



**ESTADO DEL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS EN COLOMBIA ENTRE
LOS AÑOS 2009-2016–“REVISIÓN DE LITERATURA CIENTÍFICA”-**

Carol Gisela Duarte Hernández

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ -2018**



**ESTADO DEL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS EN COLOMBIA ENTRE
LOS AÑOS 2009-2016–“REVISIÓN DE LITERATURA CIENTÍFICA”-**

**Monografía requisito para optar por el título de Bacteriólogo
y Laboratorista Clínico**

**EDITH DEL CARMEN HERNÁNDEZ ROJAS
Asesora Interna**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ -2018**

DEDICATORIA

Principalmente a Dios quien me ha permitido culminar esta gran etapa en mi vida, por llenarme de sabiduría y paciencia y entender que todo está destinado a ser en un tiempo y momento específico y que ante las adversidades que la vida me presenta debo ser fuerte y nunca perder el rumbo para cumplir mis metas.

A mis padres que son el motor fundamental de mi vida, que con su ejemplo, comprensión y amor han hecho de mí una gran persona, Ana; madre querida a ti dedico este logro, gracias por tu consejos y valores, seré tu orgullo, papá dedico a ti el trabajo y el esfuerzo que siempre me has enseñado, a no caer ante los malos momentos y siempre tener la cabeza en alto y por último a mi ángel en la tierra Adriana que siempre me apoyaste y estuviste conmigo en todo este proceso.

*A mis amigas que me demostraron que se necesita más gente que ame lo que hace que ría y que llore contigo, y que cada día te deja una enseñanza
Gracias niñas N.A.P.J.J.L.*

A Edward que me ha apoyado durante toda mi carrera, y nunca me ha dejado desfallecer, que me ha hecho crecer como persona y ha sido mi soporte para alcanzar grandes cosas.

Y a todas las personas que me apoyaron en este largo proceso a formarme como persona y profesional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios por permitirme culminar esta etapa tan importante en mi vida, y demostrarme que todo se puede lograr con dedicación esfuerzo y amor por lo que se hace. A mi familia que con su apoyo incondicional me motivo a cada día luchar por mis sueños y metas, no desfallecer ante la adversidad de las circunstancias y siempre ver el lado positivo de todo.

Agradezco también a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por educarme y convertirme en una profesional integra, a los diferentes docentes que con sabiduría formaron grandes capacidades en mí y en especial a mi asesora que fue una parte vital para el desarrollo elaboración y culminación de mi proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS.....	17
1. ANTECEDENTES.....	18
2. MARCO TEÓRICO	22
2.1. DESCRIPCIÓN DE LA BACTERIA.....	22
2.1.1. <i>Brucella</i>	22
2.1.2. Taxonomía	24
2.1.3. Composición química	26
2.1.4. Genética.....	29
2.1.5. Patogenicidad y virulencia.....	31
2.2. BRUCELOSIS HUMANA	33
2.2.1. Especies que infectan al hombre	36
2.2.1.1. <i>Brucella melitensis</i>	36
2.2.1.2. <i>Brucella abortus</i>	37
2.2.1.3. <i>Brucella suis</i>	38
2.2.2. Respuesta inmune frente a la infección por <i>Brucella</i>	40
2.3. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	44
2.3.1. Ciclo de vida de <i>Brucella</i>	44
2.4. EPIDEMIOLOGÍA	46
2.3.2. <i>Brucella</i> a nivel mundial	46
2.3.3. <i>Brucella</i> en América Latina	47
2.3.4. <i>Brucella</i> en Colombia	49
2.5. DIAGNOSTICO EN HUMANOS	53
2.5.1. Identificación del agente.....	53
2.6. MÉTODOS DIRECTOS	55
2.6.1. Cultivos	55

2.7. MÉTODOS INDIRECTOS.....	59
2.7.1. Rosa de Bengala.....	61
2.7.2. Fluorescencia polarizada	62
2.7.3. Fijación de complemento	62
2.7.4. ELISA	63
2.7.5. ELISA competitiva	64
2.7.6. ELISA indirecta.....	65
2.8. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	66
2.8.1. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA-PCR	66
2.8.2. PCR convencional.....	67
2.8.3. PCR en tiempo real	70
2.9. VACUNAS	71
3. DISEÑO METODOLOGICO	74
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	74
3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	74
3.3 MUESTRA	74
3.4 METODOLOGÍA	75
3.4.1 Búsqueda y revisión la información existente	75
4. RESULTADOS	75
5. DISCUSIÓN.....	88
6. CONCLUSIONES	94
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	95

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Biovariedad, huésped, virulencia y localización por especies del género *Brucella*. Modificado de Brucellosis in humans and animals. 25
- Tabla 2.** Distribución de la infección por especies de *Brucella* en países de América Latina **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 3.** Brucelosis en humanos seropositivos según sexos por departamento. Colombia 2013 **¡Error! Marcador no definido.48**
- Tabla 4.** Secuencia de iniciadores usados en la PCR. Modificada de Bricker y Halling **¡Error! Marcador no definido.1**
- Tabla 5.** Diferencia de las vacunas utilizadas en el control de la enfermedad. Modificada de Rivers y colaboradores **¡Error! Marcador no definido.66**
- Tabla 6.** Iniciadores citados en artículos para la técnica de PCR convencional **¡Error! Marcador no definido.77**
- Tabla 7.** laboratorios que realizan PCR en Colombia **¡Error! Marcador no definido.79**

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.**Coloración de Gram para Brucella, cocobacilos Gram negativos **¡Error! Marcador no definido.2**
- Figura 2.**Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de Brucella **¡Error! Marcador no definido.4**
- Figura 3.**Esquema simplificado de respuesta inmune frente a la infección por Brucella **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.**ciclo de transmisión de la brucelosis obtenido de blog del gobierno de Austrias **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 5.**Coloración de Gram para *B. melitensis* cocobacilos pequeños Gram negativos **¡Error! Marcador no definido.1**
- Figura 6.** Tinción especial de Stamp positiva, Brucella teñida de color rojo en un fondo azul **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 7.**crecimiento de colonias de *B. abortus* en Agar Brucella enriquecido **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 8.**crecimiento de *B. suis* en medio selectivo de Farrel **¡Error! Marcador no definido.5**
- Figura 9.**Aglutinación de sueros positivos con Rosa de Bengala **¡Error! Marcador no definido.8**
- Figura 10.**Esquema de la reacción antígeno anticuerpo. **¡Error! Marcador no definido.5**

Figura 11.Reacción colorimétrica (+/-) de ELISA indirecta 6 ¡Error! Marcador no definido.

Figura 12. Fragmentos típicos de una PCR convencional Brucella 6 ¡Error! Marcador no definido.

Figura 13.Estructura de las vacunas existentes para la brucelosis animal ¡Error! Marcador no definido.67

Figura 14.Idioma de los documentos revisados e incluidos en la base de datos ¡Error! Marcador no definido.2

Grafica 15.. Años de publicacion de articulos usados en la revision bibliografica ¡Error! Marcador no definido.3

Figura 16.Documentos sobre brucelosis en Colombia ¡Error! Marcador no definido.4

Figura 17.Publicaciones realizadas por diferentes países del mundo ¡Error! Marcador no definido.5

Figura 18.Países latinoamericanos con publicaciones ¡Error! Marcador no definido.6

Figura19. Tema principalmente tratado en cada documento. ¡Error! Marcador no definido.7

Figura 20.Estudios realizados en población en riesgo en Colombia 78

Figura 21.Documento de instituciones Colombianos ¡Error! Marcador no definido.9

Figura 22. Distribución geográfica de *Brucella* en Colombia80

Figura 23. Métodos Diagnósticos para determinación de *Brucella* 81



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**

ESTADO DEL DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS EN COLOMBIA ENTRE LOS AÑOS 2009-2016–“REVISIÓN DE LITERATURA CIENTIFICA”-

RESUMEN

La brucelosis humana es una enfermedad reemergente causada principalmente por tres especies de *Brucella*. Esta enfermedad causa debilidad e incapacidad a quien la padece. Es una de las enfermedades zoonóticas más distribuidas en el mundo, y aun así es una enfermedad muy poco estudiada, que en los humanos es sub diagnosticada y no cuenta con técnicas estandarizadas.

En éste estudio se llevó a cabo la revisión de la literatura de documentos publicados entre 2009 y 2016, acerca del desarrollo histórico del diagnóstico de la brucelosis en Colombia y su distribución en diferentes regiones del país. Se evidencio así que existe muy poca información sobre el diagnóstico en el país, y en especial sobre la enfermedad en humanos, encontrándose que en Colombia la especie más distribuida es *Brucella abortus*, el diagnóstico en humanos se limita únicamente a las técnicas serológicas y los estudios moleculares se realizan únicamente en animales en laboratorios autorizados por el ICA.

Lo anterior deja ver la necesidad de incentivar la investigación sobre este patógeno y desarrollar más proyectos que refuercen los planes de erradicación de la enfermedad a través del diagnóstico oportuno y el tratamiento eficaz y a su vez permitirá ampliar los datos epidemiológicos sobre la situación real de la enfermedad en el país y lograr un diagnóstico estandarizado para los humanos.

PALABRAS CLAVE: brucelosis humana, epidemiología, diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

Brucella es un patógeno Gram negativo intracelular causante de una de las zoonosis reemergentes más importantes y extendidas en América Latina y el mundo, con serias implicaciones en salud pública. La infección en humanos asciende a un millón de casos nuevos anuales además de generar grandes pérdidas económicas para los ganaderos y granjas pecuarias; se estima que en América Latina las pérdidas económicas anuales generadas por la brucelosis son aproximadas a los \$600 millones de dólares (1). Esto limita la exportación de productos lácteos y cárnicos internacionalmente(2).

Esta bacteria cuenta con 3 especies de importancia clínica para los humanos *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*, generando enfermedad a personas que tienen contacto directo con animales infectados y por la manipulación errónea de cepas en el laboratorio, también el contagio se puede dar de forma indirecta por el consumo de productos lácteos o cárnicos contaminados, la enfermedad produce una gran variedad de síntomas inespecíficos que causan incapacidad en los pacientes (2).

La infección en Colombia por *Brucella* es conocida como brucelosis bovina generada por *B. abortus* y considerada por el ICA como una enfermedad infecto-contagiosa que provoca aborto en animales y transmisión zoonótica. además de esto la mayoría de los casos reportados en humanos son por esta especie (3). En el estudio realizado por Morales (3) la brucelosis en humanos es una enfermedad sub diagnosticada en el país. Además, no es una enfermedad de vigilancia y control en salud pública.

En Colombia el diagnóstico de la enfermedad en humanos es limitada, debido a la falta de protocolos estandarizados que permitan una rápida identificación del patógeno, además del alto riesgo al que se expone el Laboratorista con respecto a la manipulación de la cepa. A pesar de esto Colombia si cuenta con estudios serológicos asociados con la brucelosis, sin embargo el sector salud muestra una actitud un poco indiferente frente a esta problemática, debido a que son muy pocas las campañas de promoción y prevención de la enfermedad en áreas rurales. Esto afecta directamente la calidad de vida de los pacientes y personas con riesgo de contagio debido a que esta es una enfermedad incapacitante, de curso crónico y tratamiento prolongado, que implica atención médica especializada (3).

Epidemiológicamente Colombia ha reportado la enfermedad en 25 de los 33 departamentos donde la infección en humanos es ocasionada únicamente por *Brucella abortus* (4).

La resolución 1332- 2003 era la encargada de vigilar el programa de control y erradicación de la brucelosis bovina, enfatizándose únicamente en el control de *B.*

abortus en bovinos y bufalinos (5). Además de esto el 2015 fue incluida la brucelosis en la resolución 3714 como una enfermedad de declaración obligatoria en el país y hace responsable al ICA para coordinar acciones de promoción y erradicación en animales (6). En el 2017 se publicó la resolución 7231 que reemplaza a la 1332 estableciendo las medidas sanitarias para la prevención, control y erradicación de la brucelosis en las especies bovina, bufalina, ovina, caprina, porcina y equina, además con esta medida ayudar a prevenir la transmisión zoonótica al humano(7).

Para el diagnóstico en humanos en el Instituto Nacional de Salud se realizan pruebas serológicas donde se considera que el Gold Standar es la Rosa de bengala, usándose como prueba inicial de tamizaje, también se realiza fluorescencia polarizada y una prueba confirmatoria de fijación de complemento, aunque todas estas presentan un margen de error debido a que son métodos cualitativos (2). Pero es importante recalcar que los estudios serológicos realizados en el ganado sirvieron de base para adaptar un diagnóstico en la infección en humanos, demostrando que también son útiles y seguros para el bacteriólogo, a pesar de la falta de especificidad que poseen las pruebas (3).

Debido a esto se han desarrollado pruebas moleculares como la PCR convencional ya que es más segura y específica para la identificación del género. Sin embargo aún no existe un protocolo diagnóstico para la diferenciación por especie que ayude a reconocer los pacientes positivos y de esta manera disminuir la carga infecciosa y el tratamiento sea más rápido evitando recaídas.

En esta revisión se busca identificar los métodos diagnósticos usados para la identificación de *Brucella* en el país y mediante la recopilación de la formación generar una base de datos para crear un perfil epidemiológico de la bacteria en Colombia (8).

OBJETIVOS

GENERAL

Realizar la revisión de literatura científica sobre el desarrollo histórico del diagnóstico de la brucelosis en humanos en Colombia en el periodo 2009-2016.

ESPECIFICOS

- Identificar mediante la revisión de fuentes bibliográficas el protocolo de diagnóstico de la brucelosis en Colombia.
- Analizar los resultados de diferentes estudios realizados sobre la epidemiología de la infección por *Brucella* en Colombia y América Latina.
- Identificar la presencia de las especies de *Brucella* y su distribución en Colombia.

1. ANTECEDENTES

Los primeros indicios de la enfermedad ocurrieron durante la guerra Crimea entre los años a 1854 a 1856, donde se observaron numerosos casos de fiebres prolongadas, por lo que se sospechó una infección nueva, la cual se extendió a los países del Mediterráneo, en particular a la isla de Malta. Pocos años después Marson en 1859 realizo autopsias a marines y soldados que padecían sintomatología similar en el mediterráneo, produciendo fiebre y debilidad, se denominó fiebre de Malta o del Mediterráneo por la ubicación de los pacientes que la padecieron(9).

Con los años y la continua infección de animales Bräwer y Lehnent(10)entre 1878-1880 estudiaron la procedencia de la enfermedad reportando que el patógeno era capaz de generar aborto en bovinos (10). posteriormente el doctor Sir David Bruce

En 1886 se debió trasladar al mediterráneo con el fin de identificar el agente que causa esta enfermedad abortiva en animales e incapacitante para los humanos(9). El aislamiento de la bacteria se realizó a partir de tejidos de pacientes, más específicamente del bazo de soldados británicos que consumieron leche de cabra y padecían una sintomatología muy variada, la bacteria recuperada fue denominada *Micrococcus melitensis* en 1887, que posteriormente fue denominado *Brucella melitensis* en honor a su descubridor(11). Cabe resaltar que esta enfermedad solo se encontraba en Europa, pero con la migración de personas y animales al continente Americano su expansión se vio aumentada en solo unos años.

Gracias al doctor Bernhard Bang médico patólogo veterinario en 1895 se aisló un bacilo causante de aborto en ganado que se asoció a los estudios realizados con anterioridad, fue denominado *Bacillus abortus* y en 1914 en Estados Unidos se determinó que pertenecía al mismo género que el descubierto por Bruce y se le cambió el nombre a *Brucella abortus*, descubriendo también que el patógeno ya se encontraba distribuido en diferentes países de América(11). En este mismo año los doctores Mohler y Traum aislaron *Micrococcus suis* de cerdos prematuros y también de las amígdalas de niños que se alimentaban con leche cruda(9).

En 1935, Italia fue el país con más personas infectadas en el mundo, aumentaron los casos en el ganado bovino y se diseminó la enfermedad a otros países mediterráneos, como Grecia, Turquía, Argelia, Túnez y Egipto(9).

La distribución de la enfermedad en América Latina se puede asociar a la conquista gracias a las primeras cabras, pero hasta 1912 en Perú se notaron los primeros casos en humanos, y diez años después Morales Otero refirió abortos en el ganado bovino en Argentina(9). En México se crea el primer laboratorio especializado en brucelosis, fundado en 1937 por el doctor Ruiz Castañeda debido al número de casos en humanos, a partir de los estudios realizados allí se dieron a conocer nuevas técnicas de laboratorio. Esto hizo que más casos humanos se logaran diagnosticar(9).

A partir de cada estudio se determinó que el género posee 6 especies que afectan a diferentes huéspedes animales e incluso pueden infectar humanos, esto genera pérdidas económicas para una región que la padezca por tal razón es importante seguir los planes de control y erradicación de enfermedades infectocontagiosas.

En 1985 se realizó hibridación del 70% de la cadena del ADN bacteriano para realizar la tipificación basándose en los resultados obtenidos en años anteriores donde se contaba con menos tecnología y a partir de esto se demostró la cercanía genética entre las especies (8).

hasta 1990 se desarrolló el primer ensayo molecular que identificara por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el género y en donde se amplificó con éxito un fragmento de 635 pares de bases de un gen de proteína de membrana externa OMP₂ de 43 kDa de *B. abortus* cepa 19, donde se demostró que esta técnica era más sensible que los métodos microbiológicos, no sólo para el diagnóstico de un primer episodio de infección, sino también para la detección temprana de las recaídas(12).

En 1994 Bricker y Hailing(8) avanzaron en la técnica de PCR lograr la diferenciación de las especies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. Suis*, el ensayo fue denominado AMOS basado en el polimorfismo resultante de la secuencia de inserción IS711, que puede diferenciar *B. abortus* biovariedad 1, 2 y 4, *B. melitensis* biovariedad 1, 2 y 3, *B. ovis* y *B. suis* biovariedad 1. En el ensayo se usaron cuatro iniciadores diferentes dirigidos para cada especie esto permitió clasificar las especies por los tamaños de los fragmentos obtenidos en la amplificación; la desventaja fue que no todas las especies del género *Brucella* se pueden identificar, además que la lectura de las bandas generan reacción cruzada entre especies(8).

En Colombia el responsable de prevenir, controlar y erradicar la enfermedad desde el año 2002 y a partir de el mismo se empiezan a crear resoluciones que establezcan los protocolos de diagnóstico, y vacunación en el ganado, además que es el único

ente autorizado para la realización del diagnóstico mediante cultivo bacteriológico y pruebas indirectas (13).

A nivel epidemiológico se ha conocido que la infección por *Brucella* se ha reportado en Latinoamérica desde el siglo XX y hasta el día de hoy sigue siendo una de las principales zoonosis a pesar de las campañas que se realizan para su control(14), esta infección se ha reportado en varios países de Latinoamérica como Brasil, Chile, Colombia, Cuba, República dominicana, Ecuador, el Salvador, Honduras, México, Nicaragua, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela (14) esto se debe a que el desarrollo y transmisión de la bacteria a los huéspedes es promovido por las diversas condiciones climáticas del continente, el país más afectado es Argentina en donde se ha realizado identificación del patógeno desde 1994(14).

Debido a esta problemática epidemiología países como Argentina, Brasil Colombia, Chile y Perú, solicitaron a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizar programas de vigilancia, promoción y control de la enfermedad que además afecta la salud de los trabajadores(15).

La brucelosis se mantiene como una de las principales zoonosis a nivel mundial y es una de las causas de fiebre de origen desconocido en humanos, con más de 500.000 nuevos casos anuales. Datos de la organización mundial de sanidad animal (OIE) considera, tradicionalmente, a América del Sur como un área endémica para brucelosis humana(14).

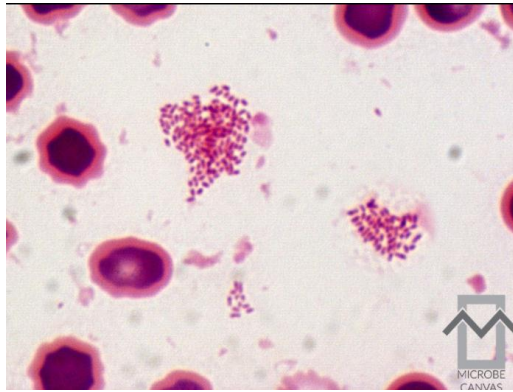
2. MARCO TEORICO

2.1. DESCRIPCION DE LA BACTERIA

2.1.1. *Brucella*

Es un patógeno bacteriano Gram negativo, su morfología corresponde a bacilos cortos de 0,5 a 0,7 μm de diámetro y de 0,5 a 1,5 μm de largo como se observa en la figura 1, son aerobios estrictos, inmóviles, no fermentan glucosa ni lactosa, Poseen 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 (16).

Figura 1. Coloración de Gram para *Brucella*, cocobacilos Gram negativos (17).



No tiene cápsulas y su crecimiento es lento y exigente (18) debido a que muchas cepas exigen un suplemento (del 5 al 10 %) de CO₂ para su crecimiento, sobre todo para el primer aislamiento (19),son intracelulares facultativos esto les ofrece protección contra las defensas celulares e inmunológicas del huésped (20).

Requieren medios selectivos con características nutricionales específicas que contengan peptona y triptosa para permitir su crecimiento, además estos agares deben ser suplementados con infusión de hígado, suero bovino o hidrolizado de levaduras (20).

Produce enfermedad zoonótica transmitida de forma directa por contacto con animales infectados o de manera indirecta por consumo de alimentos contaminados o manipulación de la cepa en el laboratorio sin las debidas barreras de bioseguridad (18),por tal razón las personas que enferman de brucelosis presentan síntomas que van desde periodos de aparente mejoría hasta periodos en los que sufren fiebres, por lo que su diagnóstico es difícil. Dado que el número de muertes producidas por esta enfermedad es baja, el interés de los médicos por ella es poco frecuente (9).

2.1.2. Taxonomía

La taxonomía clásica de *Brucella* de acuerdo con la secuencia de genes en el ARNr 16S es perteneciente al filo alfa proteobacteria filogenéticamente relacionados con patógenos de plantas como *Rhizobium*, del orden de los *Rhizobiales*, familia *Brucellaceae*, género *Brucella*, a este género pertenecen diez especies, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis* estas son especies que tienen la capacidad de infectar mamíferos terrestres, incluyendo al hombre, (23) las especies marinas son *B. ceti* y *B. pinnipedialis* no se conocen casos de infección en humanos por estas especies además algunas de estas poseen biovariedades que hacen que sea más o menos patógenas tabla 1(24).

ESPECIE	BIOTIPO	PATOGENICIDAD AL HOMBRE	RESERVORIO	CONTAGIO OCUPACIONAL	LOCALIZACIÓN
<i>Brucella melitensis</i>	3	Alta	cabras y ovejas	..	Mediterráneo, India, Asia, Latinoamérica.
<i>Brucella abortus</i>	7	Moderada	Ganado	Frecuente	distribución mundial
<i>Brucella suis</i>	4	Moderada/alta	Cerdos	Frecuente	Norteamérica, Latinoamérica Argentina
<i>Brucella canis</i>	..	Baja	Perros	..	Latinoamérica, Europa Central y Japón
<i>Brucella ovis</i>	..	Sin notificación	Ovejas
<i>Brucella neotomae</i>	..	Sin notificación	Roedores silvestres
<i>Brucella pinnipedialis</i>	..	Sin notificación	Leones marinos
<i>Brucella ceti</i>	..	Sin notificación	Ballenas, orcas

Tabla 1. Biovariedad, huésped, virulencia y localización por especies del género *Brucella*. Modificado de *Brucellosis in humans and animales* (24).

La definición del género está basada sobre todo en características biológicas como la transmisión y supervivencia, así se estableció satisfactoriamente en los años 20, mucho antes de que la filogenia y la posición taxonómica verdadera del grupo fueran conocidas (21).

Una característica de *Brucella* es que ellas exhiben una marcada pero no absolutamente estricta gama de hospederos. Esto se demuestra que no tienen preferencia por una especie animal dada sino también los humanos (21).

Estas bacterias constituyen un grupo evolutivo genéticamente ligado a sus huéspedes preferidos; sin embargo, una excepción notable es *B. suis*, puesto que el rango de hospederos parece ser una característica de las biovariedades (21).

2.1.3. Composición química

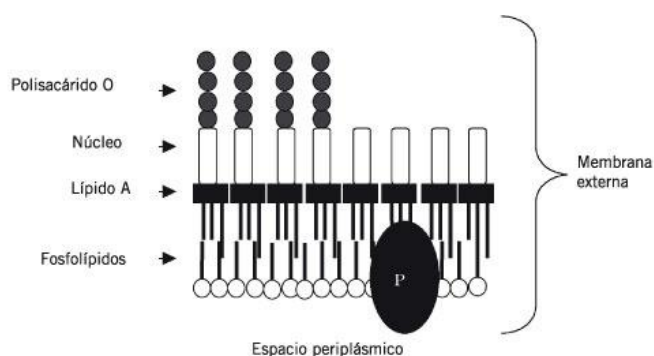
La estructura de esta bacteria es muy similar a la de las bacterias Gram negativas, aunque con características propias que le permiten diferenciarse de las demás y le otorgan el nivel de patogenicidad que posee.

La membrana externa constituye la barrera física y funcional entre el interior de la célula y el medio, es la encargada de la supervivencia de la bacteria ya sea en el medio ambiente o en el huésped, además es la primera estructura que entra en contacto con las células del sistema inmunológico en los estadios tempranos de la enfermedad ya que no se han descrito componentes capsulares en el género *Brucella* (21).

Esta membrana es rica en fosfatidilcolina que la diferencia de otras Gram negativas que poseen fosfatidil etanolamina, además de que el componente más abundante es el lipopolisacárido (LPS) también denominado endotoxina(21).

En esta membrana se distinguen tres regiones: el lípido A, el núcleo que es un oligosacárido intermedio y el polisacárido O (PSO) (16), también se asocia a la virulencia diferentes proteínas involucradas en la señalización, la regulación de genes y el transporte transmembrana. En la figura 2 se puede observar el esquema de la pared celular de *Brucella*(22).

Figura2. Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de Brucella (16).



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 de las cepas lisas, pero no en el de las cepas rugosas.

El polisacárido O es la porción más distal del LPS. Es un homopolímero lineal compuesto por una gran cantidad de residuos de N-formilperosamina (4,6 dideoxi-4-formamido- α -D-manopiranosilo). La unión entre estos residuos puede ser de dos tipos: a 1-2 o a 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(16).

Las *Brucellas* contienen otro polisacárido denominado hapteno nativo (HN), que es químicamente idéntico a la cadena O, pero no está unido al núcleo. Las cepas con epitopo A dominante (*B. abortus* biovar 1) contienen un polímero de cinco perosaminas unidas por ligadura A-1,2 y con una cierta proporción (dependiendo de la cepa), de unidades ligadas por unión a-1,3; mientras que las cepas que son M dominante (*B. melitensis*. 1), presentan unidades repetidas de un pentasacárido constituido de una perosamina unida por ligadura A-1,3 y cuatro unidas por ligadura A-1,2. Las diferentes ligaduras influyen en la forma del epitopo del LPS, así el tipo A dominante tiene forma de barra mientras que el tipo M dominante es enrollado(21).

Las proteínas de membrana externa (OMPs) se clasifican en mayores o menores de acuerdo a su abundancia, se encuentran intercaladas en la membrana y estrechamente ligadas al lipolisacarido(21).

Las primeras en describirse fueron las mayores que se encuentran expuestas en la membrana externa pero son menos accesibles en las cepas lisas debido al impedimento estérico ocasionado por las largas cadenas del polímero O, se ha demostrado que Omp solamente induce respuestas bajas y heterogéneas de anticuerpos y por lo tanto, constituyen inmunógenos pobres en ganado infectado por *Brucella abortus*(21).

Numerosas proteínas de membrana externa, interna, periplásmicas y citoplásmicas han sido caracterizadas. Algunas son reconocidas por el sistema inmune, durante la infección y solo se han reportado en *Brucella*, por lo que serían de gran utilidad en futuras pruebas diagnósticas o para ser consideradas en las nuevas vacunas (21).

2.1.4. Genética

Brucella es una bacteria que conserva una gran homología genética entre especies > 90 % entre ellas dado por relación antigénica, además de poseer múltiples replicones (16), no se han encontrado plásmidos nativos y esto se puede deber a su condición de bacteria intracelular debido a que permanecen en un ambiente estable libre de otros patógenos y no es necesaria la plasticidad genética de donde se deriva de los plásmidos (25).

Este género posee dos cromosomas circulares en casi todas las especies y biotipos, se ha observado que la organización del genoma es característica para cada especie y que existe polimorfismo en ciertos genes que permite su diferenciación, al realizar la comparación de los genomas entre *B. melitensis* y *B. suis* se encontraron diferencias que podrían ser responsables de la virulencia, estas especies difieren en sólo 74 genes: *B. suis* posee 42 y *B. melitensis* cuenta con 32 genes exclusivos para cada genoma (21).

La secuencia de inserción IS 711 es característica del género, es constante dentro de cada especie pero se ubica en diferentes posiciones, este polimorfismo asociado a la especie se utiliza en la tipificación molecular y su posterior identificación. Además la estabilidad de la secuencia, es relevante debido a que está implicada en la generación de diversidad genética (26).

Los genomas de todas las especies contienen dicha secuencia con un peso molecular de 842 pb en números de copias variables (26). Desde un punto de vista taxonómico, la localización especies específicas es particularmente significativa

puesto que estos elementos están en un número relativamente alto en el genoma y representan una posible fuente de la diversidad interna para un grupo donde, hay pocas ocasiones para el intercambio genético (26).

En la actualidad se han concluido el análisis de la secuencia del genoma de *B. melitensis* M16 y de *B. suis* y está en proceso la secuenciación de *B. abortus*. Entre los genes de importancia en la virulencia de la bacteria se encuentran el sistema de regulación de dos factores BvrR/BvrS necesarios para el tránsito intracelular en macrófagos y la virulencia, la región VirB que contiene 12 genes esenciales para la multiplicación celular encargados de codificar para un sistema de secreción tipo IV el cual se especula es un factor dominante en la virulencia de *Brucella* (21).

Por otra parte los marcadores moleculares para cada especie han sido identificados en omp25, omp31, omp2a y omp2b en los estudios que sugirieron que los genes de las proteínas externas principales de la membrana contienen información taxonómica relevante(21).

Proteína BacA es un transportador de membrana citoplasmática que es requerida para mantener la infección crónica, también posee 18 genes flagelares pero no los expresa debido a que en condiciones normales *Brucella* es inmóvil. Otro gen importante es el gen Hfq codifica la proteína del mismo nombre que emite la unión de ARN bacteriano, además le otorga a la bacteria resistencia al estrés en la fase estacionaria y multiplicación intracelular, importante en la virulencia (21).

El sistema de detección de genes BvrR / BvrS son dos componentes que actúan a través de una cascada de fosforilación proteica para modular la expresión génica bacteriana se cree que es uno de los factores clave implicados en la modulación de la unión y penetración de las células de *Brucella* tiene un profundo efecto en la expresión de varias proteínas de la superficie celular, incluyendo marcadores moleculares como las Omp25 y Omp22, que se cree que alteran la expresión de proteínas de superficie y permite que *Brucella* se adhiera y penetre en las células del huésped, además modula el tráfico intracelular y la replicación de la bacteria,

Después de unirse a los macrófagos, la bacteria es absorbida e internalizada en vesículas que normalmente se fusionarían con los endosomas. Después de la acidificación, estos endosomas se lisan y destruyen su contenido, liberando así nuevas bacterias que seguirán infectado al paciente (22).

2.1.5. Patogenicidad y virulencia

Las especies de *Brucella* tiene la capacidad de infectar a diferentes huéspedes causando una gran variedad de síntomas que pueden llegar a ser muy graves, el punto clave de la infección es la de entrada del patógeno es diversa, y dependerá del huésped. El contagio se puede dar porInhalación, transmisión cutánea, inoculación conjuntival o vía digestiva.

La aparición de la enfermedad también depende de la capacidad que tiene el huésped para restringir la multiplicación del patógeno (16). Una vez ocurre el contagio las bacterias pasan al sistema fagocítico mononuclear donde algunas de ellas son eliminadas, pero aquellas que logran evadir la respuesta inmune son transportados a linfa, que las conducirá a los ganglios linfáticos y torrente sanguíneo (16). Los ganglios linfáticos responden a la agresión por medio de una hiperplasia reticuloendotelial, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses(25).

Posterior a esto los polimorfonucleares neutrófilos y monocitos son los responsables de transportar las bacterias a diferentes órganos, como el hígado, bazo y médula ósea. Los microorganismos se multiplican en los macrófagos fijos de estos tejidos (16).Los anticuerpos humorales van dirigidos principalmente contra el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular que juega un papel muy importante en la resistencia, sin embargo (27).

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 epiteliales y formación de granulomas necrosantes, especialmente en bazo y huesos. Cuando el microorganismo infectante es *B. suis* o *melitensis* pueden aparecer, además abscesos (16).

Cuando la bacteria es internalizada en los fagosomas de los macrófagos, donde sobrevive gracias a que inhibe la fusión del fagosoma-lisosoma, mediante la acidificación rápida del medio, López A. (28) describió en su estudio que *B. abortus* escapa a la muerte dentro de los PMN, al producir guanosina 5' monofosfato (GMP) y adenina que inhiben esta fusión, con esta reacción también inhibe la activación del sistema mielo- peroxidasa-haluro y la producción del factor de necrosis tumoral. Además, produce superóxido dismutasa, que probablemente participa en las fases tempranas de la infección intracelular (28)(25). En células fagocíticas no profesionales, la internalización de *B. abortus* se asocia al dominio extracelular de la proteína tirosina quinasa ubicadas dentro del retículo endoplásmico rugoso (25).

El LPS es responsable de la producción de endotoxina debido a que el polisacárido O que es un antígeno T independiente que activa la respuesta inmune estimulando la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B sin la presencia de linfocitos Helper (14).

El LPS juega un papel importante en la patogenicidad de *Brucella* ya que se cree que altera la capacidad de la célula infectada para presentar antígenos extraños al CMH clase II (sistema de presentación de antígenos), y puede estar involucrado en la inhibición de la apoptosis de células infectadas, por lo tanto evade el ataque y muerte de la célula infectada por el sistema inmune (22).

El LPS también le otorga el aspecto a las colonias en el agar, que se clasifica como colonias lisas (S) o rugosas (R), las lisas son más virulentas debido a que poseen en su membrana externa PSO que le ayudan a bloquear el desarrollo de inmunidad innata e inespecífica durante la etapa temprana de la infección, y proteger así al patógeno de las actividades microbicidas del sistema inmune (22). Y las especies que poseen estas características son *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* conocidas como las que causan infección zoonótica (15). Por otro lado las cepas rugosas carecen del PSO por tal razón son menos virulentas debido a su incapacidad para superar el sistema inmune del huésped (22). Las especies que poseen esta membrana son *B. ovis* y *B. canis* (15).

Las cepas lisas de *Brucella* con mutaciones en el gen de fosfoglucomutasa involucradas en la síntesis de lipopolisacáridos de cadena O muestran una atenuación profunda de la virulencia lo que implica que la hace menos patógena tanto para los animales como para los humanos (22).

Hasta el momento no se conoce un mecanismo exacto de la patogenicidad de la bacteria ya que la localización intracelular le otorga la capacidad de resistir el efecto bactericida de los componentes del suero, como complemento y anticuerpos, además les permite adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células tanto fagocíticas y no fagocíticas. También se mantiene protegidas de los antibióticos, lo que hace que sea más difícil su tratamiento (28).

2.2. BRUCELOSIS HUMANA

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de tipo zoonótica, clasificada en el grupo de los síndromes febriles debido al polimorfismo clínico que posee se puede confundir no solo con patologías bacterianas si no también virales, esto hace que el diagnóstico sea demorado, errado o en muchos casos sub diagnosticado, a

su vez ayuda a que el proceso de infección se acelere y pase de un estado agudo a crónico; sin contar los casos asintomáticos, de reporte obligatorio en el mundo que afecta diferentes especies animales, los humanos también son afectados por algunas especies de este género (24).

Esta es una enfermedad sistémica que afecta a varios órganos según el tiempo y la evolución de la enfermedad (2). Y simula otras enfermedades, produce un cuadro febril agudo o sub agudo generalmente marcado por una fiebre intermitente acompañada de malestar, anorexia y postración, y que, en ausencia de tratamiento específico, puede persistir durante semanas o meses (24).

También es importante el período de incubación que difiere según la virulencia de la especie, la vía de entrada y la dosis infecciosa. Según la duración de los síntomas, se clasifica la enfermedad como aguda (< 8 semanas), sub aguda (8 a 52 semanas) y crónica (>52semanas). La enfermedad es aguda en aproximadamente la mitad de los casos, con un período de incubación de dos a tres semanas. En la otra mitad, el inicio es insidioso, con signos y síntomas que se desarrollan en un período de semanas a meses a partir de la infección (2)(29). En el cincuenta por ciento de las personas la fiebre es el síntoma más común teniendo una aparición repentina durante la noche. Los pacientes que no son tratados presentan patrones de fiebre ondulante y escalofríos(2)(29).

La brucelosis aguda se caracteriza por producir fiebre intermitente. Malestar, dolor de cabeza, pérdida de peso, artralgia, mialgia, estreñimiento, anorexia y dolor de espalda La presentación aguda es causada con mayor frecuencia por *B. melitensis*. La brucelosis sub aguda es una forma típica y clásica con fiebre ondulante descrita en áreas endémicas. Los síntomas son leves con fatiga, dolor de cabeza y mialgia. Además, las infecciones localizadas como las osteoarticulares se observan con mayor frecuencia. Los pacientes con tratamiento incompleto también se incluyen en forma sub aguda. La brucelosis crónica generalmente se debe a la persistencia de un foco de infección localizado en alguna parte del cuerpo como un hueso,

articulaciones, riñón, hígado o bazo. Los síntomas comunes observados son debilidad, fatiga, depresión, dolor de cabeza e insomnio (2)(29).

Cuando la enfermedad es de tipo crónico puede haber implicación del hígado, el bazo y/o ganglios linfáticos. La fase aguda puede progresar a una crónica con recaída, desarrollo de infección localizado un síndrome no específico que se asemeja al "síndrome de fatiga crónica". La enfermedad siempre es causada por la infección con una especie de *Brucella*, entendiéndose que no todas afectan al hombre ni casan la misma intensidad en los síntomas, el diagnóstico debe ser respaldado por pruebas de laboratorio que indiquen la presencia del microorganismo o una respuesta inmune específica a sus antígenos(24).

El riesgo de enfermedad y su gravedad está determinado en gran medida por el tipo de especie al que está expuesto un individuo. Esto también es influenciado por la especie de animal que actúa como fuente de infección. Buzgan T. 2009(30), realizó un estudio de la sintomatología causada por *Brucella* en 1.028 pacientes infectados y se correlacionaron con la carga bacteriana, donde se encontró (afectación osteoarticular, neurobrucelosis como síntomas graves) esto indica que el estado de la enfermedad es crónica a falta de un diagnóstico temprano(30). Los síntomas más frecuentes fueron artralgia, fiebre, hepatomegalia y fatiga. Todas las identificaciones se realizaron por medio de técnicas directas de cultivo a partir de muestras de médula ósea, sangre y LCR los pacientes analizados tuvieron una tasa de recaída del 4,7% (30).

La población que más se ve afectada por el contagio de esta bacteria son los ganaderos, médicos veterinarios, operarios de plantas de beneficio animal, los cuales deben minimizar el contacto con animales potencialmente enfermos usando prendas de protección que eviten el contacto de fluidos con la piel (31).

2.2.1. Especies que infectan al hombre

2.2.1.1. *Brucella melitensis*

Ese tipo más frecuentemente informado como causa de enfermedad humana, aunque es generalmente patógena para ovejas y cabras, aunque puede infectar a los ovinos y accidentalmente al hombre(19). Es el más virulento y está asociado con la enfermedad aguda severa debido a que algunos pacientes presentan el tipo crónico de la infección y se puede deber al órgano donde la bacteria se ubica, este puede ser un hueso, los riñones, el hígado o el bazo (2). Se registra como endémico en varios países del mundo, aunque en Colombia no se han reportado casos humanos ni animales, pero en otros países de América Latina representa una cantidad desproporcionada de brucelosis humana y animal. Este microorganismo normalmente se asocia con infección en ovejas y cabras, la mayoría de casos reportados ocurren en países del Medio Oriente (24).

Además esta especie posee tres biovariedades 1, 2 y 3 las tres causan enfermedad en el hombre y la diferencia entre ellas es la distribución geográfica para cada biotipo (32). Esta especie es la que menos se ha distribuido en el mundo debido a que sus brotes son ocasionales en países sub-desarrollados, es considerada una enfermedad no ocupacional en donde su contagio es por el consumo de productos lácteos o cárnicos contaminados con la bacteria(32).

Es capaz de crecer en Agar sangre o suero triptona glucosado en ambiente aerobio, no requiere CO₂ y produce H₂S se puede ver inhibido por la presencia de fucsina o tionina en el agar. Puede hidrolizar la urea(19), Su morfología es similar a *B. suis* debido a la expresión de lipopolisacárido en la superficie de las bacterias(15).

2.2.1.2. *Brucella abortus*

Es la especie que se encuentra mayormente distribuida en el mundo, pero se asocia con menos de enfermedad en humanos. La infección en el hombre a menudo es sub clínica y, cuando se produce por lo general es menos grave que la causada por *B. melitensis* o *B. suis*. El ganado es la principal fuente de transmisión (24).

Este Patógeno posee un fuerte lipopolisacárido (LPS) inmuno-dominante, el que junto con la capacidad de sobrevivir en el interior de células fagocíticas constituyen sus principales factores de virulencia(25), posee siete biovariedades reconocidas de las cuales 1, 2, 3, 4 y 9 son las más reportadas, la Biovariedad 1 es la más frecuente en América Latina y puede permanecer viable en el suelo durante mucho tiempo, especialmente si el grado de humedad es el adecuado y la presencia de materia orgánica la hace más resistente (33).

Para el cultivo bacteriológico se debe usar agar selectivo (TSA) que no contenga tionina ya que esta inhibe el crecimiento de la bacteria. Las características morfológicas son colonias no pigmentadas, no hemolíticas y puntiformes después de 48 horas de incubación en CO₂ (16). Es causante de la brucelosis bovina que induce aborto y esterilidad en el ganado también provoca enfermedad zoonótica en los humanos de carácter ocupacional en países desarrollados donde el contacto con animales es alto y la sintomatología es clasificada como crónica afectando diferentes órganos(32).

Su ADN contiene un porcentaje guanina-citosina G+C de 58-59% y el tamaño total del genoma se ha estimado en aproximadamente $2,5 \times 10^6$ pares de bases (25).

2.2.1.3. *Brucella suis*

Epidemiológicamente es la especie menos distribuida en el mundo generando enfermedad en países desarrollados siendo de carácter ocupacional, como fuente de infección en humanos puede ser tan grave como *B. melitensis*, la fuente y la virulencia dependerá según la biovariedad, de las cuales esta especie posee 5, donde 1 y 3 generan enfermedad zoonótica grave en el hombre y la 2 genera infección en cerdos (32), es moderadamente resistente si está expuesto al medio ambiente, y el tiempo de supervivencia del microorganismo disminuye a medida que aumenta la temperatura pero puede sobrevivir a la desecación (33).

El crecimiento en agares selectivos se observa después de 2 días de incubación y se debe tener precaución con la presencia de fucsina en el medio de cultivo ya que puede afectar el crecimiento de las colonias, no requiere presencia de CO₂ para un crecimiento óptimo, la morfología de las colonias son redondas de 1-2 mm de diámetro, con bordes lisos, translúcidas y de color miel pálido a la luz del día en medio transparente. Vistas desde la superficie son convexas y de color blanco perla en el transcurso del tiempo las colonias se hacen más grandes y se tornan más oscuras, si presentan cambio morfológico se puede asociar a cambios en la virulencia de la cepa (32).

Otras pruebas bacteriológicas de confirmación son ureasa donde esta cepa reacciona más rápido que *B. abortus* o *B. melitensis*, también la prueba metabólica de la oxidasa es una prueba que puede utilizarse para diferenciar a *B. suis* de otras especies en fase lisa (32). Estas cepas suelen reaccionar con el suero mono específico A, aunque algunas pueden reaccionar en función del biotipo con los antisueros mono específicos A y M, o bien con el antisuero M. estas no son lisadas por el fago Tb pero son lisadas parcialmente por el fago Fi y lisadas por los fagos Wb(19).

El genoma de *Brucella suis* contiene 13 copias del sitio de inserción IS711 donde el contenido de G+C de los dos cromosomas es casi idéntico entre las especies lo que las diferencia genéticamente debido a que existen fragmentos únicos cada genoma(19).

Se ha implementado una vacuna que únicamente genera inmunización a los cerdos, si se le es suministrada a otra especie animal la protección es menor y puede provocar abortos, fue elaborada a partir de la cepa 2 de *B. suis* (S2).

El tratamiento para los pacientes con brucelosis es la administración de dos antibióticos en combinación Doxiciclina con Estreptomicina, esta mezcla ocasiona menos recaídas de formas agudas y localizadas de la enfermedad, si se realiza administración de un solo antibiótico no se puede garantizar que se inhiba la multiplicación intracelular de la bacteria, el periodo de administración es de 6 a 8 semanas según la evolución del paciente (34).

2.2.1.4. *Brucella canis*

Es la especie responsable de la brucelosis en caninos, generando una importante de falla reproductiva. Aunque *B. canis* es zoonótica, la enfermedad rara vez aparece en humanos (21).

Se han informado casos de *B. canis* en Estados Unidos, Canadá, México y América del Sur, Es probable que *B. canis* se encuentre en casi todo el mundo; sin embargo, Nueva Zelanda y Australia parecen estar libres de este organismo. La enfermedad puede ser asintomática y crónica, al igual que la infección producida por *B. abortus*; pueden pasar meses, e incluso años, antes de presentarse sintomatología¹⁰. A nivel mundial se han documentado, desde 1968, cada vez más casos de infección humana por esta bacteria, con un incremento en los últimos años de casos reportados en personas con inmunidad competente, así como inmunosuprimidas (69).

En Colombia, la bacteria fue aislada de una persona asintomática, conviviente con caninos infectados, y fueron reportados dos médicos veterinarios con serología positiva y sintomatología compatible con la infección (datos sin publicar)

Bioquímicamente *B. canis* no requiere CO₂ para su crecimiento adicional a esto no produce H₂S pero tiene una alta producción de ureasa, la similitud antigénica entre esta especie y *B. ovis* se genera la prueba rápida de aglutinación en placa ya que es más específico debido a los antígenos solubles usados en la prueba.}

Un resultado negativo en la realización de un hemocultivo no debe ser considerado como definitivo por lo general los animales infectados presentan altos títulos de anticuerpos circulantes que persisten por varios meses, por ende se deben realizar otras pruebas para la confirmación de la infección (70).

2.2.2. Respuesta inmune frente a la infección por *Brucella*

En estados tempranos de la infección, el rol de la respuesta innata es reducir el número inicial de bacterias promoviendo una respuesta Th1 en el huésped. Los macrófagos, los neutrófilos, las células Natural Killer (NK) y el complemento juegan un rol clave en esta fase temprana de la respuesta a la invasión frente a este microorganismo(25).

Como respuesta a la infección por una bacteria Gram negativa, el huésped es expuesto a dos estructuras antigénicas diferentes como el LPS y las proteínas, que ejercen diferentes formas de activación en el sistema inmune, esta activación tiene la participación de la inmunidad innata, como los neutrófilos, macrófagos(16)y el complemento (C) que es uno de los primeros eventos que ocurren después de la entrada de la Bacteria al organismo, por lo tanto, la lisis estaría mediada principalmente por la vía clásica del complemento, la cual es dependiente de anticuerpos (25).

Diferentes células del sistema inmune están implicadas en la evasión y éxito de reproducción de la bacteria, uno de ellos son los macrófagos jugando un rol central en la respuesta inmune frente a *Brucella*, ya que actúan como células fagocíticas profesionales y como células presentadoras de antígenos (25). Procesan antígenos intracelularmente y los presentan en Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) a los linfocitos T, promoviendo de esta manera la respuesta inmune adaptativa(25).

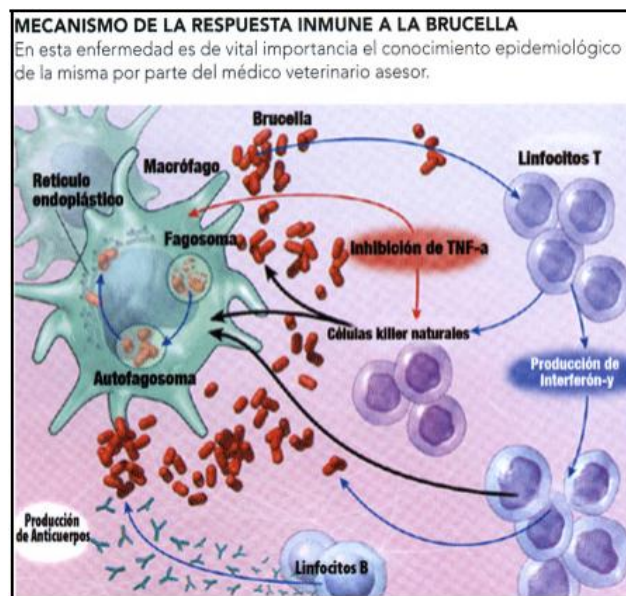
El LPS de *Brucella* interfiere con la vía de presentación de antígenos por MHC clase II, pero este es capaz de inhibir estos mecanismos de destrucción gracias a que el LPS es considerado un antígeno T independiente, capaz de activar a los linfocitos B (LB) sin la participación de los LTH (16). Las funciones bactericidas de los macrófagos se encuentran centradas en la actividad de las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno, las cuales son inducidas por IFN- γ y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Los receptores Toll-like (TLR) juegan un rol importante en el inicio de la respuesta inmune innata. Estos receptores que se encuentran en la superficie de las células fagocíticas profesionales reconocen productos microbianos donde se unen directamente a ellos e inducen señales intracelulares que activan factores de transcripción que modulan la producción de citoquinas(25).

Por otra parte las células encargadas de generar una defensa temprana frente a una infección son los neutrófilos gracias a que la opsonización de las bacterias por anticuerpos y complemento facilita su fagocitosis(16), En los casos en que la bacteria no es opsonizada se ha demostrado que tiene la capacidad de penetrar a través de los receptores de lectina o fibronectina, además de otros receptores desconocidos(25).*Brucella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse debido a que evitan la degranulación de los neutrófilos, para que no se libere mieloperoxidasa, y de esta forma ser transportada a los tejidos linfoides(16).

Se ha demostrado que *Brucella* posee mecanismos que inhiben esta degranulación y evitan así su destrucción aumentando su tiempo de supervivencia en el interior de las células infectadas(16).

Otras células que reaccionan ante la presencia de *Brucella* son los macrófagos, donde el ingreso de la bacteria a los mismos se produce a través de la interacción entre CD14 y el LPS. Esta interacción induce la producción de IL-12 que estimula las células NK y los linfocitos T helper, que secretan IFN, favoreciendo el desarrollo de una respuesta inmune mediada por LTH-1 (16) en la figura 3 se observa la respuesta que tienen las células frente a la bacteria.

Figura 3. Esquema simplificado de respuesta inmune frente a la infección por *Brucella*(35).



Las células Natural Killer una vez que son activadas por *Brucella* generan una reacción lítica, estimulando la producción de (IL-12) por parte de las células presentadoras de antígenos. IL-12 además estimula a las células NK a secretar IFN-γ (25).

Los primeros anticuerpos que se generan en el curso de una infección son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA, en infecciones crónicas aparecen anticuerpos no

aglutinantes, estos anticuerpos se diferencian de los anticuerpos completos en la incapacidad de activar complemento por cualquiera de las vías o dar adecuadas reacciones de aglutinación(16).

Martin R. demostró que esta bacteria tiene la capacidad de prevenir la apoptosis de los macrófagos infectados aumentando la concentración de la bacteria. las células dendríticas son usadas por la bacteria para resistir el ataque por del sistema inmune, causando en ellas inhibición de la maduración celular y por ende afectando el procesamiento de antígenos (36).

El TNF-alfa parece contribuir a la formación de los granulomas que se observan en los tejidos infectados. Se ha detectado tanto en brucelosis humana donde también se observa un incremento en la producción de IL-6, aunque su rol no está completamente definido (16).

La inmunidad adaptativa está mediada por células siendo el mecanismo efector más relevante en la protección frente a *Brucella* debido a que es un parásito intracelular. Las citoquinas son moléculas clave para una adecuada respuesta inmune mediada por células. La exposición prolongada a la bacteria cambiaría la naturaleza de la respuesta inmune, desde una inmunidad mediada por células hacia una res-puesta humoral (caracterizada por la producción de IgM e IgG1), respuesta que se relaciona con una disminución en la actividad de las células T ayudadoras tipo 1, con una baja en la producción de INF- γ (25).

La respuesta inmune adaptativa en la brucelosis se basa principalmente en tres mecanismos. Primero, la producción de IFN- γ por células T CD4+, CD8+, y células T. Segundo, la citotoxicidad de células T CD8+ y células T que eliminan macrófagos infectados. Y tercero, isotipos de anticuerpos Th1, tales como IgG2a que opsonizan al patógeno para facilitar su fagocitosis (25).

2.3. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD

2.3.1. Ciclo de vida de *Brucella*

El contagio a los humanos ocurre generalmente a personas que tienen contacto directo con animales infectados vivos o en la manipulación de productos cárnicos o



lácteos contaminados, se considera que es una enfermedad profesional de veterinarios, carniceros, granjeros y ganaderos. Ya que están principalmente expuestos a la sangre, orina, descargas vaginales, fetos abortados y placentas de animales infectados donde se encuentran gran cantidad de microorganismos que pasan al hombre a través de la piel. los carniceros en los mataderos que no cuenten con la suficiente capacitación al manipular carne y tengan heridas en sus manos permitirán el ingreso de la bacterias (37) el ciclo de transmisión de la enfermedad se puede visualizar en la figura 4.

FIGURA 4. ciclo de transmisión de la brucelosis obtenido de blog sobre *Brucella* (37)

Otra forma directa de contagio es mediante la manipulación errónea de cepas en el laboratorio, debido a que es una fase crítica donde cualquier contacto con esta permitirá el ingreso al cuerpo, se recomienda que los laboratorios que manipulen estas bacterias tengan un nivel de bioseguridad tipo 3 para prevenir a toda costa la diseminación de la infección.

La forma de contagio más común en los inicios de la enfermedad se debido a un contacto indirecto por el consumo de productos lácteos o cárnicos contaminados, debido a la gran cantidad de bacterias presentes en la leche y productos lácteos no higienizados (queso, mantequilla, requesón, nata, etc.) (37)(38).

Una tercera vía, aunque menos importante, es a través del aparato respiratorio por inhalación del aire de mataderos, establos o la producción de aerosoles en los cultivos de laboratorio, esta es la forma de contagio menos común y de la que menos casos se han reportado (37)(38).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

2.3.2. *Brucella* a nivel mundial

Es una enfermedad distribuida a nivel mundial con alrededor de 500.000 nuevos casos anuales en humanos y una incidencia de 0.01 a 200 por 100,000 habitantes en el 2007 (39). El inicio de la infección radica en zonas del Mediterráneo y Medio Oriente, donde la tasa de prevalencia es de más de 10 casos por 100.000 habitantes en algunos países. Por cada caso notificado 26 casos no se detectan o se subdiagnostican, la mayoría de regiones de Irán son endémicas para la enfermedad, especialmente las áreas donde existe manipulación de ganado, Según el informe del Ministerio de Salud y Educación Médica, basado en la incidencia de brucelosis en Irán, las provincias se clasifican en cuatro dependiendo del tipo de contagio de la zona, donde la incidencia anual de brucelosis humana es de 43 por 100.000 habitantes(39).

Todos aquellos países donde se manipula ganado tienen el riesgo de poseer la infección por *B. abortus*, aunque en 2008 algunos países de Europa, Canadá, Japón, Nueva Zelanda y Australia fueron declarados oficialmente libres de brucelosis para el ganado bovino, ovino y caprino. Pero también en el mismo año se reportaron nuevos casos de brucelosis en quince países que no eran libres de la enfermedad.

Estados Unidos ha logrado erradicar la infección ocasionada por *B. abortus* en la mayoría de estados, la infección aún persiste en animales salvajes de la zona de Yellowstone y sus alrededores (33).

La brucelosis ocasionada por *B. suis* se ha relacionado a la Biovariedad 1 se encuentra presente en el continente Americano y en Asia, mientras que la Biovariedad 3 se ha reportado en China, Estados Unidos y Europa. La prevalencia es generalmente baja en Europa la situación epidemiológica varía según la

ubicación y la regulación de la ciudad, aunque ocasionalmente se informan brotes esporádicos e infecciones emergentes(33).

B. melitensis es aislada en pequeños rumiantes en áreas del Mediterráneo, Oriente Medio y América Latina se encuentran presentes las biovariedades 1 y 3(33). En los países donde existen estudios epidemiológicos se realizan estrategias destinadas al control y erradicación de la brucelosis que se establece en base al contexto epidemiológico de cada país o región, esto depende del apoyo y la colaboración de los ganaderos, y su eficacia se relaciona con la calidad del servicio veterinario y de las organizaciones administrativas involucradas, puesto que las herramientas diagnósticas y profilácticas ya están validadas y estandarizadas(33).

La OMS reporta cada año 500.000 nuevos casos de brucelosis humana que solo representan el 4% de los casos que realmente ocurren; a pesar de ser de notificación obligatoria, las estadísticas oficiales no reflejan el número de individuos que se infectan anualmente debido al subdiagnóstico(40).

2.3.3. *Brucella* en América Latina

Según los datos de la organización mundial de salud animal OIE por sus siglas en inglés para el 2006, América del Sur fue considerada como zona endémica de brucelosis humana, En Latinoamérica, la mayor incidencia se presenta en Argentina, Perú, México, seguidos por Colombia, Chile y Ecuador; en nuestro país, los estudios se han limitado a la determinación de prevalencias en población de alto riesgo como los trabajadores de mataderos, y médicos veterinarios, además de los estudios realizados en animales (39).

En 2000 Klaus N.(42) realiza una revisión sobre la presencia, ausencia o falta de información de la infección ocasionada por *Brucella* en diferentes países de América latina que se puede identificar en la tabla 2. Donde indica que para este año Colombia presenta infección por *B. Abortus*(42).

B. melitensis es prevalente en Perú y el oeste de Argentina, *B. abortus* se encuentra en el este de Argentina. En 2006 Pappas P.(41) realiza un estudio de control y erradicación de la enfermedad en países como México y explica que esta no puede erradicarse a través de programas nacionales de control, debido a la inmigración de personas y animales de otros países que permiten de nuevo el ingreso de la infección a diferentes zonas del país, por ende se recomienda emprender un plan global o por lo menos continental de erradicación (41).

Tabla2.Distribución de la infección por especies de *Brucella* en países de América Latina, modificada (42).

País	<i>B. abortus</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. melitensis</i>
Argentina	Presencia	presencia	Ausencia
Bolivia	Presencia	presencia	Presencia
Brasil	Presencia	presencia	Ausencia
Colombia	Presencia	Ausencia	Ausencia
Chile	Presencia	Ausencia	Ausencia
Perú	Presencia	Sin inf.	Sin inf.
Venezuela	Presencia	presencia	Ausencia

En 2007 Lucero N (14) público un estudio donde se realizó aislamiento a partir de muestras positivas obtenidas de diferentes especies animales y humanas provenientes de diversos países de América Latina en un periodo de tiempo específico de 1968-1991 donde se confirmó la positividad de las muestras mediante técnicas directas e indirectas (aglutinación mono específica) pero no se hicieron pruebas moleculares para la clasificación por especie (14).

El estudio indica que en Colombia se presenta infección en humanos y animales de producción y la especie responsable que más afecta al país es *B. abortus* y en menor cantidad *B. suis* las cuales producen enfermedad de tipo ocupacional por el contacto directo con animales infectados(14).

Según la OMS en América latina los países que demuestran tener mayor incidencia de la enfermedad son Argentina, México y Perú, seguidos de Colombia, Chile y Ecuador. Argentina es uno de los países más afectados por esta enfermedad por tal razón la FAO/OMS, comité expertos en brucelosis llamó la atención por el valor

limitado de las pruebas serológicas en individuos expuestos repetidamente a *Brucella*, ya que pueden encontrarse positivos en ausencia de síntomas(40).

En México se notificó oficialmente una tasa promedio de morbilidad de 6,98 casos por 100.000 habitantes en el periodo de 1988 a 1993 registrándose cerca de 6.000 casos por año. Hasta la fecha no se ha aislado *B. canis* en el hombre (40).

Perú en el año 2004 registró 1.116 casos de brucelosis humana, principalmente en las ciudades de Lima y Callao, en las que la prevalencia es el 95% de los casos notificados en el país por el hábito de consumir queso proveniente de la leche de cabra sin pasteurizar (40).

2.3.4. *Brucella* en Colombia

El documento Colombia sanidad animal del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en el 2010 reporta los análisis serológicos realizados a diferentes especies animales incluyendo seres humanos por medio de técnicas indirectas los pacientes fueron remitidos al centro de diagnóstico del ICA por los servicios de salud con sintomatología compatible con brucelosis no se reporta si la causa del contagio estuvo relacionada por contacto con bovinos u otras especies, consumo de lácteos crudos, manipulación de fetos y órganos de la reproducción en mataderos o por manejo de la bacteria en el laboratorio (43)(44). Se debe tener en cuenta que existen factores que dificultan el diagnóstico en humanos como el periodo de incubación y el tipo de análisis realizado (45).

Colombia posee antecedentes de la enfermedad en 25 de los 32 departamentos del país, donde existen diagnósticos positivos áreas de Arauca, Bolívar, Boyacá, Córdoba, Cundinamarca, Magdalena, Nariño, Sucre entre otros, donde la enfermedad deja perdidas económicas de tres a diez millones de pesos por animal infectado al año, de acuerdo con los cálculos efectuados por FEDEGÁN (FNG), donde el costo por día se estima en \$21.000 pesos colombianos, a lo cual se incrementan sobrecostos asociados a la confirmación diagnóstica, incapacidad laboral y tratamiento médico del personal afectado (4).

El país actualmente cuenta con la resolución 7231 de 2017 que deroga la resolución 840 de 2011 en donde se establecen las medidas sanitarias para la prevención, control y erradicación de la brucelosis en las especies bovina, bufalina, ovina, caprina, porcina y equina(7) apoyado en este documento el ICA reporta que para el 2015 el país cuenta con tres zonas libres de Brucelosis bovina, donde se encuentra la provincia de García Rovira en Santander, Los municipios de Soatá, Boavita, Tipacoque, Covarachia, San Mateo, la Uvita, Chiscas, El Cocuy, Espino, Guacamayas, Guican, Panqueba, en el departamento de Boyacá y el archipiélago de San Andrés y Providencia (13).

Apoyando el programa del ICA la secretaria de salud a nivel de Cundinamarca reporta que en la provincia de Ubaté se han realizado charlas de concientización sobre la brucelosis, forma de contagio y prevención, en este proyecto se adelantaron muestreos, análisis y certificación de predios ganaderos, esta actividad conto con el apoyo del (ICA), y la asociación de ganaderos de Ubaté, esto con el fin de erradicar en esta zona del país la enfermedad y así disminuir el posible contagio zoonotico a los trabajadores.

Según informes de sanidad animal del Instituto Colombiano Agropecuario ICA entre 2000 y 2006 la prevalencia de brucelosis en Colombia alcanzó cifras hasta del 7%, en animales examinados y del 27%, en predios.

En Colombia, *Brucella abortus* afecta a los bovinos y produce en hembras altas tasas de abortos durante el último tercio de la gestación, retención de placenta, infertilidad, nacimiento de crías débiles y orquitis en machos. Es importante destacar que la infección en el ganado depende de la edad, del estado reproductivo e inmunológico, de la resistencia natural, de la vía de infección, de los cambios infecciosos y de la virulencia de la cepa infecciosa (4).

Es transmisible a humanos, ocupacionalmente expuestos, y se estima que, en América Latina, las pérdidas económicas anuales, generadas por la brucelosis bovina, son aproximadas a las \$600 millones de dólares (4).

Según Pappas et al.(41) la incidencia en Colombia es de 1,85 casos, cifra que requieren ser estudiadas y correlacionadas con la enfermedad en animales, para estimar la prevalencia de la brucelosis. Y con una prevalencia para el mismo año de Colombia, 4,7% en brucelosis bovina(41).

En el país el ente regulador del diagnóstico de brucelosis bovina es el ICA que bajo la resolución 7231 de 2017 estipula que se debe realizar mediante pruebas indirectas o moleculares como PCR aunque no estén estandarizadas, y estas solo pueden ser realizadas en laboratorios autorizados por la institución donde todos los

resultados son de reporte obligatorio para de esta manera identificar las zonas del país afectadas (7).

La OMS también recomienda confirmar los resultados positivos de esta prueba por SAT. Esta prueba se describió en 1897 detecta anticuerpos contra el lipopolisacárido liso (s-LPS), el principal antígeno de la bacteria. SAT mide la cantidad total de anticuerpos aglutinantes IgM. Los anticuerpos de tipo IgM desarrollan una aglutinación más fuerte. La reacción es lenta ya que requiere una incubación durante la noche a 37°C. SAT carece de especificidad y sensibilidad, aunque es económico y fácil de realizar(46). Es usada en el diagnóstico de la brucelosis aguda que en la crónica (2). Esta prueba es cuantitativa y se reporta

Colombia no reporta la presencia de *B. melitensis* en los diferentes departamentos, siendo una razón por la cual el impacto en la especie humana es bajo en comparación a otros países latinoamericanos(40).

El Laboratorio de Salud Pública del departamento de Magdalena desde el año 2005 hasta el 2008, diagnosticó 52 casos de Brucelosis humana, mediante la prueba de Elisa competitiva. En general no se conoce el comportamiento del evento en Colombia, en consecuencia es importante mencionar que no se cuenta con datos como línea de base que permitan conocer prevalencias e incidencias de la infección(40).

El ICA en el año 2013 se encargó de realizar en diferentes departamentos del país un estudio sobre la cantidad de personas infectadas con *Brucella* donde se analizaron sueros de 1.273 humanos (378 mujeres y 895 hombres). Obteniendo 56 positivas (38 hombres y 18 mujeres) en los departamentos de Arauca, Atlántico, Bolívar, Caldas, Caquetá, Casanare, Cesar, Meta, Nariño, Sucre y Tolima tabla 3 (47).

Tabla 3. Brucelosis en humanos seropositivos según sexos en Colombia 2013 (47).

DEPARTAMENTO	HOMBRES POSITIVOS	MUJERES POSITIVAS
ARAUCA	7	0
ATLÁNTICO	7	4
BOLÍVAR	5	7
CALDAS	1	1
CAQUETÁ	5	0
CASANARE	2	1
CESAR	1	0
META	7	1
NARIÑO	1	3
SUCRE	0	1
TOLIMA	2	0
TOTAL	38	18
TOTAL GENERAL	56	

2.5. DIAGNOSTICO EN HUMANOS

2.5.1. Identificación del agente

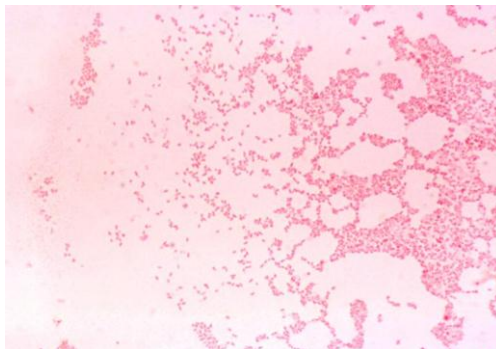
Debido a que el cuadro clínico de los pacientes con brucelosis no es claro ya que esta enfermedad presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas, es esencial realizar pruebas bacteriológicas y serológicas que aporten un resultado confiable sobre el estado del paciente, los resultados contribuirán a la identificación correcta del patógeno, para esto los métodos directos son ideales, la realización del cultivo bacteriológico y algunas pruebas bioquímicas además de la coloración e identificación microscópica (48).

El cultivo presenta un inconveniente de gran importancia debido al alto riesgo de contagio que tiene el bacteriólogo al manipular estas cepas, además que debe estar muy capacitado para la entrega de resultados confiables.

El cultivo que se realiza a partir de muestras como sangre, médula ósea, LCR, heridas o pus, su crecimiento es lento y la colonia se puede observar a partir del tercer día de incubación(48).

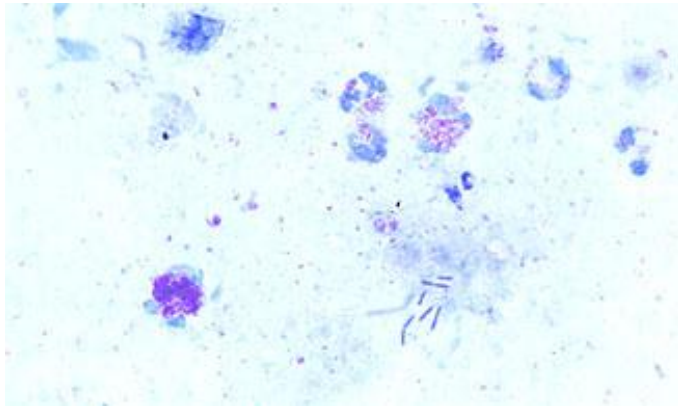
Para la observación microscópica de la bacteria se puede realizar la coloración de Gram a partir de cultivo, usando la técnica de Gram como se puede observar en la figura 5 donde hay cocobacilos pequeños Gram negativos identificada como *B. melitensis*(48).

Figura 5. Coloración de Gram para *B. melitensis* cocobacilos pequeños Gram negativos (49).



Para la visualización de las bacterias en las muestras se debe realizar la tinción especial de Stamp donde la bacteria se tiñe de un color rojo en un fondo azul, como se observa en a figura 6, si alguna de las dos coloraciones es positiva, es imprescindible el aislamiento, para que el diagnóstico sea definitivo(49).

Figura 6.Tinción especial de Stamp positiva, Brucella teñida de color rojo en un fondo azul (48).



Las pruebas bioquímicas aportan gran información y son guía para la identificación de especies, los puntos claves son, la ureasa que es positiva para todas las especies excepto *B. abortus*, igualmente la oxidasa es positiva para todas excepto *B. ovis*, la catalasa es positiva sin excepción alguna, el requerimiento de CO₂ dependerá igualmente de la especie por ejemplo *B. melitensis* cree muy bien sin CO₂ pero *B. abortus* requiere un porcentaje para tener un buen crecimiento, además de esto ninguna es fermentadora de glucosa ni lactosa, no utilizan los citratos pero si los nitratos (15).

2.6. MÉTODOS DIRECTOS

2.6.1. Cultivos

El diagnóstico bacteriológico de la brucelosis está muy limitado por el hecho de que *Brucella* es una bacteria peligrosa, y su aislamiento debe realizarse en laboratorios de nivel 3 especialmente equipados. Además, es un procedimiento muy laborioso y lento. Sin embargo, es considerado como el Gold estándar para su identificación y La biotipificación de las especies aisladas de las muestras biológicas, proporciona datos epidemiológicos significativos que permiten rastrear el foco de infección y las formas de su diseminación(46).

Los medios usados para la identificación de *Brucella* deben ser medios enriquecidos y nutritivos. El agar de primera elección es el Brucella base ya que posee triptona, peptona de carne y extracto de levadura, que constituyen los nutrientes necesarios para el crecimiento de la bacteria(50).

La brucelemia es más constante en las primeras fases de la enfermedad, sobre todo cuando esta es aguda y en menor intensidad cuando es crónica donde la bacteria se encuentra ubicada en los macrófagos de diferentes órganos. Por esta razón el hemocultivo toma importancia ya que si el paciente presenta una fase aguda las posibilidades de que este se haga positivo son altas y la muestra debe ser tomada en la fase febril, el porcentaje de aislamiento oscila entre el 90-95% de los casos(51).

El hemocultivo con medio bifásico Ruiz Castañeda permite observar las colonias en su fase sólida y a partir de ella hacer repiques para su purificación, en donde se puede usar el medio TSA y se debe hacer con ayuda de una jeringa, que evita el abrir la botella(15). Si a las 24 hora después de realizar el cultivo hay crecimiento visible en el agar, se debe descartar a botella debido a contaminación ya que la bacteria es de crecimiento lento y su desarrollo se llevará a cabo entre 4 y 5 días e incluso puede llegar a tardar más de seis semanas dependiendo de la especie(28). posterior al tiempo de incubación si es positivo se observara en la fase sólida pequeñas colonias en forma de lágrima (52).

La sensibilidad de los hemocultivo depende de varios factores, particularmente la fase de la enfermedad y los antecedentes del uso de antibióticos. Por ejemplo para la brucelosis aguda es de 80% y la del mielocultivo es del 90%. Pero en casos crónicos esta es solo de un 30%(24)(22)El crecimiento del microorganismo en este medio habitualmente ocurre entre los siete y veintidós días, aunque existen casos de crecimiento tardío que pueden llegar hasta los 35 días debido al crecimiento lento de la bacteria (51).

En la figura 7 Se puede observar el crecimiento *B. abortus* en Agar enriquecido con un 5% de sangre de caballo, este fue diseñado originariamente para el aislamiento de *Brucella spp.* La bacteria crece lentamente, necesitando un mínimo de 3 días hasta 2 semanas. La temperatura óptima de incubación es de 35°C. Son aerobios estrictos aunque algunas cepas requieren suplemento de CO₂(49).

Figura 7. crecimiento de colonias de *B. abortus* en Agar Brucella enriquecido (49).



El medio
ampliamente

selectivo de Farrell es
empleado ya que

permite un óptimo crecimiento de las colonias, como se observa en la figura 8. Además que por ser transparente facilita observar la morfología colonial; sin embargo, debido a la concentración de bacitracina *B. melitensis* puede ser inhibida; por esto, algunos autores recomiendan usar el medio Thayer-Martin modificado, que permite aumentar la sensibilidad del cultivo, pero con una menor selectividad y por tanto, se contamina con más facilidad que el de Farrell; además, no es transparente lo que dificulta la visualización de la morfología. Por otra parte el medio TSA es un medio general, que permite el crecimiento de cualquier tipo de bacteria pero se contamina con mucha facilidad.

Figura 8. crecimiento de *B. suis* en medio selectivo de Farrel(48).



La morfología macroscópica en su mayoría muestra colonias convexas y de color blanco perlado aunque también dependerá de la especie, si son cepas lisas se observarán colonias, lisas, convexas con bordes regulares, brillantes, azuladas y translúcidas. A medida que envejecen, las colonias se vuelven opacas circulares, y ligeramente opalescentes, Las cepas rugosas son opacas, amarillentas y cuando se tocan con un asa de inoculación son compactas. *Brucella* no es hemolítica en agar sangre (52)(28).

Se aconseja que antes de realizar el cultivo se realice catalasa y oxidasa, para las cuales *Brúcella* es positiva. Para identificar la especie, para identificar la Biovariedad se deben efectuar las siguientes pruebas bioquímicas especiales, requerimientos de CO₂(28).

2.7. MÉTODOS INDIRECTOS

Los métodos indirectos de diagnóstico de brucelosis se basan en la detección de la respuesta inmune frente a la infección ocasionada por esta bacteria. Donde el correcto diagnóstico de la enfermedad trae consigo un conjunto de valoraciones clínicas y de laboratorio para determinar que el paciente efectivamente está cursando con la infección, para esto el Gold estándar ha sido el cultivo de sangre y otros tejidos como médula ósea, sin embargo, no siempre es posible aislar bacterias especialmente en casos crónicos. Además el cultivo de esta bacteria aumenta el riesgo de contagio en el laboratorio generando un nuevo foco de infección para los manipuladores(46)(53).

Por lo tanto, el diagnóstico se realiza mediante técnicas indirectas de respuesta inmune, que se basan en la determinación de la presencia de anticuerpos contra el LPS de superficie lisa en suero mediante pruebas de aglutinación rápida (16). Estos anticuerpos tienden a persistir en pacientes mucho después de la recuperación; por lo tanto, en áreas endémicas, pueden ocurrir altos valores de fondo que pueden afectar el valor de diagnóstico de la prueba(22). Además de esto el antígeno del LPS liso tiende a mostrar reactividad cruzada con otras bacterias Gram negativas aumentando las posibilidades de tener resultados con falsos negativos (22). Se utiliza una variedad de pruebas como la Rosa de Bengala, la prueba de aglutinación en suero (SAT), Coombs que puede ser más adecuada para la confirmación de brucelosis en pacientes con recaídas o pacientes con enfermedad persistente (22)(53), prueba de aglutinación en placa (PAT), ELISA y prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFA). Estas pruebas son usadas para el diagnóstico de la brucelosis(16).

En Colombia el diagnóstico se realiza mediante pruebas serológicas, tanto en animales como en humanos, donde los principales afectados son médicos veterinarios y trabajadores de los mataderos, por tal razón Morales 2004 (3) realizó

un estudio para determinar la seroprevalencia de la brucelosis en trabajadores de mataderos del Departamento del Tolima. Donde se evaluaron 186 trabajadores con pruebas indirectas como (rosa de bengala, fijación de complemento y Elisa) los resultados indican que solamente siete muestras del total son positivas y únicamente una muestra presenta reactividad con las tres pruebas realizadas, esto indica que aunque en el país ya existe un programa de vacunación en animales se siguen presentando infecciones por contacto lo que indica que se deben reforzar los planes de control y erradicación de este tipo de enfermedades, si son positivos o negativos para el género, pero no se puede discriminar por especie y por departamento. El estudio se centra en este departamento debido a que es una zona de importante actividad ganadera, vacuna y bovina, en la cual la brucelosis se considera una zoonosis de importancia en salud pública y en la salud ocupacional, ya que gran parte de los contagios de brucelosis humana se consideran favorecidos por el trabajo(3).

Para determinar las biovariedades de las especies se realiza una aglutinación con sueros mono específicos donde se emplea suero monovalente es importante tener en cuenta la composición de las *mismas como por ejemplo B. abortus* puede contener antígeno A y las biovariedades que también lo tienen son 1, 2,3 y 6 el antígeno M lo poseen biovares 4,5 y 9 en forma de antígenos dominantes.

B. suis posee antígeno A en los biotipos 1,2 y 3 como antígeno dominante, y en el biotipo 4 posee los antígenos A y M, *B. melitensis* posee el antígeno M en el biotipo 1, y el antígeno A en el biotipo 2 como antígenos dominantes, y en el biotipo 3 puede poseer ambos A y M. Por consiguiente, cualquier cepa que aglutine con suero mono específico M, no es necesariamente *B. melitensis*; éste es un error que frecuentemente se comete, por desconocer la composición antigénica de los diferentes biovares de *Brucella*(28).

2.7.1. Rosa de Bengala

La prueba de Rosa de Bengala es una prueba de tamizaje rápida y económica que se usa como diagnóstico inicial de la brucelosis usando una suspensión de antígeno de *B. abortus* con un tampón de lactato a pH 3.6 coloreada con tinción de Rosa Bengala(54), un resultado positivo se notara una aglutinación como se observa en la figura 9. Donde se usó una dilución de 75 μ l de suero más 25 μ l de Rosa de Bengala, además es una prueba de aglutinación cualitativa utilizada en portaobjetos que depende de la reacción del suero y la suspensión bacteriana, es usada ampliamente como una prueba de detección con una alta sensibilidad. Sin embargo, se han informado resultados falsos negativos especialmente en casos crónicos de la infección (2). La aglutinación con Rosa de Bengala es una prueba muy económica y con una sensibilidad muy alta del 99%, pero tiene el inconveniente de una especificidad del 40%.

Figura 9. Aglutinación de sueros positivos con Rosa de Bengala (48).



Esta prueba es de utilidad en áreas rurales, en donde no es posible llevar a cabo la aglutinación en tubo y en casos en donde es muy importante un tratamiento temprano como en la neurobrucelosis, la artritis y la orquitis; pero habrá que tener en consideración que la enfermedad deberá ser corroborada por medio de una prueba confirmatoria (51).

2.7.2. Fluorescencia polarizada

Otro método interesante es el ensayo de fluorescencia polarizada (FPA). Se basa en el principio físico del cambio de velocidad de rotación dependiente de la masa de las moléculas en un medio líquido. Mientras más pequeña es la molécula, más rápido gira y se produce la despolarización de un haz de luz polarizado. Tiene una sensibilidad del 96.1% y una especificidad del 97.9% detecta casos agudos y crónicos, pero tiene el inconveniente de dar error con sueros con alto contenido de lípidos, y requiere de un polarímetro para su lectura, (55). La muestra utilizada para prueba es suero que se incuba con un antígeno de *Brucella* específico, conjugado con un marcador fluorescente. En caso de que haya anticuerpos anti-*Brucella* en el suero, se forma un gran complejo de antígeno-anticuerpo marcado fluorescentemente (46).

El método FPA se utiliza en programas para controlar y erradicar la propagación de la brucelosis, pero requiere un equipo especial, no es considerado como una prueba rápida. La respuesta seropositiva únicamente indica el género no proporciona ninguna información sobre el tipo de especie de *Brucella*, el momento de la infección (46).

2.7.3. Fijación de complemento

Es una prueba altamente específica y es la prueba de referencia internacional. 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 de lisis correspondientes. Se usa un antígeno soluble denominado HS que se prepara a partir de una suspensión bacteriana tratada con solución salina caliente. La finalidad de la prueba es

determinar la cantidad presente de anticuerpos: IgG1, donde un resultado positivo sería un título > de 1:20 (16)(56).

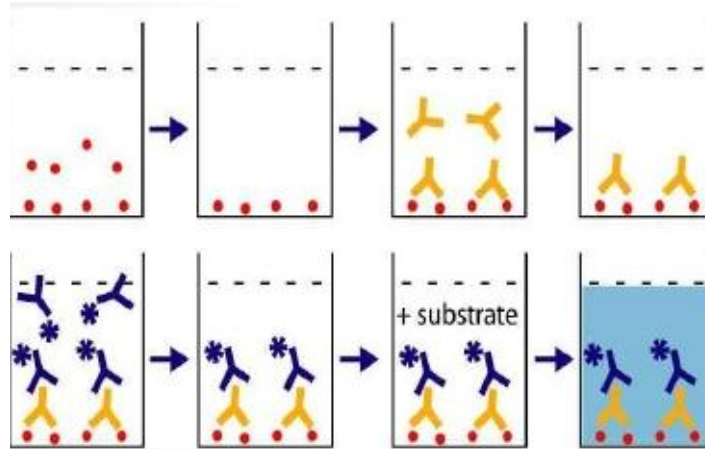
2.7.4. ELISA

ELISA es una técnica inmunoenzimática que se ha vuelto cada vez más popular como un método estandarizado para la brucelosis donde hay aglutinación y es una alternativa a la prueba de Coombs con sensibilidad y especificidad similar. Donde el antígeno usado es el LPS de la pared bacteriana de *B.abortus*. La prueba detecta rápidamente anticuerpos IgG e IgA tanto aglutinantes como no aglutinantes(2).

Se pueden generar falsos positivos con estas pruebas debido a que el LPS-O es similar al que poseen diferentes enterobacterias lo que reduce la especificidad de las pruebas. Este método diagnóstico es más sensible y específico y se recomienda en áreas endémicas y en individuos con recidivas de la enfermedad (46)(51).

La técnica se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Los componentes marcados con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmuno adsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable (Figura 10) a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (22).

Figura 10. Esquema de la reacción antígeno anticuerpo (32).



La técnica se basa en la detección de anticuerpos contra lipopolisacárido liso, el valor de corte puede necesitar ajuste para optimizar la especificidad cuando se usa en áreas endémicas, y esto puede influir en la sensibilidad(22).

2.7.5. ELISA competitiva

Es una prueba de unión primaria basada en el uso de un anticuerpo monoclonal específico para una porción, específica y repetida, de un epítipo de la cadena “O” del LPS liso de *Brucella*. El anticuerpo monoespecífico compite con los anticuerpos del suero por el antígeno que se fija al soporte sólido. Presenta menos reacciones cruzadas que las clásicas pruebas de aglutinación y se realiza en aproximadamente 2 horas (55).

Los anticuerpos encontrados pueden ser de tipo aglutinantes y no aglutinantes. Se utiliza para detectar casos agudos y crónicos, tiene una sensibilidad del 98.3% y una especificidad del 99,7%. además puede ser estandarizada (57). Se consideran positivos aquellos sueros con un porcentaje de inhibición mayor del 28% (16).

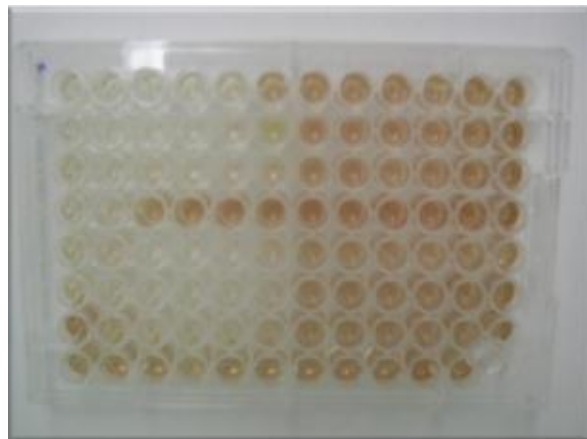
2.7.6. ELISA indirecta

La ELISA indirecta se basa en la unión específica de los anticuerpos presentes en la muestra con el antígeno inmovilizado. La unión se visualiza utilizando una reacción fluorescente o colorimétrica (46).

Los anticuerpos contra LPS liso usados en esta prueba presenta una gran desventaja y es que el polisacárido O es similar al presente en alguna bacterias Gram negativas lo que genera resultados falsos positivos y, por lo tanto, reduce la especificidad de la prueba(46).

La IELISA detectan predominantemente IgG y sus subclases, y la prueba de reacción de Wright detecta IgM. Por lo tanto, usando la combinación de estos métodos es posible obtener la cinética de la respuesta inmune y distinguir entre fases agudas y crónicas de la enfermedad(46).

Figura 11. Reacción colorimétrica (+/-) de ELISA indirecta (32).



La prueba de aglutinación 2-mercaptoetanol (2-ME) se realiza conjuntamente con la prueba de Wright tratando previamente el suero con 2-ME como agente reductor que inactiva los anticuerpos de tipo IgM. Es de baja sensibilidad y no existe consenso en cuanto al punto de corte (57).

2.8. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

2.8.1. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA-PCR

Con el fin de evitar las dificultades de las pruebas bacteriológicas, se adaptaron las técnicas de biología molecular, basadas en la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizan con éxito para la identificación y tipificación de *Brucella*(46), el paso más importante de este método es el aislamiento de ADN, debido a que de la calidad obtenida dependera la sensibilidad del ensayo (46,58).

El fundamento se basa en 3 etapas; la primera es la purificación y extracción de los ácidos nucleicos, la segunda es la amplificación de una secuencia específica que se encuentre distribuida en el genoma de la bacteria y por último detección de los fragmentos amplificados por electroforesis en gel de agarosa y bromuro de etidio o con sondas específicas (58).

La técnica se puede desarrollar con solo un par de cebadores específicos para las secuencias de ADN bacterianas, siempre y cuando estos estén dirigidos contra alguno de los siguientes genes. El operón de RNA ribosomal (16S y 23S), IS711 o BCSP31(46).

En el caso en el que se desee realizar una PCR multiplex para identificar las cuatro principales especies de *Brucella* se puede utilizar una combinación de varios pares de cebadores que permitan la amplificación de los genes BCSP31, OMP2B, OMP2A, OMP31, que codifican las proteínas de membrana externa(46).

Un estudio realizado por Morata y colaboradores(59) desarrollaron una técnica denominada PCR-ELISA como una prueba diagnóstica más precisa que otras pruebas serológicas y moleculares. Demostrando que esta es una técnica que alcanza una sensibilidad hasta del 94.9% y una especificidad del 96.5%, por lo que

se ha recomendado como el método diagnóstico de elección. Así mismo se ha demostrado que la utilidad del PCR no sólo es como un recurso de diagnóstico, sino que también tiene implicaciones pronósticas, ya que puede ser utilizada como evaluación de la respuesta terapéutica(59).

Esta técnica ofrece un apoyo importante para el diagnóstico de la brucelosis pero la sensibilidad y la exactitud de los métodos moleculares dependerán en gran medida del aislamiento del ADN y su calidad (especialmente para la PCR múltiple)(46). Todavía queda el problema de los resultados falsos negativos, porque la PCR se inhibe en presencia de algunas mezclas, como EDTA, ARNasas, ADNasas, heparina, y muchos otros(46).

También pueden ocurrir falsos positivos como resultado de la contaminación de la muestra, además, es necesario desarrollar controles positivos y negativos y estandarizar las condiciones para las reacciones de PCR con muestras clínicas(46).

2.8.2. PCR convencional

En la actualidad se han desarrollado pruebas de diagnóstico molecular que minimiza el tiempo de identificación, además se puede realizar identificación de la especie mediante una PCR basada en la amplificación selectiva del DNA presente en las muestras(21), para esto se deben tener iniciadores específicos que permitan la amplificación de un gen ubicado en cada una de las especies para que de esta manera se pueda realizar la diferenciación de las especies.

El primer estudio experimental que tuvo éxito en la diferenciación de especie fue el realizado por Bricker en 1994 (60), donde a partir de programas biotecnológicos generaron los primero iniciadores específicos para usar en una PCR multiplex como los que se muestran en la tabla 4, aunque en la actualidad el único que no presenta reacción cruzada entre especies es el iniciador que flanquea el gen IS711, pero esta

investigación contribuyo a mejorar y generar nuevos estudios en el campo del diagnóstico de brucelosis.

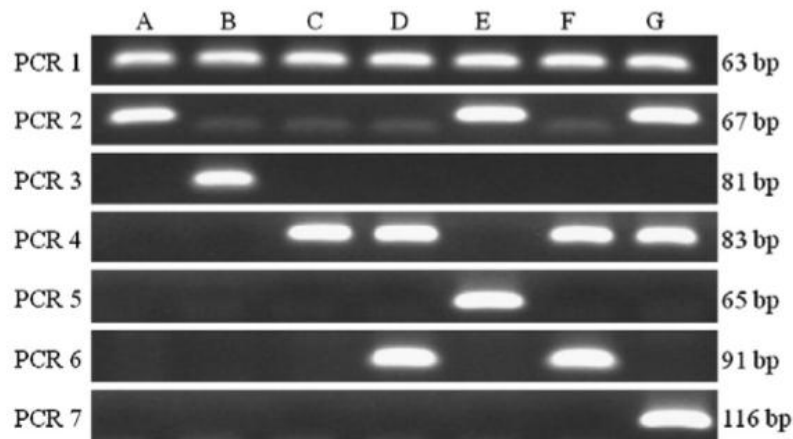
Tabla4. Secuencia de iniciadores usados en la PCR. Modificada deBricker y Halling(60).

INICIADOR	SECUENCIA 5´-3´
<i>B. abortuss pecfic</i>	GAC-GAAA-CGG-AAT-TTT-TCC-AAT-CCC
<i>B. melitensiss pecific</i>	AAA-TCG-CGT-CCT-TGC-TGG-TCT-GA
<i>B. suis</i>	GCG-CGG-TTT-TCG-GAA-GGT-TCA-GG
IS711 pimer	TGC-CGA-TCA-CTT-AAG-GGC-CTT-CAT

En la gran mayoría de iniciadores se modifica el que va dirigido contra el gen IS711 con el fin de generar menos reacciones cruzadas y aumentar la sensibilidad de las pruebas (61).

En 2008 Hinić ycolaboradores (62) realizaron una PCR convencional sensible y precisa donde aislaron 6 especies de *Brucella* que se observan en la figura 12, la técnica se basó en el loci genético de cada especie.*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae* en el cual se usaron marcadores genéticos únicos, para así identificar inicialmente en comparaciones in sillico las secuencias de genoma (62).

Figura 12. Fragmentos típicos obtenidos con una PCR convencional de varias especies de Brucella. Línea A *B. melitensis*, Línea B *B. abortus*, Línea C *B. suis*, Línea D *B. suis*, Línea E *B. ovis*, Línea F *B. canis*, Línea G *B. neotomae*(62).



Los iniciadores y sondas Taqman se construyeron basados en deleciones y coordenadas específicas de los cromosomas de cada especie. Las reacciones de PCR generaron un producto específico del tamaño esperando que se correlacionan con las especies de importancia para el estudio, demostrando que la técnica es sencilla y fácil de realizar y representa un enfoque altamente específico para la identificación del género, así como la diferenciación entre seis especies, además de esto se debe resaltar que el iniciador seleccionado para la identificación de *B. abortus* analizado con un programa de bioinformática muestra que es el único que se ancla específicamente a esta especie y no tiene otros puntos que puedan generar reacciones cruzadas en el diagnóstico (62).

A partir de la búsqueda de información se encontró que en diferentes países se ha realizado diagnóstico de algunas muestras con este tipo de técnica utilizando iniciadores específicos para cada especie como el citado anteriormente por Hinić y colaboradores(62)(63).

El iniciador usado en el estudio de Hasani (59)muestra hibridacion de 100% de identidad para *B. melitensis* con un peso molecular de 733 Pb, el ultimo iniciador para confirmar especie es el citado por Hänsel y Mertens(64) donde los iniciadores

hibridan perfectamente con el ADN de *B. suis* sin generar especificidad con las otras especies, aunque su banda es más pequeña. Los iniciadores IS711 son usados para la identificación del género, por ende si la banda es observada en el gel es diagnóstico que es positivo para *Brucella spp* esto se debe a que este es un sitio de inserción móvil presente en el genoma de todas las especies del genero pero en posiciones diferentes(59).

Sánchez y colaboradores (65) encontraron en su estudio que la realización de iniciadores para la detección de *B. abortus* en humanos por PCR presenta alta sensibilidad (100%) pero una especificidad del 98.3%, esto se puede deber a que se usaron muestras contaminadas. En casos de enfermedad real, se podrían presentar falsos negativos en los resultados de PCR, en muestras de pacientes que hayan recibido antibióticos o por la presencia de sustancias interferentes en las muestras como la misma hemoglobina, que puede inhibir la prueba (65).

2.8.3. PCR en tiempo real

Los primeros estudios de PCR en tiempo real se denominaron (HybProbe). Con el fin de identificar las especies de *Brucella* debido a la homología genética que existe entre ellas para garantizar un diagnóstico preciso mediante la curva de amplificación y un análisis de picos de fusión, en este estudio se buscaron polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) para diferenciar específicamente agentes etiológicos ubicados en la región conservada (16). Recientemente, se realizó un estudio donde se utilizó una prueba HybProbe de un SNP específico para distinguir *B. abortus* de otras especies de *Brucella* donde detectaron SNP's específicos de *B. abortus* en el gen *fbaA* del cromosoma II de *B. abortus*(66)(67).

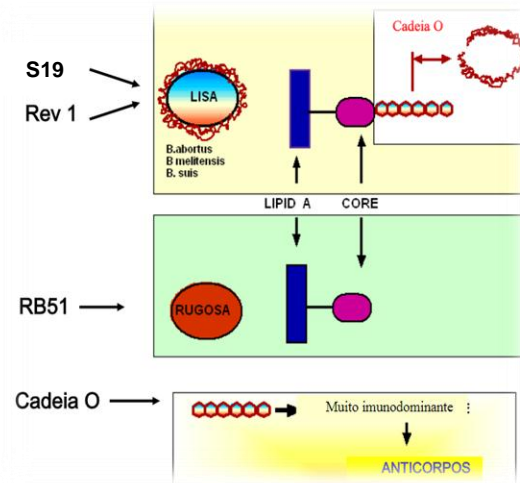
Lo anterior, podría explicar la razón de las recidivas de la enfermedad y plantearía la posibilidad de que la brucelosis una vez adquirida, permanece como una infección latente(51)(67).

2.9. VACUNAS

Las vacunas usadas en la actualidad para el control de la brucelosis animal son vacunas atenuadas, que se obtienen a partir de la bacteria que ha perdido parcialmente su virulencia debido a inoculaciones o siembras repetidas en medios de cultivo, pero conserva su capacidad antigénica. Estas vacunas introducen segmentos de ADN de *Brucella* en las células y lo usan para producir proteínas de la bacteria, estas estimulan al organismo para que produzca una respuesta inmunitaria de defensa contra la enfermedad(68).

Actualmente existen tres tipos de vacunas, de las cuales se encuentra la S19 obtenida de *B. abortus* cepa 19 que es una cepa lisa que posee la cadena O de LPS, que genera anticuerpos específicos contra antígenos del tipo IgG1, IgG2b e IgM los anticuerpos producidos inducen interferencias (falsos positivos) en las pruebas diagnósticas; y esto hace una semejanza antigénica a nivel molecular entre la cepa de vacunación y una salvaje, afectando la identificación de un animal sano vacunado y uno infectado (66) en la figura 13 se puede observar la diferencia estructural de las vacunas.

Figura 13. Estructura de las vacunas existentes para la brucelosis animal (68).



La RB51 obtenida de la cepa virulenta 2308 de *B. abortus* resistente a rifampicina es una cepa atenuada de tipo rugoso esto se debe a la ausencia de la cadena O de su LPS, esto puede explicar su baja virulencia para el hombre, no provoca abortos en ganado y no crea anticuerpos que interfieran con las pruebas diagnósticas (16) debido a que no induce la producción de anticuerpos titularles a falta del polisacárido O (42). Inmunológicamente genera activación de linfocitos T y la producción de altos niveles de IFN- γ (25).

Estas dos vacunas son utilizadas para la inmunización de bovinos (42). Su efectividad depende de variables como la edad, dosis y vía de administración (25).

Otra vacuna usada es la reverse one (Rev1) es una mutante de la cepa virulenta 6056 de *B. melitensis* (no dependiente de estreptomicina), obtenida de múltiples pases en medios de cultivo donde la cepa es capaz de revertir su virulencia (69).

La vacuna Rev 1 es obtenida a partir de una cepa lisa atenuada que otorga una protección eficaz para la vacunación de rumiantes pequeños como cabras y ovejas. Aunque induce la formación de anticuerpos anti polisacárido-O (OPS) que afectan la especificidad del diagnóstico serológico. En consecuencia, no se puede distinguir fácilmente entre un animal vacunado y uno infectado con cepas salvajes

de *B. melitensis*(68), en la tabla 5 se puede observar las diferencias entre estas dos vacunas.

Tabla 5. Diferencia de las vacunas utilizadas en el control de la enfermedad. Modificada de Rivers y colaboradores (25).

VACUNA S19	VACUNA RB51
Cepa19 de <i>B. abortus</i> vacunar bovinos	Cepa virulenta 2308 de <i>B. abortus</i> lisa vacunar bovinos
Cepa lisa que posee la cadena O del LPS	Ceparugosa, resistente a rifampicina
Produce falsos positivos	No produce falsos positivos
Se vacuna hasta los 10 meses	Se puede vacunar a cualquier edad

El país controla la enfermedad mediante la vacunación obligatoria de terneras entre 3 y 8 meses de edad con la cepa 19 y RB51, además se controla que los productos lácteos provengan de predios certificados como libres de brucelosis y tuberculosis bovina. Está prohibida la vacunación de hembras mayores de 8 meses de edad con Cepa 19, Para este caso la vacunación se realizara exclusivamente con la cepa RB51 y con previa autorización del ICA en el caso de los machos no se debe emplear ninguna de estas vacunas (13).

3. DISEÑO METODOLOGICO

3.1 Tipo de investigación

La investigación fue de tipo documental descriptivo donde se seleccionó información a partir de diferentes artículos científicos, manuales técnicos, libros microbiológicos, informes epidemiológicos, blogs informativos y estudios que establecen los diferentes métodos diagnósticos para la identificación de la brucelosis, además de la información epidemiológica sobre el estado actual de la enfermedad en el país.

3.2 Población de estudio

Se recolectaron 70 documentos sobre literatura científica publicada a nivel nacional e internacional en general, donde 45 documentos cumplieron con los criterios de inclusión requeridos para generar una base de datos sobre el diagnóstico actual de la brucelosis en Colombia en humanos.

3.3 Muestra

Se encontraron 70 referencias y de las cuales 45 cumplieron con los criterios de inclusión requeridos para este estudio que fueron Libros microbiológicos, artículos científicos, revistas científicas y bases de datos epidemiológicos que traten la brucelosis en humanos, animales el diagnóstico de la enfermedad y como evitar su transmisión en Colombia.

3.4 Metodología

3.4.1 Búsqueda y revisión la información existente

Se realizó una búsqueda de información científica del tema tratado en el actual escrito. Se revisaron artículos científicos, tesis de grado, técnicas de laboratorio y libros publicados entre el año 2009 y 2016 que aportaron información para la construcción de la revisión documental.

En esta fase, los documentos seleccionados fueron los que se relacionan con los principales temas a tratar en la revisión como las diferentes técnicas diagnósticas para determinar un paciente con brucelosis, la epidemiología de las especies que afectan al hombre presentes en Colombia, estudios realizados entre el año 2009 y 2016, nuevas técnicas diagnósticas utilizadas en el país.

Adicional a esto los documentos utilizados para esta revisión fueron descargados principalmente de bases de datos científicas como Redalyc, Scielo, science direct, Pubmed, CDC y páginas de entes nacionales.

3.4.2 Análisis de la información

En esta revisión se buscó obtener la mayor cantidad de información actualizada sobre el diagnóstico y la epidemiología de la brucelosis en humanos en Colombia y a partir de esto generar una base de datos mediante estadística básica descriptiva evaluando varios puntos importantes como los tipos de investigación, clase de documentos, país de origen y temas tratados en los mismos.

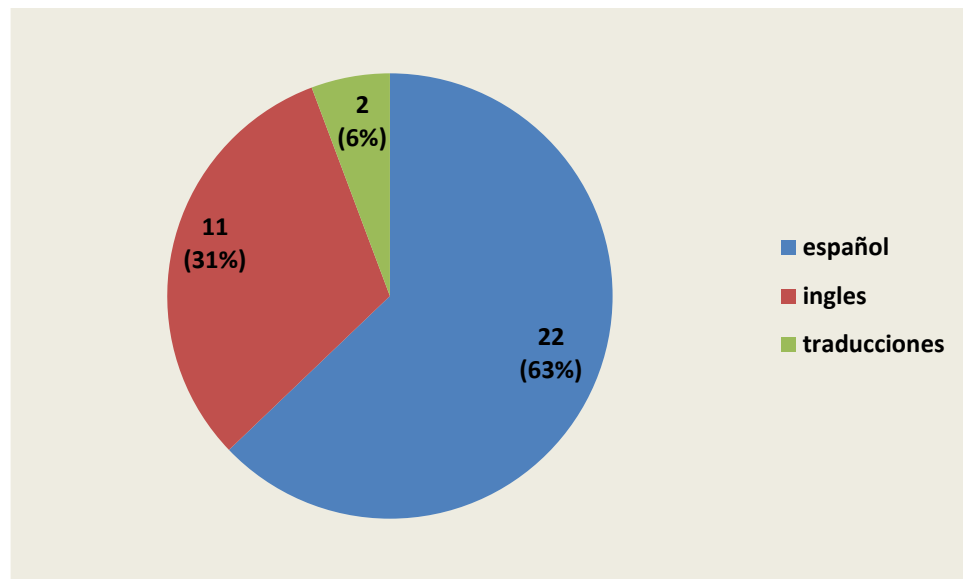
4. RESULTADOS

Se analizaron 45 documentos que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos en la presente investigación.

4.1. IDIOMA DE PUBLICACIÓN

Delos 45 documentos revisados se encontró que la mayoría de estos (63%) fueron documentos escritos en español (Figura 14).

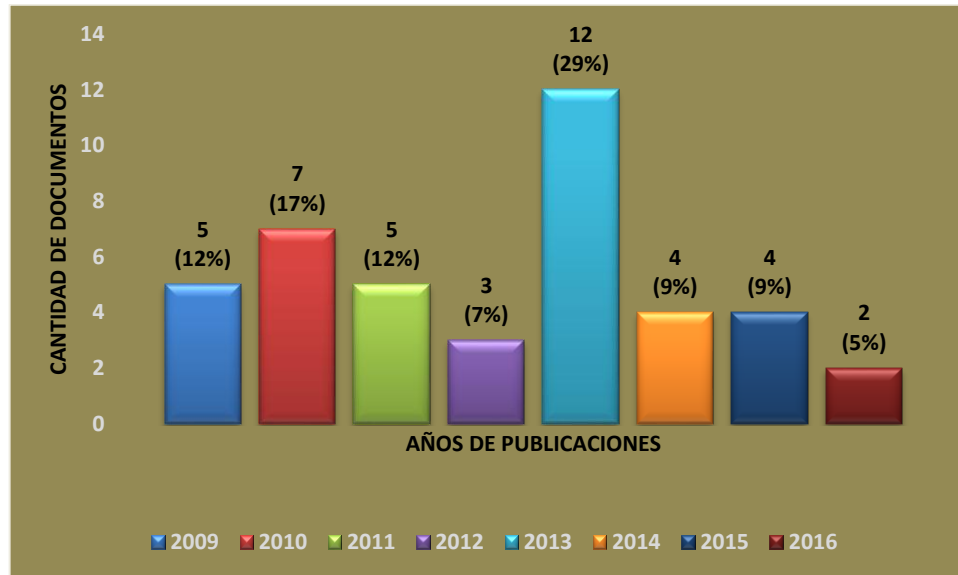
Figura 14. Idioma de los documentos revisados e incluidos en la base de datos.



4.5. AÑOS DE PUBLICACIÓN

Los artículos recolectados en la base de datos se clasificaron por años, donde se encontro que en el año 2013 se realizaron mas publicaciones con respecto a los demas años (Figura 15).

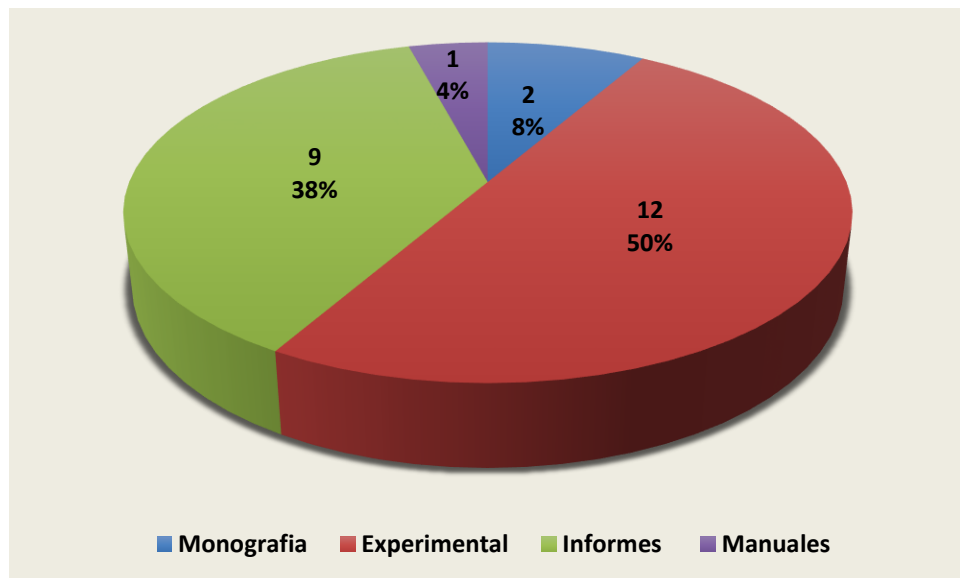
FIGURA 15. Años de publicacion de articulos usados en la revision bibliografica.



4.6. TIPO DE DOCUMENTO

Entre los documentos incluidos se encontró que la mayoría de ellos (50%) correspondieron al tipo experimental mientras que la menor cantidad (1%) fueron manuales, como se observa en la figura 16.

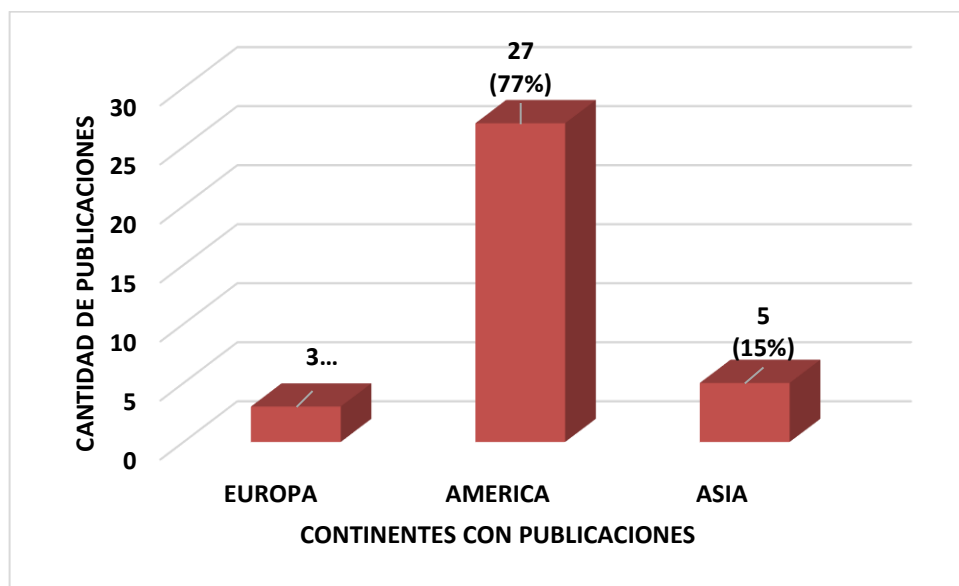
FIGURA 16. Documentos sobre brucelosis publicados en Colombia.



4.7. ORIGEN DE PUBLICACIÓN

En la presente revisión se evidencio que en los documentos analizados tres cuartas partes fueron originales de América el 77% (Figura 17).

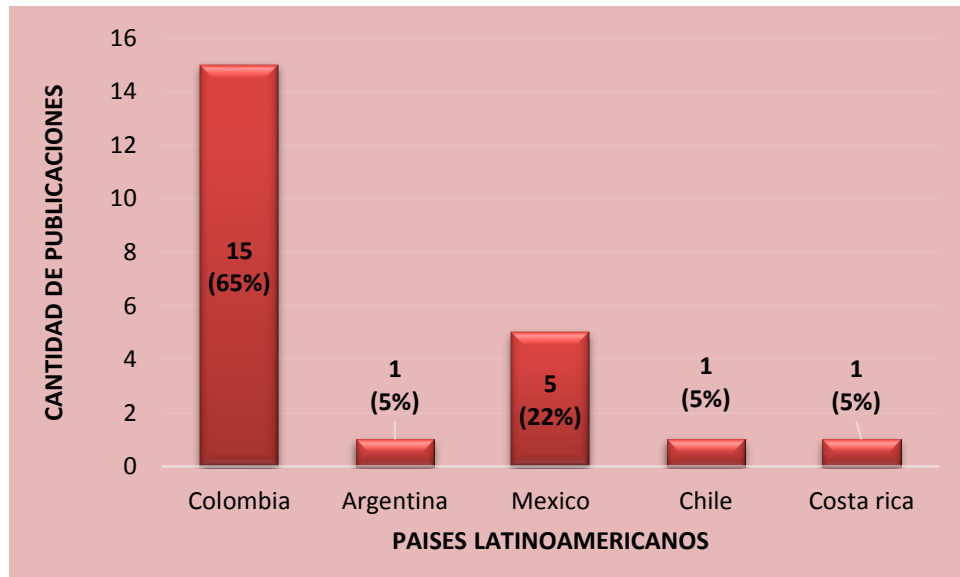
FIGURA 17. Cantidad de publicaciones realizadas por diferentes países del mundo.



4.5. PAÍSES LATINOAMERICANOS CON PUBLICACIONES

Con base en la figura anterior se seleccionaron los documentos publicados en Latinoamérica 65%, y se clasificaron según el país de origen, en la figura 18 se observa que el país con más publicaciones es Colombia.

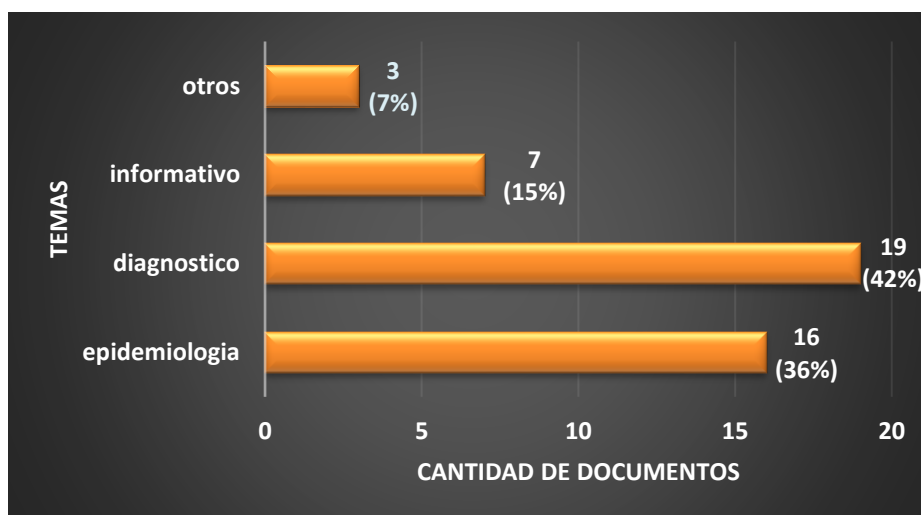
FIGURA 18. Países latinoamericanos con publicaciones referentes a la brucelosis/ *Brucella*.



4.6. TEMAS DE LOS DOCUMENTOS

Con respecto a los temas tratados en los documentos se evidencio que de los 45 documentos revisados la mayoría de estos hablaban sobre el diagnóstico de la enfermedad tanto en humanos como en animales, (Figura 19), los demás documentos trataron temas como sintomatología e inmunología en humanos.

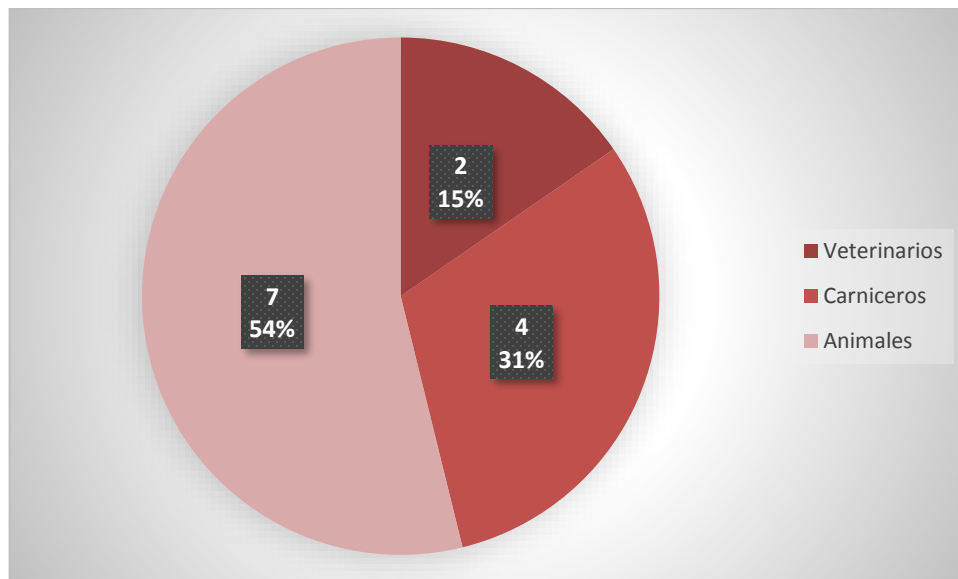
FIGURA 19. Tema principalmente tratado en cada documento.



4.7 POBLACIÓN EN RIESGO DE CONTAGIO CON *BRUCELLA* EN COLOMBIA

En esta revisión literaria se encontró que en Colombia se han realizado estudios serológicos en poblaciones de alto riesgo de contagio de brucelosis, de los 45 artículos seleccionados la mayoría son diagnóstico animales y el 31% es sobre trabajadores de mataderos (Figura 20).

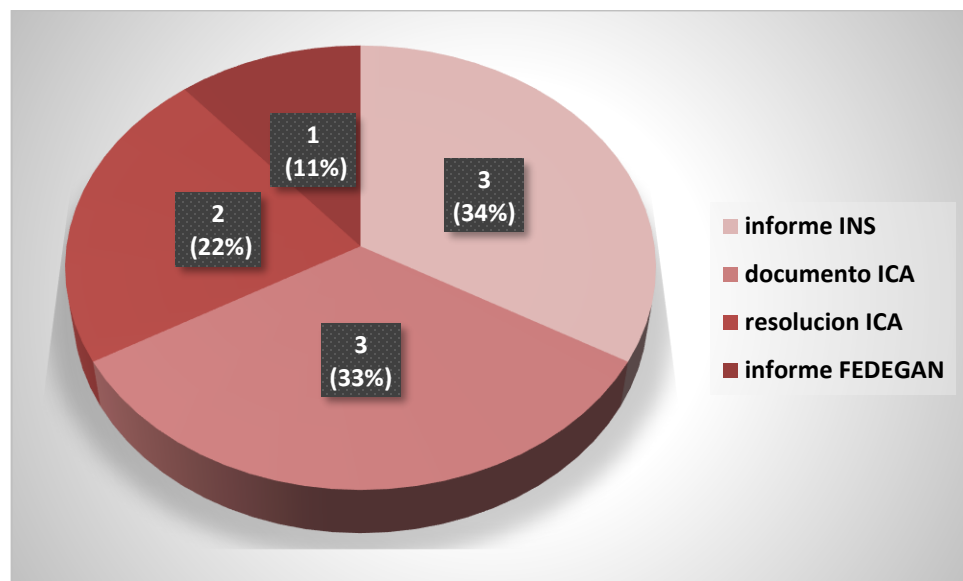
FIGURA 20. Estudios realizados en población en riesgo en Colombia.



4.7 PUBLICACIONES OFICIALES DE ENTES NACIONALES COLOMBIANOS.

Respecto a las publicaciones realizadas por instituciones nacionales colombianas sobre la situación epidemiológica de la enfermedad, en la figura 21 se observa la cantidad y tipo de publicaciones. Donde el INS es a la fecha la entidad con más documentos (34%).

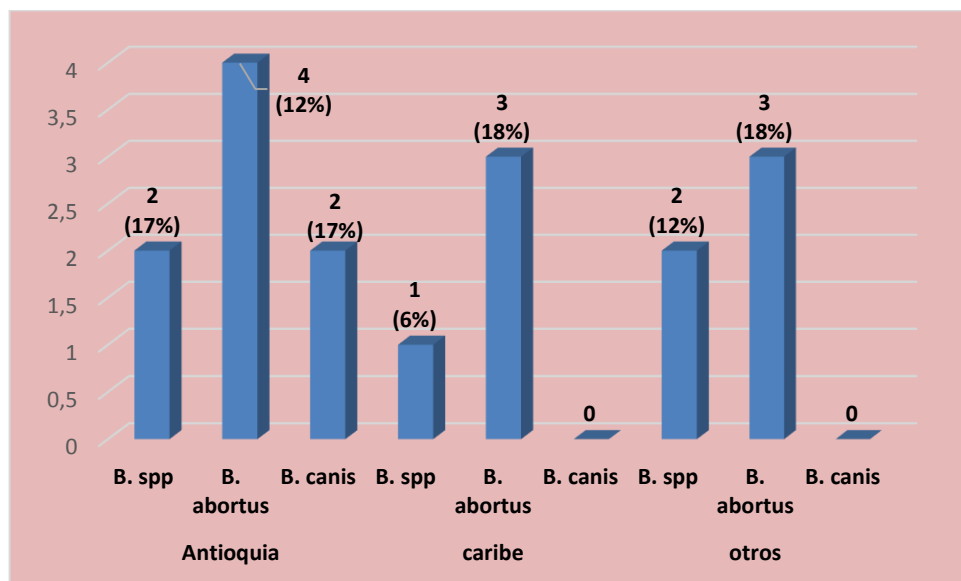
FIGURA 21. Documento de instituciones Colombianas.



4.8. DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA DE BRUCELLA EN COLOMBIA

En la presente revisión se evidencio que en Colombia la especie mayormente distribuida es *B. spp* (18%), y *B. abortus*(18%), en diferentes departamentos han publicado el diagnóstico y los métodos para el diagnóstico de estas especies, (Figura 22).

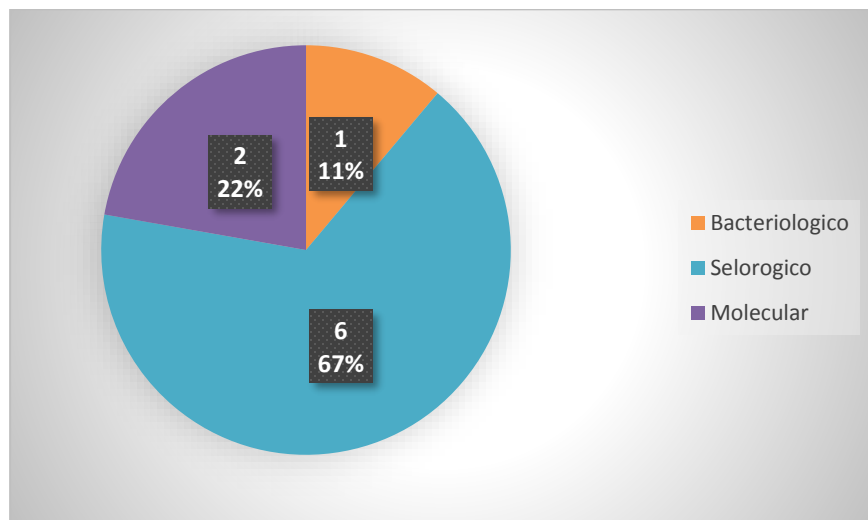
Figura 22.Distribución de especies de *Brucella* en Colombia.



4.9. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA BRUCELOSIS HUMANA.

En cuanto a los diferentes métodos diagnósticos para detectar la enfermedad en los documentos incluidos en la presente revisión se habla de técnicas bacteriológicas, serológicas y moleculares como se observa en la figura 23, los métodos más usados en el mundo son los serológicos, aunque los estudios actuales hablan de técnicas como la PCR.

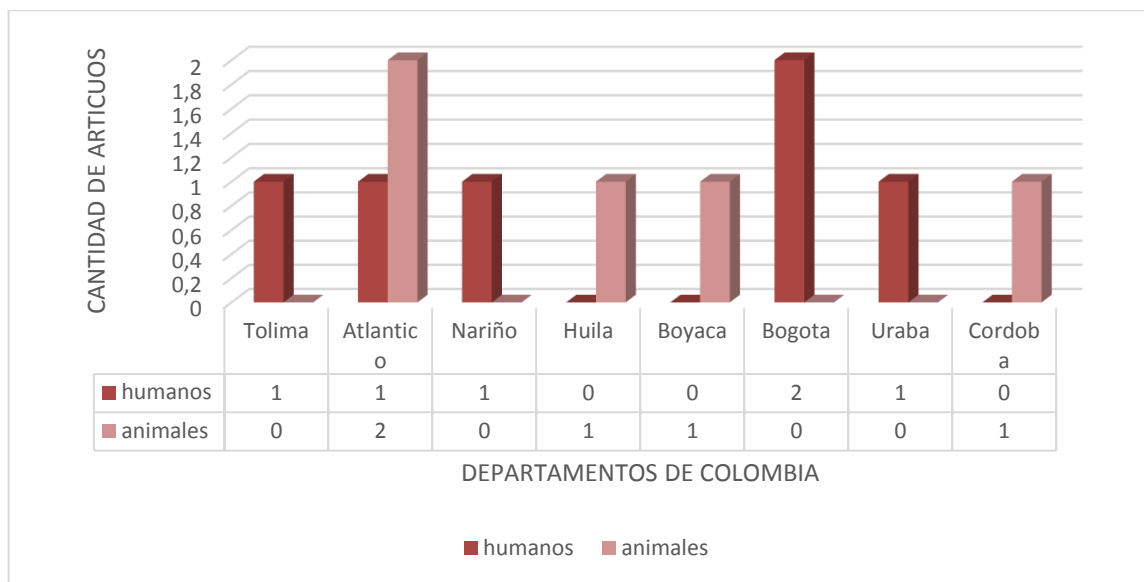
FIGURA 23. Técnicas diagnósticas para la brucelosis.



4.10. ESTUDIOS DE BRUCELLA EN COLOMBIA

Epidemiológicamente Colombia ha publicado estudios sobre la infección, y se encontró que en varios departamentos se han realizado estudios experimentales tanto en humanos como en animales, en la figura 24 se observa que en Bogotá se han realizado más estudios de la infección en humanos y los estudios en animales se han realizado mayormente en el atlántico.

FIGURA 24. Publicaciones colombianas sobre diagnóstico de la brucelosis.



4.11. DIAGNOSTICO POR PCR

El diagnóstico de la enfermedad ha avanzado mucho en los últimos años, sobre todo con la implementación de técnicas moleculares para la diferenciación de especie por medio de PCR convencional, donde se han generado iniciadores específicos para cada especie como se observa en la tabla 6 donde se recolectaron los iniciadores usados en varios artículos donde la identificación específica fue exitosa.

Tabla 6. Iniciadores citados en artículos para la técnica de PCR convencional.

INICIADOR	Oligonucleótidos 5' -- 3'	Pares de bases	Gen	Ref.
<i>B. melitensis</i>	AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA-F TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-R	733 Pb	IS711	(59)
<i>B. abortus</i>	GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC –F GGCAATGAAGGCCCTTAAGT-R	500 Pb	AlkB IS711	(60)
<i>B. abortus</i>	GCACACTCACCTTCCACAACAA-F CCCCGTTCTGCACCAGACT- R	81 Pb	IS711	(62)
<i>B. suis</i>	GCCAAATATCCATGCGGGAAG- F TTGCGCTTTTGTGATCTTTGCGCTTTATGG -R	80 Pb	IS711	(64)
IS 711	TTGTCGATGCTATCGGCCTAC –F GGCAATGAAGGCCCTTAAGT- R	158 Pb	IS711	(61)
IS 711	.TGC-CGA-TCA-CTT-AAG-GGC-CTT-CAT	160 Pb	IS711	(59)

4.12. IDENTIFICACION POR PCR EN COLOMBIA

En la presente investigación se encontró que en Colombia se han desarrollado pruebas moleculares para el diagnóstico en animales, en la tabla 7 se muestran las

instituciones donde se realiza diagnóstico molecular, el Laboratorio Nacional de Diagnostico Veterinario es el más desarrollado en cuanto a esta técnica. Además, algunos laboratorios privados certificados por el ICA también realizan PCR para el diagnóstico animal.

Tabla 7.Laboratorios que realizan PCR en Colombia

LABORATORIO	MUESTRAS	ANIMALES	TECNICA	DEPARTAMENTO
Lab. Nacional de Diagnostico Veterinario	Fetos abortados, placenta	Bovinos, Ovinos, Caprinos porcinos	RT. PCR	Bogotá
Lab. Nacional de Diagnostico Veterinario	Leche, fetos abortados y placenta	Bovinos, Ovinos, Caprinos, Bufalinos	RT-PCR	Bogotá
BIOVET	Sangre	Caninos	PCR c	Barranquilla
MICROVET	Sangre	Caninos	PCR c	Bogotá
CORPAVET	Sangre y tejidos reproductivos	Caninos, bovinos y ovinos	RT-PCR	Bogotá
MASCOLAB	Orina, sangre, hisopado de lesión, abortos	Caninos	RT-PCR	Bogotá

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio fueron obtenidos a través de la recopilación de información de varios artículos científicos, documentos, informes y libros puestos en una base de datos mediante estadística básica descriptiva evaluando varios puntos importantes en la investigación.

Partiendo de los documentos ubicados en la base de datos se encontró que la mayoría de estos provienen de América latina, donde Colombia y México son los países con más publicaciones en los años estudiados. Lo anterior es coincidente con lo reportado por Guzmán y colaboradores (70), en México la cantidad de casos reportados en animales es tan alto que ubica a este país en el segundo lugar con mayor infección en el continente, con una incidencia de 1,74 casos por cada 100.000 habitantes, la que aumentó a 2,97 para el año 2011. Estos autores reportaron que del 2000 al 2011 se registró en todo el país un aumento en la incidencia de la brucelosis bovina pasando de 1 a 15%; y debido a esto se aumentaron los reportes de infección en humanos por el consumo de productos lácteos sin pasteurizar. A raíz de estos nuevos brotes se le da relevancia a la enfermedad y se empieza generar normas mucho más exigentes frente a la erradicación de la brucelosis en animales mediante la vacunación estricta del ganado (69), y se generan documentos y artículos que tratan sobre la enfermedad en el país.

De otro lado, la presente revisión evidencio que en 2013 ocurre la mayor cantidad de publicaciones con respecto a la enfermedad, donde los temas principales de publicación fueron el diagnóstico y epidemiología en diferentes países, esto podría deberse a que en años anteriores se empezó a aumentar el caso de reportes de infección en animales como ocurrió en Chile para el 2013, donde el Ministerio de Chile (71), publico un documento donde se muestra una recopilación de datos epidemiológicos animales, el incremento de infección animal ocurre entre el 2011 y el 2014, así mismo se compara con lo ocurrido en Colombia donde la entidad nacional ICA realiza dos publicaciones epidemiológicas que tratan sobre la situación actual y como controlarla mediante la vacunación del ganado (47). Así entonces el

ICA (47) para el 2009 publica estudios diagnósticos realizados tanto en animales como en humanos donde indica que la cantidad de casos positivos es igual a la presentada en años anteriores y que los departamentos con erradicación de la enfermedad se encuentran en igual estado.

Otro hallazgo de la presente revisión hace referencia al diagnóstico de la enfermedad en animales, el cual ha tenido mayor importancia evidenciándose además que la técnica más usada es el método serológico, esto coincide con el reporte dado por el INS en el 2009(37) donde publicó un informe sobre el estado de la enfermedad en años anteriores, demostrando que Durante el año 2008 el Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario analizó 1206 sueros, el 65,9% pertenecieron al sexo masculino y el (34,1%) al femenino; de los que se identificaron como pacientes positivos 48 , (60,4%) en hombres y (39,6%) en mujeres mediante las pruebas de Rosa de Bengala, Elisa indirecta y Elisa competitiva; este informe indicó además que para este mismo año no se contó con datos que permitieran conocer la prevalencia y la incidencia de la enfermedad, sin embargo Bogotá fue la ciudad con mayor número de muestras remitidas para diagnóstico 214 en total.

De otro lado, la presente revisión encontró que la población con mayor riesgo de contagio son los manipuladores de carne y los médicos veterinarios, lo cual coincide con lo reportado por Méndez y colaboradores (39) quienes indican que los manipuladores de carne poseen una mayor prevalencia en el contagio de la enfermedad, esto se correlaciona con lo reportado por Jaramillo (72) que indica que el sacrificio animal se considera un punto determinante en la transmisión de la enfermedad por estar en contacto con tejidos finos de cerdo y fluidos corporales frescos. No obstante hasta la fecha no se han publicado documentos donde se hable de un método estandarizado para el diagnóstico de pacientes positivos y de esta forma poder minimizar el riesgo de contagio.

Por otra parte los médicos veterinarios presentan riesgo debido a la atención animal, en el momento que tienen contacto con abortos, limpieza de graneros y asistencia animal, como lo indica García (73).

En esta revisión literaria se evidencio que en Colombia los estudios realizados para brucelosis humana son muy limitados, además y no se cuenta con un método diagnóstico seguro para los laboratoristas, García (73) en su revisión afirma que el riesgo de adquirir brucelosis en el laboratorio resulta de la inadecuada manipulación de la cepa, específicamente durante la descongelación, la identificación errónea de la bacteria, y la variabilidad morfológica en el crecimiento de la colonia. Adicional a esto Morales (3) expresa que en Colombia la brucelosis es considerada una zoonosis de importancia en salud pública y en la salud ocupacional, ya que gran parte de los contagios de brucelosis humana se consideran favorecidos por el trabajo siendo este un gran factor de riesgo para el contagio.

Adicionalmente Méndez y colaboradores (39) consideran que se requiere para el oportuno diagnóstico, conocer el contexto epidemiológico, realizar una buena historia clínica y apoyo del laboratorio, y los métodos serológicos más usados tanto en humanos como en animales es la de Rosa de Bengala, esta técnica es muy útil en la detección de la fase aguda en humanos (39).

De otro lado, en cuanto al diagnóstico serológico, la presente revisión evidencio que en Colombia este tipo de diagnóstico en animales ha sido más relevante en Antioquia, lo cual coincide con lo reportado por Soto (74) quien indica que este es uno de los departamentos de Colombia donde se presenta un alto porcentaje de positividad a brucelosis en bovinos, lo que hace considerar un riesgo de contagio en la población humana, ya sea por el consumo de productos lácteos no pasteurizados o por contacto directo con animales infectados.

Así mismo Calderón y colaboradores(75)Indican que en Colombia en la especie bovina según algunos estudios serológicos realizado presenta una prevalencia entre el 2,4 al 5%. Además el ICA durante el 2012, realizó análisis serológicos de

1.496.688 bovinos en 72.374 predios de 28 departamentos y estableció una positividad en bovinos del 5% (68.187)(75). Adicional a todo lo anterior es importante recalcar la infección por *B. canis* donde en Colombia se presentan reportes en el Antioquia esto se correlaciona con lo reportado por Bakery colaboradores (70) donde reportan que la mayoría de contagio a los humanos ocurre de manera indirecta asociada a la inoculación accidental de la bacteria en el laboratorio además también se asocia a la manipulación de animales infectados (70).

En cuanto al diagnóstico de la enfermedad este estudio evidencio que en Colombia la mayoría de documentos publicados están relacionados con métodos serológicos esto se correlaciona con lo citado por Calderón (75) donde indica que en Colombia, el diagnóstico oficial de *B. abortus* en las diferentes especies animales, involucra la técnica de Rosa de Bengala (RB), fijación de complemento (FC), ELISA competitiva (C-ELISA) y fluorescencia polarizada (FP); esta última técnica fue incluida recientemente dentro del esquema de control de la brucelosis, esto revela que en el país estos métodos siguen siendo usados, a pesar de que estas pruebas pueden generar reacciones cruzadas por la vacunación del ganado, aun así sigue siendo el método más seguro en el país para el diagnóstico.

En cuanto al diagnóstico en humanos se evidencio con la presente revisión que los métodos serológicos son los más usados tanto para el diagnóstico, como para establecer la prevalencia e incidencia de la enfermedad. Morales (3) en su estudio indica que para diagnosticar pacientes que presentan sintomatología relacionada con la brucelosis en el Tolima se realizaron pruebas serológicas como la de Rosa de Bengala, fijación de complemento, (ELISA), seroaglutinación y prueba de Coombs, demostrando que la prueba de ELISA tiene una especificidad del 100% para la detección de IgM en una brucelosis aguda y en una fase crónica la especificidad del 100% le pertenece a la detección de IgG por Elisa. Además de esto Méndez y colaboradores (39) describieron en su estudio que el test de sero aglutinación (SAT) y la prueba de micro aglutinación (MAT) son útiles para la

determinación de la presencia de títulos de anticuerpos elevados para *Brucella* en pacientes que residen en áreas endémicas.

Por otra parte esta revisión permitió determinar que el diagnóstico molecular aún no se ha implementado como una técnica diagnóstica, pero los ensayos realizados in vitro demuestran que son eficaces para la identificación de especies mediante el diseño de iniciadores específicos para cada una, esto se puede sustentar con lo mencionado por Hinic(62) que especifica que los iniciadores usados para esta técnica deben tener marcadores genéticos únicos para la diferenciación de cada especie, que poseen secuencias específicas de cada genoma y como algo adicional esta técnica puede ser diagnóstica en casos con una carga bacteriana muy baja.

Además esta técnica presenta varias ventajas empezando por la minimización del contagio a los laboratoristas, la minimización de riesgo y la alta sensibilidad y especificidad de la prueba debido esta prueba tiene un blanco de amplificación específico que puede ser la región 16S-23S o la sección móvil IS711.

Adicional a lo anteriormente nombrado este estudio encontró que en Colombia si se realizan estudios moleculares para el diagnóstico de brucelosis en animales pero no en humanos. El ICA al ser el ente nacional de referencia es el encargado de autorizar los laboratorios que pueden realizar diagnóstico de *Brucella*, el laboratorio Nacional de Diagnostico Veterinario es el encargado de diagnosticar animales de producción con brucelosis en el país, además de esto otros entes privados se encargan del diagnóstico por PCR de pequeños animales y bovinos, así mismo también en esta revisión se encontró que existen estudios moleculares para detección de la bacteria en muestras como leche como lo reporta Mosquera (63) que realiza la comparación de la técnica molecular con la prueba serológica del anillo en leche demostrando que la técnica serológica arroja resultados negativos muestras que la molecular es positiva detectando ADN de *Brucella abortus* en lo que indica que la bacteria está presente en el organismo del animal, pero que los niveles de anticuerpos al momento de la toma de la muestra no era lo

suficientemente altos para ser detectados por serología. Además también afirma que la PCR podría detectar el microorganismo durante la etapa temprana de la enfermedad, cuando los animales no presentan aun síntomas clínicos. Los resultados falsos negativos favorecen la permanencia latente de la brucelosis en las fincas, ya que los animales pueden continuar transmitiendo la infección a los animales sanos, además de que también ponen en riesgo la salud de las personas.

Finalmente los países en desarrollo se beneficiaran con la creación de un método diagnostico estandarizado que ayude a minimizar los focos de infección y en un futuro erradicar la enfermedad, adicional a esto la implementación de técnicas moleculares como la PCR confirmara la enfermedad de una forma específica, rápida y segura con el fin de generar diagnósticos y tratamientos oportunos para la comunidad (22).

6. CONCLUSIONES

- Epidemiológicamente *B. abortus* se encuentra distribuida en diferentes países de América Latina donde Colombia presenta un menor porcentaje

frente a otros países como México y Argentina, departamentalmente la infección esta mayormente distribuida en el Atlántico.

- El diagnóstico de brucelosis en Colombia se limita únicamente a las técnicas serológicas, principalmente Rosa de Bengala y ELISA y de acuerdo con esto no se ha desarrollado un protocolo para el diagnóstico en humanos.
- *B. abortus* es la especie más distribuida en Colombia sobre todo en regiones con estudios serológicos, con una mayor prevalencia en Antioquia.
- En Colombia el diagnóstico molecular de brucelosis se ha limitado únicamente a la detección de la bacteria en animales, y no han desarrollado protocolos para el diagnóstico en humanos.
- El ente principal encargado de diagnosticar la brucelosis en Colombia es el ICA y es el responsable de remitir las muestras animales para realizar diagnóstico molecular en diferentes regiones del país, aunque también hay entidades privadas que realizan estas pruebas con autorización del ICA.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Tique V, González M, Mattar S. Seroprevalencia de *Brucella abortus* en en

- bovinos del departamento de Córdoba. Rev UDCA Div Cient. 2009;12(2):51–9.
2. Ulu-Kilic A, Metan G, Alp E. Clinical presentations and diagnosis of brucellosis. Recent Pat AntiinfectDrug Discov. 2013;8(1574–891X (Print)):34–41.
 3. Morales Ortegón D, David, Bayona C. Seroprevalencia de brucelosis en trabajadores de mataderos de municipios del Tolima Colombia. 2004;2(1):15–23.
 4. FNG F. Programa de Prevención, Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina. fedegan rograma Prevención, Control y Errad la Brucelosis Bov [Internet]. 2012;web. Disponible en: <http://www.fedegan.org.co/programas/programa-de-prevencion-control-y-erradicacion-de-la-brucelosis-bovina>
 5. ICA. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Resolución 1332. 2013. 2013. p. 13.
 6. ICA. Instituto Colombiano Agropecuario ICA Resolución 3714 de 2015. 2015. p. 9.
 7. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Resolucion 7231/2017 ICA. 2017. p. 3–15.
 8. Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of Brucella species. Sci Tech Rev Off Int des Epizoot. 2013;32(1):149–62.
 9. Padrón Tello O, Herrera Martínez DI, Cardeña Peniche, Álvaro López L. Historia de la brucelosis. Rev Divulg CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA LA Univ VERACRUZANA [Internet]. 2011;Volumen XX. Disponible en: <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol24num2/articulos/brucelosis/>
 10. Valera R, Sánchez R, Sánchez A, Benet P, Pérez R, Valera YR, et al. Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. Rev Electrónica Vet

REDVET. 2005;VI, n.

11. Nicoletti P. A short history of brucellosis. *Vet Microbiol.* 2002;90(1–4):5–9.
12. Wang Y, Wang Z, Zhang Y, Bai L, Zhao Y, Liu C, et al. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of human brucellosis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2014;13:31.
13. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Zonas libres de brucelosis bovina declarada por el ICA y Vacunación contra brucelosis bovina. Av en la Errad la Brucelosis en Colomb [Internet]. 2015; Disponible en: <https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Enfermedades-Animales/Brucelosis-Bovina-1/Avance-Eradicacion-de-Brucelosis.aspx>
14. Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR. Brucella isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol Infect.* 2008;136(4):496–503.
15. Malbran D. Brucelosis humana en países de América Latina taller teórico práctico****. 2013; Disponible en: <http://www.anlis.gov.ar/?p=300>
16. Castro HA, González SR, Prat MI. Inmunología Actualización Brucelosis: una revisión práctica*. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2005;39(2):203–16.
17. Erasmus. Microbe Canvas Brucella melitensis [Internet]. Microbe Canvas Dept. Medical Microbiology and Infectious diseases. Disponible en: <http://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-negative-rods/obligate-aerobic-3/oxidase-positive-2/colistin-susceptible-4/brucella-melitensis.html>
18. Enrique Freer RC-A. Brucella: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. *Rev costarric cienc méd* [Internet]. 2001;vol.22. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29482001000100008

19. Corbel M, Morgan W. Clasificación del género *Brucella*: situación presente. *Rev sci tech Off int Epiz.* 1982;1(1):301–10.
20. A, Koneman D sommer. *Diagnostico microbiológico.* Libr Fis. :247–9.
21. Medellín DMV. *Brucella abortus*: Antecedentes y avances en aspectos de patogénesis, diagnóstico y control. *Trab GRADO.* 2006;19–23.
22. Renoux G. Human brucellosis. *Dev Biol Stand.* 1976;31:223–6.
23. Moreno E, Cloeckert A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol.* 2002;90(1–4):209–27.
24. Corbel MJ. Brucellosis in humans and animals. *World Heal Organ [Internet].* 2006;1–102. Disponible en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>
25. Rivers R, Andrews E, Gonzalez-Smith A, Donoso G, Onate A. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos *Brucella.* *Arch Med Vet.* 2006;38:7–18.
26. Mancilla M, Ulloa M, López-Goñi I, Moriyón I, María Zárraga A. Identification of new IS711 insertion sites in *Brucella abortus* field isolates. *BMC Microbiol [Internet].* 2011;11(1):176. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/176>
27. Young EJ. *Brucella* species (Brucellosis). *antimicrobe [Internet].* Disponible en: <http://www.antimicrobe.org/b87.asp#top>
28. Ahidé López Merino. *Brucella.* *Esc Nac Ciencias Biológicas, Inst Politécnico Nac [Internet].* Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap7/>
29. Rodríguez Y, Torres SN, Mora JFJ, Charry JCV. *Brucelosis* recurrente. *Pediatría (Santiago) [Internet].* 2014;47(1–2):32–5. Disponible en:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0120491215301294>

30. Buzgan T, Karahocagil MK, Irmak H, Baran AI, Karsen H, Evirgen O, et al. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. *Int J Infect Dis.* 2010;14(6):e469–78.
31. Benavides Benavides B, Jiménez Salas EA, Riascos Enríquez DF. Factores De Riesgo Asociados a La Seroprevalencia De Brucelosis Y Leptospirosis En Los Operarios De La Planta De Beneficio De Pasto, Nariño. *Univ salud.* 2012;14:42–9.
32. OIE . World Organization for Animal Health. BRUCELOSIS PORCINA. Manual de animales terrestres. OIE World Organ Anim Heal. 2008;2.8.5./ 2.3.1. Pg. 1-5 / 445-451.
33. Díaz Aparicio E. Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Rev sci tech Off int Epiz.* 2013;32(1):43–51.
34. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol.* 2010;140(3–4):392–8.
35. Giménez PM, O. B, R. M. BRUCELOSIS: TÉCNICA DE POLARIZACIÓN FLUORESCENTE, PARA ESTAR SEGUROS. *Rev Brangus, Bs As,.* 2007;29(55):62-.
36. Roop RM, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Daniel W. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol .* 2013;198(4).
37. Asturias G del P de. ¿Qué es la Brucelosis o Fiebre de Malta? [Internet]. gobierno del principado de asturias. 2005. p. 1. Disponible en: <https://tematico8.asturias.es/repositorio/seguridad->

alimentaria/articulos/articulo_1184312557371.html?pagina=2

38. Mukhtar F. Brucellosis in a high risk occupational group: Seroprevalence and analysis of risk factors. *J Pak Med Assoc.* 2010;60(12):1031–4.
39. Méndez I, Trujillo D, Duque C, Acero E, Cabrera Á, Pachón D. Seroprevalencia de *Brucella* spp en estudiantes de Medicina Veterinaria, Bogotá, Colombia. *Rev la Univ Ind Santander.* 2013;45(2):39–48.
40. Paredes A. Informe Final Brucelosis Humana Datos Retrospectivos En Colombia 2009. *Inst Nac Salud Colomb* [Internet]. 2009;1–19. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/BrucelosisHumana2009.pdf#search=brucella>
41. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos E V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(2):91–9.
42. Klaus N. Brucelosis en las Américas: perspectivas de diagnóstico y de control mediante la utilización de vacunas. *Anim diseases Inst.* 2000;
43. Díaz OL, Ortiz J, Reina JF, Patiño A, Ch CL, González PM. Colombia sanidad animal 2010. Publicación del Inst Colomb Agropecu ICA. 2010;2–3.
44. Ganadero Con. Colombia le apunta a erradicar la brucelosis bovina en 12 años. contexto ganadero [Internet]. 2014;1.-1. Disponible en: <http://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/colombia-le-apunta-erradicar-la-brucelosis-bovina-en-12-anos>
45. Guarnizo PL. Estudio descriptivo de la presentación de brucelosis humana en Colombia desde 2000 hasta 2012. *Rev Med Vet.* 2014;2014:67–79.
46. Smirnova EA, Vasin A V., Sandybaev NT, Klotchenko SA, Plotnikova MA, Chervyakova O V., et al. Current Methods of Human and Animal Brucellosis Diagnostics. *Adv Infect Dis* [Internet]. 2013;3(3):177–84. Disponible en: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/aid.2013.33>

47. ICA. Colombia, Sanidad Animal 2013. Igarss 2014 [Internet]. 2013;(1):1–5. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getattachment/0b099ac3-d670-4c11-be1b-02e50db63047/2013.aspx>
48. Domínguez L, Goyache J, Cabezas A, Velasco J, Sánchez JM. OTRAS ENFERMEDADES BACTERIANAS (MAL ROJO, BRUCELOSIS, TUBERCULOSIS) [Internet]. revista universidad complutense madrid. p. 3–6. Disponible en: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/13/diagnosticola.htm>
49. Sabaleta T. Brucella [Internet]. blog. 2010. Disponible en: <http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/brucella.html>
50. ALTON G, PIETZ D., M. L, D. J. LAS TECNICAS DE LABORATORIO EN LA BRUCELOSIS. Organ Mund la salud Ginebra. 1976;
51. Vega López C, Ariza Andraca R, Rodríguez Weber F. Brucelosis. Una infección vigente. Acta Médica Grup Ángeles [Internet]. 2008;6(4):158–65. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/actmed/am-2008/am084c.pdf>
52. Montes I. DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS. Serv Microbiol Hosp Virgen del Puerto Plasencia [Internet]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/diagbruce.pdf>
53. Castrillón-Salazar L, Giraldo-Echeverri CA, Sánchez-Jiménez MM, Olivera-Angel M. Factores asociados con la seropositividad a Brucella canis en criaderos caninos de dos regiones de Antioquia, Colombia. Cad Saúde Pública [Internet]. 2013;29(10):1955–73. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&AN=24127>

092&lang=es&site=ehost-live

54. Pumarola A, Redrigues A, Garcia A, Piedrola G. microbiología y parasitología médica. salvat Ed. 2:45–501.
55. Nidia E. Lucero, Gabriela I. Escobar, Sandra M. Ayala DBH. Manual de Procedimientos Técnicas para el Diagnóstico de. 2008;1–78.
56. Brangus R. Brucelosis : Técnica De Polarización Fluorescente , Para Estar Seguros. 2007;29(55):62–6.
57. KIRCHNER, Cristina E. FERNÁNDEZ JL. Enfermedades infecciosas | Brucelosis Guía para el equipo de salud. Dir Epidemiol - Minist Salud la Nación [Internet]. 2013;12:55. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000304cnt-guia-medica-brucelosis.pdf>
58. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007;22(5):299–305.
59. Hasani SM, Mirnejad R, Piranfar V, Amani J, Vafadar MJ. Comparing rapid and specific detection of Brucella in clinical samples by PCR-ELISA and Multiplex-PCR method. Iran J Pathol. 2016;11(2):144–50.
60. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of Brucella abortus bv. 1, 2, and 4, melitensis , Brucella ovis , and Brucella suis bv . 1 by PCR. J Clin Microbiol [Internet]. 1994;32(11):2660–6. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=264138&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
61. Tomaso H, Kattar M, Eickhoff M, Wernery U, Al Dahouk S, Straube E, et al. Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of Brucellae in tissue using quantitative real-time PCR. BMC Infect Dis [Internet]. 2010;10:100. Disponible en:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2873554&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

62. Hinic V, Brodard I, Thomann A, Cvetni Z, Makaya P V., Frey J, et al. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J Microbiol Methods*. 2008;75(2):375–8.
63. Mosquera XC, Biotec I, Bernal C V, Muskus CL, Berdugo JG. DETECCION DE *Brucella abortus* POR PCR EN MUESTRAS DE SANGRE Y LECHE DE VACUNOS DETECTION OF *Brucella abortus* IN BLOOD AND MILK OF DAIRY CATTLE BY PCR METHOD. *RevMVZ Córdoba* [Internet]. 2008;13(3):1504–13. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v13n3/v13n3a10.pdf>
64. Hänsel C, Mertens K, Elschner MC, Melzer F. Novel real-time PCR detection assay for *Brucella suis*. *Vet Rec Open* [Internet]. 2015;2(1). Disponible en: <http://vetrecordopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/vetreco-2014-000084>
65. Sánchez M, Jiménez M, Cardona N. Diseño y evaluación de una prueba de PCR para detección de *Brucella* spp. y *Brucella abortus*. *Rev CES Med Vet y Zootec*. 2013;8(2):1900–9607.
66. Kim J-Y, Kang S-I, Lee JJ, Lee K, Sung S-R, Erdenebaataar J, et al. Differential diagnosis of *Brucella abortus* by real-time PCR based on a single-nucleotide polymorphisms. *J Vet Med Sci*. 2016;78(4):557–62.
67. Olivera M., Giraldo CA., Di-Lorenzo C. Identificación por PCR de *Brucella canis* en sangre y leche canina. Reporte de un caso. *Arch Med Vet* [Internet]. 2011;43(3):295–8. Disponible en: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84860175290&partnerID=40&md5=6c1d5014bc1b011a2521c2d098f327d0>

68. Cassataro J, Pasquevich K a. Nueva vacuna contra la brucelosis. Acta Bioquím Clín Latinoam [Internet]. 2006;40(1):83–8. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572006000100014
69. Martínez Herrera D. Campaña Nacional contra la Brucelosis. Univ Veracruzana, *Facultad Med Vet y Zootec [Internet]. 2010; Disponible en: https://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/CAMPANIA_NACIONALCONTRABRUSELOSIS.pdf
70. Guzmán-Hernández RL, Contreras-Rodríguez A, Ávila-Calderón ED, Morales-García MR. Brucelosis: zoonosis de importancia en México. Rev Chil infectología [Internet]. 2016;33(6):656–62. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000600007&lng=en&nrm=iso&tlng=en
71. Situación sanitaria de brucelosis bovina 2013. SAG, Minist Agric Gob Chile. 2010;
72. Jaramillo L, Arboleda M, García V, Agudelo-Flórez P. Coinfección brucelosis-leptospirosis, Urabá, Colombia. Reporte de caso. Infectio [Internet]. 2014;18(2):72–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.02.002>
73. García Vásquez ZJ. Factores de riesgo para brucelosis como enfermedad ocupacional revisión documental. 2008;107. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/enfermeria/tesis42.pdf>
74. Soto Z, Gutierrez C, Pinedo J, Matos R. SEROPREVALENCIA DE BRUCELOSIS EN HUMANOS Y BOVINOS EN EL DEPARTAMENTO DE ATLANTICO COLOMBIA. 2012;31–9.
75. Calderón-Rangel A, Angulo-Maza LA, Tique- VP, Rodríguez VC, Ensuncho CF. Seroprevalencia de brucelosis bovina en dos localidades del Caribe

colombiano. Orinoquia [Internet]. 2015;19(2):203–9. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89645829007>