



PANAFTOSA
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
y Salud Pública Veterinaria



**INFORME DE MISIÓN DE COOPERACIÓN TÉCNICA
EVALUACIÓN Y RECOMENDACIONES SOBRE BRUCELOSIS ANIMAL Y HUMANA
INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA) E INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS)**

**EXPERTO EDGARDO MORENO
Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET)
Universidad de Costa Rica (UCR)
Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET)
Universidad Nacional de Costa Rica (UNA)**



Bogotá, Colombia
25 al 27 de septiembre de 2023





PANAFTOSA
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
y Salud Pública Veterinaria



CONTENIDO

MISIÓN	3
Objetivo de la Misión	3
Desarrollo de la Misión	3
DISCUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	5
1.- Prevalencia de la brucelosis.....	5
2.- Vacunación en bovinos.....	6
3.- Control de calidad la vacuna S19	8
4.- Estrategias de control de la brucelosis bovina.....	9
5.- Diagnóstico serológico en bovinos.....	10
6.- Diagnóstico serológico en humanos	12
7.- Aislamiento e identificación de la brucella en animales.....	14
8.- Aislamiento e identificación de brucelas en humanos.....	16
9.- PCR para identificar ADN de brucelas directamente de tejidos y de fluidos	17
10- Necesidad de coordinación entre el ICA y el INS.....	18
ASISTENTES	19
ANEXOS	20
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21



PANAFTOSA
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
y Salud Pública Veterinaria



MISIÓN

Objetivo de la Misión

Fortalecer las actividades de prevención y control desarrolladas en Colombia tanto en el sector salud humana como en sanidad animal con una visión Una Salud.

Desarrollo de la Misión

Del 25 al 27 de septiembre de 2023 en Colombia y con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud/PANAFTOSA, se desarrollaron reuniones interinstitucionales con personal de alto nivel del Instituto Colombiano Agropecuario ICA y del Instituto Nacional de Salud INS, en Bogotá Colombia. PANAFTOSA junto con la persona representando a la OPS en Colombia, Milton Cardozo, acompañaron la misión del asesor Edgardo Moreno. Durante estas reuniones se validó el fortalecimiento técnico de las entidades y se recopiló información importante para el análisis de situación actual y posibles recomendaciones. Se realizaron visitas a los laboratorios del INS y se recibió la información referente de los laboratorios nivel P3 del ICA, con sus respectivos datos de capacidad operativa y diagnóstica.

Información Técnica Relevante resultado de las reuniones:

- a. La mayor prevalencia en Colombia, tanto en humanos como en bovinos es *Brucella abortus*. En bovinos se han descrito en Colombia las biovariedades 1, 2, 4 según la literatura (doi: 10.3389/fvets.2019.00321; doi: 10.1016/j.ram.2018.08.002). También se ha establecido la presencia de *Brucella canis* tanto en perros como en humanos (doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04393). Existe un reporte sobre el aislamiento de *Brucella melitensis* en humanos (<https://doi.org/10.22354/in.v24i4.886>), caracterizado por PCR usando principalmente 16SRNA, marcador genómico; este aspecto requiere mayor profundización. No se cuenta con reportes de *B. melitensis* en pequeños rumiantes a la fecha, ni de *B. suis* en los cerdos en Colombia. Sin embargo, es necesario mencionar que no se ha hecho una exploración sistemática al respecto. El único reporte sobre la prevalencia de anticuerpos en cerdos en Colombia arrojó resultados negativos (<http://www.redalyc.org/pdf/3214/321428100005.pdf>). No hay vigilancia oficial sobre la presencia de *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* y otras brucelas.
- b. Referente a protocolos de vacunación en bovinos, se usa la (1) primo-vacunación con cepa 19 en terneras; (2) primo-vacunación y revacunación en adultas con RB51 a los 6 meses; y (3) primo-vacunación con cepa 19 y revacunación con RB51 a los 6 meses. La vacunación en terneras es vía subcutánea con dosis completa de cepa 19, mientras que en adultos se usa RB51 dosis completa, con revacunaciones de la misma cepa.



- c. La vacuna S19 se fabrica en Colombia por una empresa público-privada (*Vecol*). Ésta es preparada originalmente a partir de inóculos derivados del USDA, de los Estados Unidos, (Department of Agriculture of United States) y cada lote se prueba en pureza, (ausencia de microorganismos extraños), viabilidad (bacterias vivas por dosis) y homogeneidad (determinación de la fase de disociación). Sin embargo, según información recopilada no se evalúa la relación entre bacterias vivas y muertas, la virulencia residual y la inmunogenicidad de los lotes; tampoco se estiman sus características moleculares o se compara con cepas de otras casas comerciales. Además de las agencias que venden la RB51, a *Vecol* se le ha autorizado distribuir y vender la vacuna experimental *Delta-PGM* producida en Argentina.
- d. Prevalencia de la brucelosis en bovinos: Existen estudios previos de prevalencia como el ejecutado por el ICA en el 2019 que arroja una prevalencia predial estimada entre el 27-30 %, aunque la prevalencia periódica reportada se estima entre 4-12% (doi: 10.3389/fvets.2019.00321). Aun así, se evidencia ausencia de concordancia entre las coberturas vacunales y la casuística de la enfermedad.
- e. En la actualidad en Colombia los animales sospechosos de brucelosis, por diagnóstico serológico o por aislamiento, son sacrificados sin compensación.
- f. Conforme la prevalencia en bovinos y el número de casos humanos reportados por el INS, se presume una tasa elevada de subnotificación y diagnóstico, situación que confirman algunos trabajos de riesgo ocupacional realizados en Colombia (<https://ciencia.lasalle.edu.co/mv/vol1/iss28/7/>).
- g. Referente al área de salud humana; la brucelosis actualmente en el país no es una enfermedad de reporte obligatorio y aún no hay un protocolo al respecto. Tampoco hay un protocolo oficial sobre el diagnóstico clínico, tratamiento ni un sistema coordinado de reportes.
- h. El país cuenta con varias técnicas diagnósticas estandarizadas tanto para salud animal como humana; éstas incluyen aglutinación como el Rosa de Bengala (RBT), 2-ME y el rivanol (en el INS), cELISA, iELISA, FPA. Sin embargo, la interpretación diagnóstica requiere revisión. Principalmente relacionados a los conceptos de pruebas tamiz (por ejemplo, RBT) y pruebas “confirmatorias” (como cELISA, iELISA y el FPA), lo que desde el punto de vista conceptual está errado.

DISCUSIÓN Y RECOMENDACIONES

1.- Prevalencia de la brucelosis.

Según la información recopilada; la prevalencia actual de la brucelosis bovina en Colombia se desconoce y existen algunos datos no concordantes entre academia y la entidad oficial. El ICA indica cerca de un 30% conforme estudio de seroprevalencia realizado por esta entidad en el 2019; algunas publicaciones reportan entre 4-12% de prevalencia. Situación similar ocurre respecto a la brucelosis humana, que posiblemente se encuentre subdiagnosticada.

Aparentemente, la brucelosis porcina y de pequeños rumiantes no es un problema importante en Colombia, pero no se cuenta a la fecha con investigaciones o publicaciones relevantes sobre este aspecto. Por este motivo se considera necesario establecer una estrategia que determine la prevalencia de anticuerpos en bovinos y otras especies en Colombia, así como el riesgo zoonótico en ciertas poblaciones.

Una circunstancia que dificulta la estimación de la prevalencia de la brucelosis bovina en Colombia es la vacunación por vía subcutánea de las terneras con dosis completa de S19. Se cuenta con evidencia del buen nivel inmunogénico y de protección de esta vacuna, pero una proporción importante de animales permanece con anticuerpos contra el lipopolisacárido liso, y por tanto positivo a prácticamente todas las pruebas serológicas por varios meses, e incluso por años. Situación que puede incrementar la complejidad si se vacunan animales mayores de 8 meses. Una fuente común de error es vacunar a animales mayores de 8 meses, los que frecuentemente se “deslizan” como terneras. Además de la vacunación y revacunación con RB51. Aunque la vacunación y revacunación de adultos con RB51 generalmente no induce una respuesta de anticuerpos aglutinantes, sí induce anticuerpos que se detectan en pruebas de unión como los ELISA, incrementando la prevalencia.

Se emite recomendación al Instituto Nacional de Salud adelantar estudios en poblaciones ocupacionales de riesgo como los trabajadores de mataderos, vacunadores, veterinarios, técnicos veterinarios, estudiantes de veterinaria, ordeñadores, personal de laboratorio trabajando en brucelosis y personal que trabaja en la fabricación de vacunas de brucela.

Debido a que ninguna prueba serológica convencional en estas circunstancias puede diferenciar entre anticuerpos generados por vacunación de los inducidos por infección, es probable que la prevalencia de predios (de hato) reportada en 30% esté sobrestimada debido a la presencia de anticuerpos vacunales residuales, en particular en zonas

endémicas. Lo anterior induce al sacrificio innecesario de animales, con las consecuencias económicas para los productores y de credibilidad para el programa. Está bien demostrado que las pruebas estimadas como confirmatorias (en realidad complementarias) no lo son y pueden conducir a errores diagnósticos.

Para estimar la prevalencia real de la brucelosis bovina, se recomienda hacerlo de forma tabulada y aleatoria por regiones y departamentos, en donde se estratifiquen las poblaciones, en predios no vacunados, predios vacunados (ternares) con S19 únicamente y predios vacunados con RB51. Como única prueba serológica debe usarse el RBT (ver justificación adjunta). Si se desea, se puede usar como prueba complementaria el iELISA (no es confirmatoria) debidamente estandarizado con sueros de animales positivos (con aislamiento) y libres de brucelosis vacunados y no vacunados para obtener el punto de corte en las condiciones epidemiológicas dadas. En caso de no tener esta colección de sueros, se recomienda el RBT como prueba única.

Es importante que tanto el ICA como el INS tengan un banco de sueros nacional. El INS puede establecer un banco de sueros positivos (cultivo positivo de *Brucella*) y negativos. El ICA puede coleccionar sueros de animales positivos (con cultivo positivo), animales negativos de predios libre vacunados con S19 como terneras (3-6 meses), animales adultos vacunados con S19, animales vacunados y revacunados con RB51 y bovinos negativos de predios libres de brucelosis. En la medida de lo posible, el ICA puede obtener información de la edad de vacunación de los animales y el tipo de vacunación, así como el registro de abortos e infertilidad por predio, así como de aislamientos. Debido a las circunstancias epidemiológicas y de vacunación en Colombia, es probable que la prevalencia estimada permanezca con un sesgo de falsos positivos, el que debe ponderarse hasta no cambiar el sistema de vacunación.

2.- Vacunación en bovinos.

Este aspecto es uno de los retos más evidentes que afronta el país. La literatura como las experiencias exitosas en varios países (ej. USA, Canadá; Europa, Oceanía) ofrecen evidencia que la vacunación de bovinos con S19 es la forma más eficiente de disminuir la prevalencia de la brucelosis y eventualmente controlarla. Por eso es importante inmunizar con S19 la mayor cantidad de bovinos para alcanzar una inmunidad de hato eficiente. A la fecha no existe ningún ejemplo de otra vacuna que haya logrado controlar y erradicar la brucelosis bovina.

En general hay tres estrategias de administrar la vacuna: dosis completa por vía subcutánea, dosis reducida por vía subcutánea y dosis reducida por vía conjuntival. Los tres tipos de

inmunización son igualmente eficientes y protegen a los animales contra la brucelosis. Sin embargo, como mencionamos, la dosis completa por vía subcutánea induce una producción de anticuerpos prolongada en los animales. Esto dificulta el diagnóstico. La dosis reducida en terneras minimiza el efecto serológico considerablemente ya que solo cerca del 5 % de los animales permanece positivo después de 6 meses. Aun en vacas adultas, esta dosis reducida minimiza el efecto serológico, pero no anula los abortos e infecciones de la glándula mamaria por la vacuna. La respuesta de anticuerpos disminuye aún más cuando la S19 se administra por vía conjuntival, manteniéndose el mismo nivel de protección. De la misma manera, los efectos secundarios colaterales a la vacunación con S19, disminuyen con la vacunación conjuntival.

Además de eficiente, y de requerir una sola dosis, la vía conjuntival es un método completamente seguro cuando se aplica a terneros de 3 a 6 meses de edad. Esta vacunación prácticamente reduce el problema de la interferencia serológica a un nivel mínimo en hatos libres. En condiciones endémicas la vacunación conjuntival induce un número menor de falsos positivos. Incluso la vacunación conjuntival se puede implementar en adultos. Aunque en adultos la interferencia serológica de los animales vacunados por vía conjuntival es un poco mayor que las terneras vacunadas por esta vía, la respuesta serológica es muy inferior a la vía subcutánea, favoreciendo el diagnóstico diferencial entre animales vacunados e infectados en mayor proporción. Además, la vacunación conjuntival en adultos minimiza los abortos y la pérdida de leche cuando se aplica a vacas preñadas, por es el método de elección para la vacunación masiva de todo el rebaño.

Una creencia general es que la vacunación conjuntival es más difícil y peligrosa que el procedimiento subcutáneo. Sin embargo, con un adecuado uso de medidas de protección sencillas, la vía conjuntival es fácilmente aplicable en el campo (ver enlace de video que se adjunta) Esta vacuna se puede fabricar fácilmente (se diluye la vacuna de dosis completa o bien adquirir comercialmente (ej. CZV, ver enlace que se adjunta).

Se recomienda eliminar completamente el uso de la vacuna RB51 (una cepa rugosa), ya que se ha demostrado que su nivel de protección es mucho más bajo que la S19. En experimentos controlados, la protección de RB51 es en comparación inferior a la proporcionada por la S19 y dura menos de cuatro años sin evidencia de que la revacunación con RB51 refuerce la inmunidad. Además, de la interferencia de la RB51 en ensayos inmunoabsorbentes (iELISA, cELISA y otros) y en la fijación del complemento, problemas que se acentúan al revacunar animales previamente inmunizados con RB51 o S19. Además, el contacto con brucelas de campo provocan anticuerpos contra el lipopolisacárido liso en lo animales vacunados con RB51. Por lo tanto, la RB51 no tiene propiedades DIVA (de diferenciar animales vacunados de infectados) y confunde el diagnóstico en las condiciones en que se administra en

Colombia.

Existe evidencia sólida de que RB51 se excreta en la leche y es abortiva en animales preñados, liberándose así en abortos y fluidos vaginales. Estos problemas se ven acentuados por la virulencia de RB51 en humanos, la falta de pruebas serológicas de diagnóstico que detecten estas infecciones y la resistencia a rifampicina de RB51. En este sentido en humanos cuando se sospeche clínica y epidemiológicamente un cuadro de brucelosis en aquellos lugares en donde se vacuna con RB51, la única manera de diagnosticar es mediante el cultivo de la bacteria, ya que al ser una cepa rugosa las pruebas tradicionales de diagnóstico no detectan esta infección.

Referente a la cepa argentina de *B. abortus* Delta-PGM, que actualmente se está promoviendo en Colombia, cabe mencionar que esta vacuna no se ha probado en el campo en condiciones endémicas, no se cuenta con soporte suficiente sobre cuál es su verdadero potencial y nivel de protección bajo las circunstancias de alta prevalencia que existen en Colombia. Al ser una vacuna rugosa, como la 45/20 y la RB51, tienen un nivel de protección inferior a las vacunas lisas. En experimentos controlados, un candidato vacunal similar a la Delta-PGM producido en *B. melitensis* (*B. melitensis* PGM) mostró un nivel de protección inferior en comparación con otros candidatos a vacunas (doi: [10.1371/journal.pone.0002760](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002760)). La Delta-PGMA no ha sido probada para uso oficial en Argentina y está registrada ante SENASA de Argentina con certificado de categoría “E” que cataloga a la DeltaPgM como producto de exportación que se puede producir en Argentina, pero no puede comercializarse ni vacunar ganado en ese país del cono sur (<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8739093>). En estas condiciones lo más recomendable es mantenerse apartado y a la expectativa hasta que se generen datos probados sobre su eficiencia en condiciones endémicas de campo.

3.- Control de calidad de la vacuna S19

Teniendo en cuenta los reportes de predios, en apariencia debidamente vacunados con S19, que registran brucelosis, es necesario evaluar varios aspectos. Uno de ellos es la posibilidad de subregistro de la vacunación, otro que exista un mal manejo de la vacuna, como por ejemplo una deficiente red de frío o una manipulación prolongada por parte de los vacunadores, entre otros. Sin embargo, estos aspectos son particulares y no deberían ser extensivos.

Uno de los problemas que hay que considerar es la calidad de la vacuna. Además de las pruebas bacteriológicas básicas para determinar viabilidad, disociación (lisas versus rugosas), se debe establecer la proporción de bacterias vivas versus muertas en la vacuna.

El proceso de liofilización siempre genera la muerte de una proporción de bacterias, por lo que los productores de vacunas siempre incluyen un exceso de bacterias para compensar la muerte. Sin embargo, este exceso debe limitarse a no más del 15%-25%. Para determinar la proporción de vivas y muertas, se debe pesar el contenido seco (ej. pesando un frasco vacío y uno lleno de vacuna) de la vacuna y determinar por peso cuántas bacterias vivas respecto a las muertas existen. Esto es esencial pues no solo el número de bacterias vivas es importante para la vacunación. Una alta proporción de bacterias muertas en la vacuna induce a la producción de anticuerpos no deseados en los animales vacunados interfiriendo en el diagnóstico.

También se recomienda realizar pruebas de potencia de los lotes vacunales. Las brucelas lisas crecidas en medios bacteriológicos por periodos pueden atenuarse, perdiendo potencia. En general las compañías productoras de vacuna antibrucelosas, incluyen las pruebas la "virulencia residual" en ratones. Esta prueba es una forma aceptada para evaluar las vacunas contra la brucelosis. En caso de que la compañía productora de vacuna no ejecute esta prueba, es recomendable que la realice el ICA por lo menos cada dos años con los mayores lotes, para asegurarse que la calidad inmunogénica de la vacuna permanece. Esta prueba de virulencia residual en ratones está bien descrita en el manual de la OMSA. De igual forma es conveniente comparar la virulencia residual de la vacuna que se produce en Colombia con vacunas producidas en otras latitudes (eje CZV), para asegurar su eficiencia. De igual forma, es importante secuenciar cada lote de vacuna S19 y comparar esta secuencia con las bases de datos de S19 existentes, comprobando que no tenga mutaciones adicionales. Esto da confiabilidad sobre la vacuna.

4.- Estrategias de control de la brucelosis bovina.

En Colombia, al igual que la mayor parte de los países de Iberoamérica, la erradicación de la brucelosis es sumamente difícil. La erradicación requiere una inversión enorme durante un periodo sostenido por décadas, con intervención sostenida del estado y compensación económica de todas las pérdidas de los productores. En los países de medianos ingresos como Colombia, estas condiciones son difíciles de alcanzar. *Bajo esta perspectiva lo más importante y realista es reducir la prevalencia de la brucelosis, proporcionando una inmunidad de hato contra la brucelosis extensa y eficiente. Para esto lo que se recomienda es la vacunación masiva (jóvenes y adultos) por vía conjuntival con cepa de B. abortus S19.* Esta estrategia eleva la inmunidad del hato y protege contra el aborto y la liberación de la bacteria de campo reduciendo la transmisión a los animales y al ser humano. La vacunación conjuntival, en comparación con la subcutánea, también disminuye (no elimina) el riesgo de aborto de los animales vacunados en estado de preñez y disminuye el riesgo zoonótico.

Es importante entender, que durante la inmunización masiva del hato nacional con cepa 19, no se recomienda hacer el diagnóstico serológico por un periodo de 2 años debido a la revacunación y vacunación de animales en zonas endémicas. Cierto que se puede evitar la revacunación de animales previamente vacunados con S19 (no los vacunados con RB51) mediante la comprobación del registro vacunal del predio. Sin embargo, bajo las circunstancias endémicas de Colombia es previsible que en la vacunación masiva inevitablemente revacunen animales y se vacunen bovinos que han estado en contacto con la bacteria de campo.

Lo anterior aumenta la prevalencia de anticuerpos en el hato confundiendo el diagnóstico, induciendo al sobre sacrificio de bovinos inmunes y debidamente protegidos. Un periodo de dos años después de la vacunación masiva permite que la inmunidad de hato se incremente, la prevalencia de la infección baje, y el nivel de anticuerpos baje, de tal manera que se pueda ir estableciendo el diagnóstico serológico, en particular en los remplazos vacunados. *El único diagnóstico de rutina permitido es para certificar la negatividad serológica de aquellos animales que sean transportados, vendidos o comprados, o bien los que han abortado con sospecha clínica de brucelosis. Con el tiempo, una vez que la prevalencia ha disminuido considerablemente (ej. menos del 2%) se pueden establecer estrategias para ir declarando predios libres de brucelosis (no libres de serología necesariamente), siempre con cobertura vacunal de S19 por vía conjuntival en la medida de lo posible.*

Una de las ventajas que tiene la vacunación masiva, es que, al no realizarse el diagnóstico por dos años, aumenta la credibilidad de los productores, al no sacrificar innecesariamente animales falsos positivos protegidos, al mismo tiempo que se baja la prevalencia. No hay asunto que enoje más a los productores y desprestigie a un programa que el sacrificio de animales falsos positivos, que están debidamente protegidos. Como mencionamos, la erradicación es posible, pero requiere de un alta inversión sostenida y colaboración de todas las partes, y debe establecerse como una estrategia futura y no inmediata, una vez que la prevalencia disminuya por debajo del 1%.

5.- Diagnóstico serológico en bovinos.

Actualmente el diagnóstico de la brucelosis bovina en el ICA mediante pruebas serológicas es sumamente intrincado y complicado innecesariamente. Hacer muchos ensayos confunde y es contraproducente. *Es necesario para el país simplificar el diagnóstico.* Es evidente que el RBT, BPAT y LFA son ensayos cualitativos homogéneos simples que no requieren ajustes (ej. puntos de corte) ni equipos caros que deban ajustarse y por tanto adecuados para la determinación de anticuerpos contra *Brucella* en bovinos. Por otro lado, el iELISA, cELISA y

FPA deben ajustarse para su uso en una situación epidemiológica determinada. Es decir, no se pueden usar siguiendo los puntos de corte recomendados por las casas comerciales. Necesariamente ellos deben ajustarse a cada situación epidemiológica (ver abajo). Además, estos ensayos de unión (iELISA, cELISA y FPA) no son difíciles de implementar en el campo y sólo se pueden realizar en laboratorios, al contrario del RBT y LFA que funciona perfectamente en todas las condiciones epidemiológicas. Aunque el RBT y el LFA son pruebas útiles para el diagnóstico ya que son directas, estas no son iguales: mientras el LFA requiere controles de IgG específicos de cada especie en la tira cromatográfica, el RBT es multiespecie. Además, el RBT tiene un menor costo respecto al LFA

Las consideraciones anteriores no deben interpretarse en el sentido de que los ensayos como iELISA, cELISA y FPA sean defectuosos en sí mismos. Ellos tienen utilidad. Por ejemplo, el iELISA adaptado para detectar anticuerpos en leche es apropiado. Se han introducido algunos iELISA para vigilancia en algunos países que erradicaron la brucelosis de rumiantes domésticos, ya sea en combinación con RBT o solos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que ninguno de estos países alcanzó el estatus libre de brucelosis con los iELISA, cELISA u otros ensayos de unión, pruebas que llegan tarde en comparación con los ensayos de aglutinación usados para la erradicación de la brucelosis en varios países. Otras pruebas como el FPA y el cELISA no son lo suficientemente sensibles en condiciones endémicas.

Existen una gran cantidad de mitos sobre el RBT (y su prueba hermana el BPAT). Todo lo anterior se debe a malas interpretaciones. Existe la idea de que los resultados positivos del RBT en comparación con el cELISA se deben a su baja especificidad, cuando en realidad es el cELISA el que tiene falta de sensibilidad dando falsos negativos, en particular cuando no se ha estandarizado para las condiciones epidemiológicas específicas de la región. El RBT no es una prueba de tamizaje ni el cELISA (u otras pruebas como el FPA) es confirmatoria. Es decir, no existen las pruebas confirmatorias, todas son complementarias, impulsado por la ingenua creencia de que las pruebas sofisticadas y llamativas descritas en países donde la brucelosis de rumiantes ya no es relevante, son mejores que otras más sencillas.

Por ejemplo, en ausencia de vacunación o vacunación solo con RB51, el RBT tiene un 100% de especificidad y sensibilidad, ya que no existen anticuerpos vacunales contra el LPS en estas poblaciones. Lo mismo en un sistema que se vacunen terneras con S19 por vía conjuntival, después de tres meses de la inmunización, la sensibilidad y especificidad del RBT es cercana al 100%. En condiciones endémicas de brucelosis en donde se vacuna con S19, ninguna prueba serológica (ni el RBT ni los ELISAs o FPA) es capaz de distinguir los animales vacunados de infectados con certeza, ya que el contacto con la bacteria de campo induce un refuerzo inmunológico en la población del hato. En este sentido complicar las

cosas simples es un buen negocio, y a menudo está creo que quedó incompleta la idea

Bajo este contexto se recomienda que se simplifique el diagnóstico serológico reportando solo el RBT, y a lo sumo el iELISA, siempre y cuando el punto de corte de este último ensayo se valide adecuadamente con una colección de sueros positivos (con aislamiento) y negativos de animales vacunados con S19, revacunados con RB51 y no vacunados. En caso de no poseer esta batería de sueros, entonces se recomienda usar solo el RBT. La interpretación debe hacerse de acuerdo con las condiciones epidemiológicas tal y como se mencionó anteriormente (vacunados con S19 no vacunados, vacunados con RB51). Por ejemplo, en un hato vacunado con S19 con animales RBT positivos que no tenga registro de abortos o infertilidades o zoonosis, debe vigilarse, pero no considerarse necesariamente positivo por brucelosis. El cELISA no da ninguna información adicional al respecto. Solo confunde, tal como mostramos en el ejemplo que enseñamos durante nuestra visita.

6.- Diagnóstico serológico en humanos

En forma similar a lo que sucede en brucelosis animal, el diagnóstico serológico que se realiza actualmente para detectar infecciones por *Brucella* en humanos es sumamente intrincado e innecesariamente complicado. *Por lo que se recomienda simplificarlo usando principalmente el RBT, y en algunos casos el Brucellacap.*

Es importante entender que la brucelosis humana carece de síntomas patognomónicos y las pruebas de laboratorio son fundamentales para su diagnóstico. Sin embargo, en países endémicos como Colombia la mayoría de las pruebas serológicas en humanos pueden ser difíciles de interpretar sin una historia clínica adecuada. Por ejemplo, una serología positiva corresponde a una alta sospecha de infección, pero no necesariamente de enfermedad. La enfermedad, no se puede ni debe determinar por serología, solo clínicamente, es decir por los médicos infectólogos a los que se le debe reportar el resultado de la serología la que siempre es presuntiva.

Ahora bien, una serología positiva en presencia de síntomas compatibles con brucelosis y una anamnesis que indique previo contacto con animales hospederos o productos lácteos no pasterizados, sugiere inmediatamente enfermedad clínica y por lo tanto hay que proceder al tratamiento independientemente si hay cultivo positivo o no. Por supuesto que un cultivo positivo es lo ideal y el elemento confirmatorio innegable de una infección activa por brucelosis. En humanos existe la ventaja que una sola prueba serológica, a lo sumo dos, con buena sensibilidad y especificidad es suficientes para el diagnóstico ya que no existe el problema de diferenciar vacunados de infectados, y por lo tanto no es necesario confirmar nada. Simplemente y de forma directa la presencia de anticuerpos por cualquier prueba



PANAFTOSA
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
y Salud Pública Veterinaria



serológica bien estandarizadas indica infección (no necesariamente enfermedad).

Bajo esas circunstancias se ha determinado que el RBT es una prueba muy sensible y específica en casos de brucelosis de corta evolución (llamada aguda) e incluso de larga evolución (llamada crónica) que se relaciona con su capacidad para detectar IgM, IgG e IgA, con la ausencia de prozonas debido al bajo pH en que se realiza. El RBT es una prueba altamente específica en los sueros de personas negativas que no han estado en contacto con *Brucella*, y raramente da falsos positivos. Cuando el RBT se modifica para probar diluciones de suero, se pueden diagnosticar con alta sensibilidad y especificidad en individuos infectados (título de diagnóstico >4) en este sentido la simplicidad y asequibilidad de la RBT la acercan a la prueba ideal para hospitales y para el campo. En la mayoría de las circunstancias un RBT es suficiente para el diagnóstico presuntivo de brucelosis humana.

Si bien la mayoría de los sueros humanos con sospecha de brucelosis requieren de 0.5 a 4 minutos para determinar una aglutinación franca, algunos pocos sueros humanos requieren una incubación más prolongada para detectar una aglutinación positiva en RBT. Esto puede complicar el diagnóstico serológico, en particular porque las muestras en los platos se pueden secar y requieren incubación en cámara húmeda. Por ejemplo, los sueros con IgA bloqueantes o con títulos altos de anticuerpos no aglutinantes pueden necesitar hasta 8 minutos para desarrollar aglutinaciones, lo que se vuelve poco práctico. Ese tipo de anticuerpos pueden aparecer en brucelosis de larga evolución. Es decir, el Rosa de Bengala puede mostrar falsos negativos en sueros provenientes de infecciones de evolución muy largas (aproximadamente un 75% de los casos de evolución prolongada no son detectados). En casos claros de sospecha clínica de enfermedad sin una franca aglutinación o aglutinación sospechosa, es conveniente realizar pruebas como el Brucellacap (el equivalente a la prueba de Coombs) que tiene una sensibilidad y especificidad parecida al RBT pero que además detectan anticuerpos bloqueadores o no aglutinantes. Usando Brucellapt, títulos por encima de 1/320 son indicativos de brucelosis, pero debe siempre evaluarse juntamente con las demás pruebas clínicas y la seroprevalencia de la enfermedad en la zona, antes de un juicio. Esta prueba tiene el inconveniente de ser más cara. Sin embargo, al igual que el RBT se puede adaptar para usar en el campo.

Las reacciones inespecíficas de aglutinación del RBT, se limitan generalmente a sueros muy hemolizados y bien a sueros altamente quilosos, sueros no bien desfibrinados o plasma con hilos de fibrina. Sin embargo, al “ojo bien entrenado” estas falsas aglutinaciones pueden detectarse y son previsibles. En muchos de estos casos, una buena centrifugación de los sueros y diluciones seriadas pueden resolver los problemas. Otras enfermedades febriles como tuberculosis, malaria, fiebre tifoidea, lupus eritematoso, artritis reumatoide, sarcoidosis y linfoma activo, dengue, chikunguña, Sika, malaria y otras no son fuente de

falsos positivos en el RBT. Por otro lado, existen reactividades cruzadas la con *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis* y *Yersinia enterocolitica* 0:9. Sin embargo, esto tiene poca importancia en la práctica clínica y generalmente presentan muy bajos títulos y no se relacionan con la clínica.

Las pruebas serológicas como el iELISA, cELISA, FPA no tienen ninguna ventaja comparativa respecto al RBT. Además de ser más caras y de requerir equipos para su lectura, deben estandarizarse estableciendo el punto de corte para las condiciones epidemiológicas de cada región usando sueros positivos (cultivo positivo) y negativos. En general estas pruebas tienen problemas de especificidad y sensibilidad, en particular en zonas endémicas. Por lo tanto, no se recomienda usarlas. Mucho menos ella aglutinación con 2-Me o en presencia de rivanol, las que tienen falta de sensibilidad.

Un aspecto importante en el diagnóstico de la brucelosis humana es la eliminación de los antígenos febriles (ej. Rapid Labs, Fotress Diagnostics, Biotec, Cenogenics, Plasmatec etc.) en el diagnóstico de la brucelosis humana, en particular en los hospitales y clínicas. Se ha determinado que tienen problemas enormes de especificidad debido a que la preparación de los antígenos es inapropiada y a su producción que no está bien controlada desde el punto de vista diagnóstico de la brucelosis.

7.- Aislamiento e identificación de la brucella en animales.

El país informó sobre las dificultades que tienen para el aislamiento de las brucelas y algunos problemas para su caracterización. El aislamiento de las brucelas es truculento y requiere experiencia, tanto en la identificación de las colonias como en la utilización de medios. Para el aislamiento primario de las brucelas de animales vivos se usa la leche (preferentemente individual y no por tanque) hisopados vaginales y semen. La sangre raramente se usa pues el número de bacterias circulante en bovinos es bajo. Solamente en animales acabados de abortar, en donde puede ocurrir una bacteriemia transitoria hay mejores probabilidades del aislamiento de sangre. En animales muertos, los ganglios submandibulares, parotídeos, retrofaríngeos, precapsulares, prefemorales, supramamarios; la placenta (placentomas), el semen, el epidídimo, el bazo e hígado, son los tejidos más importantes.

Se deben usar tres tipos de medios sólidos, uno rico y dos selectivos. Entre los ricos como podría ser el agar sangre, agar *Brucella*, agar Columbia suplementado con dextrosa y sangre, o algún otro similar. Los selectivos son de dos tipos: el Farrel y CITA. El primero se puede conseguir comercialmente; este medio es altamente selectivo, y aunque evita en gran medida la contaminación por otros microorganismos, dificulta el crecimiento primario de las brucelas provenientes de fluidos y tejidos. El segundo medio selectivo es el CITA que debe hacerse en el laboratorio (ver referencia abajo), este medio al tener una dosis de antibióticos

más balanceada favorece el crecimiento de las brucelas en mayor proporción que el Farrel. Los platos deben incubarse en presencia y ausencia de CO₂ y leerse cada 24 horas y no descartarlos antes de una semana.

Las colonias sospechosas deben replicarse en medio sólido e identificarse bacteriológicamente por tinción de Gram, actividad de ureasa y oxidasa, utilización de citrato, reducción de nitrato, producción de H₂S, crecimiento en presencia de tiónina (20 µg/mL) y fucsina básica (20 µg/mL), motilidad y absorción de cristal violeta (ver referencia de Alton et al). Debido a que la tinción de cristal violeta en los platos para determinar disociación bacteriana entre lisas y rugosas, es truculenta y se requiere cierta experiencia, tanto en la preparación de la tinción (el tinte requiere “madurar”) como en la tinción de las colonias, se sugiere hacer pruebas con naranja de acridina. Las bacterias rugosas como RB51 o *B. canis*, aglutinan en presencia de este colorante, mientras las lisas no lo hacen. Se debe distinguir las cepas de campo de las vacunales. La S19 es eritritol sensible, mientras la RB51 es rugosa. Es importante usar bacterias de referencia, en particular lisas y rugosas (ej. RB51y S19). Debe hacerse el diagnóstico diferencial con cepas de *Ochrobactrum*. Esto es relativamente fácil, pues estas bacterias son motiles.

Una vez que se hace la caracterización bacteriológica se procede a la caracterización molecular. Las tres pruebas recomendadas son el Bruce-Ladder, el MLVA16 y la secuenciación. Existen kits comerciales para los primeros dos. La secuenciación por Illumina es suficiente. Con el primer test es suficiente para distinguir las especies de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. ceti*, *B. neotomae* y *B. microti*. Sin embargo, diferentes especies se pueden distinguir como *B. suis* (*B. suis* 1-5, *B. amazoniensis* *B. nosferati* y otras), lo que desde el punto de vista epidemiológico no es un problema. Esta prueba distingue también las brucelas de los *Ochrobactrum*. El MLVA16, se puede realizar tanto doméstico como comprar el kit comercialmente (ver los enlaces). Tiene la ventaja de que da una dispersión filogenética que permite distinguir cepas diferentes entre las especies y que existen bases de datos públicas (<http://mlva.i2bc.paris-saclay.fr/brucella/>).

La secuenciación del genoma completo es la prueba más específica para identificar las brucelas. Tanto el MLVA como la secuenciación del genoma requieren de una persona bien entrenada y con experiencia en el uso de los programas informáticos para la comparación de los genes (MLVA16) y genomas que se interrogan para la generación de árboles filogenéticos y caracterización última de las bacterias. Es importante notar que en algunas bases de datos confunden taxonómicamente a *Ochrobactrum* con *Brucella*. Esto es incorrecto desde todo punto de vista y debe ponerse atención para no confundir estos dos géneros (ver referencias al respecto).

Es fundamental que el ICA establezca su propio cepario de las brucelas aisladas en el país en

animales y en la medida de lo posible cepas de referencia. Idealmente el cepario debe mantenerse liofilizado y en refrigeración o congelación (idealmente a -80 grados C) después de haberse identificado la especie y cepa de *Brucella*. Es importante que el cepario sea redundante, en particular con el INS, por lo que se pueden compartir.

8.- Aislamiento e identificación de brucelas en humanos.

El número de aislamientos que se han obtenido en humanos en Colombia por el momento es bajo. Por secuenciación se han caracterizado dos especies *B. abortus* y *B. canis*.

En las etapas iniciales de la brucelosis, los pacientes experimentan una bacteriemia que puede detectarse mediante la extracción de dos o tres hemocultivos separados. A medida que avanza la infección, el organismo se elimina del torrente sanguíneo y se secuestra en los tejidos y es más difícil aislar de sangre ya que la concentración de bacterias circulantes disminuye gradualmente y el patrón de bacteriemia se vuelve menos consistente, lo que hace cada vez más difícil el aislamiento del organismo. En brucelosis con lesiones focales el aislamiento se puede procurar de esas lesiones. En casos de inflamación de las articulaciones se puede intentar de líquido sinovial y en caso de meningoencefalitis del líquido cefalorraquídeo.

Tradicionalmente los cultivos se realizan en medio difásico de Ruiz Castañeda. Sin embargo, se deben mantener al menos 45 días antes de ser descartados. Los sistemas automatizados de hemocultivos, en los que se detecta la multiplicación bacteriana mediante el seguimiento de la producción de CO₂, ha aumentado la sensibilidad de los hemocultivos y ha acortado el tiempo de detección de las brucelas. Hoy en día, más del 95% de todos los hemocultivos obtenidos de pacientes con brucelosis aguda detectan el organismo causante dentro del habitual período de incubación de una semana sin necesidad de subcultivos. En pacientes con una evolución más larga de la infección y/o complicaciones focales aún se requiere una incubación prolongada y la realización de subcultivos. Las brucelas se pueden identificar directamente de los hemocultivos mediante pruebas bacteriológicas, moleculares (ej. PCR) usando los imprimadores apropiados para *Brucella* o bien hacer subcultivos en platos en presencia y ausencia de CO₂ para identificarlos como se indicó. Posteriormente se puede hacer, Bruce-Ladder, MLVA16 o secuenciación, como se indicó anteriormente.

El diagnóstico de *B. canis* en humanos debe hacerse en todos aquellos casos en donde se haya confirmado brucelosis canina en los perros de compañía o en criaderos. Hay que tener presente que las brucelosis causadas por esta bacteria, no se pueden diagnosticar serológicamente al ser rugosas y el cultivo a partir de sangre de personas sospechosas (ej. en presencia de perros infectados) es esencial. Lo mismo aplica para infecciones por RB51,

una bacteria rugosa que no puede diagnosticar por serología, por lo que el cultivo es fundamental en esos en donde se sospeche brucelosis clínica y en donde la anamnesis indique contacto con animales vacunados con esta bacteria o con productos lácteos no pasterizados.

Al igual que el ICA, es importante que el INS establezca su propio cepario de las brucelas aisladas en humanos y en la medida de lo posible cepas de referencia. Idealmente el cepario debe mantenerse liofilizado y en refrigeración o congelación (idealmente a -80 grados C) después de haberse identificado la especie y cepa de Brucella. El cepario debe ser redundante, en particular con el INS, por lo que se pueden compartir. Para esto es necesario contar con un liofilizador dedicado.

9.- PCR para identificar ADN de brucelas directamente de tejidos y de fluidos

Respecto a la utilización del PCR para el diagnóstico de la brucelosis tanto animal como humana. En términos generales no se recomienda utilizar el PCR (con ninguna combinación de genes que se interroguen) para sustituir el aislamiento bacteriológico y mucho menos para el diagnóstico de animales infectados de vacunados.

Varios laboratorios han desarrollado diferentes ensayos de PCR para detectar secuencias de ADN de *Brucella* en muestras biológicas como alternativa aislamiento bacteriano. Aparte de las diferencias significativas entre la RT-PCR convencional y la RT-PCR, el rendimiento diagnóstico de estos ensayos se ve afectado por varios factores como el método de extracción de ADN, la presencia de ADN del hospedero, presencia de inhibidores en las muestras, la contaminación de ADN, la cantidad de material genético bacteriano para detectar, sondas y reacciones cruzadas, entre otros. Extraer ADN de las brucelas no es tarea fácil ya que son muy resistentes los detergentes, la lisozima y las sustancias caotrópicas entre otras. En sangre es una tarea muy complicada en muestras reales. En un ml de sangre hay cerca de 30000 millones de veces más ADN que el de 100/ml (el número superior que se encuentra durante un estado de bacteriemia). El enriquecimiento de ADN bacteriano incrementa los costos considerablemente y no asegura mejor sensibilidad y especificidad que el cultivo, que es el Gold estándar.

Esta característica hace que la detección de ADN bacteriano esté por debajo del umbral de sensibilidad requerido en comparación con métodos de cultivo capaces de detectar pocas bacterias en la misma cantidad de material. El mayor problema en la mayoría de las PCR para el diagnóstico de brucelosis es que este no se ha validado correctamente desde el punto de vista diagnóstico con muestras en las que los métodos de cultivo hayan demostrado de forma independiente la presencia de la bacteria, respecto a la especificidad.

Un problema en animales vacunados (y revacunados) e infectados, es que el ADN bacteriano puede permanecer en diferentes órganos por un tiempo que no ha sido definido, en ausencia de la bacteria, lo que daría falsos positivos. Incluso mezclas de ADN de diferentes bacterias (ej. S19 y RB51 con ADN de brucelas de campo). Todo lo anterior complica el diagnóstico y la interpretación.

Uno de los problemas radica en que la sensibilidad analítica de los PCR se establece sembrando artificialmente las muestras (ej. sangre) con brucelas provenientes de cultivo. Sin embargo, esto no es equivalente a muestras biológicas reales en donde la bacteria esta oculta dentro de células sus condiciones no son equivalentes.

Hasta ahora, ninguna de los PCR muestra un rendimiento diagnóstico mejor que los métodos de cultivo (han sido revisadas 81 publicaciones de la literatura. Ver referencias). Cuando se realizan correctamente, los métodos clásicos de aislamiento bacteriológico que muestran un 100% de especificidad siguen siendo más sensibles que las PCR, incluso en aquellos trabajos que pretenden compararlos con muestras colectivas de rebaños en los que se aisló *Brucella* de algunos animales. Un examen de la literatura sobre bases de datos reveló alrededor de 50 protocolos de PCR diferentes para el diagnóstico de brucelosis que describen distintos métodos de extracción de ADN, genes diana, cebadores, reactivos, muestras y controles. La mayoría de los estudios solo informaron la sensibilidad analítica y no se compararon con muestras estándar de animales con cultivo positivo y libres de brucelosis. En este sentido, el PCR debe limitarse para la caracterización solo de cultivos puros, usando Bruce-Ladder o MLVA16.

10- Necesidad de coordinación entre el ICA y el INS

Es indispensable coordinar acciones entre el ICA y el INS, con respecto a los casos de botes de brucelosis animal, que podrían tener repercusiones zoonóticas. En este sentido la recomendación es que tanto a nivel técnico, como de salud animal se establezca un intercambio de protocolos y se coordinen acciones. Es fundamental que se reconozca la brucelosis humana de reporte obligatorio y se establezca un protocolo para el diagnóstico en humanos.

ASISTENTES

Asistentes ICA

Mariluz Villamil	Director técnico de análisis y diagnóstico veterinario
David Luna	Responsable del programa de brucelosis de la Dirección Técnica de Sanidad Animal
Nancy Naranjo	Coordinadora Grupo Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario LNDV
Claudia Calderón	Responsable Molecular del Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario LNDV
Zonia Sabogal	Responsable Brucelosis del Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario LNDV
Diana Paula Contreras	Responsable bacteriología del Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario
Andrés Osejo	Director técnico de Sanidad Animal
Uriel Sierra	Subgerente de análisis y diagnóstico
Milton Cardozo	Consultor Nacional. OPS Colombia
Edgardo Moreno	Asesor, Costa Rica

Asistentes INS

MABEL KARINA RODRIGUEZ CERQUERA	Profesional Universitario – Referente Síndrome febril bacteriano, Grupo de Microbiología, Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, Dirección de Redes en Salud Pública.
CAROLINA DUARTE VALDERRAMA	Profesional Especializado, Coordinadora Grupo de Microbiología, Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, Dirección de Redes en Salud Pública
ZONIA KATERÍN ALARCÓN RODRÍGUEZ	Profesional Universitario, Grupo Microbiología, Dirección de Investigación en Salud Pública
JAIME ENRIQUE MORENO CASTAÑEDA	Profesional Especializado, Grupo Microbiología, Dirección de Investigación en Salud Pública
ANDRÉS FELIPE MARTÍNEZ VEGA	Profesional Especializado, Equipo de Enfermedades Transmitidas por Vectores y Zoonosis, Grupo Enfermedades Endoepidémicas y Relacionadas con la Salud Sexual, Dirección de Vigilancia y Análisis de Riesgo en Salud Pública
LUIS CARLOS GÓMEZ ORTEGA	Profesional Especializado, Coordinador Grupo Enfermedades Endoepidémicas y Relacionadas con la Salud Sexual, Dirección de Vigilancia y Análisis de Riesgo en Salud Pública
Milton Cardozo	Consultor Nacional. OPS Colombia
Baldomero Molina	OPS/PANAFTOSA
Edgardo Moreno	Asesor, Costa Rica

ANEXOS

Documentos de consulta

Vacuna conjuntival

<https://www.czvaccines.com/en/product/b19-czv-ocular/>

Vídeo sobre el método de vacunación conjuntival

<https://www.youtube.com/watch?v=u7YpWQvRhGw>).

Rosa de Bengala

<https://www.czvaccines.com/en/product/rose-bengal/>

<https://www.idexx.es/es/livestock/livestock-tests/ruminant-tests/pourquier-rose-bengale-ag/>

MLVA16

<https://mail.google.com/mail/u/0/#search/MLVA/FMfcgzGtxSpBSkmQhhwBgmGZXmSDprpp>

Bruce-Ladder

<http://staging.euofins-technologies.com/media/4255/10bruk5-protocolo-bi.pdf>

Brucellacap

<https://www.vircell.com/soporte-tecnico/preguntas-frecuentes/3-brucellacap/>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Preparación del medio CITA para aislamiento de *Brucella*

1. De Miguel MJ, Marín CM, Muñoz PM, Dieste L, Grilló MJ, Blasco JM. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. J Clin Microbiol. 2011 Apr;49(4):1458-63. doi: 10.1128/JCM.02301-10.

Referencias importantes para el desarrollo de técnica de cultivo, identificación y serología.

1. Alton, G.G.; Jones, L.M.; Angus, R.D.; Verger, J.M.; Plackett, P.; Corner, L.A.; Stewart, J. Techniques for the Brucellosis Laboratory. In: Paris, Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. <http://hdl.handle.net/102.100.100/263389?index=1>
2. Moreno, E., Moriyón, I. (2006). The Genus *Brucella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds) The Prokaryotes. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_17

Referencias sobre los programas de vacunación, uso de vacunas y el diagnóstico en animales

1. Blasco, J. M., Moreno, E., & Moriyón, I. (2022). Efficacy of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains: A systematic review and meta-analysis. *Transboundary and emerging diseases*, 69(4), 1670–1673. <https://doi.org/10.1111/tbed.14440>.
2. Blasco, J.M., E. Moreno, I. Moriyón. 2020. Brucellosis vaccines and vaccine candidates BT - Veterinary Vaccines for Developing Countries. FAO (Rome), in: Metwally, S., Viljoen, G.J., El Idrissi, A. (Eds.), Veterinary Vaccines for Developing Countries. FAO (Rome). Rome. <https://www.amazon.com/-/es/Samia-Metwally/dp/111950595X>
3. Ducrotoy, M. J., Conde-Álvarez, R., Blasco, J. M., & Moriyón, I. (2016). A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 171, 81–102. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.002>



PANAFTOSA
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
y Salud Pública Veterinaria



4. Ducrotoy, M. J., Muñoz, P. M., Conde-Álvarez, R., Blasco, J. M., & Moriyón, I. (2018). A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. *Preventive veterinary medicine*, 151, 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.01.005>
5. Moreno E, Blasco JM, Moriyón I. Facing the Human and Animal Brucellosis Conundrums: The Forgotten Lessons. *Microorganisms*. 2022 Apr 30;10(5):942. doi: 10.3390/microorganisms10050942. PMID: 35630386; PMCID: PMC9144488.
6. Moriyón, I., Grilló, M. J., Monreal, D., González, D., Marín, C., López-Goñi, I., Mainar-Jaime, R. C., Moreno, E., & Blasco, J. M. (2004). Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Veterinary research*, 35(1), 1–38. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003037>
7. Moriyón, I., Blasco, J. M., Letesson, J. J., De Massis, F., & Moreno, E. (2023). Brucellosis and One Health: Inherited and Future Challenges. *Microorganisms*, 11(8), 2070. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082070>
8. OMSA. Brucellosis (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.1.4. Paris: OIE; 2022. p. 1-4

Referencias sobre el diagnóstico de brucelosis en humanos

1. Moreno E, Blasco JM, Moriyón I. Facing the Human and Animal Brucellosis Conundrums: The Forgotten Lessons. *Microorganisms*. 2022 Apr 30;10(5):942. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050942>
9. Moriyón, I., Blasco, J. M., Letesson, J. J., De Massis, F., & Moreno, E. (2023). Brucellosis and One Health: Inherited and Future Challenges. *Microorganisms*, 11(8), 2070. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082070>.
10. Yagupsky, P., Morata, P., & Colmenero, J. D. (2019). Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clinical microbiology reviews*, 33(1), e00073-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-19>



Referencia de problemas con el uso de PCR para el diagnóstico de la brucelosis

1. Moreno E, Blasco JM, Moriyón I. Facing the Human and Animal Brucellosis Conundrums: The Forgotten Lessons. *Microorganisms*. 2022 Apr 30;10(5):942. doi: 10.3390/microorganisms10050942. PMID: 35630386; PMCID: PMC9144488.

Referencias sobre la diferencia entre *Ochrobactrum* y *Brucella*

1. Moreno, E., Blasco, J. M., Letesson, J. J., Gorvel, J. P., & Moriyón, I. (2022). Pathogenicity and Its Implications in Taxonomy: The *Brucella* and *Ochrobactrum* Case. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(3), 377. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030377>
2. Moreno, E., Middlebrook, E. A., Altamirano-Silva, P., Al Dahouk, S., Araj, G. F., Arce-Gorvel, V., Arenas-Gamboa, Á., Ariza, J., Barquero-Calvo, E., Battelli, G., Bertu, W. J., Blasco, J. M., Bosilkovski, M., Cadmus, S., Caswell, C. C., Celli, J., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., Comerci, D. J., Conde-Álvarez, R., ... Moriyón, I. (2023). If You're Not Confused, You're Not Paying Attention: *Ochrobactrum* Is Not *Brucella*. *Journal of clinical microbiology*, 61(8), e0043823. <https://doi.org/10.1128/jcm.00438-23>