciarse la bacteriemia y que puede detectar animales afectados por lo menos seis meses después de cesar la bacteriemia, es decir, cuando las otras pruebas dan resultados equívocos.

MATERIALES Y METODOS

Se procedió a la toma de muestras de liebres faenadas en frigoríficos habilitados por el Servicio Nacional de Sanidad Animal, en el área de eviscerado.

Se obtuvieron en total 123 muestras correspondientes a 80 animales seleccionados en forma aleatoria en la línea de producción (100% del número mínimo de muestras programadas).

Correspondieron a hígado (24,39%), bazo (20,32%), testículo (32,52%) y ovario (22,76%).

El 92% de las muestras fueron procesadas en fresco, mientras que el 8% restante fueron congeladas para su posterior procesamiento.

Para el diagnóstico bacteriológico, las muestras fueron maceradas en mortero estéril con arena y solución fisiológica hasta formación de masa homogénea.

Fueron sembradas en medio Skirrow en placa dividida en dos partes e incubadas en microaerofilia durante 96 horas.

Las muestras congeladas fueron descongeladas en su continente estéril original y sembradas en agar sangre durante 72 horas a 37°.

En el 20 % de las muestras se modificó el tiempo de incubación llevándola de 96 horas a 168 horas.

Las placas sospechosas se resemebraron en medio Skirrow incubándolas durante 168 horas y efectuándoles pruebas de oxidasa, catalasa, producción de H₂S y actividad ureásica.

RESULTADOS.

Las primeras muestras obtenidas presentaron desarrollo de bacilos gram (-) y gram (+). En función de ello se modificó la forma de obtención de muestras durante el eviscerado, hasta lograr la reducción de la contaminación.

La totalidad de las muestras procesadas resultaron negativas para Brucelosis, tanto durante la primer etapa como a partir de las modificaciones a la estrategia de toma de muestras.

DISCUSION

Se conoce que en Europa la infección de la liebre (Lepus europaeus), que es el reservorio de B.suis biovar 2, se transmite a los cerdos domésticos, por lo que juega un papel importante en la epidemiología de la enfermedad.

Brucelosis en liebre europea se ha descrito en Alemania (1941), Francia (1958) e Italia (1964) correspondiendo a Brucela suis.

En Argentina, se ha demostrado la trasmisión de la infección de animales domésticos a liebre europea por B. abortus biovar 1. Señalándose prevalencias serológicas del 0,2%.

El papel de la liebre europea como fuente de infección para el hombre no está suficientemente documentado.

El presente trabajo no ha logrado demostrar niveles de riesgo para los manipuladores, tanto cazadores como trabajadores de frigorífico, descartándose así la hipótesis planteada.

Sin embargo, esta situación podría surgir de las técnicas empleadas (particularmente de producirse eliminación intermitente de brucelas) y/o del tipo de muestras analizadas. Conclusiones definitivas sobre el papel de la liebre europea en la epidemiología de la enfermedad se podrían obtenerse mediante la ampliación de los estudios sobre la base de screening serológicos y/o análisis bacteriológicos de muestras de envolturas fetales, sangre o semen.

BIBLIOGRAFIA

1. Amato Gauci AJ. The return of brucellosis. *Maltese Medical Journal* 1995; 7:7-8.
2. García Carrillo C. Animal and human brucellosis en the Americas. Paris: OIE, 1990:287.
3. López Merino, A. Brucellosis in Latin America. Young EJ, Corbel MH, editors. *Brucellosis; clinical and laboratory aspects*. Boca Raton: CRC Press Inc., 1989:151-61.
4. Carmichael LE. *Brucella canis*. In: Nielsen K, Duncan JR, editors. *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press Inc.: 1990,335-50.
5. Ewalt DR, Payeur JB, Martin BM, Cummins DR, Miller WG. Characteristics of a Brucella species from a bottlenose dolphin (Tursiops truncatus). *J Vet Diagn Invest* 1994;6:448-52.

6. Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M Brucella A monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:292-5.
7. Corbel MJ. Identification of dye – sensitive strains of Brucella melitensis. *J. Clin Microbiol* 1991; 29:1066-8
8. Allardet-Servent A., Bourg G, Ramuz M., Bellis M., Roizes G. DNA polymorphism in strains of the genus Brucella. *J. Bacteriol* 1998;170:4603-7
9. O'Hara MJ., Collins DM., Lisle GW. Restriction endonuclease analysis of Brucella ovis and other Brucella species. *Vet Microbiol.* 1985;10:425-9.
10. Cellier MFM, Teyssier J., Nicolas M., Liautard JB, Marti J., Sri Widada J. Cloning and characterization of the Brucella ovis heat shock protein DnaK functionally expressed in Escherichia coli. *J. Bacteriol* 1992;174:8036-42
11. Douglas JT., Rosenberg EY., Nikaido H., Verstrete DR., Winter AJ. Porins of Brucella species. *Infect Immun* 1984;44:16-21.
12. Cloeckaert A., Verger J-M, Grayon M., Grepinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25kDa and 36kDa outer membrane proteins of Brucella. *Microbiology* 1995;141:2111-21
13. Cloeckaert A., Salih-Alj Debarrh H., Zygmunt MS., Dubray G. Polymorphism at the dnaK locus of Brucella species and identification of a Brucella melitensis species-specific marker. *J Med Microbiol.* 1996;45:2000-13.
14. Jumas – Bitlak E, Maugard C., Michaux – Charachon S., Allardet-Servent A., Perrin A., O'Callaghan D. Study of the organization of the genomes of Escherichia coli, Brucella melitensis and Agrobacterium tumefaciens by insertion of a unique restriction site". *Microbiology* 1995; 141:2425-32.
15. Da Costa M., Guillou J-P., Garin-Bastuji B., ThiJbaud M., Dubray G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus Brucella by DNA amplification. *J. Appl Bacteriol.* 1996;81:267-75.
16. Minnick M.F., Stiegler G L., Nucleotide sequence and comparison of the 5S ribosomal genes of Rachalimaea henselae, R. Quintana and Brucella abortus. *Nucleic Acid Res.* 1993;21:2518

17. Relman DA., Lepp PW., Sadler KN., Schmidt TM., Phylogenetic relationships among the agent of bacillary angiomatosis, Bartonella bacilliformis, and other alpha-proteobacteria. Mol. Microbiol. 1992;6:1801-7
18. Perry MB., Bundle DR., Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of Brucella In: Adams LG., editor. Advances in Brucellosis Research Austin (TX): Texas A & M University, 1990; 76-88
19. Bundle DR., Cherwonogrodzky JW., Gidney MAJ., Meikle PJ., Perry MB., Peters T. Definition of Brucella A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. Infect Immun 1989;57:2829-36
20. Wilson GS., Miles AA. The serological differentiation of smooth strains of the Brucella group. British Journal of Experimental Pathology 1932;13:1-13
21. Goldbaum FA., Leoni J., Walach JC., Fossati CA. Characterisation of an 18-kilodalton Brucella cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. J. Clin Microbiol 1993;31:2141-5
22. Corbel MJ. The immunogenic activity of ribosomal fractions derived from Brucella abortus. Journal of Hygiene, Cambridge 1976;76:65-74
23. Zhan Y., Cheers C. Differential activation of Brucella – reactive CD4+ cells by Brucella infection or immunization with antigenic extracts. Infect Immun 1995;63:969-95.
24. Dubray G. Protective antigens in brucellosis. Annales de l'Institut Pasteur, Microbiologie 1987;138:84-7
25. Tatum FM., Cheville NF., Morfitt D. Cloning, characterisation and construction of htr A and htr A – like mutants of Brucella abortus and their survival in BALB/C mice. Microb. Pathog. 1994;17:23-36
26. Santini C., Baiocchi P., Berardelli A., Venditti M., Serra P. A case of brain abscess due to Brucella melitensis. Clin Infect Dis 1994; 19:977-8
27. Potasman I, Even L., Banai M., Cohen E., Angel D., Jaffe M. Brucellosis: an unusual diagnosis for a seronegative patient with abscesses, osteomyelitis and ulcerative colitis. Rev Clin Dis 1991;13:1039-42
28. Shakir RA., Al-Din ASN, Araj GF., Lulu AR., Mousa AR., Saadah MA. Clinical diagnosis of neurobrucellosis. A report on 19 cases. Brain 1987;110:213-23
29. Young EJ., An overview of human brucellosis. Clin Infec Dis 1995;21:283-90

30. Madkour MM. Brucellosis. Butterworths, London 1989.
31. Solomon HM., Jackson D. Rapid diagnosis of Brucella melitensis in blood; some operational characteristics of the BACT/ALERT. J Clin. Microbiol 1992;28:2139-41
32. Luzzi GA., Brindle R., Socket PN., Solera J., Klenerman P., Warrell DA. Brucellosis: imported and laboratory acquired cases, and an overview of treatment trials. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1993;87:138-41.