Diversidad Genética de *Brucella* en España

Montserrat Ortega, Sylvia Valdezate y Juan Antonio Sáez-Nieto

Unidad de Taxonomía del Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid)

RESUMEN

La brucelosis constituye una de las principales zoonosis existentes en España y, presenta una gran relevancia en países de la Unión Europea, especialmente en países mediterráneos, y del Centro y Sur de América[1]. Sus presentaciones humana y animal, suponen un serio problema sanitario y económico. El bajo polimorfismo genético de *Brucella,* patógeno intracelular facultativo responsable de la infección, y el riesgo biológico en su manipulación, han restringido el desarrollo de métodos de tipificación necesarios en la vigilancia epidemiológica de la brucelosis. Las nuevas técnicas moleculares de tipificación proporcionan herramientas útiles para la caracterización de aislamientos de *Brucella spp*. En el laboratorio de Taxonomía del Servicio de Bacteriología, del Centro Nacional de Microbiología (CNM), del Instituto de Salud Carlos III, se ha profundizado en la epidemiología y análisis filogenético de *Brucella melitensis* por ser el principal agente etiológico de la brucelosis humana en nuestro país.

ANTECEDENTES

La brucelosis es una zoonosis de distribución mundial, endémica en la Unión Europea, en áreas del Mediterráneo, oeste asiático y en diferentes zonas de África, Centroamérica y Sudamérica, así como en Estados Unidos[1-4](Figura 1), que origina abortos y esterilidad en animales y enfermedad sistémica en el hombre. El establecimiento de medidas higiénicas en alimentación, veterinaria, la vacunación, así como los programas de seguimiento han reducido el número de casos de brucelosis en el hombre[5]. Sin embargo, su adquisición en humanos sigue produciéndose debido a la exposición ocupacional por contacto directo con los animales infectados, sus secreciones, o sus cadáveres, e indirecta con el consumo de leche o productos lácteos frescos o no pasteurizados[6, 7]. La adquisición alimentaria es la vía prioritaria en humanos en países industrializados, generándose numerosos brotes de origen alimentario[2, 3].

La brucelosis en humanos constituye una infección sistémica importante, de carácter debilitante de tipo crónico, con implicación multiorgánica: gastrointestinal, cardiovascular, genitourinaria, hematopoyética, nerviosa, esquelética, pulmonar, renal, cutánea y ocular[8, 9]. La sintomatología de la brucelosis no es específica: fiebre, artralgias, calambres, dolor de cabeza y espalda, dolor, fatiga, demencia, linfoadenopatías, hepato-esplenomegalia, lo que origina que el número de casos de brucelosis activa pudiera ser superior a lo notificado[10, 11]. Estas mismas características de la infección, hacen que *Brucella* aparezca como potencial agente de amenaza biológica de categoría B en la lista del CDC[12]. Su clasificación es controvertida[13] porque los estudios de hibridación DNA-DNA han demostrado la alta homología (>95%) de *Brucella spp*. Actualmente se tiende a utilizar la taxonomía clásica, considerando las especies y biovariedades descritas hasta el momento, que se indican en la tabla 1, con afinidad por distintos huéspedes. Aún así no siempre se puede hablar de una adaptación absoluta a los mismos.

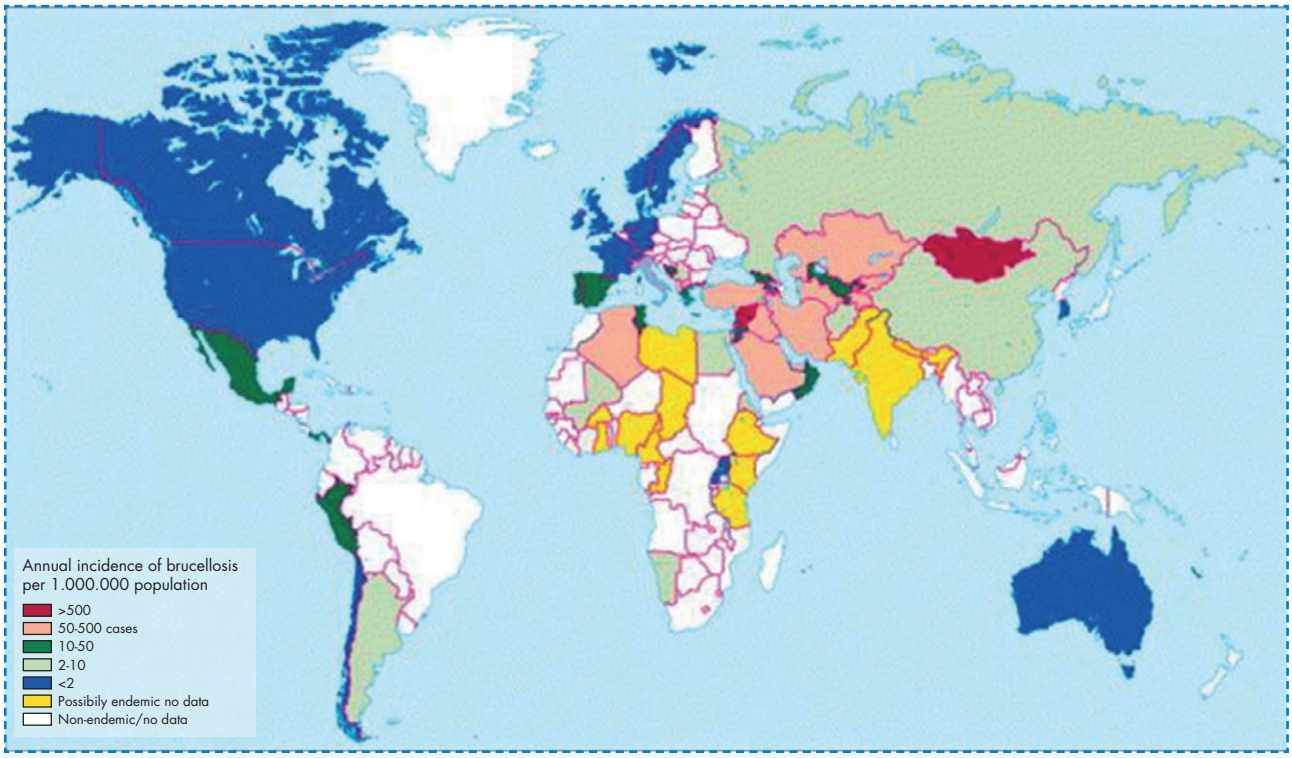

Fig. 1. *Incidencia mundial de la brucelosis humana (Pappas G y cols, 2006).*

ESPECIES	BIOVARIEDADES DESCRITAS	PRINCIPAL/ES HOSPEDADOR/ES
Especies clásicas		
B. melitensis	1-3	ovinos, camello
B. abortus	1-6, (7), 9[a]	ternera, búfalo, camello, yak
B. suis	1-5	cerdo, liebre, reno, roedor, caribú[b]
B. canis	-	perro
B. ovis	-	oveja
B. neotomae	-	roedor
Especies recientes		
B. ceti	-	delfín, ballena, marsopa
B. pinnipedialis	-	foca
B. microti	-	zorro rojo, roedor de campo
B. inopinata	-	desconocido
Especies futuras		
BO2	-	desconocido
Aislado de babuino	-	Babuino

[a] La biovariedad 7 está bajo revisión, posiblemente la cepa de referencia procede de un cultivo mixto.
[b] la preferencia por un hospedador es dependiente de la biovariedad.

Tabla 1. *Taxomonía actual de* Brucella.

Los principales objetivos definidos por el departamento de agricultura de la FAO para la vigilancia de la brucelosis humana[14] son la identificación de los nuevos casos de brucelosis y la detección de la(s) fuente(s) responsables de la infección, ocupacional[15] o por el contrario alimentaria[2]. Para poder llevar a cabo estos objetivos se ha hecho uso de distintos marcadores moleculares que pretenden mejorar el conocimiento sobre la patogénesis de la infección permitiendo la detección de brotes de brucelosis y la identificación de reservorios y mecanismos de transmisión.

IDENTIFICACIÓN DE *BRUCELLA*

La falta de polimorfismo genético de *Brucella spp*[16] ha limitado la identificación y la aplicación de técnicas convencionales de tipificación en este patógeno, como ha sucedido con la electroforesis en campo pulsado (PFGE)[17], con la amplificación polimórfica al azar (RAPD)[18] o la amplificación arbitraria (AP-PCR)[19], obligando al desarrollo y aplicación de nuevos marcadores moleculares. Desde el punto de vista diagnóstico, la amplificación de un fragmento (223 pb) de una proteína de membrana inmunogenética, BCSP31, ha permitido la detección eficiente de *Brucella spp*. en muestras clínicas[20].

Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con otros patógenos bacterianos, la identificación de las distintas especies de *Brucella spp* no se consigue mediante la secuenciación del 16S rRNA[21] ni con la amplificación de la región del DNA ribosomal situada entre el 16S-23S[22]. Una de las propuestas más eficientes para la diferenciación entre especies de *Brucella* consiste en la utilización de la distribución variable de una secuencia de inserción en el cromosoma, IS711, generándose diferentes tamaños de amplicón según la especie[23, 24]. Esta técnica ha permitido la identificación de *B. abortus* (bv. 1, 2, 4), *B. melitensis, B. ovis,* y *B. suis* (bv.1) pero no así la identificación de *B. abortus* bv 3, 5-7, ni de *B. suis* bv 2-5. Un estudio posterior que utilizaba una región específica de *B. abortus* S19, eryC-eryD, permitió amplificar los biovares 3b, 5, 6 y 9[25]. Sin embargo ambos métodos han fallado en la detección de todas las especies y de todos los biovares.

Una mejor identificación ha sido posible mediante la utilización de una PCR múltiple de nueva generación, «Bruce-ladder», con 8 parejas de primers especie-específicos, que amplifican 7 productos con diferencias en número y en tamaño, logrando la identificación de *B. abortus, B. melitensis, B. suis, B. ovis, B. canis, B. neotomae, y B. pinnipedialis* y *B. ceti* (mamíferos marinos), aunque no la diferenciación de biovares[26]. La información epidemiológica a largo plazo que proporciona el MLST («multilocus sequence typing») mediante el estudio de 9 genes «housekeeping» *(gap, aroA, glk, dnaK, gyrB, trpE, cobQ, omp25 e int-hyp)* en aislamientos de *Brucella spp* ha permitido la difenciación clara en clusters que corresponden a especies clásicas de *Brucella spp; B. abortus, B. melitensis, B. ovis* y *B. neotomae,* además de observar una mayor diversidad en *B. suis* y un cluster diferenciado para *Brucella spp* de mamíferos marinos[27]. Una novedosa PCR con ligación en la que la mayoría de los marcadores utilizados proceden de los genes utilizados en el esquema original de MLST ha logrado la identificación de todas las especies de *Brucella* descritas hasta el momento[28].

ESTUDIO DE LA CLONALIDAD DE *BRUCELLA*

La secuenciación genómica completa de *B. melitensis, B. abortus* y *B. suis,* ha supuesto el inicio de nuevas técnicas dirigidas hacia la identificación de genes que permiten la diferenciación genómica de especies y biovariedades de *Brucella spp,* así como la caracterización genotípica. En este aspecto, la aplicación de técnicas de AFLP-PCR *(amplified fragment length polymorphism PCR)*[29]; del análisis de la existencia y transcripción «in vitro» de determinados genes implicados en el metabolismo, virulencia, sistemas de secreción, y recombinasas sitio-específicas o mediante la detección de repeticiones en tándem (TRs) presentes en 8 genes[30] han supuesto un avance en la identificación de este género.

Concretamente, con la información epidemiológica a corto plazo proporcionada por las técnicas **MLVA** *(multilocus variable number of tandem repeats analysis)* se ha alcanzado una información epidemiológica de mayor nivel, ya que los marcadores incluidos actúan como un reloj molecular rápido. Basadas en la variación de secuencias repetidas en tándem, **VNTRs,** están siendo adecuadas para estudios locales epidemiológicos como tipo de adquisición, brotes, reactivación, etc...

A raíz de la descripción de una técnica de MLVA denominada **HOOF-Prints** *(Hypervariable Octameric Oligonucleotide Finger-Prints),* para la detección de TRs hipervariables en 8 loci de genoma de *Brucella spp*.[31] se ha conseguido un importante avance en la tipificación de este microorganismo. Es aplicable a todas las especies y biovariedades. Esta técnica ha sido ampliamente estudiada en *B. abortus* de origen animal[38], mostrando una gran capacidad discriminatoria y eficiencia en la distinción de cepas implicadas en brotes. Por otro lado, **VNTR-21** incrementó la capacidad de HOOF-Prints al añadir 13 marcadores nuevos. La inclusión de VNTRs de mayor tamaño de repetición (pero con menor diversidad), permitió la agrupación de los aislamientos en clusters constituidos por las especies tradicionalmente consideradas (Figura 2) consiguiendo una resolución a nivel inter e intra-especie[33].

Actualmente, **MLVA-16** se ha convertido en el método de tipificación de mayor aplicación, tanto en aislamientos humanos como de animales y de diferentes ámbitos locales y globales. Surgida de añadir un marcador más a los 15 seleccionados de **MLVA-15** que fueron agrupados en 3 paneles tras analizar 80 VNTRs en cepas de referencia[30, 34] ha permitido la identificación de las especies descritas recientemente: *B. microti* y *B. inopinata* (Figura 3). El panel 1 formado por 8 minisatélites ha establacido en *B. melitensis* los grupos o biotipos: ***americano, mediterráneo-este y mediterráneo-oeste***. Los paneles MLVA-16 2A y 2B con 3 y 5 microsatélites (6-9 pb), respectivamente, presentan una mayor discrimina-

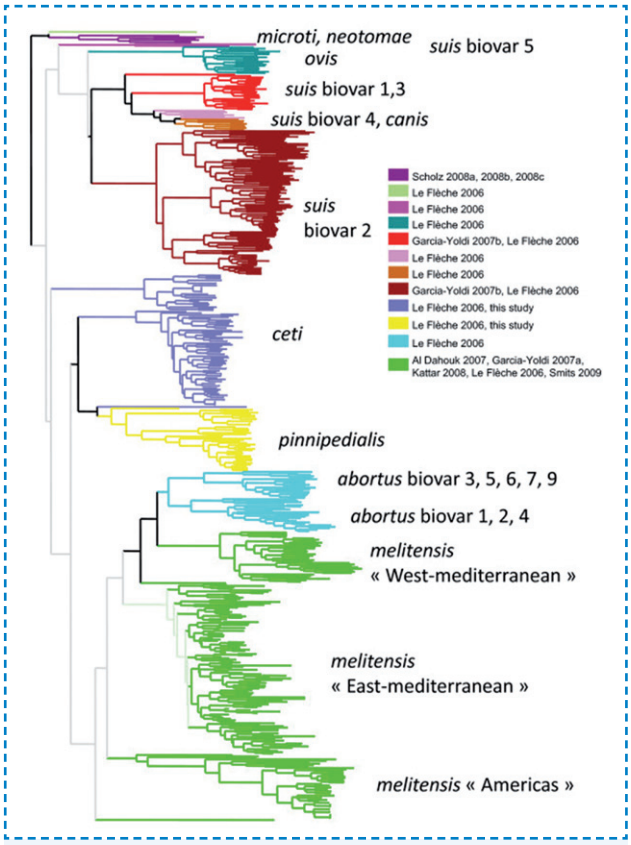

Fig. 2. *Estructura de la población global del género* Brucella. *El tipado mediante MLVA-16 de 295 aislados de* Brucella *de mamíferos marinos procedentes de distintos orígenes tanto animal como geográfico identificó 7 grandes grupos. (Maquart M y cols, 2009).*

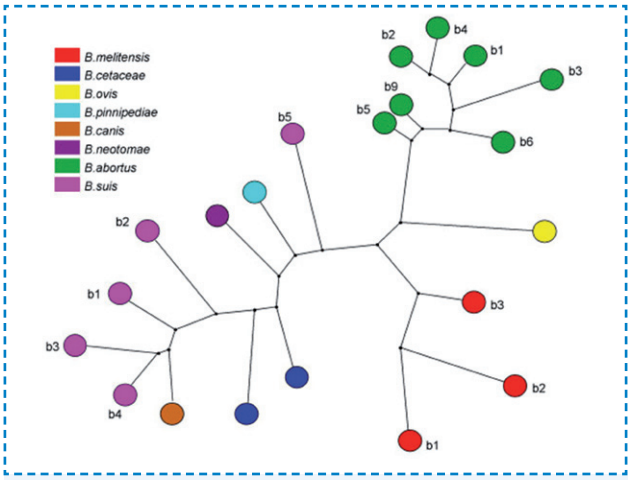

Fig. 3. *Análisis, mediante máxima parsimonia, en 21 cepas de referencia utilizando la técnica de MLVA-16 (Le Fleche P y cols, 2006).*

ción permitiéndonos conocer los casos y fuentes implicados en brotes, y confirmar o descartar el tipo de adquisición.

Este método taxonómico también permitió la detección de una línea clonal de *B. abortus* biovar 3b diferente a la Europea y Africana mediante el análisis de cinco cepas de pacientes españoles que presentaban 5 genotipos MLVA-16 (similitud genética del 80-95%), 5 genotipos HOOF-Prints (similitud del 35-65%) y que por otro lado eran idénticas, por biotipia, y también por 16S rDNA, *rpoB, gyrA, parC,* y MLST[35].

Una gran ventaja que ha supuesto MLVA-16 ha sido la creación de la plataforma internacional *MLVA database Brucella 2012* (http://mlva.u-psud.fr/brucella/), que codifica los alelos y los perfiles de las cepas analizadas, agrupando los MLVA-16 tipos que se identifican a nivel mundial, facilitando así el intercambio de información entre laboratorios.

Actualmente, técnicas moleculares como VNTR-21 y MLVA-16 permiten para *Brucella spp.* estudios *taxonómicos* y *filogenéticos* utilizando los marcadores minisatélites, y estudios de *tipificación* mediante el empleo de los marcadores microsatélites. Bien es cierto, que para la tipificación de este patógeno quedan aún un largo camino por recorrer, como la adecuada selección de marcadores o loci más eficientes según la especie y biovariedad, así como una reducción del número de marcadores. Además habría que conseguir una estandarización y validación de las técnicas empleadas, además de favorecer el intercambio entre laboratorios de la información obtenida, mediante la recopilación de datos a través de la web.

EPIDEMIOLOGÍA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE CEPAS ESPAÑOLAS DE *BRUCELLA MELITENSIS*

Según los datos del Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) y del Sistema de Brotes se observa una evolución de las tasas de incidencia de brucelosis humana en España pasando de 5,3 casos/100.000 habitantes en 1996 a 0,22 casos/100.000 habitantes en 2011.

En España, *B. melitensis* es la principal especie responsable de la mayoría de los casos de brucelosis humana. La biovariedad 3 de *B. melitensis* aparece, además, como la más frecuente en Francia, España, Portugal, Grecia y Turquía[36]. Cada año y desde 1996, en el Laboratorio de Taxonomía Bacteriana del CNM se reciben aislamientos de *Brucella spp* procedentes de toda la geografía española para la confirmación de género y la identificación a nivel de especie. Aprovechando esta información y que *B. melitensis* es responsable del 97,5% de los casos notificados en nuestro país[3] este Laboratorio ha realizado estudios que han permitido un mayor conocimiento a nivel epidemiológico y filogenético de la especie.

La aplicación de la aparición variable de repeticiones múltiples en tandem (TR) descritos en las técnicas «HOOF-Prints» y MLVA, ha permitido detectar los distintos genotipos en *B. melitensis,* su relación genética y evolución, y la identificación de los clones responsables de los diferentes brotes en nuestro país, así como el origen de la infección.

En una primera aproximación del estudio de la brucelosis en España, se analizan 87 cepas de infección en humanos procedentes de casos esporádicos y de brotes causantes de brucelosis en España durante un período de 9 años, por exposición alimentaria u ocupacional[37]. Como marcador molecular se analizó el uso de HOOfs-Prints basado en los VNTRs[31]. Los alelos fueron definidos para cada VNTR de acuerdo al número de unidades de repetición encontradas y se asignó un HOOF tipo (HT) a cada muestra, basado en la combinación de los alelos para VNTRs 1-8. Estas cepas se clasificaron en 3 grupos en función de su vínculo geográfico: no relacionadas, semi-relacionadas y estrechamente relacionadas. Siete de los ocho HOOfs utilizados fueron detectados en estos grupos, así como en la población completa. Por otro lado, esta técnica fue útil para poder distinguir entre cepas de casos esporádicos de aquellas que pertenecían a un brote: dentro del grupo de cepas estrechamente relacionadas se encontró que la similitud entre HTs había aumentado, con un coeficiente de similitud genética elevada (>90%). Tras una investigación clínica de los pacientes cuyas cepas presentaban esta similitud, se constató que estaban todos implicados en un mismo brote, en el cual la brucelosis había sido adquirida por el consumo de queso fresco de cabra[37].

Esta fue la primera vez que esta técnica se utilizaba para el análisis de una colección de muestras humanas de *B. melitensis* con diferentes características epidemiológicas pero procedentes del mismo país. Además, la gran diversidad y altas tasas de mutación de los VNTRs utilizados en el estudio proporcionaron una gran resolución del análisis de las epidemias, sin tener en cuenta el nivel del vínculo epidemiológico. Concretamente, VNTR-5, VNTR-7, VNTR-4 y VNTR-1 fueron los loci con mayor grado de diversidad tanto en el grupo no relacionado geográficamente como en la población entera, lo que implicaba su utilidad para estudios de muestras de un único país, permitiendo obtener resultados para un preliminar tipado molecular.

Posteriormente, se profundizó en un nuevo estudio de *B. melitensis* mediante el análisis de una población de 109 cepas humanas de *B. melitensis* procedentes de 29 provincias de España recogidas durante un período de más de 10 años, que permitió el análisis de la capacidad de tipificación así como de los genotipos circulantes a partir del uso de MLVA-16[38]. Esta técnica proporcionó una muy buena discriminación, diferenciando 86 genotipos agrupados en los tres biotipos o clusters principales descritos anteriormente[30, 34]. A diferencia de otras técnicas basadas en repeticiones en tándem, el tipado con MLVA-16 requirió un gran número de marcadores que se agruparon en tres paneles complementarios. En este estudio, la baja diversidad encontrada en los paneles 1 y 2A no permitió un análisis exhaustivo de la filogenia de las muestras presentes en España, pero que si se consiguió con el alto polimorfismo que presentaban los marcadores del panel 2B[38].

Por otro lado, el panel 1 fue de gran utilidad para la identificación de 9 genotipos. En este estudio destacó el **genotipo 42** del biotipo mediterráneo-oeste, que fue el más frecuente (55%), encontrándose también su predominancia en otros países como Turquía y Portugal[33]. Este genotipo mostró un bajo polimorfismo alélico para los marcadores de MLVA-16 con una similitud alélica del 75 al 94%, hecho que podría sugerir una evolución reciente de sus cepas a partir de un antecesor común en España, o bien limitaciones en el tipado de *B. melitensis* utilizando este método.

Paralelamente se estudió el potencial uso de la subunidad beta de la ARN polimerasa, ***rpoB***, principal responsable de la actividad catalítica de esta enzima, al haberse demostrado su utilidad como un potente instrumento para la identificación a nivel de género, especie y subespecie[39, 40]. Se establecieron tres tipos *rpoB* basándose en dos SNPS (codones 1249 y 1309). El análisis mediante los modelos UPGMA y MST mostraron una clara correlación entre los tres biotipos principales y los tres asignados mediante el tipado con *rpoB,* de modo que, como se muestra en la Figura 4, existía la siguiente **correlación: biotipo americano con tipo *rpoB* 1, biotipo mediterráneo-este con tipo *rpoB* 2 y biotipo mediterráneo-oeste con tipo *rpoB* 3**. Al igual que ocurre con otras bacterias, el estudio de polimorfismos detectados en esta subunidad proporciona una herramienta muy útil para la identificación y tipado a niver inter e intra especies, siendo fácil su incorporación en cualquier laboratorio como un inicial marcador de la brucelosis.

Además, con solo la mitad de marcadores requeridos para MLVA-16, el uso de **HOOF-Prints** ha mostrado un alto grado de diversidad intraespecies[33, 34]. En esta población se

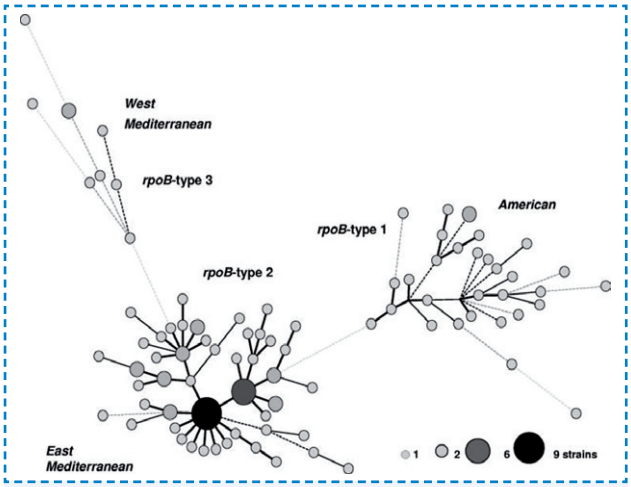

Fig. 4. *Perfecta asociación entre los tres biotipos determinados por MLVA-16 y los otros 3 mediante* rpoB *(análisis con los modelos UPGMA y MST) de las cepas de* B. melitensis *estudiadas (Valdezate S y cols, 2010).*

encontró una mayor diversidad para el genotipo 42 de lo que lo hizo el tipado con MLVA-16, sugiriendo que cepas aparentemente relacionadas podrían no estarlo tanto, siendo este hecho consecuencia de la hipermutabilidad de los loci de HOOF-Prints que están en continua microevolución. También, como en el estudio anterior se pudo dilucidar con estas técnicas qué cepas estaban relacionadas y cuál era la fuente de infección.

Todos estos estudios han revelado la importancia de combinar diferentes técnicas de tipado molecular para una mejor vigilancia epidemiológica de *B. melitensis*.

AGRADECIMIENTOS

G. Carrasco, MJ. Medina, P. Villalón y N. Garrido del Laboratorio de Taxonomía del Servicio de Bacteriología del CNM.

BIBLIOGRAFÍA

Corbel MJ. (1997) Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis, 3: 213-221.

Méndez Martínez C, Páez Jiménez A, Cortés Blanco M, Salmoral Chamizo E, Mohedano E, Plata C y cols. (2003) Brucellosis outbreak due to unpasteurized raw goat cheese in Andalucia (Spain). Euro Surveill 8: 164-168.

Sanchéz-Serrano LP, Ordóñez P, Díaz MO, Torres A. (2004) Vigilancia de la brucelosis. Bol Epidemiol. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 12: 209-220.

Troy SB, Rickman LS, Davis CE. (2005) Brucellosis in San Diego: epidemiology and species-related differences in acute clinical presentations. Medicine (Baltimore). 84: 174-187.

European Commission. (2009) Commission decision of 5 August 2009. Off J Eur Union. 52: L/204/39-42.

Young EJ. (1995). An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis. 21(2): 283-289.

Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos E. (2006) The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis. 6: 91-99.

Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, Sanchez-De-Mora D, Delgado M, Causse M, Martin-Farfan A, Juarez C. (1996) Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. Medicine.

Reguera JM, Alarcon A, Miralles F, Pachon J, Juarez C, Colmenero JD. (2003) *Brucella* endocarditis: clinical, diagnostic, and therapeutic approach. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 22: 647-650.

Pappas G, Akrtidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. (2005) Brucellosis. N Engl J Med. 352: 2325-3236.

Vassalos CM, Vangelis E, Vassalou E, Papadopoulou C. (2009) Brucellosis in humans: why is it so elusive? Rev Med Microbiol. 20: 63-73.

Yagupsky G, Baron EJ. (2005) Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism. Emerg Infect Dis. 11: 1180-1185.

Vizcaíno N, Cloeckaert A, Verger J, Grayon M, Fernández-Lago L. (2000) DNA polymorphism in the genus *Brucella*. Microbes Infect. 2: 1089-1100.

Robinson A. (2003) Guidelines for coordinated human and brucellosis surveillance. In: Animal Production and Health Division FAO Agriculture Department. EMPRES. 4: 11-15.

Serra J, Pujol R, Godoy P. (2000) Seroepidemiological study of brucellosis in a rural endemic area. Enferm Infecc Microbiol Clin. 18: 74-78.

Gándara B, Merino AL, Rogel MA, Martínez-Romero E. (2001) Limited genetic diversity of *Brucella spp*. J Clin Microbiol. 39: 235-240.

Jensen AE, Cheville NF, Ewalt DR, Payeur JB, Thoen CO. (1995) Application of pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of vaccine strain RB51 from field isolates of *Brucella abortus* from cattle, bison, and elk. Am J Vet Res. 56: 308-312.

Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Stich RW. (1992). Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. J Bacteriol. 174: 7778-7783.

Tcherneva E, Rijpens N, Jersek B, Herman LM. (2000) Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. J Appl Microbiol. 88: 69-80.

Queipo-Ortuño MI, Morata P, Ocón P, Manchado P, Colmenero JD. (1997) Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. J Clin Microbiol. 35: 2927-2930.

Gee JE, De BK, Levett PN, Whitney AM, Novak RT, Popovic T. (2004) Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. J Clin Microbiol. 42: 3649-3654.

Fox KF, Fox A, Nagpal M, Steinberg P, Heroux K. (1998) Identification of *Brucella* by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation of *Brucella canis* from other *Brucella spp*. pathogenic for humans by carbohydrate profiles. J Clin Microbiol. 36: 3217-3222.

Ouahrani S, Michaux S, Sri Widada J, Bourg G, Tournebize R, Ramuz M, Liautard JP. (1993) Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella spp.:* relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. J Gen Microbiol. 139: 3265-3273.

Bricker BJ, Halling SM, (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis, Brucella ovis,* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol. 32: 2660-266.

Ocampo-Sosa AA, Agüero-Balbín J, García-Lobo JM. (2005) Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. Vet Microbiol. 110: 41-51.

López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ y cols. (2008) Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including vaccine strains. J Clin Microbiol. 46: 3484-7.

Whatmore AM, Perrett LL, Macmillan AP. (2007) Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. BMC Microbiol. 7: 34.

Wattiau P, Whatmore AM, Van Hessche M, Godfroid J, Fretin D. (2011) Nucleotide polymorphism-based single-tube test for robust molecular identification of all currently described *Brucella* species. Appl Environ Microbiol. 77: 6674-6679.

Whatmore AM, Murphy TJ, Shankster S, Young E, Cutler SJ, Macmillan AP. (2005) Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. J Clin Microbiol. 43: 761-769.

Le Fleche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoeud F. (2006) Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. BMC Microbiol. 6: 9.

Bricker BJ, Ewalt DR, Halling SM. (2003) Brucella «HOOF-Prints»: strain typing by multi-locus anaylisis of variable number tandem repeats (VNTRs). BMC Microbiol. 3: 15.

Bricker BJ, Ewalt DR. (2005) Evaluation of the HOOF-Print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: results with our performance criteria. BMC Microbiol. 5: 37.

Whatmore AM, Shankster SJ, Perrett LL, Murphy TJ, Brew SD, Thirlwall RE, Cutler SJ, MacMillan AP. (2006) Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella spp*. J Clin Microbiol. 44: 1982-93.

Al Dahouk S, Fleche P, Noeckler K, Jacques I, Grayon M, Scholz HC. (2007) Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. J Microbiol Methods. 69: 137–145.

Valdezate S, Navarro A, Virginia R, et al. (2009) Emergence of a clonal lineage of *Brucella abortus* biovar 3 in clinical cases in Spain. J Clin Microb. 47: 2687-2688.

Gruner E, Bernasconi E, Galeazzi RL, Buhl D, Heinzle R, Nadal D. (1994) Brucellosis: an occupational hazard for medical laboratory personnel. Report of five cases. Infection. 22: 33–36.

Valdezate S, Cervera I, Hernández P, Navarro A, and. Saéz-Nieto J.A. (2007) Characterization of human brucellosis outbreaks and sporadic cases by the use of HOOF variable number tandem repeats. Clin Microbiol Infec. 13: 887-892.

Valdezate S, Navarro A, Villalón P, Carrasco G, and Saéz-Nieto JA. (2010) Epidemiological and phylogenetic analysis of Spanish human *Brucella melitensis* strains by multiple-locus variable-number tandem-repeat typing, hypervariable octameric oligonucleotide fingerprinting and *rpoB* typing. J Clin Microb. 48: 2734-2740.

Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R. (2006) Molecular characterization of the *rpoB* gene in *Brucella* species: new potential molecular markers for genotyping. Microb Infect; 8: 860-865.

Sayan M, Yumuk O, Bilenoglu O, Erdenling S, Willke A. (2009). Genotyping of Brucella melitensis by *rpoB* gene analysis and reevaluation of conventional serotyping method. J Infect Dis. 62: 160-163.

Maquart M, LeFelche P, Foster G, et al. (2009) MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedalis*. BMC Microbiol. 9: 145-155.

Cerámica histórica en la fachada de una vivienda del casco histórico de la ciudad de Coria (Extremadura), que certifica la salubridad epidemiológica del inmueble.