

**Brucelosis: continúa representando una de las principales
infecciones adquiridas en el laboratorio**

Raúl Garza-Velasco¹, Silvia Livera-Sabbagh¹ y Luis Manuel Perea-Mejía²

¹Facultad de Química, UNAM

²Facultad de Medicina, UNAM

Resumen

La brucelosis representa una enfermedad complicada, desde el diagnóstico hasta el tratamiento del enfermo, habida cuenta que su origen depende de la ocupación o de las costumbres alimentarias de los individuos y que su sintomatología es intermitente y la comparten muchos otros padecimientos.

Dentro del laboratorio clínico, la presencia de *Brucella* en las muestras puede resultar particularmente peligrosa para los Químicos y técnicos que realizan los estudios microbiológicos correspondientes, ya que pueden adquirir la brucelosis al entrar en contacto con los aerosoles que se forman al manipular los cultivos y las suspensiones.

El presente trabajo aborda las principales temáticas asociadas a esta enfermedad, incluida la relativa al peligro que significa para el personal del laboratorio.

Terminología clave: Brucelosis, patología, patogenia, brucelosis en el laboratorio, tratamiento.

**Brucellosis: it continues to be one of the most common
Laboratory- acquired infections**

Abstract

Brucellosis is a complicated disease because of its diagnosis and its therapy. In human patients, the origin of the infection depends on the occupation and alimentary habits of the individuals and their symptoms are intermittent and shared with many others diseases.

The presence of *Brucella* in mucosal secretions, blood or other specimens is a significant risk to technicians that make microbiological analysis in clinical laboratories. They can acquire brucellosis through infectious aerosols associated with unprotected handling of cultures and bacterial suspensions.

The present work describes the main characteristics of this disease including those related to the risk that it represents to the laboratories personnel.

Keywords: Brucellosis, pathology, disease origin, brucellosis acquire in the laboratory, therapy.

**Brucelosis: continúa representando una de las principales
infecciones adquiridas en el laboratorio**

Raúl Garza-Velasco¹, Silvia Livera-Sabbagh¹ y Luis Manuel Perea-Mejía²

¹Facultad de Química, UNAM

²Facultad de Medicina, UNAM

Introducción

La brucelosis es un padecimiento naturalmente zoonótico, que afecta a numerosas especies animales, en las cuales se manifiesta primordialmente como una enfermedad abortiva resultante de una infección prolongada, que por lo regular cursa sin sintomatología alguna (1).

Por su parte, la brucelosis humana corresponde a una patología compleja en la que destacan los episodios septicémicos derivados del establecimiento bacteriano en diversos órganos, entre los que figuran el bazo, hígado, corazón, riñones, huesos y cerebro (1, 2).

Al género *Brucella* se le encuentra distribuido en todo el mundo, estimándose que ocasiona más de medio millón de casos anuales en humanos, si bien su incidencia en cada región geográfica es particularmente variable; por ejemplo, en los Estados Unidos y otros países desarrollados se considera que la brucelosis está cerca de ser erradicada, pero en muchos otros es evidente que se trata de una afección típicamente endémica, tal como lo refleja el hecho de que en Perú, Kuwait y Arabia Saudita se presentan más de 200 casos anuales por cada 100,000 habitantes (3, 4, 5).

Los seres humanos pueden infectarse con *Brucella melitensis*, *Brucella suis* o *Brucella abortus*, aunque también llegan a detectarse casos raros por *Brucella canis*; sin embargo, la primera de las especies mencionadas es la más importante, tanto por su virulencia como por su mayor frecuencia. En general, la brucelosis tiene su origen en el contacto directo con animales infectados o sus tejidos, en cuyo caso se habla de una importante enfermedad ocupacional que afecta a ganaderos, granjeros, veterinarios y trabajadores de las industrias que procesan carne y/o lácteos; no obstante, la manera común de que la comunidad abierta la contraiga reside en la ingestión de productos lácteos provenientes de animales enfermos, sobresaliendo la leche bronca, quesos frescos y mantequilla, entre algunos otros (1, 3, 6).

Para el Químico, también resulta indispensable tener presente que se trata de la afección que se adquiere con más frecuencia dentro del laboratorio clínico, incidiendo principalmente en el personal que se desempeña en el área de Infectología. En este caso, la transmisión ocurre a través de aerosoles y la magnitud del riesgo varía con la especie y el número de bacterias que contienen la muestra o los cultivos implicados. Esta clase de riesgo se extiende hasta los químicos que elaboran las vacunas utilizadas para inmunizar al ganado (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13).

Por último, a *Brucella* se le reconoce un gran potencial como arma biológica, dada su capacidad para originar epidemias por vía aérea. De hecho, en 1954, el ejército americano llevó a cabo diversas investigaciones tendientes a desarrollar a *Brucella suis* como arma estratégica pero, afortunadamente, los cambios políticos a nivel mundial, así como la Convención de Armas Biológicas y Tóxicas de 1972 originaron el abandono de este objetivo (8, 10, 14)

El presente trabajo aborda las principales temáticas asociadas a la brucelosis, haciendo énfasis en su trascendencia como una de las afecciones que se pueden adquirir dentro del laboratorio clínico.

Patología asociada a la brucelosis humana

A la brucelosis humana suele dividírsele en subclínica, aguda, subaguda y crónica, dependiendo de la intensidad de los síntomas y del tiempo que afecta al individuo. En tal sentido, la enfermedad subclínica es prácticamente asintomática, sólo se llega a detectar mediante algunas pruebas de laboratorio y se estima que su duración es de hasta tres meses; la forma aguda da lugar a signos clínicos claros, aunque buena parte de ellos es compartida por otros padecimientos y se extiende por tres a doce meses. Finalmente, los cuadros crónicos se caracterizan por afectar al paciente durante un año o más y pueden ocurrir en dos formas: específica o inespecífica; en la primera, los síntomas y signos son fácilmente atribuibles a los efectos tardíos de la brucelosis, mientras que en la inespecífica no se manifiestan signos distintivos, sino un malestar general similar al de las infecciones agudas, incluyendo insomnio, anorexia, náuseas, nerviosismo, depresión, taquicardia, palpitaciones, síncope, disnea, debilidad, indigestión y dolor de cabeza, entre algunos otros (1, 3, 4, 15).

En las recidivas, los síntomas semejan a los del cuadro inicial, aunque son más severos y comúnmente aparecen dos o tres meses después de haberse completado el tratamiento con antibióticos; por tal motivo, dichas recaídas son difíciles de distinguir de las reinfecciones (16, 17).

Síntomas y signos. El periodo de incubación del padecimiento fluctúa entre los cinco días y varios meses, los que preceden a una sintomatología que inicia abrupta o gradualmente. Es importante hacer notar que ninguno de los síntomas de la brucelosis es lo suficientemente específico para facilitar el diagnóstico y que la fiebre es la manifestación más común, aunque puede presentarse de modo constante o intermitente; la temperatura corporal del enfermo suele descender casi hasta valores normales durante la mañana y elevarse por la tarde, rasgo que sustenta la otra denominación más frecuente del padecimiento: fiebre ondulante (1, 15, 16).

Los individuos infectados pueden evidenciar cuadros muy diversos que involucran a distintas partes del organismo. Los más definidos, son (2, 14, 15, 16, 18):

- Síntomas constitucionales, tales como anorexia, astenia, fatiga, debilidad, malestar, dolores generalizados y sudoración profusa. En ocasiones el cuadro es severamente debilitante y provoca incapacidad para realizar actividades cotidianas.
- Síntomas asociados a la afectación de articulaciones y huesos, incluyendo artralgias, dorsalgias, dolor o sensibilidad en los huesos de la espina dorsal y artritis.
- Síntomas neuro-psiquiátricos comunes, tales como depresión, fatiga, insomnio, cefalea, irritación, nerviosismo, debilidad, mareo, inestabilidad al caminar e impotencia sexual.
- Síntomas gastrointestinales que incluyen dolor abdominal, constipación, diarrea y vómito.

- Síntomas respiratorios, con tos y disnea, los cuales rara vez se relacionan con alguna infección activa en pulmones.

Las lesiones localizadas pueden comprometer a las articulaciones -siendo más afectadas las de rodillas, cadera y hueso sacroilíaco-, hígado (con hepatomegalia, abscesos diversos o hepatitis granulomatosa), bazo (con esplenomegalia y abscesos múltiples), vías respiratorias (con efusión pleural), sistema nervioso central (con paraparesia, radiculopatía, meningitis y pérdida del oído), tracto genitourinario masculino (con prostatitis, epididimitis, orquitis o epidídimo-orquitis) y sistema reproductivo femenino (con salpingitis, abscesos en ovarios o en la glándula de Bartholin y aborto)¹ (3, 14, 19, 20, 21, 22).

Así mismo, existen casos documentados de signos que llegan a prolongarse por más de treinta años, e inclusive, en individuos con tendencia a la neurosis, la brucelosis puede repercutir en la personalidad, provocando depresión severa e incrementando la irritabilidad, nerviosismo e inestabilidad emocional (3, 17).

Patogenia

Una vez que los bacilos del género *Brucella* alcanzan alguna de las mucosas o la sangre humana, los macrófagos o monocitos pueden englobarlos, lo que establece el inicio de una interacción microorganismo-hospedero que puede prolongarse por semanas, meses o años.

¹ En los seres humanos, la bacteria no muestra una marcada afinidad por el sistema reproductivo femenino ni por las glándulas mamarias -tal como sí sucede en los animales-, lo que podría deberse a la baja concentración de eritrol en las secreciones genitales humanas.

La bacteria entra en contacto con la superficie del monocito o macrófago y se desplaza varios minutos sobre ella, obedeciendo a la inercia de la re-estructuración de la membrana del fagocito, hasta que resulta engullida por macropinosomas (6, 14, 23).

La reproducción de *Brucella* en el interior de monocitos y macrófagos supone la evasión o neutralización bacterianas de los eficaces mecanismos microbicidas con que cuentan estos fagocitos profesionales. El microorganismo ingresa a ellos previa interacción con su estructura superficial y queda ubicado en el interior de vesículas fagosómicas asociadas a la vía endocítica, a las cuales no logran fusionarse los lisosomas, lo que permite la supervivencia del patógeno (6, 24, 25).

De hecho, dichas vesículas se conocen como fagosomas de replicación o brucelomas, ya que los bacilos crecen dentro de ellas, aún cuando deben soportar, tanto cierta escasez de nutrientes, como las condiciones imperantes de microaerobiosis y la interacción con reactivos intermediarios de oxígeno. Sin embargo, al no formarse el fagolisosoma, la bacteria permanece a salvo de la exposición a hidrolasas, lipasas y defensinas (3, 6, 14).

Diversos estudios muestran que *B. abortus* sobrevive en los fagosomas de replicación o brucelomas, merced a que éstos, por influencia de dos proteínas del bacilo (BvrR y BvrS) interaccionan con algunos componentes de la vía autofágica y se unen a autofagosomas tempranos derivados del retículo endoplásmico rugoso; esto último evita que se concrete la fusión fagolisosomal, lo que garantiza que no ocurra la inactivación del microorganismo vía las hidrolasas y los agentes oxidantes contenidos en los lisosomas (23, 24).

Esta clase de observaciones es particularmente interesante para tratar de entender la evolución y curso de la enfermedad, si bien el modo en que se estabiliza un bruceloma aún no se ha definido con claridad (6).

Si bien los niveles de IgG anti-*Brucella* se elevan durante las primeras etapas de la infección, en realidad no existe correlación entre la aparición de esta respuesta y la resolución de la infección, debido a que la bacteria puede persistir en el organismo de su hospedero a pesar de la presencia de altas concentraciones de anticuerpos dirigidos en su contra²; de hecho, los altos títulos séricos anti-*Brucella* de dicha clase de inmunoglobulina sólo representan indicadores de infección activa (6, 16, 26).

La brucelosis adquirida en el laboratorio

La brucelosis representa una de las enfermedades que más comúnmente se adquieren en el laboratorio clínico y, en la mayoría de los casos, las especies involucradas son *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* o *B. canis*, aunque también figuran las cepas vacunales *B. abortus* 19S y RB51, así como *B. melitensis* Rev-1.

Si bien *B. melitensis* es la que más afecta al personal, todas las especies son altamente contagiosas, por lo cual no es infrecuente que, previos errores de manipulación, tengan lugar pequeñas epidemias que afectan a químicos y técnicos. De acuerdo con diversos estudios, entre las posibles causas de las brucelosis adquiridas dentro de los laboratorios, destacan las siguientes (7, 8, 10, 11, 13):

² Desde el punto de vista del proceso invasivo, las IgGs parecen promover la infección, habida cuenta que, vía la opsonización, los bacilos cuentan con un medio rápido y eficaz para ingresar a los macrófagos.

- Los resultados erróneos en las extensiones teñidas al Gram. Por ejemplo, se han reportado casos en donde *Brucella* resistió la decoloración correspondiente, apareciendo como cocobacilo Gram positivo, lo que condujo a identificarla equivocadamente como *Micrococcus* sp o como un bacilo corineforme. Es decir, las interpretaciones inexactas no sólo conducen a diagnósticos imprecisos sino que, además, incrementan el riesgo de exposición del personal de laboratorio al virulento agente causal.
- El manejo inadecuado de las muestras o de los cultivos. En este caso, aunque la concentración de *Brucella* en los especímenes puede ser baja, la probabilidad de exposición aumenta después de la incubación de los cultivos; por obvio, el peligro crece cuando estos se someten a centrifugación y agitación vigorosa o se emplean para efectuar resiembras y pruebas de identificación. Todas las manipulaciones se asocian a la generación de aerosoles y a derramamientos accidentales.
- Las inapropiadas prácticas de laboratorio, tales como las que implican el aspirado del contenido de las cajas Petri, el trabajo con microorganismos viables en mesas abiertas, la manipulación sin la utilización de guantes, máscaras y lentes de seguridad y la ingestión accidental de bacterias al pipetear con la boca. Evidentemente, también ha llegado a ocurrir la autoinoculación con jeringas que contienen muestras clínicas o suspensiones microbianas, e inclusive, la inhalación de patógenos al romperse los frascos con especímenes o suspensiones bacterianas durante la centrifugación.

El riesgo del personal se puede reducir cuando el médico informa oportunamente sobre la sospecha de brucelosis en el paciente, ya que ello alerta al laboratorio sobre la necesidad de llevar a cabo un manejo adecuado de las muestras y los cultivos. Sin embargo, la amplia e inespecífica gama de manifestaciones clínicas de la enfermedad dificulta su reconocimiento durante la consulta médica. Por tal motivo, es indispensable que todo el personal del laboratorio clínico se encuentre debidamente capacitado y asista periódicamente a cursos que le instruyan sobre seguridad; de hecho, resulta contraproducente dar por sentado que el personal conoce las buenas prácticas de laboratorio. El programa debe identificar riesgos potenciales relacionados con la labor de cada individuo e instruir al empleado acerca de los procedimientos aprobados para prevenir y controlar los riesgos. En el laboratorio de Microbiología o Infectología, los profesionales de nueva incorporación deben recibir la información oportuna acerca de los agentes etiológicos que podrían encontrar, de los métodos autorizados oficialmente para inactivar o descontaminar y de lo que procede realizar en caso de que se presente algún accidente (11, 13).

Los cultivos vivos de *Brucella* y de otros microorganismos virulentos se deben manejar en un gabinete de seguridad de tipo II, siguiendo las medidas de bioseguridad de nivel III. Otras recomendaciones para minimizar el riesgo de contagio en el laboratorio, incluyen la de evitar la realización de pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, ya que *Brucella* generalmente no adquiere resistencia y el régimen terapéutico involucrado es estándar; así mismo, se sugiere la implantación de sistemas automatizados de monitoreo continuo para el cultivo sanguíneo en muestras de pacientes con sospecha de brucelosis. Lógicamente, cuando se llega a derramar una suspensión de *Brucella* es indispensable evacuar todo el laboratorio de inmediato y aplicar un germicida efectivo como fenol al

3% o cloro al 10%; la persona encargada de ello debe estar entrenada y utilizar máscara de seguridad, lentes de seguridad, guantes y bata impermeable³ (11, 13).

Tratamiento de la brucelosis humana

Si bien aún no se ha establecido alguna evidencia concluyente sobre el tratamiento óptimo de la brucelosis, desde 1986 ha estado vigente la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), consistente en una combinación de rifampina (600 a 900 mg) y doxiciclina (200 mg), administradas diariamente en forma oral, durante un mínimo de seis semanas (21, 27, 28, 29).

Alternativamente, la OMS ha sugerido que la rifampina puede ser reemplazada por estreptomicina (15 mg/Kg) intramuscular por dos semanas, en virtud de que algunos autores han reportado que esta nueva combinación se asocia a una mayor eficacia y menor probabilidad de recurrencia, especialmente en las formas localizadas de la enfermedad. Sin embargo, el perfil toxicológico de la estreptomicina obliga al monitoreo de la función renal (1, 28, 29).

Las pruebas clínicas controladas que se han efectuado con otros antibióticos, incluidos el sulfometoxazol-trimetoprim, nuevos macrólidos y beta-lactámicos, han proporcionado resultados inferiores a los obtenidos con las dos combinaciones mencionadas anteriormente (27).

³ No existe predisposición entre los individuos que padecen afecciones subyacentes y el microorganismo no se transmite de persona a persona, lo que al parecer disminuiría el riesgo de contraer brucelosis a los familiares de químicos y técnicos afectados.

Las fluoroquinolonas constituyen una alternativa en pacientes que presentan recurrencias o episodios de toxicidad después de haber recibido otros medicamentos pero, además, pueden reemplazar a la tetraciclina o a la rifampina en los regímenes recomendados por la OMS, aunque también llegan a administrarse como un tercer agente terapéutico (27).

La monoterapia con rifampina es la alternativa para tratar la brucelosis durante el embarazo y su combinación con trimetoprim-sulfametoxazol es la opción más recomendada para combatir a la enfermedad en los infantes (1, 20, 27).

La cirugía constituye una posibilidad en pacientes con endocarditis o abscesos en cerebro, bazo u otros órganos. Evidentemente, la terapia con antimicrobianos es esencialmente la sugerida por la OMS, pero suele prolongarse hasta por seis meses o más, especialmente en pacientes con formas osteoarticulares de la enfermedad y/o con espondilitis. Finalmente, se ha reportado que las combinaciones de tres antibióticos resultan apropiadas en algunos casos de endocarditis, espondilitis o meningitis, destacando el régimen terapéutico que incluye a la rifampina, una tetraciclina y un aminoglucósido (1, 16, 27).

Comentarios finales

El control de la brucelosis humana depende de que se logren establecer y cumplir las medidas adecuadas de control de la enfermedad en el ganado y en los alimentos de origen animal. Numerosos países del tercer mundo aún se encuentran en las primeras fases de la implementación de un plan maestro.

Entre las principales vacunas que se emplean para inmunizar a los animales, destacan la cepa no virulenta Rev1 de *B. melitensis* (para ganado caprino y pequeños rumiantes) y la lisa atenuada S19 de *B. abortus* S19 (para bovinos), aunque recientemente ésta ha sido reemplazada por la RB51, mutante rugosa atenuada de la misma especie, en México, EUA, Chile, Colombia, Costa Rica y Uruguay (9, 12).

El control de *Brucella* en los alimentos de origen animal debe considerar que el microorganismo permanece viable hasta 180 días en el queso de cabra y resiste la salmuera y el ahumado, pero muere en la leche acidificada y en los quesos fermentados, e inclusive, es destruido por pasteurización de los productos lácteos a 62.7°C durante 30 minutos o a 71.6°C por 15 minutos (1).

Finalmente, es oportuno señalar que los principales reportes relacionados con infecciones adquiridas dentro del laboratorio clínico establecen que cerca de la mitad de los casos son provocados por bacterias, entre las que destacan *Brucella melitensis*, *Salmonella* del serotipo *Typhi* y *Coxiella burnetii*. Por su parte, la enfermedad con mayor mortalidad (4.2%) entre los químicos y técnicos del laboratorio que no manipulan adecuadamente las muestras y los cultivos, es la psitacosis, padecimiento neumónico de las aves, causado por *Chlamydia psittaci*, que también afecta el tracto respiratorio inferior de quienes tienen como mascotas a diversas clases de pájaros (8, 10, 11, 13).

Referencias bibliográficas

1. Andriopoulos P, Tsironi M, Deftereos S, Aessopos A and Assimakopoulos G: Acute brucellosis: presentation, diagnosis, and treatment of 144 cases, *Int J Infect Dis*, 2007; 11(1): 52-57.

2. Dornand J, Lafont V, Oliaro J, Terraza A, Castaneda-Roldán E and Liautard JP: Impairment of intramacrophagic *Brucella suis* multiplication by human Natural Killer cells through a contact-dependent mechanism, *Infect Immun*, 2004; 72(4): 2303-2311.
3. Drevets DA, Leenen PJM and Greenfield RA: Invasion of the Central Nervous System by intracellular bacteria, *Clin Microbiol Rev*, 2004; 17(2): 323-347.
4. Fallatah SM, Oduloju AJ, Al-Dusari SN and Fakunle YM: Human brucellosis in Northern Saudi Arabia, *Saudi Med J*, 2005; 26(10): 1562-1566.
5. Pourbagher MA, Pourbagher A, Savas L, Turunc T, Demiroglu YZ, Erol I and Yalcintas D: Clinical pattern and abdominal sonographic findings in 251 cases of brucellosis in southern Turkey, *Am J Roentgenol*, 2006; 187(2): 191-194.
6. Roop II RM, Bellaire BH, Wright Balderas M and Cardelli JA: Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche, *Mol Microbiol*, 2004; 52(3): 621–630.
7. Noviello S, Gallo R, Kelly M, Limberger RJ, DeAngelis K, Cain L, Wallace B and Dumas N: Laboratory-acquired brucellosis, *Emerg Infect Dis*, 2004; 10(10): 1848-1850.
8. Yagupsky P and Baron EJ: Laboratory exposures to *Brucellae* and implications for bioterrorism, *Emerg Infect Dis*, 2005; 11(8): 1180-1185.
9. Ashford DA, Di Pietra J, Lingappa J, Woods C, Noll H, Neville B, Weyant R and Perkins BA: Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51, *Vaccine*, 2004; 22(25-26): 3435-3439.
10. Memish ZA and Mah MW: Brucellosis in laboratory workers at a Saudi Arabian hospital; *Am J Infect Cont*, 2001; 29(1): 48-52.
11. Olle-Goig JE and Canela-Soler J: An outbreak of *Brucella melitensis* infection by airborne transmission among laboratory workers, *Am J Pub Health*, 1987; 77(3): 335-338.
12. Wallach JC, Ferrero MC, Victorial Delpino M, Fossati CA and Baldi PC: Occupational infection due to *Brucella abortus* S19 among workers involved in vaccine production in Argentina, *Clin Microbiol Infect*, 2008; 14(8): 805-807.
13. Yagupsky P, Peled N, Riesenberk K and Banai M: Exposure of hospital personnel to *Brucella melitensis* and occurrence of laboratory-acquired disease in an endemic area, *Scand J Infect Dis*, 2000; 32(1): 31-35.
14. Cutler SJ, Whatmore AM and Commander NJ: Brucellosis –New Aspects of an Old Disease, *J Appl Microbiol*, 2005; 98: 1270-1281.
15. Tohme A, Zein E, El Rassi B, Koussa S and Nasnas R: Human brucellosis in Lebanon. Clinical features and therapeutic responses in 88 patients, *J Med Liban*, 2004; 52(3): 149-155.

16. Hasanjani Roushan, MR, Mohrez, M, Smailnejad Gangi SM, Soleimani Amiri MJ and Hajiahmadi M: Epidemiological features and clinical manifestations in 469 adult patients with brucellosis in Babol, Northern Iran, *Epidemiol Infect*, 2004; 132(6): 1109-1114.
17. Kokoglu OF, Hosoglu S, Geyik MF, Ayaz C, Akalin S, Buyukbese MA and Cetinkaya A: Clinical and laboratory features of brucellosis in two university hospitals in Southeast Turkey, *Trop Doct*, 2006; 36(1): 49-51.
18. Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-1994. Para la prevención y control de la brucelosis en el hombre. Diario Oficial de la Nación. 2 de febrero de 2001. Segunda sección.
19. Akinci E, Bodur H, Cevik MA, Erbay A, Eren SS, Ziraman I, Balaban N, Atan A and Erqul G: A Complication of brucellosis: epididymoorchitis, *Int J Infect Dis*, 2006; 10(2):171-177.
20. Peled N, David Y and Yagupsky P: Bartholin's gland abscess caused by *Brucella melitensis*, *J Clin Microbiol*, 2004; 42(2): 917-918.
21. Rovey C, Rolain JM, Raoult D and Brouqui P: Shell Vial Culture as a tool for isolation of *Brucella melitensis* in chronic hepatic abscess, *J Clin Microbiol*, 2003; 41(9): 4460-4461.
22. Luc M, Armingeat T, Pham T, Legré V and Lafforgue P: Chronic *Brucella* infection of the humerus diagnosed after spontaneous fracture, *Joint Bone Spine*, 2008; 75: 229-231.
23. Kim S, Watanabe K, Suzuki H and Watarai M: Roles of *Brucella abortus* SpoT in morphological differentiation and intramacrophagic replication, *Microbiol*, 2005; 151: 1607–1617.
24. Manterola L, Moriyón I, Moreno E, Sola-Landa A, Weiss DS, Koch MHJ, Howe J, Brandenburg K and López-Goñi I: The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains Lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides, *J Bacteriol*, 2005; 187(16): 5631–5639.
25. Zwerdling A, Victoria Delpino M, Barrionuevo P, Cassataro J, Pasquevich KA, García Samartino C, Fossati CA and Giambartolomei GH: *Brucella* lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by *Brucella abortus*, *Microbes Infect*, 2008; 10: 1346-1354.
26. Almuneef M and Memish ZA: Persistence of *Brucella* antibodies after successful treatment of acute brucellosis in an area of endemicity, *J Clin Microbiol*, 2002; 40: 2313.
27. Falagas ME and Bliziotis IA: Quinolones for treatment of human brucellosis: critical review of the evidence from microbiological and clinical studies, *Antimicrob Agents Chemother*, 2006; 50(1): 22–33.

28. Orhan G, Bayram A, Zer Y and Balci I: Synergy tests by E Test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*, J Clin Microbiol, 2005; 43(1): 140–143.
29. Solera J, Rodríguez-Zapata M, Geijo P, Largo J, Paulino J, Sáenz L, Martínez-Alfaro E, Sánchez L, Sepúlveda MA, Ruiz-Ribó MD and the GECMEI Group: Doxycycline-Rifampin versus Doxycycline-Streptomycin in treatment of human brucellosis due to *Brucella melitensis*, Antimicrob Agents Chemother, 1995; 39(9): 2061–2067.