

Académie Universitaire Wallonie – Europe
Université de Liège – Faculté de Médecine Vétérinaire
Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires
Service d'Épidémiologie et Analyse de Risques Appliquées aux Sciences Vétérinaires



Institut de Médecine Tropicale d'Anvers
Unité de Biostatistique et d'Epidémiologie
Département de Sciences Biomédicales



Centro Internacional de Zoonosis
Universidad Central del Ecuador



ETUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE LA BRUCELLOSE BOVINE ET SON IMPACT EN SANTÉ PUBLIQUE DANS LE NORD-OUEST DE L'ÉQUATEUR

EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF BOVINE BRUCELLOSIS AND ITS IMPACT IN PUBLIC HEALTH IN THE NORTHWEST OF ECUADOR



Jorge RON-ROMÁN

Thèse présentée en vue de l'obtention du
Grade de Docteur en Sciences Vétérinaires
Année académique 2016-2017

Source des illustrations de la couverture : Jorge Ron-Román et Alexandra Angulo-Cruz

Académie Universitaire Wallonie – Europe
Université de Liège – Faculté de Médecine Vétérinaire
Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires
Service d'Épidémiologie et Analyse de Risques Appliquées aux Sciences Vétérinaires



Institut de Médecine Tropicale d'Anvers
Unité de Biostatistique et d'Epidémiologie
Département de Sciences Biomédicales



Centro Internacional de Zoonosis
Universidad Central del Ecuador



ETUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE LA BRUCELLOSE BOVINE ET SON IMPACT EN SANTÉ PUBLIQUE DANS LE NORD-OUEST DE L'ÉQUATEUR

EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF BOVINE BRUCELLOSIS AND ITS IMPACT IN PUBLIC
HEALTH IN THE NORTHWEST OF ECUADOR

Promoteur:

Prof. Dr. Claude SAEGERMAN

Unité de recherche en Epidémiologie
et Analyse de Risque Appliquées aux Sciences Vétérinaires (UREAR-ULg),
Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH) Center,
Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires
Faculté de Médecine Vétérinaire – Université de Liège

Co-promoteur:

Prof. Dr. ir. Dirk BERKVEN

Unité de Biostatistique et d'Epidémiologie
Département de Sciences Biomédicales
Institut de Médecine Tropicale d'Anvers

Jorge RON-ROMÁN

Thèse présenté en vue de l'obtention du
Grade de Docteur en Sciences Vétérinaires
Année académique 2016-2017

Dédicace

¡Amen!

La louange, la gloire, la sagesse, l'action de grâces, l'honneur, la puissance, et la force,
soient à notre Dieu, aux siècles des siècles.

!Amen!

Apocalypse 7:12 (La Sainte Bible, Louis Segond, 1910)

Au peuple équatorien:
mon plus grand investisseur et sponsor.

À ma épouse et filles:
María-Augusta, Emilia et María-Inés.

À mes parents et frères:
Jorge, Victoria, Carlitos, Carmita y Rebequita

Dedicatoria

¡Amén!

La bendición, la gloria, la sabiduría, la acción de gracias, la honra, el poder y la fortaleza sean a nuestro Dios por los siglos de los siglos.

¡Amén!

Apocalipsis 7:12 (Santa Biblia, Reina & Valera, 1960)

Al pueblo ecuatoriano:
mi mayor inversionista y patrocinador.

A mi esposa e hijas:
María-Augusta, Emilia et María-Inés.

A mis padres y hermanas:
Jorge, Victoria, Carlos, Carmita y Rebeca

RÉSUMÉ

Version française

INTRODUCTION

La brucellose, aussi connue en tant que fièvre de Malte ou fièvre ondulante chez l'homme, et comme maladie de Bang ou avortement contagieux chez les bovins, est une infection hautement contagieuse causée par des bactéries du genre *Brucella*. Malgré les nombreux efforts déployés pour contrôler et éradiquer cette maladie, elle est toujours considérée comme l'une des zoonoses les plus répandues dans le monde. La prévalence est élevée dans les pays ou les régions où les conditions sanitaires sont mauvaises, où les systèmes d'exploitation des animaux sont traditionnels, et lorsqu'aucun système adéquat de surveillance épidémiologique de la maladie n'est mis en place. Son importance est liée à l'impact désastreux en matière de santé publique, ainsi qu'aux pertes économiques qu'elle peut générer.

En santé publique, les pertes économiques sont associées au coût des diagnostics clinique et de laboratoire, aux frais thérapeutiques et aux compensations versées aux patients; en effet, cette affection est reconnue comme maladie professionnelle dans de nombreuses régions du monde. Chez les bovins, l'avortement, la stérilité, la chute de production laitière, les retards dans les programmes d'amélioration génétique et la naissance de veaux faibles sont les causes les plus courantes de pertes économiques. Les restrictions en termes d'échanges commerciaux internationaux des animaux et de produits alimentaires dérivés de ceux-ci ont également un impact économique majeur.

L'homme et les animaux s'infectent, soit par contact direct avec des animaux ou du matériel infecté (fœtus, membranes fœtales ou sécrétions vaginales), soit après consommation de produits laitiers non pasteurisés.

L'une des options les plus fréquemment utilisées pour contrôler la brucellose bovine repose sur la vaccination du bétail avec une souche atténuée de *B. abortus* Buck 19 (B19). Malheureusement, la stratégie de vaccination ne peut éradiquer à elle seule la maladie. En effet, il est indispensable d'identifier les animaux infectés et de les éliminer de manière adéquate. De gros problèmes se posent suite à la vaccination car ce type de vaccin présente l'inconvénient d'engendrer la production d'anticorps qui interfèrent avec les tests diagnostiques tels que l'agglutination, l'ELISA et le test cutané. Cette caractéristique complique la confirmation d'un diagnostic, interfère avec la

compréhension réelle du problème et avec les moyens permettant d'identifier des options de gestion adaptées aux particularités d'une région ou d'un pays.

La présence de la brucellose dans le cheptel bovin équatorien a été mise en évidence par Salvestroni en 1926. Néanmoins, malgré les efforts consacrés à la recherche sur la brucellose animale en Equateur, le manque de techniques diagnostiques standardisées (présentant une sensibilité et une spécificité élevées), l'insuffisance d'interprétation des résultats et le faible nombre d'isolements et caractérisations de *Brucella* spp. n'ont pas permis de réellement cerner l'ampleur du problème.

Ce travail visait à générer des informations fiables sur la situation épidémiologique réelle de la brucellose bovine et son impact en santé publique dans le nord-ouest de l'Equateur, et à investiguer les potentiels facteurs de risque d'infection. En effet, ces informations revêtent une importance primordiale pour les organismes officiels en charge de la surveillance de cette zoonose. Quatre objectifs spécifiques ont été définis et sont précisés ci-dessous.

Ce manuscrit est divisé en deux sections principales: d'une part, l'introduction, sous la forme d'une revue de littérature sur *Brucella* spp. et la brucellose, et d'autre part, la section expérimentale, dans laquelle sont présentées les études réalisées en Equateur chez l'homme et plusieurs espèces animales (travaux de terrain et de laboratoire).

L'introduction résume les informations générales sur l'agent infectieux, l'épidémiologie de la maladie et la réponse immunitaire de l'hôte, ainsi que sur les différentes méthodes de diagnostic direct et indirect. De plus, les systèmes d'élevage pratiqués en Equateur sont décrits afin de mieux cerner le contexte épidémiologique (**Objectif 1**).

La section expérimentale présente les résultats d'études réalisées chez les espèces animales afin de caractériser l'agent causal, de déterminer la prévalence réelle de l'infection, et d'estimer les paramètres de sensibilité et spécificité des tests diagnostiques utilisés (**Objectif 2**). Par ailleurs, l'importance zoonotique de la brucellose en Equateur a été investiguée (**Objectif 3**).

Dans un premier temps, les résultats de l'étude réalisée chez les bovins dans le nord-ouest de l'Equateur, ainsi que les résultats de l'étude de la brucellose chez les chèvres dans deux régions d'Equateur sont développés.

Concernant l'aspect santé publique, les études visaient (i) à déterminer la prévalence réelle de la maladie et les facteurs de risque et à caractériser l'agent causal, (ii) à évaluer la sensibilité et la spécificité des tests diagnostiques utilisés, et (iii) à présenter un rapport de cas d'orchite avec son suivi clinique et sérologique.

Le travail se clôture par la présentation des lignes directrices servant de base à l'élaboration d'une stratégie de surveillance épidémiologique des brucelloses bovine et humaine, adaptée aux conditions du nord-ouest de l'Equateur (**Objectif 4**).

RESULTATS

1. Une révision de la bibliographie locale a démontré que la brucellose a toujours été une préoccupation en Equateur

Sans aucun doute, la compréhension d'un problème constitue la base de la formulation, non seulement, des solutions correctes mais aussi et surtout viables. En ce sens, et dans le cadre de ce travail visant à mieux comprendre, et de manière correcte, la situation épidémiologique de cette zoonose chez l'homme et ses différents hôtes, une revue complète de la littérature s'avérait nécessaire comme point de départ.

La brucellose a toujours été un centre d'intérêt en Equateur, car suite aux premières notifications chez les bovins par Salvestroni en 1926 et chez l'homme par Valenzuela en 1934, de nombreuses études ont été réalisées, principalement chez les espèces animales réservoirs. Le rôle du vétérinaire de terrain vis-à-vis de cette zoonose a d'ailleurs été mis en avant.

La situation réelle de la brucellose humaine en Equateur, telle que rapportée au niveau international, est erronée. En effet, selon les rapports officiels, soit la maladie ne serait pas présente, soit il n'existerait aucune information fiable sur la situation, soit elle serait contrôlée. Cela s'explique par le peu d'études menées chez l'homme. La plupart de ces

dernières ont été réalisées dans le but de rechercher la maladie uniquement chez les groupes à risque. En effet, dans le contexte équatorien, la surveillance de la maladie humaine est uniquement passive et repose sur les déclarations des cas hospitalisés. De plus, les professionnels de la santé publique ne lui accordent que peu d'importance, ce qui est confirmé par la faible place qu'elle occupe tout au long de la formation médicale. Ce manque de sensibilisation des professionnels de la santé représente un frein au dépistage correct de la maladie dans la patientèle de tous les jours, à tel point que ce sont les vétérinaires qui conseillent aux personnes présentant un tableau clinique suspect de se soumettre à des tests diagnostiques.

2.- Détermination de la prévalence apparente et des facteurs de risque de brucellose chez les bovins

Les nombreux tests existants permettant de confirmer le diagnostic de brucellose chez l'animal, sont non seulement liés à l'importance zoonotique majeure de la maladie, mais aussi aux problèmes qui persistent quant à la fiabilité des résultats, principalement en termes de sensibilité (Se) et de spécificité (Sp). Afin d'obtenir des informations épidémiologiques fiables sur la prévalence réelle de la brucellose bovine par zone (zone1=Sierra et zone2=Costa) et par province, ainsi que sur la performance des tests utilisés pour diagnostiquer la maladie en Equateur, une étude transversale a été menée dans le nord-ouest du pays.

La prévalence estimée était de 2,1%, tandis que les Se et Sp étaient les suivantes, pour chaque test: Se=84% et Sp=98% pour RB, Se=85% et Sp=99% pour SAT-EDTA et Se=89% et Sp=97 pour iELISA. Les facteurs de risque tels que le sexe (OR=3,91 pour les femelles), l'âge (OR=3,14 pour la classe des 25 à 60 mois), la zone (OR=4,19 pour la zone 1) et la province (OR=6,62 dans la province de Pichincha) ont été identifiés grâce à une enquête épidémiologique et un échantillonnage représentatif. L'étude a mis en évidence que la différence de prévalence entre zones d'échantillonnage ne se situait pas au niveau des fermes (21,89% dans la zone 1 et 25,17% dans la zone 2), mais étaient surtout liées à la prévalence intra-troupeau (12,46% dans la zone 1 et 3,28% dans la zone 2). *Brucella abortus* biovar 4 a été isolée à partir du lait d'animaux ayant présenté des résultats sérologiques fortement positifs (n=13). Elle a présenté des caractéristiques

particulières, à savoir l'inhibition de croissance en milieu coloré avec de la fuchsine (20 mg/ml) et de la safranine (100 pg/ml).

3.- La découverte de la souche vaccinale B-19 chez les chèvres pourrait-elle confirmer la situation anarchique de la vaccination chez les bovins ?

Dans le cas des maladies zoonotiques, l'élevage en zone péri-urbaine ou urbaine augmente le risque de transmission suite à la production de déchets tels que urines, matières fécales, sécrétions diverses et avortons qui peuvent contaminer l'environnement.

A ce jour, très peu d'études sérologiques ont ciblé la brucellose caprine en Equateur, la plupart sont d'ailleurs relativement anciennes. Afin d'évaluer la situation épidémiologique actuelle, une étude sérologique transversale a été menée parmi les populations caprines des provinces de Carchi (n = 160 animaux), Pichincha (n = 224 animaux) et Loja (n = 2.024 animaux). L'étude a seulement permis d'identifier deux animaux faiblement positifs, ce qui va à l'encontre d'un rapport qui avait estimé une prévalence de 17,8% chez cette espèce.

Vingt-cinq échantillons de lait se sont révélés positifs au test de l'anneau (*Milk Ring Test* - MRT) dans la province de Pichincha, ce qui représente une prévalence de 11,16%. Les échantillons positifs ont été mis en culture. Tous les résultats ont été négatifs, à l'exception d'un animal de la région de Quito. Ce dernier a présenté une culture positive pour *Brucella abortus* souche 19 (B19). Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour interpréter un tel résultat inattendu, la plus probable étant l'utilisation accidentelle chez cet animal d'une aiguille utilisée au préalable pour immuniser les bovins avec le vaccin B19. Même si cette observation a déjà été rapportée antérieurement, elle met en évidence la problématique liée à l'utilisation d'un vaccin vivant atténué. Il est indispensable de former et sensibiliser les utilisateurs de vaccins contre la brucellose aux normes relatives à leur transport, reconstitution, stockage, dosage, administration et élimination des déchets, telles que précisées par les fabricants et surtout selon les exigences de l'OIE.

4.- Le rôle des chiens dans la transmission de la brucellose bovine en zone endémique

Au cours de cette étude, la prévalence élevée au niveau des troupeaux bovins et des animaux dans la Sierra équatorienne, ajouté à la forte prévalence des avortements chez les bovins, et à la facilité d'isolement de *Brucella* spp. à partir de leur lait, a rapidement soulevé la question du rôle potentiel des chiens en tant que réservoir de l'infection. Une étude réalisée dans plusieurs élevages bovins localisés dans le canton Mejía province de Pichincha, une zone endémique d'Equateur a été menée dans le but de déterminer si les chiens hébergeaient des *Brucella* spp.

La majorité des chiens (85,43%) avaient des contacts avec le bétail et ingéré du lait cru. D'autre part, 64,24% d'entre eux mangeaient régulièrement les produits d'avortement. Au total, 43 chiens (30,46%) ont réagi positivement à au moins un test diagnostique. Pris individuellement, les tests ont fourni les résultats suivants: (i) 15,89% des chiens étaient positifs au test d'agglutination rapide au RB, (ii) 11,92% étaient positifs au SAT-EDTA et (iii) 23,85% étaient positifs au test iELISA. Seuls 13 chiens (8,6%) avaient réagi positivement aux trois tests. Quatre bovins (4,30%) étaient positifs aux tests RB et SAT-EDTA. *Brucella abortus* biotype 4 a été identifié par essais microbiologiques et PCR-711, à partir des prélèvements de chiens (n= 5) et de bovins (n= 1). Ces observations confirment le rôle biologique que peuvent jouer les chiens dans les maladies ré-émergentes telles que la brucellose.

Les résultats démontrent que le contrôle de la brucellose ne devrait pas se limiter uniquement à l'espèce bovine, chez qui les pertes économiques sont évidentes. Davantage d'attention devrait être portée aux autres espèces animales comme par exemple les chiens de ferme, en tant que réservoirs potentiels de la maladie.

5.- Détermination de la prévalence apparente et des facteurs de risque de brucellose chez l'homme

L'évaluation du statut réel de la brucellose chez les réservoirs animaux est influencée par la fiabilité des résultats des tests diagnostiques appliqués. De plus, chez les bovins, l'existence de réactions croisées suite à la vaccination avec la souche vaccinale B19 complique encore l'interprétation des résultats. La prévalence d'anticorps contre l'agent

causal, ainsi que l'isolement et la caractérisation des souches de *Brucella* sp. circulant chez l'homme, pourraient non seulement fournir des informations épidémiologiques à propos de cette zoonose, tant au niveau régional que national, mais également évaluer son impact sur la santé publique, car il n'existe aucun vaccin commercial chez l'homme.

Une grande enquête a été réalisée en Equateur, sur base de prélèvements sanguins réalisés chez l'homme dans la partie nord-ouest du territoire (n = 3.733) et accompagnée d'une enquête épidémiologique. Les résultats de trois tests de diagnostic utilisés en parallèle ont permis d'estimer une séroprévalence globale de 1,88% (intervalle de confiance [IC] à 95%: 1,48-2,38). Une régression logistique multivariée a permis d'identifier les principaux facteurs de risque associés à la séropositivité chez l'homme, à savoir : le contact avec un élevage (odds ratio [OR] = 3,0; IC 1,25-7,08), la consommation de fœtus et de placenta (OR = 2,5; IC 1,18 -5,22), et la participation à des activités à risque (OR = 1,8; IC 1,00-3,35). La souche qui circulait était *Brucella abortus* biotype 4.

Cette étude a souligné que, les contacts avec le bétail, la consommation de foetus et de placenta et les activités professionnelles à risque, sont autant de facteurs jouant un rôle important dans la contamination par *Brucella* sp. chez les individus dans le nord-ouest de l'Equateur.

5.- Détermination des prévalences réelles de brucellose humaine et bovine et performance des tests diagnostiques utilisés, au moyen du théorème de Bayes

Une fois la prévalence apparente de la brucellose estimée chez l'homme et les bovins et les facteurs de risque identifiés, les résultats des tests diagnostiques imparfaits ont été combinés à une information "*a priori*" (avis d'experts), dans un modèle bayésien, afin d'estimer les performances (Se et Sp) du test utilisé chez l'homme.

La brucellose pourrait certainement être la maladie pour laquelle un grand nombre de tests diagnostiques a été développé pour le diagnostic indirect. Ceux-ci vont d'une simple agglutination rapide sur plaque comme le RB aux tests de polarisation de fluorescence, en passant par l'ELISA (indirect et de compétition). Ils obéissent à la complexité du diagnostic direct basé sur l'isolement de *Brucella* sp., et au risque élevé

de contamination lors des manipulations. La performance d'un test indirect basé sur la détection d'Ac contre le LPS dépend non seulement de son principe mais aussi du type d'échantillon sur lequel il est effectué (sang entier, sérum, plasma, lait ou lactosérum).

Dans ce contexte, un modèle Bayésien combinant l'information collectée sur le terrain avec l'information *a priori* (opinions d'experts) a permis d'estimer la prévalence réelle de la brucellose chez l'homme et dans l'espèce bovine. Notre étude a permis, à l'aide d'une approche bayésienne, d'estimer une prévalence réelle de 1% chez l'homme (intervalle de crédibilité: 0,4 à 1,6) et 2,1% chez les bovins, ainsi que la Se et la Sp des tests utilisés (RB, SAT-EDTA et iELISA). Chez l'homme, les sensibilités des tests iELISA et RBT étaient plus élevées mais très similaires (respectivement 95,1% et 95,0 %,) en comparaison à celle de la SAT-EDTA (60,8 %). Même si tous les tests ont présenté une spécificité élevée (> 99,0 %), celle du SAT-EDTA était la plus importante (99,9 %). Chez les bovins, les Se et Sp étaient les suivantes, pour chaque test: Se=84% et Sp=98% pour RB, Se=85% et Sp=99% pour SAT-EDTA et Se=89% et Sp=97 pour iELISA.

Le modèle a identifié l'iELISA comme étant le meilleur test pour le diagnostic de la brucellose chez l'homme et l'animal. Néanmoins, la Sp du test ELISA dépend du type de conjugué utilisé. Le test RB ne devrait pas être écarté: c'est un des tests les plus utilisés dans le diagnostic de cette maladie car il est facile à réaliser, peu coûteux, ses résultats sont faciles à lire, et il présente une haute Se. Ce test permet d'obtenir une appréciation sérologique rapide, tant au niveau individuel qu'à l'échelle du troupeau.

La stratégie proposée doit se baser sur des données factuelles, dont les décideurs doivent tenir compte pour mettre en place des programmes appropriés de prévention et de contrôle de la brucellose dans le monde entier

6.- Isolement et typage des souches de *Brucella abortus* chez différents espèces réservoirs en Equateur

Des inquiétudes subsistent dans de nombreux pays, dans lesquels la brucellose a été déclarée comme présente suite à la réalisation de méthodes sérologiques sans que les souches de *Brucella* spp. circulantes n'aient encore pu être identifiées. Comme le

suggèrent la FAO et l’OMS, chaque fois qu’il est possible de le faire, l’identification de l’agent causal doit être entreprise y inclus un biotypage car des souches présentent fréquemment une distribution géographique particulière. Malheureusement, l’isolement des germes n’est pas une tâche aisée, requiert un laboratoire spécialisé et de haute sécurité. C’est la raison pour laquelle le nombre d’isollements rapportés par pays est en relation directe avec le degré de développement de ses laboratoires de références. L’Equateur n’échappe pas à la règle. A l’heure actuelle il n’existe aucune information officielle sur le nombre d’isollements réalisés ni sur la distribution des souches de *Brucella* spp. circulant en Equateur.

Sur base des stratégies décrites ci-dessus, basées sur l’optimisation des ressources et la diminution des risques de contamination (fréquentes lorsqu’on travaille avec une bactérie présentant un tel risque biologique) 26 souches ont été isolées: 17 chez des bovins, 1 chez un caprin, 4 chez l’homme et 4 chez des chiens. *Brucella abortus* biotype 4 était majoritaire, une souche isolée chez une chèvre s’est avérée être *B. abortus* biotype 1 souche vaccinale (B-19) et un isolement chez un cas humain a révélé une souche de terrain *B. abortus* biotype 1. Quelques-unes de souches de *B. abortus* biotype 4 isolées chez les bovins et chez l’homme, ainsi que la souche de terrain *B. abortus* biotype 1 isolée chez deux patients humains, ont présenté certaines particularités lors du typage, notamment l’inhibition de croissance en milieu coloré avec la safranine (100 µg/ml) et la fuchsine (20 µg/ml).

La mise en place en Equateur de l’isolement et du typage microbien au travers des tests bactériologiques, des tests biochimiques et du typage moléculaire ont permis de réaliser 50% des isollements et typages dans le pays d’origine. Le développement de ces capacités permettrait d’éviter le transfert de matériel contaminant vers un pays indemne de brucellose comme par exemple, la Belgique. Ce serait une valeur ajoutée au travail réalisé durant cette thèse. L’utilisation de protocoles standardisés pour l’isolement et le typage de souches selon les procédures décrites et les contrôles d’ADN nous a permis de garantir des résultats ce qui est un plus en terme de développement.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'appréciation erronée de la situation épidémiologique de la brucellose en Equateur, tant chez l'homme que chez les animaux, n'a pas permis de comprendre et d'apprécier l'ampleur du problème représenté par cette zoonose, qui est un aspect fondamental si des solutions adaptées à la réalité doivent être développées. Ce travail de thèse a éclairci, au travers de la revue de la littérature locale et de quatre sections expérimentales, la situation épidémiologique réelle de la brucellose bovine et son impact en santé publique, dans le nord-ouest de l'Equateur. Il a pu mettre en évidence que les brucelloses humaine et animale sont des maladies négligées en Equateur, et apporte l'information de base nécessaire afin de faire évoluer la situation.

La combinaison des résultats obtenus grâce à l'application de tests multiples dans un modèle statistique basé sur le théorème de Bayes, a permis d'estimer les prévalences réelles des brucelloses bovine et humaine et les paramètres (sensibilité et spécificité) de chaque test inclus dans le modèle. Les résultats nous ont permis de conclure que l'iELISA serait un test de choix pour diagnostiquer la maladie, mais que le test au Rose Bengale de devrait pas être mis de côté, au vu de sa réalisation aisée et de son faible coût.

L'information collectée répond à l'appel de l'OIE sur la possible compartimentation d'un territoire comme stratégie de contrôle et d'éradication d'une maladie. De plus, ce travail de thèse déclenche la sonnette d'alarme sur les conséquences de la vaccination anarchique des bovins et sur la circulation de *Brucella* spp. au sein des diverses espèces réservoirs potentielles.

Pour conclure, l'information récoltée met en évidence que les brucelloses humaine et animale sont toujours un problème en Equateur. Une stratégie contextualisée, adaptée à la situation épidémiologique de chaque zone, devrait être élaborée pour contrôler la brucellose en Equateur.

SUMMARY

English version

Brucellosis, also known as Malta fever or undulant fever in humans, and Bang disease or contagious abortion in cattle is a highly contagious infection caused by bacteria belonging to the genus *Brucella*. Despite the numerous efforts made to control and eradicate the disease, it is still considered as one of the most widespread zoonoses worldwide. Prevalence is elevated in countries or regions where sanitary conditions are poor, where animals are still traditionally managed, and where no adequate system of epidemiological surveillance is implemented. The relative importance of the disease is a consequence of its disastrous impact on public health, and to the severe economic losses associated.

In the public health sector, economic losses are associated with clinical and laboratory diagnostic tests, with therapy costs and with compensations paid to patients; indeed, the disease is recognised as a professional disease in numerous regions. In cattle, abortion, sterility, decreased milk production, delays in programmes of genetic improvement and birth of weak calves are the most frequent causes of economic losses. Furthermore, restrictions on international trade of animals and animal products also have a major economic impact.

Humans and animals get infected, either by direct contact with infected animals and materials (foetuses, foetal membranes or vaginal secretions), or after consuming unpasteurised milk products.

One of the most frequent control measures is vaccination with B19 strain (B-19). Unfortunately, vaccination alone cannot eradicate the disease, because it is essential to identify infected animals to eliminate them appropriately. Numerous problems arise after vaccination, because the vaccine has the disadvantage of generating the production of antibodies which interfere with diagnostic tests such as agglutination, ELISA or skin test. That characteristic is a hindrance to a correct diagnosis; interfere with the real comprehension of the problem and with the means to identify the most appropriate management with regards to a specific regional or national context.

Brucellosis was first reported in Ecuadorian cattle by Salvestroni in 1926. Nevertheless, despite all efforts devoted to research on animal brucellosis in the country, the lack of

standardised diagnostic tests (combination of a high sensitivity with a high specificity), the lack of interpretation of results and the low number of *Brucella* spp. isolations and characterisations, did not allow understanding the magnitude of the problem.

The present work aimed at generating reliable information on real epidemiological status of bovine brucellosis and on its impact on public health in north western Ecuador; it also meant to identify potential risk factors. Indeed, this information is essential for official institutions in charge of brucellosis surveillance in Ecuador. For this purpose, four specific objectives were defined and described below.

The manuscript is subdivided in two main sections: on one hand, introduction, which consists in a literature review over *Brucella* spp. and brucellosis, and on the other hand, the experimental section, which presents all studies performed in Ecuador, both in humans in animals (field and laboratory work).

The introduction summarises all general information on the pathogen, epidemiology of the disease and immune response in hosts, as well as characteristics of all diagnostic tests, either direct or indirect. Furthermore, farming systems as existing in Ecuador are described in order to better understand the epidemiological context (**Objective 1**).

The experimental section summarises the results of studies performed in animals in order to (i) characterise the causing agent, (ii) estimate the real prevalence of the disease, and (iii) assess the sensitivity and specificity of diagnostic tests used in Ecuador (**Objective 2**). In addition, the zoonotic importance of brucellosis in Ecuador was investigated (**Objective 3**).

At first, the results of the study performed in cattle in north western Ecuador, as well as the results of the study on brucellosis in goats, as carried out in two regions of Ecuador will be presented

Regarding public health aspects, the results of several studies were presented. The first study aimed at estimating the real prevalence, identifying the risk factors and characterising the pathogen. The second study allowed assessing sensitivity and

specificity of diagnostic tests used in the Ecuadorian context. An ultimate study presented the clinical and serological follow up of a human case of orchitis .

The document concludes with the proposition of guidelines which could be seen as a basis for developing a strategy of epidemiological surveillance of bovine and human brucellosis, adapted to the context of north western Ecuador (**Objective 4**).

RESUMEN

Versión en español

INTRODUCCIÓN

La brucelosis, también conocida como “Fiebre de Malta”, o “fiebre ondulante” en los humanos, y como “enfermedad de Bang” o “aborto contagioso”, en los bovinos es una enfermedad altamente contagiosa, causada por las bacterias del género *Brucella*. A pesar de los grandes esfuerzos que se realizan para controlarla y/o erradicarla, sigue siendo considerada como una de las zoonosis más difundida en el mundo, con elevada prevalencia en los países o regiones donde las condiciones sanitarias son deficientes, los sistemas de explotación animal son de tipo tradicional, y no existen sistemas de seguimiento epidemiológico adecuado de la enfermedad. Su importancia, radica entre otras, por las consecuencias nefastas que ocasiona en la salud pública, así como por las graves pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad

Las pérdidas económicas en humanos están relacionadas al costo del diagnóstico clínico y de laboratorio, costo del tratamiento, indemnizaciones, y juicios laborales. En el caso de los bovinos, el aborto, esterilidad, disminución de la producción de leche, retrasos en los programas de mejoramiento genético, nacimiento de terneros débiles, son las causas más comunes de pérdidas económicas, pero a estas se deben sumar otras como la restricción en la comercialización internacional de animales y productos alimenticios derivados de estos, debido a las restricciones sanitarias existentes.

El hombre y los animales, adquieren esta infección, sea por el contacto directo con animales o material infectado (fetos, membranas fetales, secreciones vaginales), o por la ingestión de las bacterias contenidas en productos lácteos no pasteurizados.

Una de las opciones más frecuentemente utilizadas para el control de la brucelosis bovina, es la inmunización de los bovinos con la vacuna cepa-19 (B-19). Lamentablemente la sola estrategia de vacunación no podrá erradicar el problema, para ello es necesario la identificación de los animales infectados y su correcta eliminación. Es allí cuando surgen los grandes problemas, pues este tipo de vacuna tiene la desventaja de producir anticuerpos aglutinantes, que interfieren tanto en las pruebas de aglutinación, así como en el iELISA y el "Skin test", lo que dificulta el diagnóstico correcto, interfiriendo en la comprensión real del problema y la búsqueda de soluciones adecuadas.

La presencia de la brucelosis en la ganadería ecuatoriana fue evidenciada por Salvestroni en 1926, posteriormente a pesar de los esfuerzos realizados en los trabajos de investigación relacionados a la brucelosis animal en Ecuador, la falta de técnicas de diagnóstico estandarizadas de alta sensibilidad y especificidad, inadecuada interpretación de resultados, así como el bajo número de aislamientos y tipificaciones de *Brucella* spp., ha impedido tener una apreciación veraz del problema.

Este trabajo fue realizado con el objetivo de generar información confiable sobre la situación epidemiológica de la brucelosis bovina y su impacto en la salud pública en la región noroeste de Ecuador, y los factores de riesgo que se asocian; conocimiento que ayude a tomar decisiones adecuadas por parte de los Organismos Oficiales responsables de la vigilancia de esta zoonosis en Ecuador, basado en la contextualización de problemas. Con este fin, se establecieron cuatro objetivos específicos.

Este manuscrito de tesis, está dividido en dos grandes secciones: la introducción elaborada para proveer un acercamiento a la literatura existente sobre *brucella* sp. y la brucelosis, y la sección experimental en la cual se presentan los estudios realizados en humanos y animales en Ecuador, realiados durante las fases de campo y laboratorio.

En la sección de introducción, se abordan aspectos generales sobre el agente causal de la enfermedad, aspectos epidemiológicos y de la respuesta inmunitaria de los hospederos, así como las particularidades de los diferentes métodos utilizados para su diagnóstico directo e indirecto, además se presenta un revisión bibliográfica sobre los sistemas de crianza animal en Ecuador, a fin de establecer la situación actual de la brucelosis (**Objetivo 1**).

La sección experimental presenta los estudios realizados en animales, con la finalidad de caracterizar el agente causal, determinar la prevalencia real de la infección, y estimar los parámetros de sensibilidad y especificidad de los test de diagnóstico utilizados (**Objetivo 2**), y para establecer la importancia zoonótica de la brucelosis (**Objetivo 3**).

Primero, se presentan los resultados obtenidos del estudio realizado en bovinos de la zona nor-oeste del Ecuador: y luego las observaciones realizadas durante el estudio de la brucelosis en los caprinos de dos regiones de Ecuador.

En el caso de los humanos, son presentados los resultados de los estudios para determinar la prevalencia real, factores de riesgo y caracterización de agente causal, determinación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas utilizadas, y la presentación del seguimiento clínico - serológico de un caso de orquitis.

La tesis finaliza con la presentación de líneas directrices que podrían servir de base para el desarrollo de una estrategia para la vigilancia epidemiológica de la brucelosis bovina y humana, adaptada a las condiciones de la región noroeste de Ecuador. (**Objetivo 4**).

REMERCIEMENTS

A la fin de ce travail de recherche, les souvenirs se bousculent dans ma tête, tous liés à chacune des étapes de la recherche, tant en Equateur qu'en Belgique. Le chemin parcouru fut en réalité long et difficile, mais mené à terme grâce aux personnes qui étaient à mes côtés et qui ont contribué de loin ou de près à alléger cette charge.

Essayer de résumer le vécu de cette période est impossible, car à chaque étape surgissent des images et un/des nom(s) des replis de ma mémoire. Mon plus sincère remerciement et ma plus grande gratitude à chacun et chacune d'entre vous, qui avez pris part à cette aventure, et à la grande équipe de travail à laquelle je me sens fier d'appartenir.

Un remerciement particulier à mes promoteurs, les Professeurs Claude Saegerman (ULg), Dirk Berkvens (IMT-ITG) et Washington Benítez (CIZ), pour leurs conseils avisés, le partage de leurs connaissances et de leur travail, ainsi que leur patience et compréhension. Un tout grand merci, Claude, de m'avoir contaminé par ton enthousiasme et ta passion pour la recherche dans le vaste monde de la brucellose. Dirk, merci de m'avoir ouvert les portes de l'épidémiologie lors du module du CIPSAT, et d'avoir choisi, en accord avec Jef, cette zoonose importante comme thème du M.Sc; en réalité, il n'y avait pas de meilleur choix possible. Cher Dr Benítez, malgré votre façon particulière de stimuler les gens au travail, au final, cela a porté ses fruits; merci pour vos conseils, spécialement lors des longs voyages à Imbabura et Loja.

Au personnel scientifique du CIZ, qui a contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail de recherche, Maritza Celi, Margoth Barrionuevo, María-Augusta Chávez, Freddy Proaño, María-Fernanda Mera, Lenin Ron et Richar Rodríguez, tous mes remerciements.

Toute ma reconnaissance à chacun des thésards du CIZ qui a travaillé sur la brucellose, ils ont toujours montré un intérêt particulier à mon travail, bien que je n'étais pas leur directeur de thèse: Elsa Miño, Fabián Pico, Maritza Celi, Laura Vizcaíno, Alexandra Angulo, Andrés Tufiño, Jaime Calva, Tania Solís, Marcelo Ibarra, Mayra Ruiz, Luis Pontón, Francisco Benítez, Pablo González, Marco Larrea, Lizbeth Olmedo, Daniela Barzallo, Elizabeth Minda, José-Luis Espinoza et Mayra Faz. Tant le travail de terrain

que le travail de laboratoire que vous avez développé ont permis, non seulement de collecter les informations de base, mais aussi et surtout de valoriser nos capacités. Mes sincères remerciements à Liz, Daniela et Elly, les filles du “ghetto”, pour leur apport scientifique et technique non négligeable à la recherche développée au sein des laboratoires de Microbiologie et Biologie Moléculaire du CIZ. Merci, Mary et Pablito, votre appui inconditionnel, surtout lors du travail coude à coude sur le terrain, et votre amitié restera gravée à jamais dans ma mémoire.

Je voudrais aussi remercier le personnel administratif du CIZ, Luis Simbaña, Paulina Correa et Angel Mosquera, pour son appui logistique toujours opportun. Merci Luchito d’avoir ramassé les pots cassés que nous avons laissés derrière nous, et à toi, Pauly, pour ta joie et sincérité contagieuses.

Je tiens à exprimer ma gratitude au personnel scientifique du CODA-CERVA, et plus particulièrement aux Dr. Karl Walravens, Prof. Jacques Godfroid et Dr. David Fretin, qui m’ont transmis leurs connaissances au travers de leurs compétences, dans le cadre des tests diagnostiques réalisés en Sérologie, Microbiologie et Biologie Moléculaire (Laboratoire de Référence pour la brucellose). Merci à Luc Utterhaegen, Cristel Demedt, Patrick Michel, Martine Marin, Sylvie Malbrecq et Damian Desqueper pour leur enseignement, leurs conseils et la rigueur de travail en regard d’une maladie aussi dangereuse que la brucellose.

A Jef Brandt (IMT-ITG), je dis merci pour ses précieux conseils et sa motivation dans le cadre de la tâche difficile de présentation et publication des résultats. Merci, cher Jef d’être toujours disponible. Anke Van Hul (IMT), pour ton aide précieuse tout le long du sentier tortueux de standardisation de l’iELISA, les portes de la maison te seront toujours grandes ouvertes. Je remercie aussi le personnel scientifique et administratif de l’IMT, Emmanuel Nji Abatih, Danielle Debois et Nadia Ehligier, qui a collaboré pour la finalisation de ce travail.

Ma reconnaissance éternelle au peuple Belge, qui, au travers de ses impôts, contribue au développement de son pays et d’autres, grâce à la collaboration internationale et interuniversitaire. Sans votre soutien économique, canalisé par différentes institutions

qui m'ont ouvert leurs portes au cours de mon travail, la collecte d'informations épidémiologiques très utiles pour l'Equateur et le monde entier n'aurait pas été rendue possible. Je tiens à souligner l'aide précieuse apportée par la *Direction générale Coopération* au développement et Aide humanitaire (DGD), la Coopération Technique Belge (CTB) et l'Académie de Recherche et d'Enseignement supérieur (ARES-ULg).

Je tiens également à remercier l'Université Centrale d'Equateur et le Centre International sur les Zoonoses (CIZ) pour leur appui logistique et financier, sans lequel ce travail de terrain n'aurait pu être réalisé. Pour le dialogue et le travail collaboratif, je dis merci aux Facultés de Médecine Vétérinaire et des Sciences Chimiques de l'Université Centrale d'Equateur, à l'Agence Equatorienne d'Assurance Qualité de l'Agriculture (AGROCALIDAD), au Ministère de la Santé Publique (MSP), au projet PROCANOR, à l'Entreprise Métropolitaine des Résidus de Quito, à l'Abattoir Municipal d'Ibarra et à l'Hôpital Voz Andes de Quito. Mes sincères remerciements vont aussi à l'Université des Forces Armées (ESPE) pour son appui durant la phase finale de la thèse.

Je remercie les propriétaires et travailleurs des Unités de Production Agricole pour leur participation volontaire et leur grande collaboration tout au long de ce travail.

Merci à toutes celles et ceux qui ont rendu agréables mes séjours en Belgique, Marie-France Humblet, Mario Machado et Laetitia Lempereur. Merci, Marie-France et Mario, pour votre amitié et votre confiance. Je voudrais aussi remercier les personnes suivantes que j'ai connues en Belgique et avec qui j'ai passé de nombreux moments agréables: Amel Adel, Dolf Michielsen, Nicolas Praet, Deko Moleka, Maixent-Cyr-Teddy Bekangba, Emma Resplandy, Zahira Auladin, Ngendakuriyo Pie, Katrien Santy et Abdou Razac Boukary.

Je tiens à remercier les collègues de l'Unité de Recherche en Epidémiologie et Analyse de Risque Appliquées aux Sciences Vétérinaires» (UREAR-ULg), Ludovic Martinelle, Noémie El Agrebi, Véronique Renault, Quentin Nemery, Fabiana Dal Pozzo et Juana Bianchini pour leurs conseils et compagnie. Un merci particulier à Marie-France Humblet pour son aide dans la rédaction de la thèse en "bon français".

Ma plus sincère et profonde gratitude à mes parents, Jorge et Victoria, pour leur support émotionnel inconditionnel à chaque étape de ma vie, et à mes frères et soeurs, Carlitos, Carmita et Rebequita, d'avoir été des exemples de travail, de dépassement de soi, de ténacité et de valeurs. Ma reconnaissance spéciale à mon épouse, María-Augusta, un véritable appui et une compagne d'aventure et de travail, et à mes filles, Emilia y María-Inés, pour leur compréhension d'avoir entendu parler continuellement de "vache brucellique". A mes amis et autres membres de la famille, je dis merci d'avoir toujours été présents et de m'avoir soutenu. Finalement, mon ultime remerciement va au Père Céleste, pour son immense miséricorde et sa bénédiction. A toi la gloire, "mon Père".

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo de investigación, los recuerdos se agolpan en mi mente, pensamientos ligados a las actividades realizadas en cada una de las etapas de investigación tanto en Ecuador como en Bélgica. El camino recorrido fue en verdad largo y duro, pero siempre llevadero gracias a las personas que estuvieron a mi lado, y que contribuyeron directa o indirectamente a aligerar la carga.

Tratar de resumir lo vivido en este tiempo, es imposible, pues siempre surgirán de los pliegues de nuestra memoria, imágenes y nombre. Mi más sincero reconocimiento público y gratitud a cada uno de ustedes, quienes fueron parte de esta aventura y del numeroso equipo de trabajo del cual me siento orgulloso de haber pertenecido.

Un reconocimiento especial a mis estimados promotores, Prof. Claude Saegerman (ULg), Prof. Dirk Berkvens (IMT-ITG), Prof. Washington Benítez (CIZ) por sus consejos oportunos, el compartir de sus conocimientos y mística de trabajo, así como por su paciencia y comprensión. Sin duda, este trabajo ha llegado a feliz término gracias a constante soporte y seguimiento. Muchas gracias Claude por contagiarme de tu entusiasmo y pasión por la investigación en el amplio mundo de la brucelosis. Dirk, gracias por haberme abierto las puertas a la epidemiología durante su módulo del CIPSAT, y haber escogido, junto con Jef, esta importante zoonosis como tema de la M.Sc., en verdad fue la mejor elección. Estimado Dr. Benítez, al parecer su particular forma de estimularme al trabajo al final dio frutos; muchas gracias por sus consejos especialmente en los largos viajes a Imbabura y Loja.

Al personal científico del CIZ, que directa o indirectamente contribuyeron en la realización de este trabajo de investigación: Maritza Celi, Margoth Barrionuevo, María-Augusta Chávez, Freddy Proaño, María-Fernanda Mera, Lenin Ron y Richar Rodríguez, mis agradecimientos.

Un profundo reconocimiento a cada uno de los tesisistas de brucelosis del CIZ, quienes tuvieron siempre un espíritu enseñable, a pesar de no haber sido yo su director de tesis: Elsa Miño, Fabián Pico, Maritza Celi, Laura Vizcaíno, Alexandra Angulo, Andrés Tufiño, Jaime Calva, Tania Solís, Marcelo Ibarra, Mayra Ruiz, Luis Pontón, Francisco Benítez, Pablo González, Marco Larrea, Lizbeth Olmedo, Daniela Barzallo, Elizabeth

Minda, José-Luis Espinoza, Mayra Faz. El trabajo prospectivo de campo y laboratorio por ustedes desarrollado, no solo permitió tener información de base, sino y principalmente permitió valorar nuestras capacidades. Mi reconocimiento especial a Liz, Daniela y Elly, las chicas del “gheto”, por su sustancial aporte científico-técnico a la investigación desarrollada en los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular del CIZ. Gracias Mary y Pablito por su apoyo incondicional especialmente durante el trabajo de campo, el trabajo hombro a hombro y amistad siempre fueron sus distintivos.

También quisiera agradecer por el apoyo logístico siempre oportuno del personal administrativo del CIZ: Luis Simbaña, Paulina Correa y Angel Mosquera. Gracias Luchito por limpiar cada desastre que dejábamos a nuestra paso; y a ti Pauly por tu contagiante alegría y sinceridad.

Quisiera dejar constancia de mi reconocimiento al personal científico del CODA-CERVA: Dr. Karl Walravens, Prof. Jacques Godfroid, Dr. David Fretin, quienes gracias a su confianza fue posible la adquisición de conocimientos y destrezas en la realización del gran número de pruebas diagnósticas aplicadas en los laboratorios de Serología, Microbiología y Biología Molecular, en un Laboratorio de Referencia para brucelosis. Gracias Luc Utterhaegen, Cristel Demedt, Patrick Michel, Martine Marin, Sylvie Malbrecq y Damian Desqueper, por sus enseñanzas, consejos y forma de trabajar con una enfermedad tan peligrosa como es la brucelosis.

A Jef Brandt (IMT-ITG) por sus valiosos consejos y motivación durante la siempre difícil tarea de presentación y publicación de resultados. Gracias querido Jef por siempre estar disponible. A Anke Van Hul (IMT) por su valiosa ayuda durante el tortuoso proceso de estandarización del iELISA, las puertas de la casa siempre seguirán abiertas para personas como tú. Al personal científico y administrativo del IMT, que colaboraron para que esta tesis llegue a feliz término: Emmanuel Nji Abatih, Danielle Debois y Nadia Ehlinger.

Un reconocimiento eterno a los habitantes de Bélgica, quienes a través de sus impuestos, contribuyen al desarrollo de su país, así como de otros gracias a la Colaboración Internacional e Inter-universitaria. Sin su aporte económico, canalizado

por diferentes instituciones que me abrieron sus puertas durante este largo tiempo de trabajo, no hubiera sido posible la obtención de información epidemiológica de gran utilidad para el Ecuador y el mundo. Quisiera destacar el importante aporte realizado por: Dirección General de Cooperación Internacional del Gobierno de Bélgica (DGCI), Cooperación Técnica Belga (CTB-BTC), y la Academia de Investigación y de Enseñanza Superior (ARES - ULg).

Quisiera dejar constancia de mi agradecimiento a la Universidad Central del Ecuador y a su Centro Internacional de Zoonosis - CIZ, por su apoyo logístico y financiero, sin el cual el importante trabajo de campo no hubiera sido posible realizar. A cada una de las instituciones que estuvieron dispuestas para el diálogo y trabajo colaborativo: Facultades de Medicina Veterinaria y Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCALIDAD, Ministerio de Salud Pública – MSP, Proyecto PROCANOR, Empresa Metropolitana de Rastro de Quito, Camal Municipal de Ibarra, Hospital Voz Andes Quito. A la universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, por su apoyo durante la fase final de esta tesis.

A los propietarios y trabajadores de las Unidades de Producción Agrícola, por su participación voluntaria y gran colaboración en el transcurso del presente trabajo.

Un agradecimiento a todos aquellos que hicieron posible que mi estadía en Bélgica durante los múltiples viajes haya sido siempre agradable: Marie-France Humblet, Mario Machado, Laetitia Lempereur. Gracias, Marie-France y Mario por su amistad y confianza. Quisiera también agradecer el tiempo y vivenciar compartidas con grander personas que pudo conocer durante el tiempo transcurrido en Bélgica: Amel Adel, Dolf Michielsens, Nicolas Praet, Deko Moleka y Maixent-Cyr-Teddy Bekangba, Emma Resplandy, Zahira Auladin, Ngendakuriyo Pie, Katrien Santy, Abdou Razac Boukary.

A los compañeros de la «Unité de Recherche en Epidémiologie et Analyse de Risque Appliquées aux Sciences Vétérinaires» (UREAR-ULg), por sus consejos y compañía: Ludovic Martinelle, Noémie El Agrebi, Véronique Renault, Quentin Nemery, Fabiana

Dal Pozzo, Juana Bianchini. Un especial agradecimiento a Marie-France Humblet, por su valiosa ayuda al poner el texto de la tesis en un “buen francés”.

Mi más profundo y sincero agradecimiento a mis padres, Jorge y Victoria, por su invalorable soporte principalmente emocional durante cada etapa de mi vida; a mis hermana Carlitos, Carmita y Rebequita, por ejemplo de trabajo, superación, tenacidad y valor. Un especial reconocimiento a mi esposa María-Augusta, una verdadera “ayuda idónea” y compañera de aventura y trabajo; a mis hijas Emilia y María-Inés por su comprensión al haber escuchado hablar continuamente de “la vaca brucela”. A mis amigos y demás familiares, gracias por estar siempre presentes.

Finalmente, pero el principal reconocimiento a mi Padre Celestial, por su inmensa misericordia y multitud de bendiciones. A ti la gloria “aba padre”.

TABLE DES MATIERES

Dédicace.....	i
Dedicatoria	i
RÉSUMÉ.....	i
VERSION FRANÇAISE.....	l
SUMMARY	xii
ENGLISH VERSION	xii
RESUMEN	i
VERSIÓN EN ESPAÑOL	l
REMERCIEMENTS	i
AGRADECIMIENTOS.....	i
TABLE DES MATIERES.....	i
LISTE DES ABREVIATIONS	i
LISTE DES TABLEAUX DE L'INTRODUCTION	i
INTRODUCTION.....	1
PRÉAMBULE	2
INTRODUCTION.....	5
PARTIE 1: BRUCELLOSES: GÉNÉRALITÉS, ÉPIDÉMIOLOGIE, RÉPONSE IMMUNITAIRE, SIGNES CLINIQUES, DIAGNOSTIC ET	
VACCINATION.....	5
1.- <i>Généralités</i>	1
1.1.- Historique	1
1.2.- Synonymes.....	3
1.3.- Importance en santé publique et impact économique.....	3
1.4.- <i>Brucella</i> et le bioterrorisme	5
2.- <i>Le genre Brucella</i>	5
2.1.- Généralités	5
2.2.- Structure	7
2.3.- Le Lipopolysaccharide.....	7
3.- <i>Epidémiologie</i>	8
3.1.- Résistance dans l'environnement.....	8
3.2.- Modes de transmission.....	8
3.3.- Espèces animales sensibles.....	9
3.4.- Distribution géographique.....	9

3.5.-	Vecteurs mécaniques.....	10
3.6.-	Groupes humains à risque	10
4.-	<i>Réponse immunitaire</i>	11
4.1.-	Pathogénie.....	11
4.2.-	Réponse immunitaire de type humoral.....	12
4.2.1.-	Généralités.....	12
4.2.2.-	Réponse immunitaire humorale après vaccination	13
4.3.-	Réponse immunitaire de type cellulaire	13
4.3.1.-	Généralités.....	13
5.-	<i>Tableau clinique</i>	13
5.1.-	Chez l'homme	13
5.2.-	Chez les animaux	14
5.2.1.-	L'avortement.....	14
6.-	<i>Diagnostic</i>	15
6.1.-	Diagnostic chez les animaux	15
6.1.1.-	Diagnostic bactériologique	15
6.1.2.-	Diagnostic moléculaire.....	16
6.1.3.-	Méthode diagnostique reposant sur la détection de la réponse humorale.....	16
6.1.4.-	Méthodes diagnostiques reposant sur la réponse immunitaire de type cellulaire.....	22
6.2.-	Diagnostic chez l'homme.....	23
6.2.1.-	Considérations générales.....	23
6.2.2.-	Diagnostic direct ou bactériologique	23
6.2.3.-	Diagnostic indirect ou sérologique	24
7.-	<i>Vaccination</i>	24
7.1.-	Souche 19 ou B-19	24
7.2.-	Vaccin 45/20.....	27
7.3.-	Vaccin RB-51	27
8.-	<i>Principes épidémiologiques</i>	28
8.1.-	Prévalence (<i>P</i>).....	28
8.2.-	Incidence (<i>I</i>)	28
8.3.-	Facteurs de risque	29

9.-	<i>Les caractéristiques des tests de dépistage</i>	30
9.1.-	Sensibilité (<i>Se</i>).....	30
9.2.-	Spécificité (<i>Sp</i>)	31
9.3.-	Valeur Prédicative Positive d'un résultat positif (<i>VPP</i>)	31
9.4.-	Valeur Prédicative Positive d'un résultat négatif (<i>VPN</i>).....	31
INTRODUCTION.....		32
PARTIE 2: LE SYSTÈME D'ÉLEVAGE ET LA SITUATION ACTUELLE DE LA BRUCELLOSE EN EQUATEUR		32
ARTICLE 1		34
BRUCELLOSIS IN ECUADOR: A CRITICAL REVIEW OF THE CURRENT SITUATION, PROSPECT AND CHALLENGES.....		34
OBJECTIFS		68
SECTION EXPÉRIMENTALE		70
PARTIE 1: ESTIMATION DE LA SENSIBILITÉ ET LA SPÉCIFICITÉ DES TESTS DE DIAGNOSTIC ET ESTIMATION DE LA PRÉVALENCE RÉELLE DE LA BRUCELLOSE BOVINE DANS LE NORD DE L'ÉQUATEUR.....		71
ARTICLE 2		73
BOVINE BRUCELLOSIS IN NORTH-WEST ECUADOR: TYPING OF <i>BRUCELLA</i> SPP., SEROPREVALENCE, AND ASSOCIATED RISK FACTORS.....		73
PARTIE 2: BRUCELLOSE CAPRINE EN EQUATEUR		99
ARTICLE 3		101
UNEXPECTED DISCOVERY OF <i>BRUCELLA ABORTUS</i> BUCK B-19 VACCINE IN GOATS FROM ECUADOR.....		101
PARTIE 3: DÉTERMINATION DE LA SÉROPRÉVALENCE, DES FACTEURS DE RISQUE ET DES ESPÈCES ET BIOVARS DE		116
ARTICLE 4		118
HUMAN BRUCELLOSIS IN NORTH-WEST ECUADOR: TYPIFYING OF <i>BRUCELLA</i> SPP., SERO-PREVALENCE, AND ASSOCIATED RISK FACTORS		118
PARTIE 4: PERFORMANCE DES TESTS UTILISÉS POUR LE DIAGNOSTIC DE LA BRUCELLOSE HUMAINE EN EQUATEUR		131
ARTICLE 5		133
BAYESIAN EVALUATION OF THREE SEROLOGICAL TESTS FOR DETECTING ANTIBODIES AGAINST <i>BRUCELLA</i> SPP. AMONG HUMANS IN THE NORTH-WESTERN PART OF ECUADOR.....		133
PARTI 5: ÉVALUATION DE L'IMPORTANCE ZOOTIQUE DE LA BRUCELLOSE EN EQUATEUR		167
ARTICLE 6		169
FIRST REPORT OF ORCHITIS IN MAN, CAUSED BY <i>BRUCELLA ABORTUS</i> BIOTYPE 1 IN ECUADOR.....		169

DISCUSSION GÉNÉRALE	176
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	198
RÉFÉRENCES	202
ANNEXES	227
POSTER 1	228
VALIDATION OF DIAGNOSTIC TEST TO DETECT BRUCELLOSIS AND EPIDEMIOLOGICAL SURVEY IN THE ECUADORIAN ANDES	228
POSTER 2	232
DOGS AS POTENTIAL MECHANICAL VECTOR OF TRANSMISSION OF <i>BRUCELLA</i> SPP. IN DAIRY CATTLE IN THE SIERRA OF	
ECUADOR.....	232

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviations

Ac	Anticorps
Ag	Antigène
ac	Agglutination complète
ai	Agglutination incomplète
Bayes-P	<i>Posterior predictive check probability</i>
BPAT	<i>Buffered Antigen Plate Agglutination Test</i> (=épreuve d'agglutination sur lame à l'antigène tamponné)
B-19	Souche vaccinale Buck 19 (également appelée S19)
CERVA	Centre d'Etude et de Recherche Vétérinaires et Agrochimiques (Belgique)
CFT	<i>Complement Fixation Test</i> (= test de fixation du complément)
CIZ	<i>Centro Internacional de Zoonosis (Universidad Central del Ecuador)</i>
DIC	<i>Deviance Information Criterion</i> (= critère d'information de déviance)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate</i> (= acide éthylène diamine tétra-acétique)
FAO	Fonds des Nations Unies par l'Alimentation et l'Agriculture
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (= sérum de foetus bovin)
FN	Faux négatif
FP	Faux positif
g	gramme
HRPO	<i>Horseradish Peroxydase</i> (= peroxydase de raifort)
<i>I</i>	Incidence
IA	Insémination artificielle
iELISA	<i>Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (= test d'immuno-absorption enzymatique indirecte réalisé sur sérums)
iELISA-L	<i>Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-L</i> (= test d'immuno-absorption enzymatique indirect réalisé sur le lait)
IC	Intervalle de confiance
I Cr	Intervalle de crédibilité
IgA	Immunoglobuline de type A
IgG	Immunoglobuline de type G

IgM	Immunoglobuline de type M
km ²	kilomètre carré
l	litre
LPS	Lipopolysaccharide
M	mole
MAGAP	Ministère de l'Agriculture et de l'Élevage
mg	milligramme
ml	millilitre
mM	millimole
mm	millimètre
MRT	<i>Milk Ring Test</i> (= épreuve de l'anneau sur le lait)
msnm	<i>Metros sobre el nivel del mar</i> (= mètres d'altitude)
MSP	Ministère de la Santé Publique
N	normal (normalité)
NBCS	<i>Newborn Calf Serum</i> (= sérum de veau nouveau-né)
<i>NEca</i>	Niveau d'exposition des cas
<i>NEco</i>	Niveau d'exposition des témoins
nm	nanomètre
OIE	Organisation Internationale de la Santé Animale
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPS	Organisation Panaméricaine de la Santé
<i>OR</i>	Odds Ratio
<i>P</i>	Prévalence réelle
<i>p'</i>	Prévalence apparente
PANAFTOSA - Centre Panaméricain de la fièvre aphteuse	
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (= tampon phosphate salin)
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PCR-711	PCR dirigée sur la séquence d'insertion 711 de <i>Brucella</i> spp.
pD	<i>Number of parameters estimated</i> (= nombre de paramètres estimés)
PNSA	Programme National de Santé Animale
RB	Rose de Bengale (= Épreuve d'agglutination rapide sur plaque)

RB51	Souche vaccinale RB51. Il s'agit d'une souche mutant de la souche 2308 de <i>Brucella abortus</i> . Elle est résistante à la rifampicine qui est l'antibiotique de choix dans le traitement de la brucellose humaine.
RE+	Risque dans le groupe exposé
RE-	Risque dans le groupe non exposé
RR	Risque Relatif
SAT	Serum Agglutination Test (= test de séro-agglutination lente, épreuve de Wright)
SAT-EDTA	Test de séro-agglutination lente en présence d'EDTA
SAT-2ME	Épreuve de Wright en présence de 2-Mercaptoetanol
Se	Sensibilité
SESA	Service Équatorien de Santé Agricole
Sp	Spécificité
ST	<i>Skin Test</i> (= test cutané)
µg	microgramme
UI	Unité Internationale
µl	microlitre
UCF	Unités Formant des Colonies
UPA	Unité de production Agricole
VP	Vrais positif
VN	Vrais négatif
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive
°C	Degré centigrade

LISTE DES TABLEAUX DE L'INTRODUCTION

Tableau 1.1 Tests permettant de différencier les biotypes de <i>Brucella</i> (Alton et al., 1988; Marín & Blasco, 2001).....	6
Tableau 1.2 Hôtes accidentels de <i>Brucella</i> spp. (Alton et al., 1988; Godfroid et al., 2010; Saegerman et al., 2010).....	10
Tableau 1.3 Avantages, inconvénients et paramètres de sensibilité et de spécificité) des tests de diagnostic de la brucellose bovine.	25
Tableau 1.4 Caractéristiques permettant de distinguer une souche vaccinale 27	27
<i>B. abortus</i> (souche 19) d'une souche sauvage <i>B. abortus</i> typique (biovar 1) 27	27
(Alton et al., 1988) 27	27
Tableau 1.5 Répartition des effectifs dans le cadre d'une étude exposés/non exposés (Toma et al., 2010a) 29	29
Tableau 1.6 Effectifs dans une étude cas-témoins (Toma et al., 2010a)..... 30	30
Tableau 1.7 Définitions des notions de sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur productive négative d'un test (Toma et al., 2010b) 31	31
Tableau 4.1 Résultats des tests réalisés dans le cadre du diagnostic de brucellose chez les animaux non vaccinés 177	177
Tableau 4.2 Estimations de la sensibilité et de la spécificité des tests appliqués dans le cadre du diagnostic de la brucellose bovine 178	178
Tableau 4.3 Information complémentaire concernant les animaux chez lesquels <i>Brucella abortus</i> biotype 4 a isolée..... 179	179
Tableau 4.4 Résultats du suivi des vaccins contre la brucellose bovine utilisés dans la zone d'étude..... 179	179

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Préambule

La brucellose est une maladie infectieuse causée par des bactéries du genre *Brucella*, qui peuvent affecter différentes espèces animales telles que les bovins, les moutons, les chèvres, les porcs et les chevaux. Chez ces espèces, des infections chroniques ont été rapportées. Le premier isolement de l'agent causal chez les bovins a été réalisé au Danemark en 1897, mais onze ans après que Bruce Davis ait identifié l'infection chez l'homme suite à l'isolement de *Micrococcus mellitensis*¹, caractérisant ainsi cette infection comme étant une zoonose.

La prévalence et l'incidence de la brucellose chez l'homme sont directement liées à la présence de l'infection au sein des réservoirs animaux. Chez ces derniers, des troubles de la reproduction tels que l'avortement, la rétention du placenta, l'orchite - épididymite et la stérilité sont rapportés. Les pertes économiques causées par la brucellose ne sont pas seulement liées aux effets directs sur la santé humaine et animale, mais aussi à des restrictions en termes de commercialisation des animaux et de leurs produits.

La brucellose bovine est apparue en Equateur suite à l'introduction d'animaux infectés au moment de la conquête espagnole, bien que sa présence n'ait été confirmée officiellement qu'en 1955. La prévalence réelle et la distribution de *Brucella* sp. chez les bovins sont inconnues en Equateur. Seule une enquête nationale sérologique menée en 1979 a permis de mettre en évidence la présence d'anticorps contre l'agent causal.

Les actions mises en œuvre pour le contrôle et l'éradication de la brucellose dans le monde entier reposent principalement sur la vaccination des animaux et l'abattage des animaux infectés. En raison des réactions croisées liées à la vaccination, et au vu des particularités des tests de laboratoire, la fiabilité du diagnostic de l'infection chez l'homme et les animaux a toujours porté à discussion.

¹ Ultérieurement dénommée *Brucella melitensis*.

Actuellement, la brucellose est considérée comme une maladie ré-émergente, en raison de la recrudescence des cas humains liés aux voyages et à l'ingestion de produits laitiers, dans les zones où l'infection est toujours présente parmi les réservoirs animaux.

L'introduction de cette thèse vise, dans un premier temps, à donner une appréciation sur les aspects généraux de l'agent causal et de l'infection chez l'homme et chez les différents réservoirs animaux, ainsi que sur l'épidémiologie de la maladie. Dans la seconde partie, les caractéristiques du système d'élevage en Equateur ainsi qu'une revue de littérature ciblant les études sur les brucelloses humaine et animale en Equateur seront développés.

INTRODUCTION

Partie 1: Brucelloses: généralités, épidémiologie, réponse immunitaire, signes cliniques, diagnostic et vaccination.

1.- Généralités

1.1.- Historique

La brucellose serait apparemment connue depuis l'époque d'Hippocrate, c'est-à-dire 400 ans avant Jésus Christ, bien que les premières descriptions détaillées sur cette maladie n'aient été réalisées qu'en 1751 par Cleghorn (Ruiz Castañeda, 1954; Suárez, 2001). La première description clinique fiable de la maladie remonte à 1859 et est attribuée à Marston (Nicoletti, 2002).

Jusqu'en 1875, le mode de transmission de cette infection était toujours inconnu, et représentait une source de polémique entre médecins, vétérinaires et producteurs. En 1870, Franck, et ensuite Lehnert et Brauel, ont provoqué un avortement après avoir placé dans le vagin de vaches saines des fragments de placentas provenant de vaches avortées. En 1875, Saint et Cyr conclurent que l'avortement épizootique des bovins était causé par un agent non encore déterminé. En 1886, Woodhead provoqua l'avortement de vaches et de chèvres en plaçant des sécrétions vaginales provenant de vaches infectées dans leurs voies génitales (OIE, 2000; Young, 1997).

Cette maladie fut d'abord étudiée chez l'homme, et après seulement chez les animaux domestiques. C'est en 1886 que Bruce isola l'agent causal à partir de la rate de soldats morts après avoir contracté cette infection, caractérisée par une fièvre ondulante; il a alors baptisé cet agent *Micrococcus melitensis* (Nicoletti, 2002). Ce n'est qu'onze ans après, en 1897, que le vétérinaire danois Bang isola l'agent responsable d'avortement infectieux chez le bovin et le surnomma «*Bacille de Bang*».

En 1897, Wright & Smith mirent au point une méthode de diagnostic sérologique basée sur la propriété d'agglutination des sérums sanguins de patients envers des cultures de *Micrococcus melitensis*. Wright se fit vacciner avec ces bactéries mortes mais contracta ensuite la maladie (OIE, 2000; Young, 1997).

En 1905, 19 ans après le premier isolement du *Micrococcus melitensis*, Zammit & Horrocks isolèrent le micro-organisme dans le lait des chèvres, mettant en évidence pour la première fois l'importance épidémiologique que représente les mammifères domestiques dans le cycle de transmission. Cette découverte a permis d'instaurer la première mesure de contrôle, à savoir interdire aux soldats anglais de consommer du lait de chèvre.

En 1911, Schroeder et Cotton, mais aussi Moudre et Traum, isolèrent l'agent causal respectivement dans le lait de vache et à partir d'amygdales d'enfants qui consommaient ce lait. Ils ont ainsi déterminé le rôle épidémiologique que jouent les bovins dans la transmission de cette zoonose (Godfroid et al., 2010; Saegerman et al., 2010).

En 1914, Traum rapporta l'existence d'un troisième membre de l'actuel genre *Brucella*, à savoir *Brucella suis*, isolé à partir de fœtus avortés de truies. Néanmoins, ce n'est que dix ans plus tard que Keefer rapporta l'infection chez l'homme (Godfroid et al., 2010; Saegerman et al., 2010).

La relation entre l'agent causal de la fièvre de Malte et la maladie de Bang a été mise en évidence en 1920, au travers des travaux d'Alice Evans. C'est elle-même qui suggéra de baptiser l'agent causal «*Brucella*» en hommage à David Bruce.

En 1929, Huddleson développa des techniques permettant de différencier *B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis* (Bowden, 1996). La souche vaccinale de *B. abortus* 19 (B19 ou S19) a été isolée en 1923 par Buck, qui démontra son pouvoir protecteur chez les bovins dès 1930. Les vaccins vivants atténués ont fait leur apparition en 1945 avec la souche *Brucella abortus* 45/20 mise au point par Mc Ewwen et Priestly et c'est Elberg qui a créé la première souche mutante de *Brucella melitensis* Rev-1.

Mc Farlane et ses collaborateurs furent les premiers à isoler *Brucella ovis* en Nouvelle Zélande en 1950. En 1968, Carmichael et Bruner isolèrent pour la première fois *Brucella canis* (Bowden, 1996).

Depuis la création du genre *Brucella*, réalisée en 1920 par Meyer et Shaw, jusqu'à 1963 uniquement l'espèce *Brucella suis* a été ajoutée dans ce genre. Au cours des 30 dernières années, trois nouvelles espèces de *Brucella* (*B. canis*, *B. ovis*, et *B. neotomae*) ont été officiellement ajoutées à ce groupe. *Brucella neotomae*, qui, comme toutes les espèces classiques est lisse, ce qui ne fut pas le cas pour les espèces naturellement rugueuses (*B. ovis* et *B. canis*) dont le rattachement au genre *Brucella* fut plus difficile (Saegerman et al., 2010; Suárez, 2001).

Plus récemment, de nouvelles espèces sont venues s'ajouter: *Brucella ceti* et *Brucella pinnipedialis* chez les mammifères marins (Maquart et al., 2009), *Brucella inopinata* isolée d'un implant humain (Scholz et al., 2010) et enfin *Brucella papionis* (Whatmore et al., 2014).

1.2.- Synonymes

Au fil des années, la brucellose humaine a acquis plusieurs synonymes, tels que: fièvre ondulante, septicémie de Bruce, fièvre Méditerranéenne, fièvre de Malte, fièvre du Rio Grande (López, 2002), fièvre gastrique, (Mammerickx, 1990), fièvre du Gibraltar, fièvre de Chypre, fièvre sudorale, fièvre caprine, fièvre de Traum ou encore fièvre du Peñon (Kelsner & Schoening, 1946). Chez les animaux, elle est connue comme maladie de Bang, avortement contagieux et avortement épizootique. Ces expressions font référence, tantôt aux signes cliniques de la maladie, tantôt à sa localisation géographique.

1.3.- Importance en santé publique et impact économique

Malgré les efforts de contrôle et/ou d'éradication, la brucellose est considérée par les organismes internationaux comme la zoonose la plus répandue dans le monde (Gil & Samartino, 2001; OIE, 2016a). Elle est toujours présente à l'état endémique dans de nombreux pays d'Amérique du Sud, dans les pays du bassin méditerranéen, au Moyen-Orient, en Afrique et en Asie occidentale (Lucero et al., 2008).

Cinq des espèces traditionnellement reconnues (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis* et *B. canis*) peuvent causer une infection chez l'homme (M. Corbel, 2006; Doganay et al.,

2003). Les espèces isolées de mammifères marins présentent aussi un caractère zoonotique (Corbel, 2006; Godfroid et al., 2005).

On estime, qu'au niveau mondial, entre 400 000 et 500 000 nouveaux cas de brucellose humaine sont rapportés annuellement (Alvarez, 2001). Son importance est liée aux conséquences néfastes qu'elle provoque en santé publique et aux importantes pertes économiques associées (Halling et Boyle, 2002; Spînu et al., 1966).

Vu le caractère chronique de la maladie chez l'homme, les pertes économiques sont consécutives aux incapacités liées à la maladie, à une diminution des heures de travail ainsi qu'aux coûts engendrés par le traitement (Bowden, 1996). Une étude réalisée au Pérou a estimé le coût minimal associé au traitement de la brucellose à 255 USD par patient, tandis qu'une étude plus récente a évalué ce chiffre à 1.000 USD voire 4.000 USD pour les cas graves (Gil et Samartino, 2001).

Les pertes économiques engendrées par cette infection varient d'un pays à un autre, selon la prévalence réelle de la maladie et les espèces animales concernées. Ainsi Acha et Szyfres (2003) ont précisé qu'en Amérique latine, la brucellose causait une perte annuelle proche des 600 millions de dollars, et ce, rien que pour ses conséquences sur le cheptel bovin. Elles sont principalement liées aux avortements, à la naissances de veaux faibles, à la stérilité des animaux adultes, aux traitements des infections secondaires dus aux métrites et aux mammites, aux diminutions de production laitière et à l'augmentation de l'intervalle entre les vêlages (Acha et Szyfres, 2003; Blood et al., 1987; Corbel, 2006).

Au Mexique, une perte annuelle de 200 millions d'USD a été estimée (Luna-Martínez et Mejía-Terán, 2002), tandis que les pertes économiques générées par la brucellose animale en Amérique Centrale s'élèvent à 25 millions d'USD par an (Moreno, 2002).

La nécessité de certifier que les animaux destinés à l'exportation sont indemnes de plusieurs maladies, parmi lesquelles on retrouve la brucellose, empêche la

commercialisation d'animaux vers l'Amérique du Nord et les pays de l'Union Européenne (UE), dont les exigences sanitaires sont très strictes.

Il a été suggéré que l'aide, tant scientifique que financière, soit dirigée vers les zones endémiques (Pappas et *al.*, 2006).

1.4.- *Brucella* et le bioterrorisme

Les *Brucella* spp. sont également des agents potentiels du bioterrorisme qui sont repris dans la catégorie B des agents pathogènes des Centres de prévention et de contrôle d'Atlanta.

2.- Le genre *Brucella*

2.1.- Généralités

Les bactéries du genre *Brucella* sont de petits coccobacilles, immobiles et sans capsule, qui croissent dans des conditions d'anaérobiose, à 37°C. Certains biotypes ont besoin d'une concentration en CO₂ comprise entre 5% et 10% (Alton et *al.*, 1988). Sur base du séquençage de l'ADN ribosomique 16S, le genre *Brucella* appartient à la subdivision α des Protéobactéries (Mantur et *al.* 2007), laquelle regroupe des organismes caractérisés par leur pouvoir pathogène intracellulaire affectant les plantes (*Agrobacterium* et *Rhizobiaceae*) et les animaux (*Brucella*, *Bartonella* ou *Rickettsia*). Ce sont des bactéries dont la longueur varie entre 0.5 et 1.5 μm et leur diamètre de 0.5 à 0.7 μm (Alton et *al.*, 1988).

Les tests classiques, à savoir le besoin en CO₂, la sensibilité aux colorants, la production de H₂S, l'activité uréasique, et les réactions d'agglutination avec des sérums mono-spécifiques (ciblant les épitopes A et M), permettent de confirmer l'identité de ces bactéries et sont également utiles dans la différenciation du biotype des principales sous-espèces de *Brucella* (FAO & OMS, 1986). Le tableau 1.1 résume les tests permettant de différencier les biotypes de *Brucella* (Alton et *al.*, 1988; Marín et Blasco, 2001).

Tableau 1.1 Tests permettant de différencier les biotypes de *Brucella* (Alton et al., 1988; Marín & Blasco, 2001).

Espèce	Biotype	Exigence en CO ₂	Production de H ₂ S	Croissance en présence de ^a			Agglutination avec sérums ^b	
				Thionine	Fuchsine basique	Safranine	A	M
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	+	-	+
	2	-	-	+	+	+	+	-
	3	-	-	+	+	+	+	+
<i>B. abortus</i>	1	+ ^c	+	-	+	+	+	-
	2	+ ^c	+	-	-	-	+	-
	3	+ ^c	+	+	+	+	+	-
	4	+ ^c	+	-	+ ^d	+	-	+
	5	-	-	+	+	+	-	+
	6	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. suis</i>	9	+ o -	+	+	+	+	-	+
	1	-	+	+	- ^e	-	+	-
	2	-	-	+	-	-	+	-
	3	-	-	+	+	-	+	-
	4	-	-	+	- ^f	-	+	+
<i>B. neotomae</i>	5	-	-	+	-	-	-	+
		-	+	- ^g	-	-	+	-
<i>B. ovis</i>		+	-	+	- ^f	-	-	-
<i>B. canis</i>		-	-	+	- ^f	-	-	-
<i>B. cetaceae</i>		-	-	+	+	+	+	-
<i>B. pinnipediae</i>		+	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i> 19		-	+	-	+	+	+	-
<i>B. abortus</i> RB51		+	+	-	+	+	-	-
<i>B. abortus</i> Rev.1		-	-	-	-	+	-	+

^a Concentration de 20 µg/ml de thionine et de fuchsine basique et 100 µg/ml de safranine ajoutées au milieu sérum dextrose agar

^b A= sérum mono-spécifique anti-A, B = sérum mono-spécifique anti-B

^c Positif pour la majorité des souches

^d Quelques souches isolées au Canada, en Grande-Bretagne et aux USA sont inhibées par la fuchsine basique

^e Quelques souches résistantes à la fuchsine basique ont été isolées en Amérique du Sud et dans le Sud-Est Asiatique

^f Négatif pour la majorité des souches

^g Croissance à une concentration en thionine de 10 µg/ml

L'étude des acides nucléiques a permis de démontrer le faible degré de différence entre les espèces de ce genre (Mellado, 1996). *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et *B. neotomae* présentent presque 100% d'homologie au niveau de leur séquence en poly nucléotides. *Brucella ovis*, quant à elle, présente 94% d'homologie avec les autres espèces, la différence étant due au fait que 6% des bases du génome sont manquantes chez cette espèce (Moriyón & López-Goñi, 2001; Vizcaíno, Cloeckert, Verger, Grayon, & Fernández-Lago, 2000). Pour cette raison, il a été proposé de réduire le genre à une seule espèce, à savoir *B. melitensis*, avec multiples biotypes, mais cette proposition n'a pas encore

été acceptée (Acha & Szyfres, 2003). La nomenclature actuelle reste en vigueur, au vu des différences en matière de préférences d'hôtes selon les espèces, de leur distribution géographique et de leurs caractéristiques métaboliques (Mellado, 1996; Moriyón & López-Goñi, 2001). En conséquence, les deux systèmes taxonomiques sont utilisés.

Les souches de *Brucella* isolées de mammifères marins semblent ne pas pouvoir s'adapter complètement aux espèces classiques; la création de nouvelles espèces a donc été suggérée (Marín & Blasco, 2001).

2.2.- Structure

Parmi les onze espèces de *Brucella* existantes, neuf d'entre elles (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. inopinata* and *B. papionis*) se présentent en phase lisse (s), tandis que deux (*B. ovis* et *B. canis*) se présentent en phase rugueuse (r) (Acha & Szyfres, 2003; Alton et al., 1988; Jacques Godfroid et al., 2010; Saegerman et al., 2010) Les espèces de *Brucella* sont classées comme lisses ou rugueuses en fonction de l'aspect de leurs colonies en culture sur milieu solide. Celui-ci est lié à l'expression particulière de lipopolysaccharides (LPS) de surface par les bactéries. Chez les espèces telles que *B. abortus*, les LPS-s (lipopolysaccharides lisses) ont une structure en polysaccharide exposant la "chaîne O" (polysaccharide O, PSO), qui est absente chez les espèces rugueuses.

Dans le cytoplasme des bactéries, il existe aussi des antigènes qui semblent jouer un certain rôle dans la réaction d'hypersensibilité retardée (protéines intra-cytoplasmiques).

2.3.- Le Lipopolysaccharide

Le LPS, est constitué de trois régions: (1) le lipide A (2) l'oligosaccharide, appelé noyau et (3) le polysaccharide O ou chaîne O (PSO). Ce PSO est responsable du déclenchement de la réponse immunitaire humorale chez les hôtes réservoirs.

La similitude de cette chaîne O est responsable des réactions croisées avec d'autres bactéries Gram négatives; *Yersinia enterocolitica* O:9, par exemple, présente une chaîne O identique à celle trouvée chez *B. abortus* biotype 1. D'autres bactéries telles que *Salmonella* spp, *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli* montrent aussi des réactions croisées (Bowden, 1996; M. Corbel, 2006; Doganay et al., 2003).

Les antigènes A et M, définis par Wilson et Mille en 1932, sont des structures présentes dans la chaîne O du LPS-s et dont la distribution quantitative varie d'un biotype à un autre.

3.- Épidémiologie

3.1.- Résistance dans l'environnement

Bien que les *Brucella* soient sensibles au rayonnement solaire direct ainsi qu'aux désinfectants et à la pasteurisation (Davis & Casey, 1973, cités par Bercovich, 2000), leur durée de survie dans l'environnement varie selon le milieu dans lequel elles se trouvent; elle sera de 60 à 140 jours dans le sol humide, 30 jours dans l'urine, 75 jours dans des fœtus avortés, plus de 200 jours dans des sécrétions utérines et 30 à 210 jours dans les matières fécales (Kerimov, 1983, cité par Bercovich, 2000; Carter, 1985).

3.2.- Modes de transmission

Les animaux infectés peuvent excréter les bactéries dans l'urine, le lait, les sécrétions vaginales ou le sperme, qui peuvent à leur tour contaminer d'autres animaux du troupeau et l'environnement (pâtures, eau et locaux) (Roux, 1979).

Une vache infectée peut commencer à excréter la bactérie dès le 39^{ème} jour post-infection. Bien que la plus forte excrétion de germes se produise au moment du vêlage ou de l'avortement, les animaux peuvent continuer à excréter les micro-organismes de manière intermittente au cours de longues périodes (Herr et al. et 1990; Philippon et al., 1970, cités par Bercovich, 2000). Selon certaines estimations, 10^{11} à 10^{14} bactéries peuvent être éliminées dans l'environnement par gramme de tissu cotylédonaire, principalement au moment du vêlage ou de l'avortement (Saegerman et al., 2010; Godfroid et al., 2010).

Les voies de contamination chez l'homme et les animaux sont:

- Contacts directs avec des animaux ou carcasses infectés, des avortons ou lors d'accidents dans des laboratoires (Doganay et al., 2003; Gavazzi, Prigent, Baudet, Banoita, & Daoud, 1997) ;
- Ingestion de liquides ou tissus contaminés, tels que membranes foetales et sécrétions utérines, généralement en cas d'avortement (Kang, Gunaseelan, & Abbas, 2014; Saegerman et al., 2010) ;
- Pâturage dans un environnement contaminé ou ingestion d'eau contaminée (Saegerman et al., 2010; Godfroid et al., 2010; Kang et al., 2014) ;
- Ingestion de matériel contaminé tel le lait ou les produits laitier non pasteurisés, ou encore ingestion d'aliments inhabituels comme du sang ;
- Inhalation d'aérosols contaminés, à la ferme ; à l'abattoir ou en laboratoire ;
- Voie conjonctivale, suite à un contact direct avec une main ou un gant contaminé, ou via des aérosols contenant des micro-organismes (Nicoletti, 1980) ;
- Auto-inoculation accidentelle, en travaillant de manière inadéquate avec des vaccins vivants ;
- Voie sexuelle, lors de monte naturelle ou d'insémination artificielle, via le sperme contaminé (Acha & Szyfres, 2003; Carter, 1985; Nicoletti, 1980).

3.3.- Espèces animales sensibles

Les différentes espèces du genre *Brucella* ont une prédilection pour l'une ou l'autre espèce-hôte animale: *B. abortus* chez les bovins, *B. melitensis* chez les caprins et *B. suis* chez les suidés (Tableau 1.2). Toutefois, il n'est pas rare de rencontrer des brebis, chèvres, chiens, chevaux, camélidés (dont les sud-américains), buffles et animaux sauvage infectés par *B. abortus*; ils peuvent alors jouer le rôle de réservoir et disséminer la maladie (Manthei & Deyoe, 1970, cités par Bercovich, 2000; Corbel, 2006; Robinson, 2003; Roux, 1979; Saegerman et al., 2010).

3.4.- Distribution géographique

A l'heure actuelle, la brucellose est distribuée au niveau mondial (Suárez, 2001). Certains pays ont réussi à éradiquer la brucellose bovine grâce à la mise en place de programmes de

surveillance épidémiologique et de contrôle; c'est le cas, par exemple, de la Finlande, du Royaume-Uni, de la Norvège, de la Suède, de la Belgique et du Danemark (Godfroid et Käsbohrer, 2002). D'autres pays ont réussi à réduire considérablement l'incidence de la brucellose bovine comme, par exemple, le Japon, la Nouvelle-Zélande, l'Australie ou encore l'Allemagne (Suárez, 2001).

Tableau 1.2 Hôtes accidentels de *Brucella* spp. (Alton et al., 1988; Godfroid et al., 2010; Saegerman et al., 2010)

Espèce	Morphologie de la colonie*	Biotype	Hôtes préférentiels	Pathogénicité chez l'homme
<i>B. melitensis</i>	lisse	1-3	ovins, caprin	haute
<i>B. abortus</i>	lisse	1-6, 9	bovins	haute
<i>B. suis</i>	lisse	1-3	porcs, lièvres, rennes	haute
<i>B. neotomae</i>	lisse	-	néotomas	modérée
<i>B. ovis</i>	rugueux	-	ovins	haute
<i>B. canis</i>	rugueux	-	canidés	modérée
<i>B. pinnipedialis</i>	lisse	-	pinnipèdes	oui
<i>B. ceti</i>	lisse	-	cétacés	oui
<i>B. microti</i>	lisse	-	rongeurs	non
<i>B. inopinata</i>	lisse	-	homme	?
<i>B. papionis</i>	lisse	-	babouin	?

3.5.- Vecteurs mécaniques

Il existe des vecteurs mécaniques, parmi lesquels des animaux domestiques et sauvages ainsi que l'homme, qui peuvent propager la maladie (Roux, 1979). Il est difficile de déterminer jusqu'à quel degré le passage d'animaux dans les zones urbaines ou dans les parcs peut s'accompagner d'une contamination de ces lieux, mais le risque existe néanmoins.

3.6.- Groupes humains à risque

La prévalence de la maladie est influencée par les conditions socio-économiques de chaque pays, région ou localité. Dans les pays en voie de développement, où prédominent les systèmes d'élevage traditionnels et où les infrastructures sanitaires sont déficientes voire inexistantes, cette maladie affecte la population en général, tandis que dans les pays développés, cette maladie présente plutôt un caractère professionnel (Corbel, 2006; Doganay et al., 2003).

Parmi les professions à risque, ce sont les métiers liés à l'agriculture et à l'élevage qui présentent le risque le plus élevé, à savoir les médecins vétérinaires, les ingénieurs agronomes, les travailleurs agricoles, les ouvriers d'abattoirs et de boucherie ainsi que le personnel de laboratoire. Les infections causées par *B. abortus* et *B. suis* sont souvent des maladies professionnelles, tandis que *B. melitensis* affecte la population en général (Acha & Szyfres, 2003).

4.- Réponse immunitaire

Brucella spp. entraîne le déclenchement d'une réponse cellulaire (activée par les protéines intra-cytoplasmiques) et humorale (activée par le LPS). L'ampleur et la durée de la réponse dépendent de plusieurs facteurs, parmi lesquels: la virulence de l'agent causal, la dose infectieuse, et les facteurs propres à l'hôte tels que l'âge, le sexe, l'état de grossesse ou le degré d'exposition (Nicoletti, 2001).

4.1.- Pathogénie

Brucella spp. est un pathogène intracellulaire facultatif. L'infection de l'hôte par *Brucella* spp. se déroule en deux étapes au minimum. L'infection initiale voit le nombre de germes augmenter, puis l'étape latente se caractérise par leur survie intracellulaire (Halling & Boyle, 2002).

Après avoir pénétré l'organisme au niveau d'une des voies d'entrée possibles, les bactéries sont phagocytées et véhiculées par voie lymphatique jusqu'aux ganglions régionaux (le plus souvent, rétro-mammaires et sous-maxillaires). Elles sont ensuite distribuées vers les différents organes suite à une bactériémie (Mellado, 1996). Ces bactéries sont phagocytées par les macrophages, mais une fois à l'intérieur des cellules, elles restent pendant plusieurs heures dans des endosomes formés lors de la phase G1 du cycle cellulaire (en fonction du type de cellule-hôte); il s'agit du premier stade de l'infection (De Bolle et al. 2015).

Cette espèce de bactéries dispose de plusieurs mécanismes de défense pour lutter contre les réponses bactéricides de l'hôte. Les espèces avec lipopolysaccharide lisse (LPS-S) sont plus résistantes à la réponse immunitaire, ce qui influence leur survie intracellulaire. Les

mécanismes d'évasion consistent en la production d'adénine et de guanine monophosphate, qui vont inhiber la fusion phagosome - lysosome, la production de Cu-Zn superoxyde-dismutase, utilisée lors de la première phase de l'infection intracellulaire et l'activation du système myéloperoxydase (de Bagues et al., 2005).

Chez les animaux non gestants, les germes se localisent dans les ganglions rétro-mammaires, et pendant la gestation, les *Brucella* envahissent l'utérus, où elles se multiplient à la faveur de la présence en grandes quantités d'érythritol, un hydrate de carbone présent dans le placenta des vaches (De Bolle et al., 2015).

4.2.- Réponse immunitaire de type humoral

4.2.1.- Généralités

Le contrôle de l'infection est assuré par les cellules T spécifiques, qui, grâce à la sécrétion de lymphokines, activent les mécanismes bactéricides des macrophages. En même temps que l'immunité cellulaire, une hypersensibilité retardée dirigée contre des antigènes (Ag) protéiques de *Brucella* spp est déclenchée. La réponse humorale est caractérisée par une augmentation initiale d'immunoglobulines (Ig) de type M (IgM), suivie d'une augmentation des titres en immunoglobulines G (IgG). Cette augmentation se produit dans les 7 à 14 jours suivant l'infection. Dès cet instant, une augmentation des deux types d'Ig peut être observée (MacMillan, 1990 cité par Bercovich, 2000). Chez les bovins, l'infection chronique est caractérisée par une synthèse prolongée d'IgG et des concentrations faibles en IgM (Alton et al., 1988; Bowden, 1996). Les concentrations en anticorps (Ac) de type IgG2 varient d'un bovin à l'autre, alors que celles en IgG1 restent généralement faibles, suite au passage des Ig sériques dans le colostrum. Les IgG1, IgM et IgA se retrouvent dans le lait des animaux infectés (Bowden, 1996). Les Ac sont principalement dirigés contre la chaîne du LPS de *Brucella abortus*, qui joue ainsi le rôle d'Ag. Les Ac induisent la lyse bactérienne par la voie classique d'activation du complément, ainsi que par phagocytose. Une réaction légèrement retardée est également développée contre les protéines de la membrane externe. Chez les bovins pubères, les Ac sont détectables dès 30 jours et jusqu'à 3-6 mois après l'infection, parfois même durant toute la vie de l'animal.

4.2.2.- Réponse immunitaire humorale après vaccination

Après l'administration d'un vaccin chez un animal, la séroconversion est observée 1 à 2 semaines après la vaccination, principalement du type IgM pendant environ 2 semaines. En général, les anticorps après la vaccination, diminuent à des niveaux indétectables après une période de 3 à 8 mois après la vaccination chez les veaux femelles pré-pubères (Olizki 1970, cité par Bercovich, 2000; Bowden, 1996). Du fait que *Brucella* spp. est un pathogène intracellulaire facultatif, il ne convient pas de se fier uniquement sur les niveaux de circulation des anticorps comme seul indicateur de l'immunité d'un animal. Les animaux vaccinés ou infectés par une souche virulente développent également une réaction d'hypersensibilité plus lente si un extrait de *Brucella* (protéines intra-cytoplasmiques) est administré (Saegerman et al., 1999).

4.3.- Réponse immunitaire de type cellulaire

4.3.1.- Généralités

La réponse immunitaire de type cellulaire est dirigée exclusivement contre des protéines bactériennes.

Elle se déroule en quatre étapes : 1) les macrophages infectés produisent des cytokines; 2) les lymphocytes précurseurs se différencient en lymphocytes de type 1; 3) ces lymphocytes de type 1 se différencient en lymphocytes T «*helpers*» CD4+ et cytotoxiques CD8+ et 4) l'interféron gamma sécrété par ces deux types de lymphocytes induit la lyse bactérienne.

Le délai d'installation de l'hypersensibilité retardée spécifique est identique à celui nécessaire au déclenchement de la réponse humorale.

5.- Tableau clinique

5.1.- Chez l'homme

Parmi les six principaux biovars, quatre sont fréquemment associés à des manifestations cliniques chez l'homme : *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* et *B. canis*. Ces manifestations cliniques incluent: fièvre, maux de tête, arthralgie, myalgie, douleur dorsale, toux, malaise, anorexie, fatigue et perte de poids. Chez quelques patients, la brucellose peut conduire à des complications de type ostéo-articulaires, voire des désordres gastro-intestinaux, cardiovasculaires, neurologiques, génito-urinaires, pulmonaires ou cutanés. Ces signes

cliniques seront plus sévères et fréquents chez des patients infectés par *B. melitensis*, en raison de sa plus grande pathogénicité.

La majorité des cas de brucellose chronique sont consécutifs à un traitement inadapté, soit à cause de l'utilisation d'antibiotiques inadéquats, soit à cause d'un dosage insuffisant. La forme clinique de la brucellose chronique est caractérisée par des infections localisées; les principaux signes sont: fatigue persistante, malaise et dépression, sans évidence clinique, microbiologique ou sérologique d'une infection active.

5.2.- Chez les animaux

Certains facteurs peuvent influencer le tableau clinique, parmi lesquels: l'état immunitaire de l'animal, l'âge, l'existence d'une gestation ainsi que la dose infectante (Blood et al., 1987).

Chez les bovins, la maladie passe souvent inaperçue (Ragan, 2002), le seul signe clinique étant l'avortement au cours de la première gestation, généralement pendant le dernier trimestre (Crawford, Huber, & Adams, 1990; England, Kelly, Jones, MacMillan, & Wooldridge, 2004). Ont également été rapportés: naissance des veaux faibles, rétention placentaire, métrite, orchite (uni - ou bilatérale), synovite (surtout au niveau des membres postérieurs), diminution de la fertilité et de la production laitière.

5.2.1.- L'avortement

L'affinité de *Brucella* spp. pour le placenta a été attribuée à la production en grande quantité d'erythritol, un hydrate de carbone produit par le placenta de la vache, mais que l'on ne retrouve pas chez l'homme (Carter, 1985). Il est notamment capable de stimuler la croissance de ces germes (Mellado, 1996).

Le coût engendré par des avortements à *Brucella* spp. fluctuerait entre 1.000 et 2.000 USD par animal (Luna-Martínez et Mejía-Terán, 2002). Ceci peut représenter un poste important de pertes économiques à l'échelle d'une ferme (Samartino et Enright, 1993).

6.- Diagnostic

6.1.- Diagnostic chez les animaux

6.1.1.- Diagnostic bactériologique

Bien que l'analyse bactériologique reste la seule méthode diagnostique la plus fiable, son coût élevé, sa mise au point difficile et le risque important lié aux manipulations pour l'opérateur, ne permettent pas son utilisation en routine. Son usage est actuellement restreint à des laboratoires de niveau de biosécurité 3 (OIE, 2016a).

Il est important de noter que les résultats de l'examen bactériologique peuvent s'avérer être des faux négatifs, surtout si les échantillons sont contaminés par d'autres bactéries, ou s'ils ont été mal conservés (Alton et al., 1988).

Des *Brucella* peuvent être isolées à partir du placenta ainsi que du contenu pulmonaire et stomacal des fœtus avortés. Les vaches cessent généralement d'excréter des germes au niveau du tractus utérin après son involution, mais ceux-ci sont néanmoins stockés dans la mamelle. C'est la raison pour laquelle le micro-organisme peut être isolé dans le lait et les sécrétions mammaires d'une vache en production laitière. Le colostrum est également un prélèvement d'intérêt.

6.1.1.1.- Isolement de *Brucella*

L'isolement des bactéries peut être réalisé sur plusieurs milieux de culture ou sur des milieux sélectifs simples, tels que le milieu Farrell (Farrell, 1974) ou le milieu de Thayer-Martin modifié.

Brucella peut être isolée à partir des échantillons suivants: ganglions lymphatiques rétro-pharyngiens, sous-maxillaires et supra-mammaires, ainsi que contenu stomacal du fœtus avorté, tissus fœtaux, placenta ou sécrétions vaginales et mammaires.

Les échantillons sont mis en culture après inoculation d'un milieu solide Farrell, et incubés à une température de 37° C dans une atmosphère dont la concentration en CO₂ varie entre 5 et 10%.

6.1.1.2.- Typage de *Brucella*

Les colonies suspectes sont identifiées par observation macroscopique et microscopique, et par analyse biochimique (tests à l'oxydase, la catalase et l'uréase). Les espèces et biotypes sont déterminés grâce à leur dépendance en CO₂, leur croissance en milieu coloré (fuchsine, thionine et safranine) et leur agglutination avec des sérums mono-spécifiques A et M.

6.1.2.- Diagnostic moléculaire

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique basée sur la détection moléculaire des séquences spécifiques de *Brucella* spp., telles que 16S - 23S, ou du gène *bcbp31* codant pour la protéine de 31-kDa présent chez cette espèce. Cette méthode est utilisée pour détecter et identifier l'ADN dans les cultures et échantillons cliniques. Cependant, la technique PCR permettant de diagnostiquer la brucellose présente une faible sensibilité par rapport aux méthodes de culture, alors que sa spécificité est proche des 100% (Godfroid et al., 2010).

6.1.3.- Méthode diagnostique reposant sur la détection de la réponse humorale

6.1.3.1.- Aspects généraux

Quand Evans a pu mettre en évidence la relation antigénique entre *B. abortus* et *B. melitensis*, en 1918, l'utilisation de *B. abortus* a été généralisée dans le cadre des tests sérologiques. En effet, *B. abortus* est plus sensible aux agglutinines, et moins exposée aux dissociations pouvant altérer leur réactivité (Ruiz Castañeda, 1954).

Les tests sérologiques utilisés en routine présentent plusieurs avantages, tels leur mise au point relativement aisée ou leur coût acceptable. Néanmoins, des inconvénients sont rapportés, liés principalement à la grande variabilité des résultats qui dépend: (1) du caractère endémique ou non de la zone dont proviennent les échantillons, (2) du seuil de positivité (*cut-off*) au-delà duquel un résultat est considéré comme positif, et (3), de la standardisation correcte des réactifs et procédures.

6.1.3.2.- Réactions croisées

Les *Brucella* sont des pathogènes qui, de par leur caractère intracellulaire facultatif, sont capables de déclencher une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Les tests sérologiques classiques, basés sur la détection d'Ac dirigés contre le LPS lisse (Garin-Bastuji, 1993), présentent des réactions faussement positives avec des bactéries Gram négatives, parce que celles-ci partagent un épitope du LPS (FAO et OMS, 1986; Pouillot et al., 1997).

Plusieurs recherches ont mis en évidence des problèmes dans l'éradication de la maladie suite aux réactions croisées avec, par exemple, *Yersinia enterocolitica* O:9 et *Escherichia coli* O:157 (M.J. Corbel, 1985; Saegerman et al., 1999), mais aussi aux infections croisées de bovins par d'autres espèces de *Brucella*, comme par exemple, *B. melitensis* (Halling & Boyle, 2002). Un système permettant de discriminer les vrais des faux positifs consiste à évaluer la réponse cellulaire sur base des protéines intra-cytoplasmiques de la bactérie (Pouillot et al., 1997; Saegerman et al., 1999).

6.1.3.3.- Tests de diagnostic sur sérum

6.1.3.3.1.- Test d'agglutination rapide sur plaque "Rose de Bengale" (RB)

Le test au rose Bengale (RB) est une réaction d'agglutination sur lame, qui met en contact, d'une part un Ag constitué d'une suspension de *B. abortus* (souche 99) inactivées par la chaleur et colorées au rose Bengale, dans un tampon (pH $3,5 \pm 0,05$), et d'autre part le sérum à analyser (OIE, 2016a). Pietz et Schilf ont développé cet Ag acidifié, tamponné et stable en 1967 (Mancera, 2001). Il s'agit d'un test qualitatif. Simple de réalisation, et d'un coût peu élevé, il est très utile comme test de dépistage (Doutre et al., 1977).

Ce test est capable de détecter des Ac de type IgM et IgG, bien que le pH acide permette une très bonne détection des IgG en réduisant les unions non spécifiques avec d'autres Ig (Nielsen, 2002). La concentration en bactéries dans la suspension antigénique est de 8% (v/v) (FAO et OMS, 1986).

Il existe des faux négatifs, lorsque l'infection est très récente, mais aussi des faux positifs, quand il y a présence d'Ac après vaccination, lors de réactions croisées, et d'erreurs dans l'exécution du test, en déclarant positif, par exemple, un échantillon qui contient uniquement de la matière grasse (Blood et al., 1987).

Ce test est plus tardif que le test de séro-agglutination de Wright (SAT), mais il restera positif plus longtemps car il détecte les IgG (Godfroid et Boelaert, 1995)

6.1.3.3.2.- Test d'agglutination sur plaque - BPAT

Le test BPAT (*Buffered Plate Antigen Test*) est similaire au test d'agglutination rapide sur plaque RB. Il utilise une suspension concentrée de *B. abortus*, souche lisse 1119-3, colorée au vert brillant et au cristal violet (OIE, 2016a). La concentration totale de cellules dans l'Ag doit être de 11% (v/v). C'est un test rapide et relativement simple (FAO et OMS, 1986). Le mélange sérum - Ag doit respecter des proportions 8:3.

6.1.3.3.3.- Test de séro-agglutination lente en tube ou test de Wright (SAT)

Ce test, également basé sur l'agglutination d'une suspension de *Brucella*, met en contact, d'une part, une quantité constante d'Ag, et d'autre part, des dilutions croissantes de sérum. Il met en évidence les IgM, et dans une moindre mesure, les IgG. Il peut être utilisé pour confirmer une infection aiguë. Les titres en Ac sériques sont fournis de manière quantitative, et exprimés en unités internationales (UI) d'agglutination (Godfroid & Boelaert, 1995).

Parmi les inconvénients liés à ce test, il faut mentionner les réactions croisées avec d'autres bactéries, ainsi qu'une interférence suite à la vaccination. Lors d'infection chronique, des résultats faussement négatifs peuvent être observés (Blood et al., 1987). Etant donné l'excès d'Ac bloquants qui empêche l'union des Ac agglutinants avec l'Ag, le phénomène de pro-zone peut être observé (résultats négatifs lors des premières dilutions, et positifs pour les suivantes).

Ce test présente des avantages, tels que: (1) être le plus précoce à détecter les Ac agglutinants et (2), permettre, grâce à des dilutions progressives du sérum, d'apprécier le

titre complet d'agglutination de chaque échantillon. Différents auteurs mentionnent que les animaux sont considérés comme positifs lorsqu'il y a agglutination complète à une dilution 1/100 pour des animaux non vaccinés et 1/200 pour des animaux vaccinés (entre 3 et 9 mois d'âge); d'autres précisent, par contre, que les animaux sont considérés comme positifs, quand les niveaux d'Ac sont égaux ou supérieurs à 30 UI (EC Directive 64/432/EC, cité par Bercovich, 2000).

Lors de la réalisation du test SAT, l'ajout d'EDTA réduit le risque d'union non spécifique (Garin et al., 1985). D'autre part, le test SAT-2ME est un test SAT modifié, dans lequel une solution de 2-mercaptoetanol (2ME) détruit les ponts disulfures des IgM (FAO et OMS, 1986). L'efficacité de ce test pour détecter les IgG a été remise en question car le 2ME affecterait aussi les IgG. Alternativement, le dithiothréitol (DTT) est également utilisé.

6.1.3.3.4.- Test de fixation de complément (CFT)

Le test de fixation du complément (CFT), basé sur la détection d'IgG, est un test important pour le diagnostic de la brucellose (Hill, 1963, cité par Bercovich, 2000). Malgré une lourde mise en œuvre, à cause, notamment, de la nécessité de titrer les réactifs en continu et d'utiliser des globules rouges frais chaque semaine; elle est relativement économique. Il s'agit d'un des tests diagnostiques de routine dont la sensibilité analytique est la plus élevée (Cobos et al., 2001). Il utilise un Ag préparé à partir de la souche lisse de *B. abortus* 99 ou de la souche 1119-3 (OIE, 2016a).

Ce test est plus tardif que le SAT conventionnel et les titres obtenus confirment plutôt une infection chronique (Blood et al., 1987). Comme il engendre peu de réactions non spécifiques, il est utile pour différencier les animaux vaccinés de ceux infectés naturellement; c'est d'ailleurs la raison pour laquelle il est utilisé pour écarter les résultats faussement positifs obtenus avec le test RB (Godfroid et al., 2010).

6.1.3.3.5.- Test «Enzyme Linked Immunosorbent Assay» indirect (iELISA)

Les tests ELISA qui, depuis leurs débuts, ont utilisé divers types d'Ag, comme des bactéries complètes ou du LPS purifié ainsi que divers conjugués, présentent une sensibilité et une spécificité très élevées.

Ces techniques combinent la spécificité de l'union Ag - Ac avec la sensibilité d'un système enzymatique. Les Ag (généralement du LPS) sont passivement immobilisés (adsorbés) dans une phase solide (microplaque); le signal coloré est alors directement proportionnel à la concentration de l'échantillon en Ac (Bautista et Ochoa, 2001).

Ces méthodes peuvent être à la base d'une nouvelle génération de techniques simples, qui pourraient utiliser du matériel et des réactifs peu coûteux (FAO et OMS, 1986).

D'autre part, seuls les tests ELISA utilisant le LPS lisse de *B. abortus* sont recommandés. L'ELISA indirect (iELISA), spécifique pour la détection d'IgG, fournit des résultats presque équivalents à ceux obtenus avec la CFT. Ce test peut être utilisé pour analyser des échantillons de sérum ou du lait (OIE, 2016a).

Comme tests conventionnels utilisés pour le diagnostic de la brucellose bovine, l'iELISA ne permet pas de distinguer les Ac produits après administration de la souche vaccinale B-19 et ceux produits suite à une infection naturelle. L'iELISA présente une sensibilité supérieure à celle de la CFT, mais sa spécificité est par contre inférieure.

6.1.3.3.6.- Test «Enzyme Linked Immunosorbent Assay» compétitif (cELISA)

Le test «*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*» compétitif (cELISA) consiste en la fixation de l'Ag (LPS) de *Brucella* sur un milieu solide (plaque de polystyrène), suivie par une incubation du sérum avec un Ac monoclonal de souris dirigé contre la chaîne O du LPS. Après incubation et lavage, le conjugué (peroxydase) puis le substrat-chromogène seront déposés sur la plaque.

En l'absence d'Ac dirigés contre *Brucella* dans le sérum, l'Ac monoclonal se lie à l'Ag, entraînant ainsi un changement de couleur. Si par contre le sérum contient des Ac contre *Brucella*, il y aura compétition avec les Ac monoclonaux pour les sites de liaison à l'épitope, ce qui inhibera la liaison et n'engendrera pas ou peu d'émission colorée.

Le cELISA est devenu un test diagnostique fiable pour la brucellose car l'utilisation d'Ac monoclonaux empêche les réactions faussement positives; sa sensibilité et sa spécificité sont élevées. L'avantage du cELISA réside dans le fait qu'il peut être utilisé sur plusieurs espèces contrairement à l'iELISA où cela va dépendre du conjugué utilisé.

6.1.3.4.- Tests sur le lait

6.1.3.4.1.- Test de l'anneau coloré sur le lait (MRT)

Le test de l'anneau coloré sur le lait ou *Milk Ring Test* (MRT) détecte la présence d'IgA et d'IgM, lesquelles induisent la formation d'un anneau coloré (généralement de couleur bleue) après incubation de l'échantillon de lait avec l'Ag coloré au moyen d'hématoxyline (Collin, 1976). Les globules gras présents dans le lait jouent un rôle important dans ce test, car s'ils sont présents en quantité insuffisante, les résultats peuvent être faussement négatifs (Sutra, Caffin, & Dubray, 1986). Si les échantillons à analyser contiennent uniquement de la crème ou ont été mal conservés, la lecture est difficile et le pourcentage de faux négatifs augmente significativement.

Le MRT est une technique facile à réaliser et peu coûteuse. Elle permet de détecter la présence de la brucellose dans une zone géographique particulière (Ragan, 2002). Les échantillons de lait peuvent être récoltés dans chaque exploitation de chaque vache individuellement ou, collectivement à partir d'une cruche à lait. La fiabilité des résultats est intimement liée à la quantité d'échantillon car le facteur de dilution (échantillon individuel positif dilué dans le tank à lait) influence le résultat de manière importante (OIE, 2016a); il est pour cela recommandé de prélever une certaine quantité de lait (8 ml) (Bercovich & Legendijk, 1978).

6.1.3.4.2.- Test iELISA sur le lait (iELISA-L)

Le test iELISA sur le lait (iELISA-L) permet de détecter les Ac de type IgG dans ce type d'échantillon; il s'avère être plus sensible que le MRT (Bercovich et Taaijke, 1990). Toutefois, ce test diagnostique est aussi influencé par la concentration en Ac dissous dans l'échantillon, et par l'état de conservation de ce dernier. Des résultats faussement négatifs sont générés lorsque les échantillons analysés contiennent une grande quantité de colostrum (Sutherland et al., 1986).

6.1.4.- Méthodes diagnostiques reposant sur la réponse immunitaire de type cellulaire

6.1.4.1.- Test cutané «Skin test» (ST)

Dans le cas de la brucellose, le contact d'un animal avec l'agent infectieux, ou avec le vaccin, engendre le déclenchement d'une réponse immunitaire de type cellulaire, comme mentionné précédemment. Elle se manifeste sous la forme d'une sensibilisation pouvant être révélée par l'injection d'un allergène préparé au départ de ces mêmes germes (Chukwu, 1985; FAO et OMS, 1986).

Le test cutané ou «*Skin Test*» (ST) consiste en l'injection intradermique d'un extrait protéique cytoplasmique de *B. melitensis* B-115. Cet extrait est le plus approprié car il contient une quantité minimale de LPS, et évite ainsi la production d'Ac par l'hôte (Bhonghibhat et al., 1970). Ce type de protéines est partagé par d'autres espèces de *Brucella* en phases rugueuse et lisse.

Puisque le ST met en évidence la réponse immunitaire de type cellulaire, indépendante de la concentration en Ac circulants, ce test peut être très utile en appui aux méthodes sérologiques. Différents auteurs mentionnent que l'utilisation de ce type d'outil diagnostique permet d'identifier un plus grand nombre d'animaux positifs que les tests sérologiques (Fensterbank et Pardon, 1977; Saegerman et al., 1999).

Sa haute spécificité (OIE, 2016a) permet de détecter des animaux séronégatifs (Bercovich et al., 1993), mais aussi de confirmer le diagnostic chez des animaux séropositifs, ou chez des animaux présentant des résultats difficilement interprétables.

L'immunisation d'animaux avec des vaccins tels le B-19 génère chez ces derniers une réponse faussement positive de longue durée au ST; la réponse inflammatoire est plus importante chez les animaux vaccinés. De ce fait, ce test est recommandé pour le diagnostic de la brucellose chez les animaux non vaccinés (Pouillot et al., 1997; Saegerman et al., 1999).

Dans le tableau 1.3, est présenté de façon résumée les avantages et les inconvénients de chacun des tests utilisés pour le diagnostic de la brucellose chez les bovins, ainsi que les caractéristiques (sensibilité et spécificité) de chacun.

6.2.- Diagnostic chez l'homme

6.2.1.- Considérations générales

La suspicion clinique de la maladie doit être confirmée par la mise en évidence d'Ac dans le sang du patient, et/ou par l'isolement de *Brucella* spp. Comme le tableau clinique de la maladie est non spécifique, il ne permet pas d'établir un diagnostic sur sa base uniquement (Mellado, 1996). Il est dès lors vital que le médecin récolte des informations sur le patient, grâce à une anamnèse détaillée: profession, contacts potentiels avec des animaux, voyages en zone endémique, et ingestion d'aliments potentiellement contaminés, en particulier ceux à base de lait et de produits laitiers non pasteurisés.

6.2.2.- Diagnostic direct ou bactériologique

L'isolement de l'agent causal constitue le moyen le plus sûr pour confirmer le diagnostic, car il permet de déterminer l'espèce et le biotype de la bactérie (Mellado, 1996).

6.2.3.- Diagnostic indirect ou sérologique

Les méthodes de diagnostic indirect mettent en évidence les titres d'Ac présents dans le sang du patient. Différents méthodes peuvent être employées à cette fin, dont les méthodes de séro-agglutination telles que le RB (souvent utilisée car facile à réaliser) et séro-agglutination de Wright (SAT) (spécificité élevée et facile à réaliser). Lors d'infection chronique, le taux d'Ac agglutinants est faible, ce qui peut générer des résultats négatifs. Il convient alors de recourir au test de Coombs pour démontrer la présence d'Ac non agglutinants (Mellado, 1996).

7.- Vaccination

7.1.- Souche 19 ou B-19

Le vaccin B-19 est un vaccin immunogène vivant atténué élaboré par Buck en 1930. Bien qu'elle soit d'une grande aide dans le contrôle de cette zoonose, la vaccination à elle seule ne permet pas d'éradiquer la maladie. Elle doit être associée à l'identification et à l'élimination des animaux infectés (Roux, 1979).

Bien que B-19 soit le vaccin le plus utilisé dans les programmes de contrôle et d'éradication de la brucellose dans de nombreux pays à travers le monde, il présente des inconvénients devant être pris en considération : risque de provoquer la maladie chez l'homme, risque d'avortement chez l'animal, mais aussi persistance momentanée d'Ac agglutinants qui interfèrent avec le diagnostic (Nicoletti, 1980).

Les Ac produits suite à l'administration de B-19 génèrent des réactions croisées lors de la réalisation de tests diagnostiques, spécialement avec ceux basés sur l'agglutination rapide sur plaque (RB). En effet, la vaccination engendre la production d'Ac dirigés contre le LPS (Schuring et al., 1991, cités par Vargas, 2002).

Tableau 1.3 Avantages, inconvénients et paramètres de sensibilité et de spécificité des tests de diagnostic de la brucellose bovine.

Paramètres	Tests de diagnostic									Bactériologie
	RB	BPAT	SAT	SAT-2ME	CFT	iELISA	ST	MRT	iELISA-L	
• Equipement de laboratoire										
- Équipement de base	X	X					X	X		
- Équipement moyen			X	X	X					
- Équipement avancé						X			X	X
• Procédure										
- Facile et rapide	X	X						X		
- Difficulté moyenne			X	X			X			X
- Grande difficulté					X	X			X	
• Interprétation de résultats										
- Subjective	X	X	X	X	X		X	X		X
- Objective						X			X	
• Coût										
- Peu élevé	X	X						X		
- Moyen			X	X						
- Élevé					X	X	X		X	X
• Sensibilité	(0.21 – 0.98) ^a	(0.75 – 0.99) ^b	(0.29 – 1) ^c	(0.56 – 1) ^d	(0.23 – 0.97) ^e	(0.93 – 1) ^f	(0.95) ^g	(0.56) ^h	(0.98) ⁱ	
- Présence de RFN										
- étape précoce de l'infection	X	X			X	X				
- erreurs de lecture							X		X	
- existence de «pro-zone»			X	X	X					
- étapes chroniques de l'infection			X							
- âge des animaux anergiques							X			
- facteur de dilution de l'échantillon								X		
• Spécificité	(0.69 - 1) ^a	(0.91 - 1) ^b	(0.99 – 1) ^c	(0.99 – 1) ^d	(0.31 – 1) ^e	(0.91 – 1) ^f	(0.78 - 0.99) ^g	(0.99) ^h	(0.99) ⁱ	(1)
- Présence de RFP										
- par Ac post-vaccination	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
- par des réactions croisées	X	X	X	X	X	X		X	X	
- erreurs de lecture	par grasse									
• Risque de contamination										
- Moyen	X	X	X	X	X	X	X			
- Élevé								X	X	X

Légende : voir page suivante.

Légende:

^a (Nielsen, 2002; Samartino, Gregoret, Gall, & Nielsen, 1999; Van Aert et al., 1984)

^b (Nielsen, 2002; Samartino et al., 1999; Stemshorn et al., 1985)

^c (Lord, Rolo, & Cherwonogrodsky, 1989; Nielsen, 2002; Van Aert et al., 1984)

^d (Lord et al., 1989; Nielsen, 2002; Saravi, Wright, Gregoret, & Gall, 1995; Stemshorn et al., 1985)

^e (Huber & Nicoletti, 1986; Nielsen, 2002; Saravi et al., 1995; Van Aert et al., 1984)

^f (Dohoo et al., 1986; Nielsen, 2002; Rojas & Alonso, 1994)

^g (Pouillot et al., 1997; Saegerman et al., 1999)

^{h-i} (J Godfroid & Boelaert, 1995)

(**RB**) Rose Bengale, (**BPAT**) "Buffered Plate Agglutination Test", (**SAT**) "Serum Agglutination Test", (**SAT - 2ME**) "Serum Agglutination Test" en présence de 2-mercaptoetanol, (**CFT**) "Complement Fixation Test", (**iELISA**) "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" indirect, (**ST**) "Skin test", (**MRT**) «Milk Ring Test», (**iELISA-L**) "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" indirect, sur échantillons de lait, (**RFN**) Résultats Faux Négatifs, (**RFP**) Résultats Faux Positifs.

L'âge optimal pour vacciner les femelles se situe entre 4 et 8 mois (FAO et OMS, 1986; OIE, 2016a) car les Ac produits disparaîtront dans les 4 à 6 mois post-vaccination (Carter, 1985). L'utilisation du vaccin B-19 est interdite chez les mâles car elle induit de la stérilité (Blood et al., 1987). La présence d'Ac maternels justifie la vaccination des animaux au minimum 4 mois après la naissance. Normalement, la dose administrée par voie sous-cutanée est de 5 à 8 x 10¹⁰ organismes viables. Alternativement, des doses de 5 à 10 x 10⁹ peuvent être administrées par voie conjonctivale à des bovins de tout âge, ce qui les protégera sans générer une production d'Ac agglutinants détectés par les tests de diagnostic sérologiques (OIE, 2016a); pour ce faire, il faut maximiser le niveau de (bio)sécurité afin de prévenir des contaminations des animaux.

L'immunité conférée par le vaccin B-19 est solide et peut perdurer presque toute la vie reproductrice de l'animal, dans un contexte où les vaches ne sont pas conservées dans le troupeau où la moyenne d'âge des animaux n'est pas trop élevée, c'est-à-dire environ 6 ans dans le contexte européen, contre 15 ans en Equateur (André et al., 2013). Berman et collaborateurs (1952 cités par Nelson, 1975) ont déterminé qu'il n'existait aucune stimulation de l'immunité des animaux s'ils étaient revaccinés avec la souche B-19.

Comme le vaccin est vivant, il doit être administré selon une procédure déterminée, c'est-à-dire en suivant strictement les recommandations du fabricant. Les vaccins lyophilisés sont plus stables que les vaccins sous forme liquide (Blood et al., 1987). Grâce à l'utilisation de milieux de culture spéciaux (voir tableau N° 1.4), la différenciation entre une souche vaccinale de *Brucella abortus* (B-19) et une souche

«sauvage» de *Brucella abortus* biotype 1 est possible. Des infections vaccinales ont été rapportées chez des vaches laitières, avec excrétion de bactéries de la souche vaccinale dans le lait (Nicoletti, 1981). Des infections chez le taureau, avec excrétions dans le sperme, ont également été mentionnées (Lambert et al., 1964).

7.2.- Vaccin 45/20

McEwen et Priestly, respectivement en 1938 et en 1940, ont développé un vaccin inactivé 45/20, à partir de tissu cellulaire de la souche rugueuse (45/20) de *B. abortus*. Comme les souches rugueuses ne possèdent pas les Ag des LPS lisses (lesquels sont responsables des réactions sérologiques post-vaccinales), les animaux vaccinés avec ce type de molécule ne réagiraient pas aux tests sérologiques de routine (FAO et OMS, 1986). Malheureusement, son efficacité est inférieure à celle du B-19 (Roux, 1979). Toutefois, la protection conférée par le vaccin 45/20, administré en deux doses à 6 mois et 9 mois d'âge, était comparable à celle prodiguée par le vaccin B-19.

Tableau 1.4 Caractéristiques permettant de distinguer une souche vaccinale *B. abortus* (souche 19) d'une souche sauvage *B. abortus* typique (biovar 1)
(Alton et al., 1988)

Souche	Exigence en CO ₂	Croissance dans des milieux contenant:		
		Thionine (2 µg/ml)	Érythritol (1 mg/ml)	Pénicilline (5 UI/ml)
Biovar 1	(+) ^a	(+) ^a	(+)	(+) ^a
Souche B-19	(-)	(-)	(-) ^b	(-)

Légende:

^a Habituellement positif dans les isolats primaires.

^b La taux de mutation à la tolérance à l'érythritol est très élevé. Toutefois, quelques colonies peuvent se développer en présence d'érythritol.

7.3.- Vaccin RB-51

Le vaccin RB-51 a été développé par Schuring et collaborateurs, en 1980 (Halling et Boyle, 2002); il s'agit d'une souche mutante rugueuse de la souche lisse *B. abortus* 2308 (Schurig et al., 1991) développée après culture sur des milieux contenant des antibiotiques (rifampicine et pénicilline) (Blasco, 2001).

Actuellement, et contrairement au B-19, le vaccin RB-51 ne présente pas l'inconvénient de générer la production d'Ac agglutinants qui interfèrent dans le diagnostic; il peut donc être utilisé même chez des animaux adultes (Díaz et al., 2001; Ragan, 2002; Samartino et al. 2000).

Le vaccin RB-51 a officiellement été approuvé dans des pays comme l'Argentine, le Chili, la Colombie, le Costa Rica, le Mexique, le Paraguay et le Vénézuéla. Chaque pays utilise des méthodes diverses. Par exemple, aux Etats-Unis, la dose est constituée de 1 à $3,4 \times 10^{10}$ bactéries et est administrée entre 4 et 12 mois d'âge (Dorneles et al., 2015) alors que la vaccination des animaux de plus de 12 mois s'effectue uniquement sous l'autorisation de fonctionnaires de l'État avec une dose de 1×10^9 bactéries viables. Dans d'autres pays, la vaccination des animaux est recommandée entre 4 à 12 mois d'âge, en combinaison avec un rappel ultérieur au moyen d'une dose de 1 à $3,4 \times 10^{10}$, afin d'augmenter l'immunité (OIE, 2016a).

Le vaccin RB-51, introduit en Amérique Centrale en 1998, est actuellement le seul vaccin disponible dans la majorité des pays de cette région, bien qu'il soit encore difficile d'évaluer son efficacité (Moreno, 2002).

8.- Principes épidémiologiques

8.1.- Prévalence (P)

La prévalence (P) est une mesure permettant de quantifier, au sein d'une population, la proportion d'individus malades à un moment précis ou sur un certain laps de temps. Son estimation est réalisée par le calcul suivant:

$$P = \frac{\text{Nombre de cas de la maladie dans un contexte précis}}{\text{Population à un moment donné}}$$

Le contexte précis prend en compte les notions de temps (moment précis vs. période de temps) et d'espace (zone géographique).

8.2.- Incidence (I)

L'incidence (I) est définie comme étant le nombre de nouveaux cas d'une maladie qui sont détectés dans une population donnée au cours d'une certaine période. Elle est calculée comme suit:

$$I = \frac{\text{Nombre de nouveaux cas d'une maladie au cours d'une période donnée}}{\text{Population à risque}}$$

8.3.- Facteurs de risque

Un facteur de risque peut être défini comme une caractéristique détectable ou une circonstance particulière augmentant la probabilité qu'une population soit affectée par un/des événement(s) négatif(s). Le facteur de risque est une mesure statistique qui permet d'estimer, de manière prospective, la survenue d'un événement généralement indésirable dans une population. Les facteurs de risque peuvent être de nature biologique, environnementale, socio-culturelle et économique, mais peuvent également être associés.

Afin de démontrer un lien de causalité, il peut être intéressant de recourir à l'analyse d'informations collectées par le biais d'enquêtes explicatives, en essayant de regrouper les individus analysés en deux catégories: exposés vs. non exposés (études de cohorte, prospectives) ou malades vs. non malades (études cas-témoins, rétro-spectives).

Dans les études de cohorte, fréquemment utilisées étant donné le caractère aléatoire de la sélection des individus, la mesure épidémiologique permettant de détecter et de mesurer la présence/l'importance d'un facteur de risque est appelée «*Risque Relatif*», également connue sous le terme de *Ratio du Risque (RR)*. Le *RR*, qui est le rapport du «risque dans le groupe exposé» (*RE+*) sur le «risque dans le groupe non exposé» (*RE-*), est calculé de la façon suivante, et à l'aide du tableau 1.5.

$$RR = \frac{RE +}{RE -}$$

Tableau 1.5 Répartition des effectifs dans le cadre d'une étude exposés/non exposés
(Toma et al., 2010a)

	Maladie		Total	
	(+)	(-)		
Exposés	A	B	A+B	$RE+ = \frac{A}{A+B}$
Non exposés	C	D	C+D	$RE- = \frac{C}{C+D}$

Légende:

$RE+$ risque dans le groupe «exposés»

$RE-$ risque dans le groupe «non exposés».

Dans une étude cas-témoin, l'identification des facteurs de risque exige une méthodologie plus rigoureuse, notamment en ce qui concerne la sélection des individus; le rapport des cotes ou *Odds Ratio (OR)*, est généralement utilisé comme mesure épidémiologique. L'*OR* est défini comme étant le rapport entre l'Odds des cas (*Ocas*) et l'Odds des témoins (*Otem*). Le calcul est effectué comme suit, et en fonction du tableau 1.6.

Il est bien avéré que pour les maladies ayant une prévalence faible (<10%), les indicateurs épidémiologiques calculés dans des études exposés-non exposés (*RR*) seront similaires à ceux qui auraient été estimés si l'échantillonnage avait été réalisé pour une étude cas-témoins (*OR*).

$$OR = \frac{Ocas}{Otem} \quad OR = \frac{A \times D}{B \times C}$$

Tableau 1.6 Effectifs dans une étude cas-témoins (Toma et al., 2010a)

	Cas (maladie +)	Témoins (maladie -)
Exposés	A	B
Non exposés	C	D
Total	A+C	B+D
Odds d'exposition	$Ocas = \frac{A}{\frac{A+C}{C}}$	$Otem = \frac{B}{\frac{B+D}{D}}$

Légende:

Ocas Odds des cas

Otem Odds des témoins (contrôles)

9.- Les caractéristiques des tests de dépistage

9.1.- Sensibilité (*Se*)

La sensibilité (*Se*) d'un test de diagnostic est la probabilité conditionnelle qu'un animal/patient soit testé positif si l'animal/patient est infecté. Elle correspond à la proportion d'animaux Vrais Positifs (VP) sur l'ensemble des infectés, à savoir VP et Faux Négatifs (FN) (VP+FN), et pourrait être traduite comme étant la capacité à détecter le plus grand nombre d'individus ou de patients infectés. Elle est estimée de la manière suivante:

$$Se = \frac{VP}{VP + FN}$$

9.2.- Spécificité (Sp)

La spécificité (Sp) est la probabilité conditionnelle qu'un animal/patient soit testé négatif si l'animal/patient est indemne de maladie. C'est la capacité d'un test de diagnostic à détecter le plus grand nombre d'individus en bonne santé, ou Vrais Négatifs (VN). Elle peut être calculée comme suit, et à l'aide du tableau 1.7.

$$Sp = \frac{VN}{VN + FP}$$

Tableau 1.7 Définitions des notions de sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur productive négative d'un test (Toma et al., 2010b)

		Situation réelle		
		Infectés	Indemnes	TOTAL
Reponses du test	Positive	VP	FP	$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$
	Negative	FN	VN	$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$
TOTAL		$Se = \frac{VP}{VP + FN}$	$Sp = \frac{VN}{VN + FP}$	

Légende:

Se Sensibilité

Sp Spécificité

VPP Valeur prédictive positive

VPN Valeur prédictive négative.

9.3.- Valeur Prédictive Positive d'un résultat positif (VPP)

Il s'agit de la probabilité qu'un résultat positif à un test de diagnostic corresponde à un animal réellement infecté. Elle se calcule de la façon suivante:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

9.4.- Valeur Prédictive Positive d'un résultat négatif (VPN)

C'est la probabilité qu'un résultat négatif à un test de diagnostic corresponde à un animal/patient vraiment indemne:

$$VPN = \frac{VN}{VN + FP}$$

INTRODUCTION

Partie 2: Le système d'élevage et la situation actuelle de
la brucellose en Equateur

"El sogueo"



Le système de élevage traditionnel appelé "sogueo" consiste en garder les animaux dans les terrains vagues, accotements des routes et autoroutes et dans les lieux publics; limitant son mouvement en tenant l'animal à un piquet par une corde.

Source: Jorge Ron-Román
Cantón Mira, provincia del Carchi – Ecuador.
2008

ARTICLE 1

**Brucellosis in Ecuador: a critical review of the current
situation, prospect and challenges.**

Ron-Román J., Saegerman C., Brandt J., Berkvens D., Benítez-Ortíz W.

Article soumis pour publication

Revista Científica, FMV - Universidad de Zulia

Préambule

Sans aucun doute, la compréhension d'un problème constitue la base de la formulation, non seulement, des solutions correctes mais aussi et surtout viables. En ce sens, et dans le cadre de ce travail visant à mieux comprendre, et de manière correcte, la situation épidémiologique de cette zoonose chez l'homme et ses différents hôtes, une revue complète de la littérature s'avérait nécessaire comme point de départ. Le manque d'information au niveau international ne reflète pas toujours le travail effectué par des chercheurs locaux, qui restent souvent dans l'anonymat le plus total.

Résumé en français

Objectifs: la brucellose est une zoonose négligée. La situation actuelle de la brucellose en Equateur est peu connue, ce qui génère un manque de stratégies de prévention et de contrôle au niveau national. **Méthodes et résultats:** dans le but de rassembler les connaissances préliminaires disponibles à l'heure actuelle, les auteurs ont pris connaissance des publications et rapports officiels nationaux, dont 58 mémoires de thèses. **Conclusions et mise en œuvre des résultats:** sur base de ces données et d'observations préliminaires propres, des conclusions ont été tirées et une série de recommandations prodiguées afin d'améliorer la situation de la brucellose dans le secteur animal et en santé publique dans le pays.

Brucellosis in Ecuador: review of the current situation, prospects and challenges.

Ron-Román J. ^(1-2-3*), Saegerman C. ⁽²⁾, Brandt J. ⁽⁴⁾, Berkvens D. ⁽⁴⁾
& Benítez-Ortíz W. ⁽¹⁻⁵⁾.

- ⁽¹⁾ Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), Universidad Central del Ecuador, P.O.Box 17-03-100, Quito Ecuador.
- ⁽²⁾ Research Unit of Epidemiology and Risk analysis applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULg), Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH) Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Boulevard de Colonster 20, B42, B-4000 Liege, Belgium.
- ⁽³⁾ Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, Ecuador.
- ⁽⁴⁾ Unit of Veterinary Biostatistics and Epidemiology, Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerp, Belgium.
- ⁽⁵⁾ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador.

* **Corresponding author:** Jorge Ron-Román, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Av. General Rimiñahui s/n. Sangolquí, Ecuador. P.O.Box 171-5-31B Tel.: + 593.2.398.9400. *E-mail address:* jwron@espe.edu.ec / jorgeronroman@gmail.com (J. Ron-Román)

Abstract

Objectives: Brucellosis is a neglected zoonosis. The brucellosis situation in Ecuador is characterized by little knowledge about the current situation resulting in a lack of prevention and control strategy at national level. **Methodology and Results:** In an attempt to gather the preliminary available knowledge, the authors reviewed official reports and regional publications at national level, including 58 final year dissertations. **Conclusions and application of findings:** Based on these data and own preliminary observations, conclusions and recommendations are presented to improve the brucellosis situation both in animal and human compartments in this country.

Keywords: brucellosis, human, animal, Ecuador

INTRODUCTION

Brucellosis, a highly contagious disease, caused by *Brucella* spp. has been recognised by international organisations like FAO, WHO and OIE as a zoonosis of major importance with a worldwide distribution (Gil & Samartino, 2001; Halling & Boyle, 2002) and, depending of the *Brucella* species and biovar, with bovines, goats, sheep and pigs as natural reservoirs.

Brucellosis induce important economic losses to the animal production which amount to about 600 million US\$ per annum in Latin America (Acha & Szyfres, 2003). Brucellosis can be transmitted to man, which happens usually through direct contact with infected animals or consumption of non-pasteurised dairy products. Therefore in various countries, numerous control and eradication programmes have been set up with the two-sided approach (in function of the epidemiological situation) of vaccination of susceptible animals and/or eradication of infected animals. The latter action is obviously very dependent, in first instance to the true prevalence of brucellosis, to the available laboratory capacity and also on characteristics of laboratory diagnostic tests, which are severely hampered by the lack of a “Gold Standard” test. This is mainly due to interference by cross-reacting antibodies, raised against other pathogens such as *Yersinia enterocolitica* 0:9 (FAO & OMS, 1986), or by antibodies generated after vaccination (Pouillot et al., 1997; Saegerman et al., 1999, 2004). Consequently, the isolation and correct identification of the pathogen is of utmost importance for a correct diagnosis, but applying these techniques in developed countries is confronted with many difficulties (Alton et al., 1988; Macmillan, 1990).

Brucellosis was reported for the first time in cattle in Ecuador by Salvestroni in 1926 (Alvarado, 1959), whereas the first human case was described by Valenzuela in 1934 (Sánchez, 1997).

MATERIALS AND METHODS

The present paper attempts to present the situation of brucellosis in Ecuador, based on a review of the literature and the available information from public and private institutions directly or indirectly involved in diagnosis, prevention, control, or epidemiological surveys of brucellosis, including graduate dissertations presented at

different universities in Ecuador. Only the reference literature was mentioned in the appropriated section of the paper.

RESULTS AND DISCUSSION

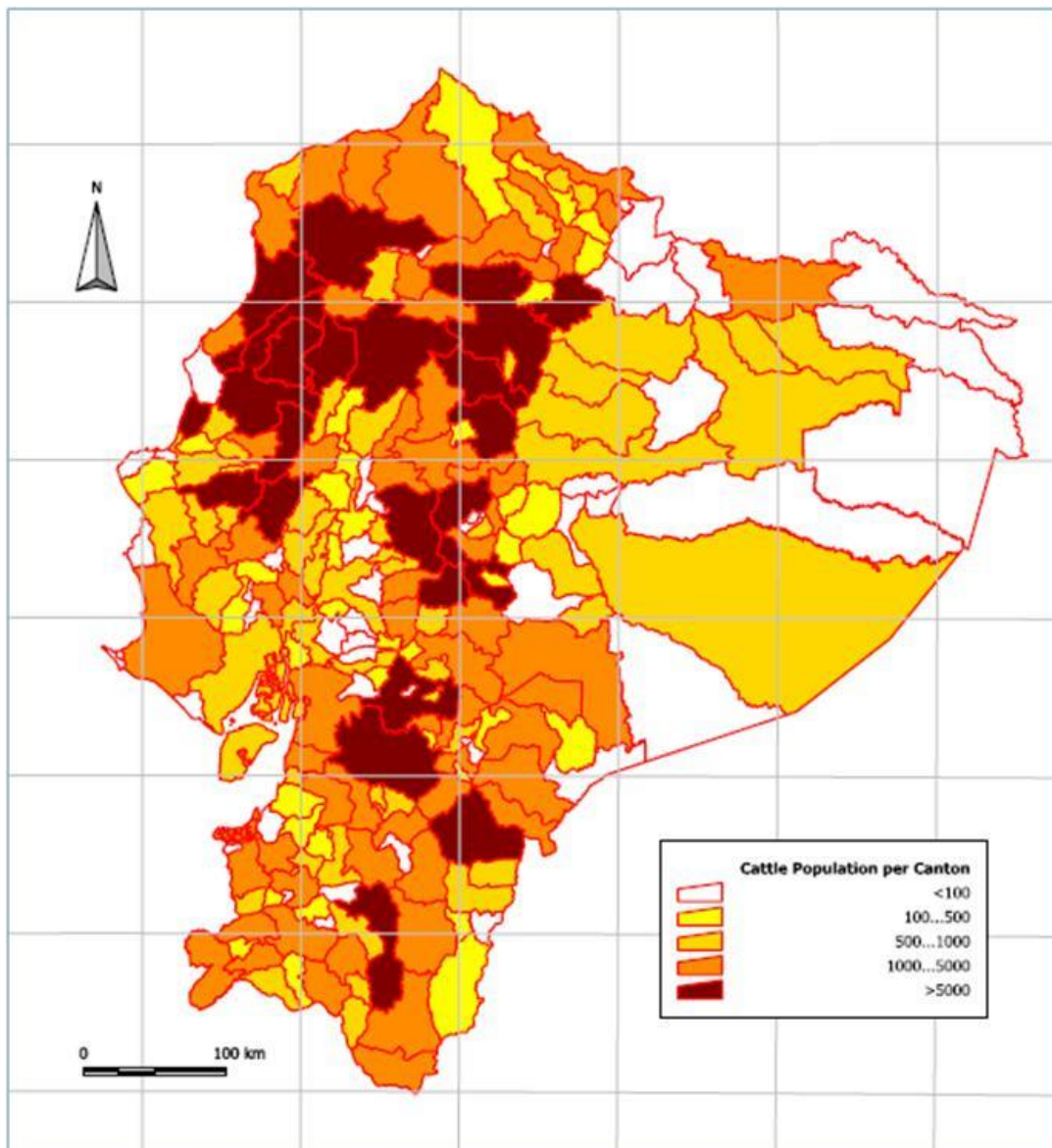
Animal husbandry systems and consumption habits in Ecuador

Ecuador is divided into four regions (i.e. the coastal region, the mountains, the Eastern region and the islands) with different climatological and ecological conditions, which has led to several distinct systems of animal husbandry and production. In 2002, according to the Ecuadorian Animal Health Services (Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria - SESA) currently the Quality Assurance Agency of Agriculture (Agencia de Aseguramiento de Calidad del Agro – AGROCALIDAD), of the Ministry of Agriculture and Animal Husbandry (Ministerio de Agricultura y Ganadería - MAG) currently the Ministry of Agriculture, Animal Husbandry, Aquaculture and Fisheries (Ministerio de Agricultura Ganadería Acuacultura y Pesca - MAGAP), Ecuador counted 4,486,020 heads of cattle distributed over 427,514 Agricultural Production Units (Unidades de Producción Agrícola - UPAs), 1,527,114 pigs in 440,475 UPAs, 1,127,468 sheep in 178,995 UPAs, 178,367 goats in 16,405 UPAs, 21,662 llamas in 7,610 UPAs, 2,024 alpacas in 206 UPAs and 375,760 equines in 189,289 UPAs (INEC, MAG, & SICA, 2002). The distribution of cattle, goats, sheep and pigs, as shown on Figures 1A, 1B, 1C and 1D.

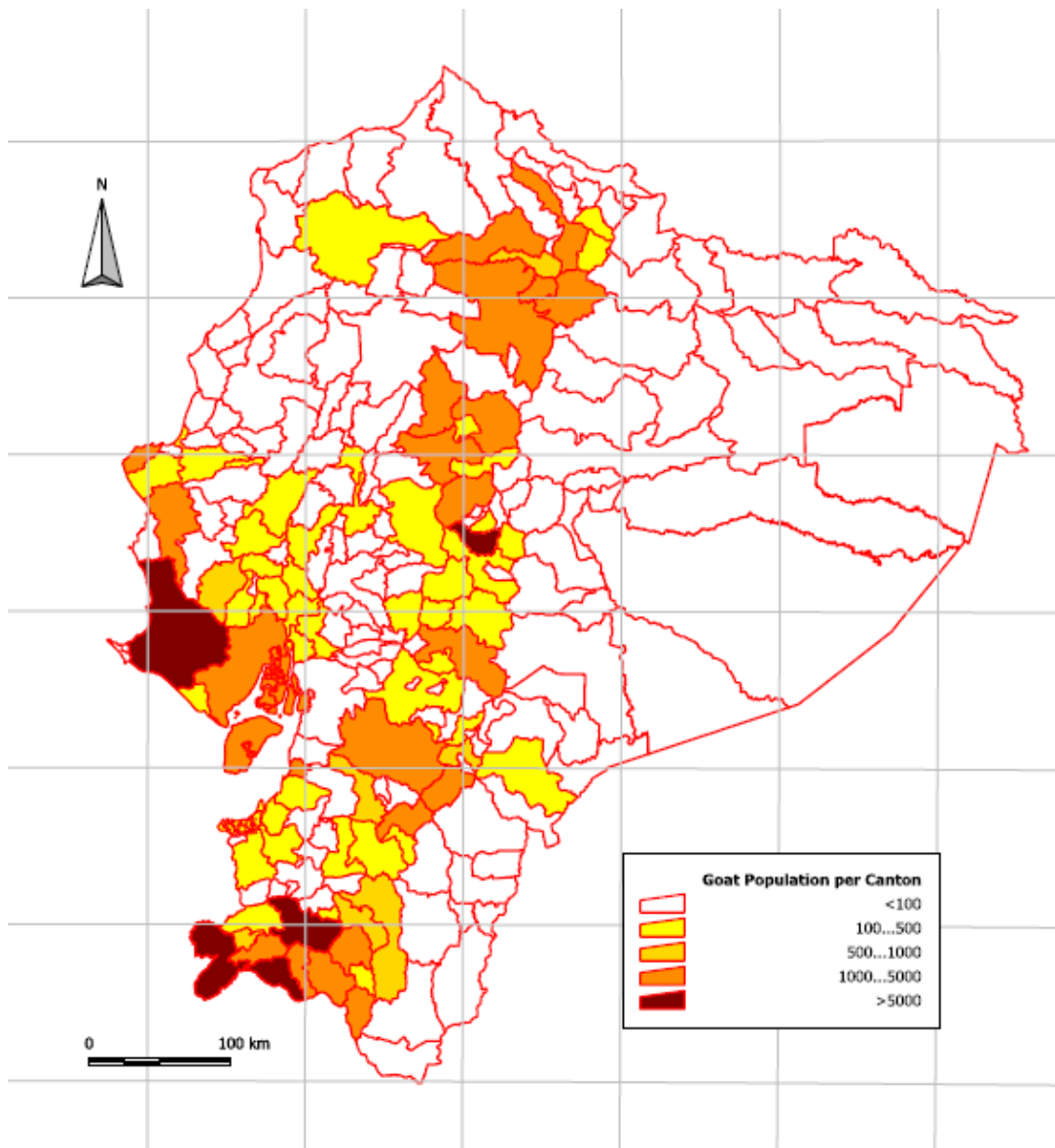
Concerning bovines, 50.69% (2,274,137 animals), is concentrated in the mountainous region or Sierra, in 339,555 UPAs, representing 79.42% of the national total of UPAs. During 2002, in 54.33% of the UPAs cattle were kept tethered (“soguelo”), 44.22% practiced cattle grazing and in the remaining 1.43% another husbandry system was used. It has to be mentioned that in the traditional system animals are tethered on a pole in fallow land, alongside roads on communal lands. Concerning reproduction practices: in 76.45% of the UPAs, cows are served (freely or controlled) by a stud bull, with artificial insemination (AI) applied in only 0.68% UPAs. In the remainder 24.16% the reproduction prevalence is unknown (INEC et al., 2002).

Figure 1. Animal populations per Canton (INEC et al., 2002)

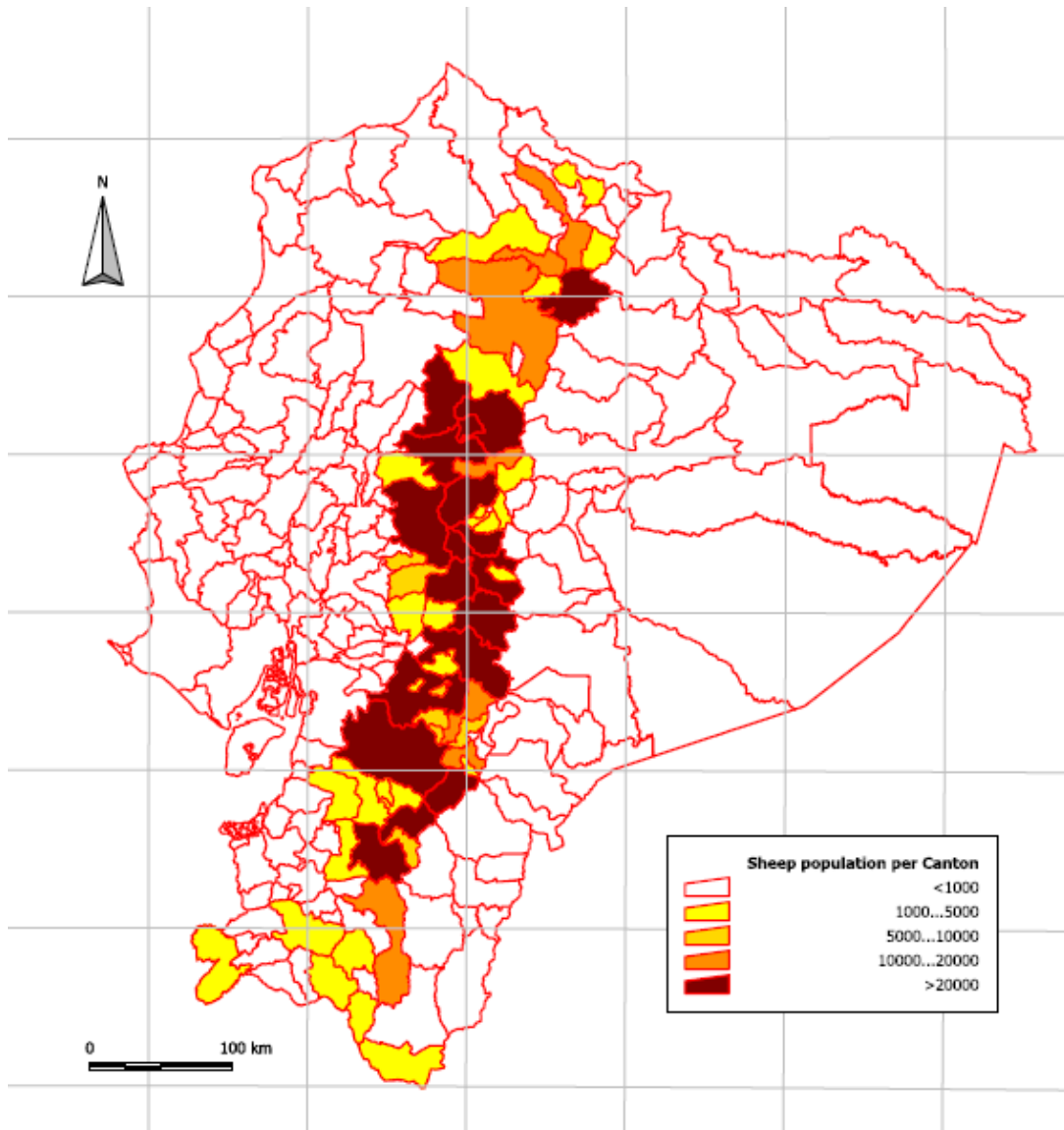
A



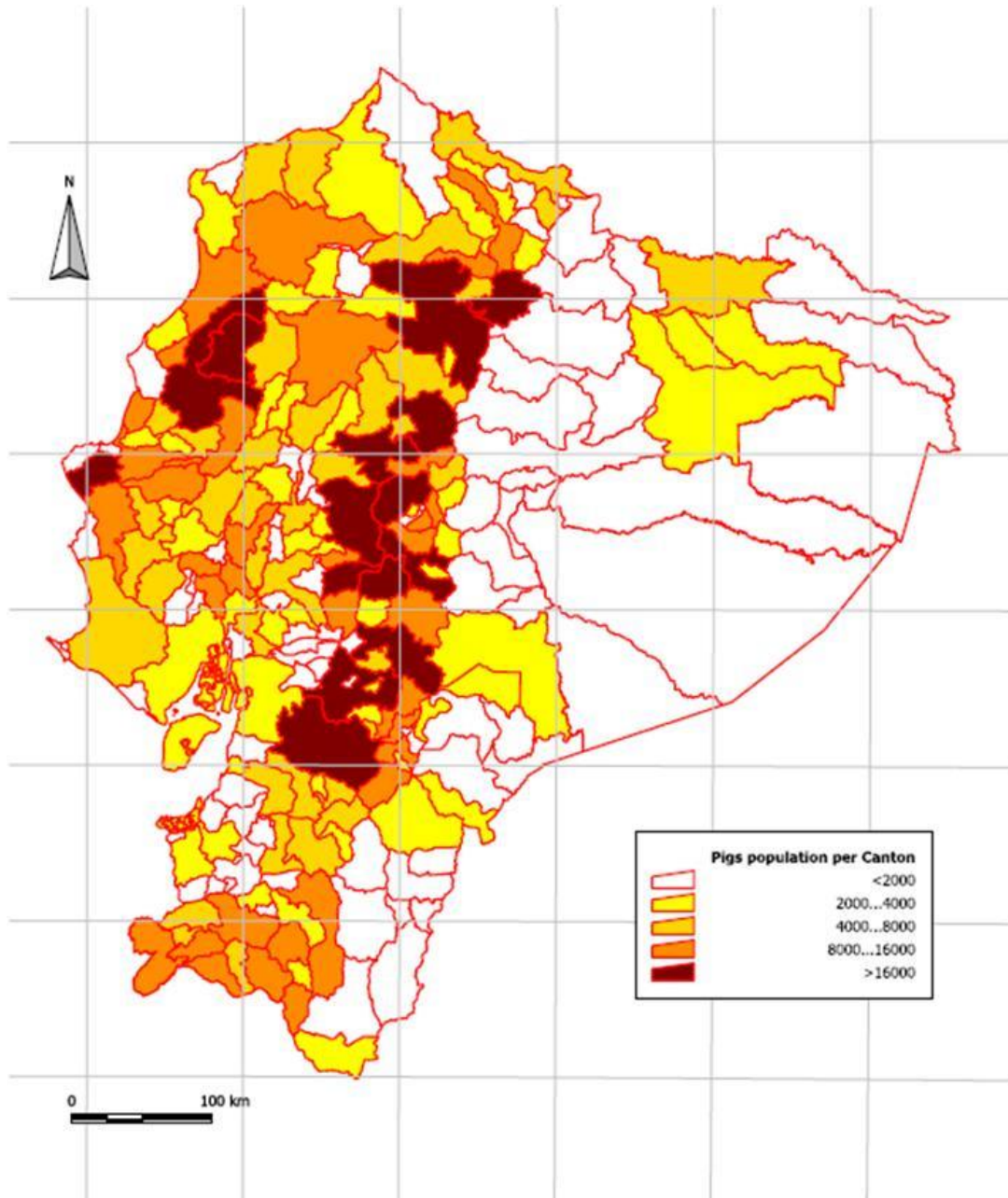
B



C



D



Legend:
A = Cattle
B = Goats
C = Sheep
D = Pigs

In 2002, dairy production mounted to about 3.5 millions litres per day, with a mean of 4.35 litres/cow/day, of which 58.49% was consumed or processed on the UPAs. In 99% of the UPAs, cows were milked by hand. In 2002, 61.96% of the 808,856 cows in production were concentrated in the Sierra; in that year abortusses were reported in 9.88% of the UPAs, affecting 11.36% of the cows in production (INEC et al., 2002).

This percentage of abortions is in discrepancy with threshold used to classify healthy herds; value of less than 3% is considered as normal (Radostits, 2001).

One of the main characteristics of the production systems in Ecuador is the coexistence of various animal species (both large and small species) in the same UPA. This together with the poor implementation of modern technology, deficient sanitary conditions, the absence of biosecurity measures and of a proper vaccination scheme, contributes to the existence of an environment ideal for the introduction and maintenance of infections and contagious diseases, as suggested by the high percentage of abortions reported. In addition, the causal agents of these diseases can easily be transmitted to humans due to risky alimentary habits such as consumption of blood, colostrum, unpasteurised milk and other dairy products, placenta (locally called “guagua mama - huagra mama”) and foetuses (locally known as “ville”) and due to manipulation of contaminated biomaterials.

Brucellosis in animal and human compartments

Bovine brucellosis

In 1926, Salvestroni was the first to detect and to notify the first case of brucellosis in Ecuadorian cattle (Alvarado, 1959). From then onwards, the major part of the research on animal brucellosis has solely been executed in the veterinary and agronomy faculties of the various universities in the country (Table I). In spite of the efforts, a fair idea of the problem was never obtained because of the lack of standardised diagnostic methods used, difficult interpretation of the results (post vaccinal cross-reactions), inadequacy of sample sizes and too limited collections and identifications of isolates of *Brucella* spp.

The only survey at a national level was executed by the National Programme of Animal Health (Programa Nacional de Sanidad Animal - PNSA) of MAG, which during 1978 and 1979 organised a serological cattle survey in the Sierra and coastal provinces.

Table I. Main studies about animal brucellosis in Ecuadorian universities

Authors	Animal species	Zone of study (number*)	Diagnostic tests	N° of samples	N° of herds sampled	% positives
Vásconez-López (1960)	cattle	Quito (1)	MRT	ND	pasteurisation unit	30 – 50
Estupiñan (1967)	cattle	Pasteurisation units: Quito (1), Cayambe (1), Latacunga (1)	MRT	ND	384	68.8
Manzano (1974)	cattle	Tungurahua (1)	MRT Hudd	409 1156	47 47	11.4 (4.8 susp) 4.3 (3.1 susp)
Maldonado & Salgado (1979)	cattle	Car (1), Imb (1), Pich (1), Cot (1), Mab (2)	RB IC	989 989	ND ND	51.6 52.6
LCSP, 1953; cit. by Saltos & Saltos (2001)	cattle	Litoral (2)	ND	6535	ND	11.5
Alvarado (1959)	cattle	Zaruma (2)	Hudd	607	26	3.5
Gómez (1964)	cattle	Coastal zone (2)	Hudd	2400	ND	12
Olleague (1969)	cattle	El Oro (2)	MRT	1231	208	20 - 57
Valdivieso (1969)	cattle	Machala (2)	Hudd MRT	1537 1537	ND ND	9.9 5.0
Aragundi(1969)	cattle	Los Ríos (2)	MRT	257	113	33
Galán (1969)	cattle	Daule (2)	Hudd	2015	14	3.5
Centro de Salud Pecuaria Guayaquil, 1969; cit. by Chamorro (1972)	cattle	Los Ríos (2), Guayas (2), El Oro (2)	MRT	ND	496	39
Albornoz (1970)	cattle	Guayas (2)	MRT	1200	ND	31.8
García (1970)	cattle	Manabí (2)	MRT	233	ND	5.5
Córdova (1970)	cattle	Guayas (2)	MRT	395	395	33.2
Plaza (1970)	cattle	Manabí (2)	Hudd	800	74	11.3
Santillán (1971)	cattle	Esmeraldas (2)	MRT	ND	134	4.1
Mora (1971)	cattle	Chone (2)	Hudd	2011	ND	9.6
Falconí (1972)	cattle	Manabí (2)	MRT	749	206	5.5
Plasa (1977)	cattle	Manabí (2)	Hudd	1000	20	0.4
Cordero (1978)	cattle	Esmeraldas (2)	Hudd	500	43	8.8

Miketta (1980)	cattle	Esmeraldas (2)	Hudd	1009	120	6.5
Nieto (1981)	cattle	El Oro (2)	MRT	119	119	39.5
Arteaga (1983)	cattle	Manabí (2)	Hudd	409	ND	13.2
			RB	70	ND	37.1
Loor & Moreira (1986)	cattle	Portoviejo (2)	Hudd / RB	1000	120	4.6
Zambrano & Cedeño (1995)	cattle	El Carmen (2)	Hudd	862	60	3.2
Valdez, Bazurto, & Vera (2000)	cattle	Manabí (2)	SA	202	ND	20
Brito & González (2001)	cattle	Manabí (2)	RB	608	ND	0.9
			cELISA	6	ND	NR
Saltos & Saltos (2001)	cattle	Manabí (2)	Hudd	709	70	10
Demera, Farfán, Ortega, & Intriago (2002)	cattle	Manabí (2)	Hudd	210	ND	0
Zambrano (2002)	cattle	El Carmen (2)	Hudd	1225	ND	2
Bailon & Muñoz (2003)	cattle	Manabí (2)	Hudd	648	ND	13.3
Herrera (2003)	cattle	Santo Domingo (2)	Hudd	500	100	1.4
Vera & Flores (2004)	cattle	Manabí (2)	MRT	807	ND	0
			MRT	19	19	5.26
Paredes (2012)	cattle	Santo Domingo (2)	RB	534		0.19
			SAT-EDTA	534		0.19
			RB	600	1	0.5
Cuenca (2013)	cattle	Santo Domingo (2)	SAT-EDTA	600		0.5
Quinde (1959)	cattle	Loja (3)	Hudd	300	ND	0.7 (susp)
Saldaña (1973)	cattle	Cuenca (3)	MRT	186	ND	6.5
			SA	145	ND	6.2
			Hudd	2500	ND	0.1
Chauvin (1969)	cattle	Loja (3)	Hudd	ND	ND	0
Segarra (1971)	cattle	Loja (3)	MRT	2500	ND	0.3
Rivadeneira (1980)	cattle	Cuenca (3)	Hudd	2500	ND	0.1
			MRT	97	54	1.9
Delgado & Vega, 1985; cit. by Delgado (1992)	cattle	Cañar (3)	Hudd	9	1	11.1
			ND	346	ND	0
Fernández & Peña (1991)	cattle	Cuenca (3)	RB	3000	ND	0.7
Vidal (1992)	cattle	Cuenca (3)	Hudd	600	20	1.2
Alvarado (1995)	cattle	Azuay (3)	RB	130	ND	0
Crespo (1999)	cattle	Cuenca (3)	RB	600	ND	1.4
Chamorro (1972)	cattle	Napo (4)	MRT	63	15	14.2

			Hudd	63	7	6.4
Rivadeneira (1980)	cattle	Upano (4)	Hudd	850	ND	0.9
Castro & Zhunbio (1989)	cattle	Morona Santiago (4)	Hudd / RB	1329	ND	0.2
Delgado (1989)	cattle	Morona Santiago(4)	Hudd / RB	766	ND	0
Ortiz (1962)	goat	Guayas (2)	Hudd	ND	ND	0
Albornoz (1970)	goat	Guayas (2)	MRT	800	ND	33.2
Granda (1972)	goat	Macará (3)	Hudd	205	ND	0 (0.2 susp)
Tapia (1998)	goat	Loja (3)	Hudd	435	83	0
Sánchez (1997)	goat	Azuay (3)	Hudd	500	ND	1.2
Tobar (1961)	goat	ND	MRT/Hudd	19/375	3/3	0/0
Tobar (1961)	pig	Slaughterhouse Quito (1)	Hudd	200	ND	3
Robalino (1966)	pig	Slaughterhouse Quito (1)	Hudd	1200	ND	2.1 – 11.3
Encalada (1963)	pig	Guayaquil (2)	Hudd	1000	ND	3.4 (7.7 susp)
Intriago (1971)	pig	Portoviejo (2)	Hudd	1200	ND	7.9
Demera et al. (2002)	pig	Manabi (2)	Hudd	210	ND	0
Tobar (1961)	sheep	ND	MRT/Hudd	30/388	6/7	0/0
Zambrano (1978)	dog	Manabí (2)	Hudd	400	ND	3.5

Legend: LCSP = Laboratorios del Centro de Salud Pecuaria; SA = Serum Agglutination Test; RB = Rose Bengal; Hudd = Huddleson Agglutination Test; MRT = Milk Ring Test; IC = heat inactivation test; cELISA = competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay; susp = suspected; ND = not determined; NR = results not reported; Car = Carchi; Imb = Imbabura; Pich = Pichincha; Cot = Cotopaxi; Mab = Manabí; * This number refers to the number of zone mentioned in the **Figure 2**.

Based on the results of 15,473 bovines with the Rose Bengal Test, 3.19% and 5.5% animals were considered positive and suspected respectively. This information allowed SESA in 1999 to characterise three epidemiological regions in Ecuador (Figure 2), i.e. those with high prevalences i.e. the provinces of the northern Sierra with prevalences between 4% and 10.62% (zone 1), likewise the coastal provinces with prevalences between 5.88% and 10.62% (zone 2) and the provinces of the southern Sierra with low prevalences, between 1.3% and 2.6% (zone 3). Since there was no information available from the Amazonian region, SESA assumed that, because of its similar characteristics of animal husbandry with zone 3, prevalences were equally lower in that region. A subsequent study by SESA in 1997 concluded that the disease was absent from the Galapagos Archipelago, since all samples (507 bovines from 4 islands) proved to be negative by Rose Bengal Test (Torres, 2008). According to MAG, the entire cattle population of the islands consisted of 11,104 animals, divided over 297 UPAs (INEC et al., 2002).

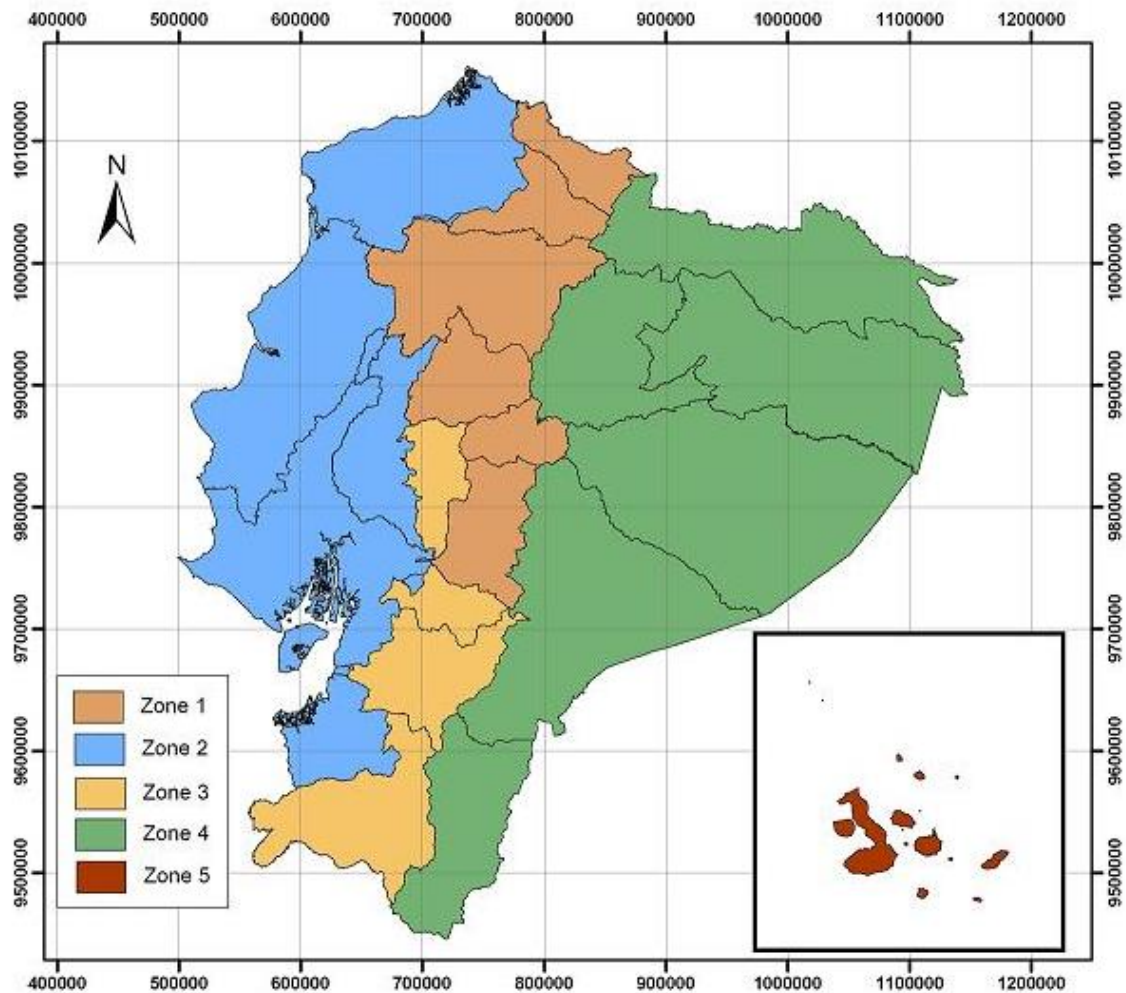
In order to predict the true prevalence and the evolution of the disease, similar surveys should be held regularly, yet supported by epidemio-statistical models, underpinned if possible by combined results of multiple diagnostic assays with high specificity and sensitivity.

The assumption that a geographically isolated zone like the Archipelago is free of brucellosis, cannot be based solely on a serological survey of a few percentage of bovines in addition to the application of a single and very restricted assay, rather it should be based on a sufficiently large sampling of all animal species which may be potential reservoirs not only of the traditionally known *Brucella* spp. It should equally include marine mammals as potential reservoirs of recently described species like *Brucella pinnipedialis* and *Brucella ceti* (Godfroid et al., 2010; Pappas et al., 2005).

In Ecuador, the information about the economical impact of the disease is scarce yet professionals and cattle owners agree that losses are considerable, as such, for the year 1967 it was estimated that 26,000 calves were lost due to brucellosis (Laboratorio del Centro de Salud Pecuaria, 1970; cited by García-Carrillo, 1987). Losses during 1983 were estimated at 8,850,900 US\$, (Vallejo, 1983; cited by García-Carrillo, 1987),

during 1998 at 2,482,269 US\$ (Torres, 2008), and during 2005 at 5,436,908 US\$ (Torres, 2008).

Figure 2. Prevalence of bovine brucellosis in Ecuador: epidemiological feature (MAG-SESA, 1999)



Legend: Zone 1 = high prevalence zone on Sierra; Zone 2 = high prevalence zone in coastal area; Zone 3 = low prevalence zone on Sierra; Zone 4 = presumed low prevalence zone in Amazonia; Zone 5 = presumed brucellosis-free zone of the Galapagos Islands.

The available information about studies on animal brucellosis in Ecuador is presented in Table I, data are mainly based on results described in undergraduate dissertations. Little scientific literature is available and even more so rarely published in international journals. The reliability of these data from dissertations is often questionable because of the above mentioned reasons, i.e. lack of standardised diagnostic techniques (e.g. heterogeneous protocols are used with different cut-off's), the lack of information about vaccinations (e.g. kind of vaccine, age of animal at vaccination, number of animals vaccinated in a herd) and the restricted number of animals sampled.

The studies as presented in Table I can be classified in field studies (in a geographically or administratively defined zone) and studies in slaughterhouses, the latter being very useful to obtain a qualitative indication about the presence or absence of the disease in a geographical zone. However, even these studies should be assessed with caution, often because of poor design (e.g. insufficient number of animals, biased sampling and insufficient information about the animals). In addition, the use of assays which are based on IgM detection i.e. acute infections, and the lack of IgG detecting assays may often lead to subestimations of the disease (or surestimations in case of false positive serological reactions with Gram-negative bacteria, sharing the same epitope on the lipopolysaccharide of *Brucella*).

In addition to the different production and breeding systems (extensive in the coastal area and semi-intensive in the Andean region), the variability in sensitivity and specificity of the serological assays, used in these surveys, are important contributing factors to the highly variable data on prevalences as presented in Table I. In conclusion, despite most of previous surveys underlined the presence of brucellosis in Ecuador, a validated study, to estimate the prevalence and to determine predisposing and decisive factors, prevailing in every geographical zone of the Ecuadorian territory, should be realised.

Ovine and caprine brucellosis

Sheep and goat husbandry is very traditional and up to now the ancestral practices, characterised by poor management and unbalanced nutrition, are still prevailing. Sheep and goats, nicknamed cows of the poor, are the economical subsistence of the small holders. The majority are indigenous breeds (93.38%) are concentrated in the Sierra. Of the national total of animals, 34.17% are kept in UPAs, maximum 2 hectares wide (INEC et al., 2002).

The 44.81% of the goats in Ecuador are kept in UPAs up to 10 hectares. In the southern region goats are free roaming.

In the traditional husbandry system, still in use today, animals are guarded at night in simple corrals close to the dwellings of the owner (Benítez-Ortiz et al., 1982).

There are no specific epidemiological surveillance system and any prevention and/or control of brucellosis in small ruminants, which is highly symptomatic for the poor sanitary conditions in which ovines and caprines are kept. In Ecuador there is certainly no official and apparently no clandestine form of commercialisation of a vaccine against brucellosis in small ruminants.

Limited studies (Table I) have shown that a low percentage of animals have antibodies against *Brucella* spp. There are no official reports in Ecuador about the occurrence neither of *Brucella melitensis* nor of *Brucella ovis* (Lucero et al., 2008; Thimn, 1982), equally there was never any local or regional programme to prevent and/or control brucellosis in small ruminants.

Consumption of milk from sheep is very rare, yet in certain regions, specifically in southern Ecuador; consumption of milk from goats is very common and a substantial part of goat dairies is destined for traditional production of cheese. It is not so uncommon to observe small herds of 3 to 8 goats, roaming in the villages, guarded by the owner and being milked on demand by customers who believe in the curative benefits of goat milk, obviously without any sanitary control whatsoever.

In a prospective survey on caprine brucellosis by the International Centre for Zoonoses (Centro Internacional de Zoonosis - CIZ) there was no evidence of antibodies against *Brucella* spp (smooth *Brucella*), found. This study, held in the Zapotillo canton in the Loja Province, comprised 437 randomly selected sera, analysed using the Rose Bengal test (2005, unpublished data).

3.1. Porcine brucellosis

The amount and types of studies conducted in pigs, revealed lack of importance that has been given to the brucellosis in this species. The use of Huddleson agglutination test has shown prevalences between 2.1 and 11.3% (Table I). However, the notification of the isolation of *Brucella suis* (biotype 1) (Lucero et al., 2008; Thimn, 1982), demonstrate not only the importance of brucellosis in this natural reservoir, but in public health, due to the high pathogenicity for humans, attributed to this specific biotype of species of *Brucella*.

Brucellosis in South American camelids

Currently, in comparison with other Andean countries, the camelid population in Ecuador is very small, yet there is a growing interest on behalf of the rural population in llama and alpaca as a valuable alternative for auto-consumption in addition to wool production for handicraft. Unfortunately in Ecuador, as in neighbouring countries there is no information about the prevalence of brucellosis in llamas or alpacas.

Canine brucellosis

Equally canine brucellosis has hardly been studied in Ecuador, yet there are two interesting reports. In 1978 (+90), a sero-prevalence of 3.5% was found in 400 dogs from the coastal province of Manabi. Antibodies against *Brucella* spp. (smooth *Brucella*), were demonstrated by the Huddleson assay. In 1997, antibodies against *Brucella canis* were reported in 14.1% of 404 dogs examined. Samples were collected in veterinary clinics in Quito; the authors used Agar Gel Immunodiffusion Test with *B. ovis* antigen (Martínez & Proaño, 1997).

Currently in CIZ, research has been initiated aiming to determine the seroprevalence of *Brucella* spp (smooth *Brucella* strains) in dogs on cattle ranches. Standardised immunodiagnostic assays will be used in addition to attempts to isolate local strains.

Human brucellosis

In 1934, Valenzuela was the first to diagnose brucellosis in Ecuador in a patient from the rural zone of Pichincha Province (Valdivieso, 1969).

In Ecuador, until 2007, brucellosis belonged to the group of mandatory notifiable diseases or events which are submitted to epidemiological alertness - EPI 2 (confirmed cases by laboratory or epidemiological link). However since 2008, brucellosis is not included in this list anymore which may deepen the under reporting of cases even more.

Diagnosis is based on clinical findings rather on the results of laboratory assays, specifically the Huddleson Agglutination Test and on the occasional isolation of the pathogen. In practice, there is no epidemio-surveillance of people at risk nor is there any proper notification system.

The course of the official reports from 1990 to 2007 by the National Directorate of Epidemiology of the Ministry of Public Health (Dirección Nacional de Epidemiología, del Ministerio de Salud Pública - MSP) is shown in Figure 3 and studies on human brucellosis, based mainly on graduate dissertations, are summarised in Table II.

According to available information from the World Animal Health Information Database (WAHID) of the OIE, 6 cases of human brucellosis were reported in 2005, corresponding to 0.0449 per 100,000 inhabitants and a rank of importance of 5. Incidentally, highly ranked diseases are: salmonellosis (rank 1 with 8,611 cases), leishmaniasis (rank 2 with 1,925 cases), cysticercosis (rank 3 with 161 cases) and leptospirosis (rank 4 with 59 cases). Obviously, to determine the true prevalence of these zoonoses and to assess the risk factors, there is an urgent need for epidemiological studies, not restricted to the population at risk, but in the entire population using more sensitive diagnostic tests.

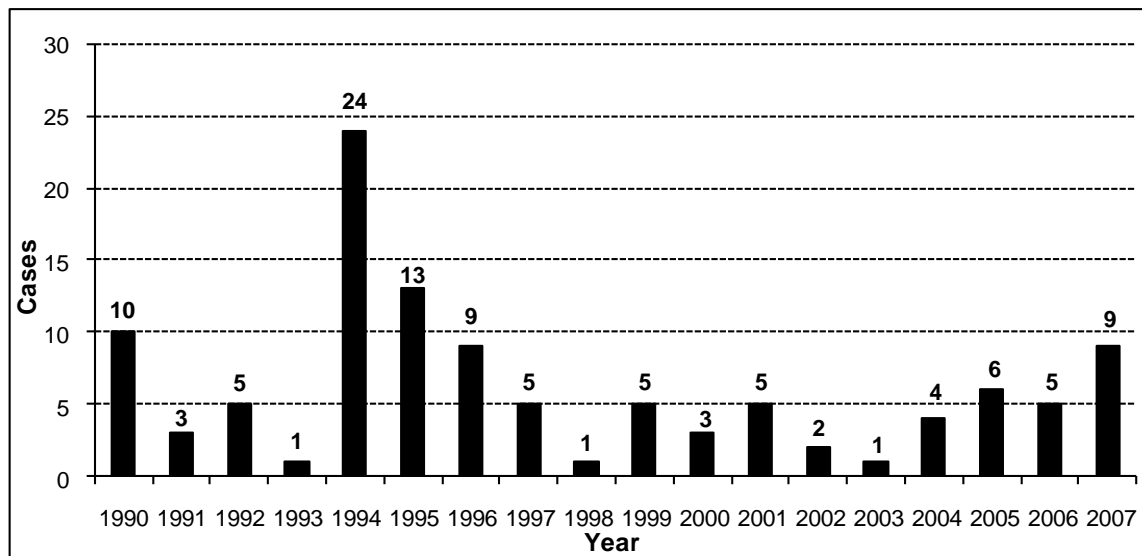
Control programme of bovine brucellosis in Ecuador

MAGAP through SESA designed a control scheme aimed at a progressive decrease of the number of positive bovines in the endemic regions of the country, aiming to arrive finally at the required conditions for total eradication of the disease (MAG-SESA, 1999).

The national strategy focuses on the immunisation of female calves, epidemiological vigilance and stamping out of positive animals.

A strategic plan, considered in the national programme for the control of bovine brucellosis (Programa Nacional de Control de la Brucelosis bovina), has been prepared to be launched. A diagram of the proposed control strategy is presented in Figure 4. In the new programme, a herd will be declared brucellosis-free when the animals of the UPA in question have been submitted to at least two consecutive diagnostic assays, with an interval of 45 to 60 days, both yielding negative results. It should be noted that this is a considerable simplification of the existing required strategy (Godfroid et al., 2010; MAG-SESA, 1999; Saegerman et al., 2010).

Figure 3. Official reports of human brucellosis in Ecuador: incidence from 1990 to 2007 (Cartelle, Holban, Escalante, & Cevallos, 2015).



It is obvious that any control and eradication programme of a given disease can never achieve its goal in the absence of a reference laboratory, where quality control of the biologicals (vaccines and antigens), as well as the repeatability and the reproducibility of standardised diagnostic tests can be guaranteed. In addition, decisions should be scientifically based and made only by a team of professionals, experts in human and animal health and underpinned by laws, regulating all aspects concerned i.e. vaccinations (registration of the selection of strain, way of administration, dose, age at vaccination and possible boost-vaccinations), official recognition of diagnostic laboratories (public or private), law –enforced notification of positive cases (human and animal) and organised culling of positive animals.

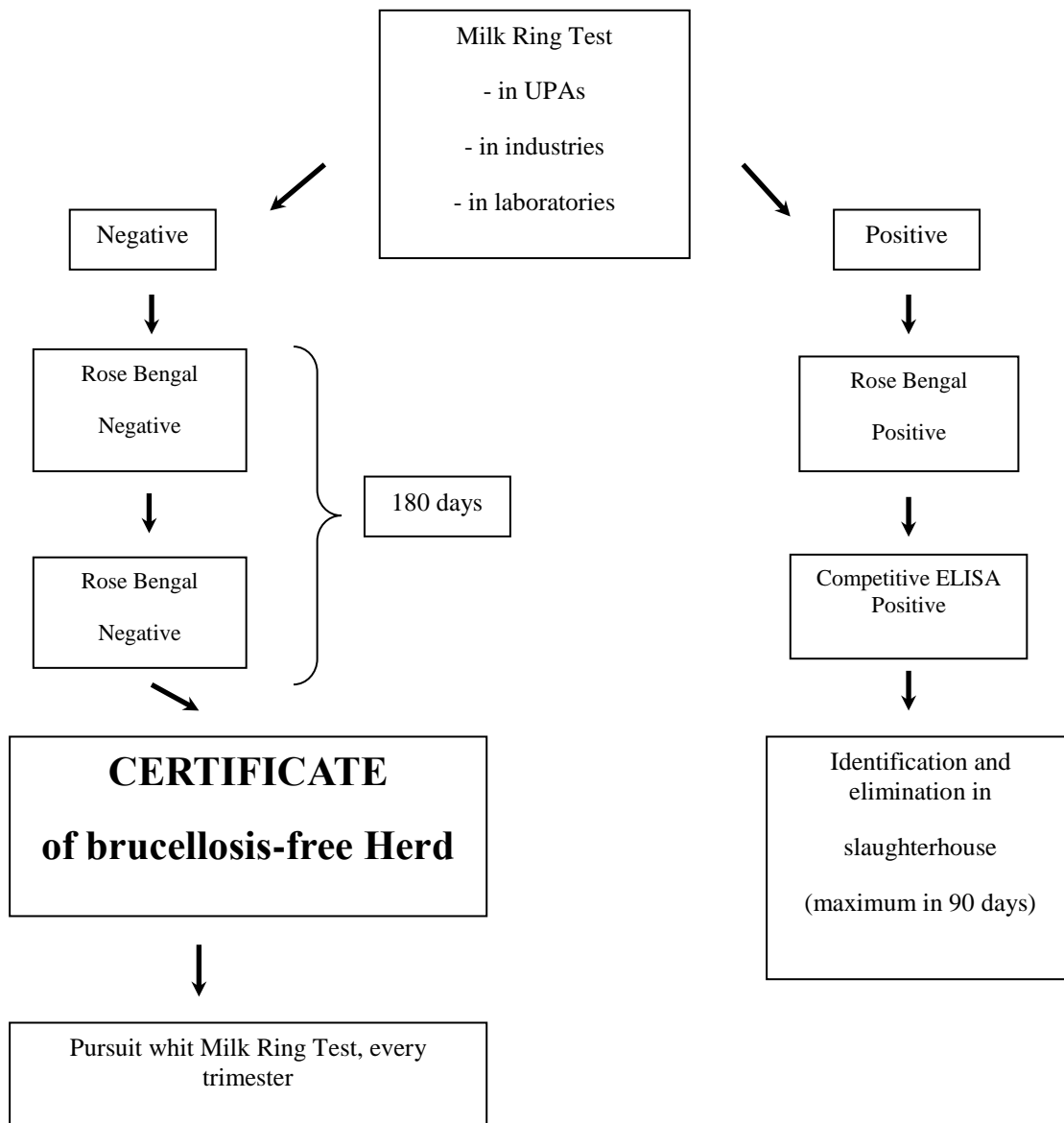
A control programme must not emphasise on imposing penalties or on sanctioning cattle owners, rather to the contrary, on incentives e.g. economic benefits for those farms applying pasteurisation and with official declaration of brucellosis-free herds.

Table II. Main studies of human brucellosis at Ecuadorian universities

Authors	Subjects of study	Zone of study (number*)	Diagnostic tests	N° of persons sampled	% and cases positives
León, 1952; cited. by Chamorro (1972)	ND	Quito (1)	Hudd	ND	1.4 – 2
Encalada (1963)	Slaughterhouse workers	Guayaquil (2)	Hudd	5	0
Lince & Uriguen, 1965; cited by García-Carrillo (1987)	ND	ND	ND	566	4.1
Intriago (1971)	Slaughterhouse workers	Portoviejo (2)	Hudd	25	4.0
Macías (1977)	Hospital patients	Portoviejo (2)	Hudd	700	2.4
León, 1979, cited by Delgado, (1992)	Slaughterhouse workers	Guayaquil (2)	Hudd	211	10.9
Encalada, 1980; cited by Delgado, (1992)	Slaughterhouse workers	El Oro (2)	ND	235	26
Zurita, 1980; cited by García-Carrillo (1987)	Slaughterhouse workers	El Oro (2)	ND	235	23.8
Arteaga, Navas, Obando, & Zambrano (2002)	Slaughterhouse workers	Manabí (2)	Hudd	207	0
(Betancourt, Guerrero, & Román, 2002)	Pregnant women	Manabí (2)	Huddl	42	0
Alvarez & Pillacela (1985)	Reports of health centres (1974 – 1983)	Cuenca (3)	ND	ND	3 cases
Delgado, (1992)	Workers in slaughterhouses and meat-processing centres	Cuenca (3)	Hudd	173	2.3
Cuenca (2013)	Workers	Santo Domingo	RB	70	1.43
			SAT-EDTA	70	1.43

Legend: SA = Serum Agglutination Test; Hudd = Huddleson Agglutination Test; ND = Not determined; RB= Rose Bengal Test; SAT-EDTA = Wright Slow Agglutination Test with EDTA; * This number refers to the number of zone mentioned in the **Figure 2**.

Figure 4. Current official strategy used in Ecuador to certify animal production units officially free from bovine brucellosis and to monitor the disease (Torres, 2008)



Legend: UPA= Agricultural Production Units (Unidades de Producción Agrícola).

In spite of “80 years of active monitoring and diagnosis of brucellosis” (Torres, 2008), there is still no specific legislation regulating the control of brucellosis in Ecuador, i.e. the notification of human and animal cases, the import and commercialisation of vaccines, the use of diagnostic assays, the recognition and authorisation of laboratories and staff, the stamping out procedures and the liability to quarantine transported animals. There only is the fact that brucellosis was listed as a notifiable disease according to the law on animal health, enacted in 1981 (Órgano del Gobierno Del Ecuador, 1981), and according to the general decree of law

on animal health, enacted in 1996 (Órgano del Gobierno Del Ecuador, 1996), which in practice was never properly implemented due to lack of funds. A specific set of rules such as those stipulated by the Directive 98/46 of the European Community is urgently needed.

Vaccination of cattle

Currently two types of vaccines are in use for cattle in Ecuador, namely B-19 and RB-51. In 2005, according to official OIE information (OIE, 2016b) 12000 cattle were vaccinated against brucellosis, without indicating the strain being used. However, in that year apparently a higher number of animals should have been vaccinated since in the same year, 47020 doses of RB51 were sold in the country (see Table III for a summary of the available information). Vaccination is applied sub-optimally and practices like intra-muscular application, vaccination of calves, underdosing with strain RB-51 are common, including the supposed “treatment” of seropositive animals by repeated vaccinations. Furthermore, there is no quality control and registration of the vaccines distributed in the country.

The poor vaccination coverage, observed in traditional husbandry systems, mainly due to a lack of coordination in the control programme at national, zonal and regional level and the lack of an official vaccine distribution circuit, together with the existing ignorance and lack of interest for small holdings, plus the careless handling of biologicals and the practice of deferred vaccination of heifers (sometimes at the age of 12 or even 18 months), are likely causes of the persistence of foci of brucellosis. Vaccination thus remains a matter of private initiative, only performed by a small group of cattle owners, who in addition never immunise animals other than cattle with an appropriated vaccine.

Table III. Characteristics of vaccines used in bovines in Ecuador during 2005

Vaccine	Country of origen	Strain	Form	N° of germs per dose	ml/dose	Way of administration	N° of doses distributed
1	Ecuador	B-19	Lyophilised	60×10^9	5	SC	ND
2	Ecuador	B-19	Liquid	ND	5	SC	ND
3	USA	RB-51	Lyophilised	10×10^8	2	SC	47020

Legend: SC = Sub-cutaneous; ND = Not determined; Source: own unpublished observations.

Diagnostic tests, applied in Ecuador

Serological tests

Just like any other infectious organism, *Brucella* spp. must secure its survival in its host and thus for this purpose possesses highly developed and complex antigenic and enzymatic structures, which in turn generate equally complex immune responses in the host. Due to the difficulties and occasional risks involved by the direct demonstration of the causal agent, even more so in case of intracellular infection, antibody detection assays were developed and are mostly relied upon.

Currently, the number of serodiagnostic tests, both quantitative and qualitative; to detect antibodies against *Brucella* spp. far exceeds those developed for most of the other pathogenic agents. However, the sensitivity and specificity of these tests have been a matter of discussion and controversy, since many of them suffer from false positive serological reactions with Gram-negative bacteria, sharing the same epitope on the lipopolysaccharide (LPS) (Buzgan et al., 2010; FAO & OMS, 1986; Gerbier et al., 1997; Godfroid et al., 1994; Pouillot et al., 1997; Saegerman et al., 2004) and with post-vaccination antibodies (Pouillot et al., 1997; Saegerman et al., 1999, 2004).

Concerning the current diagnostic tests used in Ecuador, they exist no control neither of the protocols nor of the antigens used in the laboratories involved. It is even not known which test(s) is (are) employed in a specific situation. Tests used are Huddleson Agglutination Test, Agar Gel Immuno-diffusion Test (AGID), Rose Bengal Test, Wright Slow Agglutination Test (SAT), SAT with EDTA (SAT-EDTA), SAT with 2-mercaptoethanol (SAT-2ME), Agglutination Test with Rivanol (RIV), indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (iELISA), competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (cELISA) and milk ring test (MRT) (Table IV). Each laboratory uses its own protocols, cut-offs and so called “Gold Standard”, the whole usually covered by a blanket of secrecy.

Isolations of *Brucella* spp.

Isolation of the germ is confronted with many difficulties and requires specialised high-security laboratories. Consequently the number of successful isolations, reported in a given country, is directly related to the standard of its reference laboratories, if present. Ecuador is no exception to this rule and therefore there is no official information neither on the number of isolations performed or on the geographical distribution of the strains. Out of the 794

isolations of *Brucella*, realised and reported between 1965 and 1977 in 12 American countries, 8 were performed in Ecuador i.e. one of *Brucella abortus* (biotype 1), 6 of *Brucella abortus* (biotype 4), and one of *Brucella suis* (biotype 1) (Lucero et al., 2008; Thimn, 1982).

Recently, some strains from different animal species have been isolated by CIZ and will eventually be characterised (unpublished data).

Table IV. Results of serodiagnosis of bovine brucellosis during 1997-2006, officially reported cases & cases reported by private labs (cases not reported).

Year	Official report*		Private laboratory**	
	Animals analysed	Animals positive	Animals analysed	Animals positive
1997	NA	231	NA	NA
1998	NA	172	NA	NA
1999	NA	448	NA	NA
2000	NA	313	NA	NA
2001	NA	337	NA	NA
2002	NA	348	6628	689
2003	2583	330	4494	593
2004	2206	332	2274	273
2005	NA	NA	3775	605
2006	NA	NA	4402	419

Legend: * Official information reported by Ecuador to OIE; ** Private diagnostic; laboratory in Quito, Ecuador; NA = No data available.

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

From the available information and own observations, brucellosis seems to be a major problem in Ecuador, both in cattle and man. Official documents show the current state of knowledge to be rather poor. This is due mainly to the complex symptomatology of human brucellosis, the underreporting of cases, the lack of epidemiological studies and the scarcity of laboratories and experts involved. In addition, the range of diagnostic tests is restricted in most laboratories and backup from national or international reference centres are nonexistent. Lastly, there is little isolation, identification and characterisation of *Brucella* spp.

A basic requirement for future control and eradication programmes is the development of up-to-date, practical and efficient maps, suited for every region and indicating the true prevalence of brucellosis in Ecuador and the practices of vaccination. Furthermore, continuous training for professionals and general public awareness campaigns should be organised and evaluated.

It is obvious that information about vaccine quality and registration and reliability of laboratory tests is fundamental for any prevention and/or control or eradication programme.

Hence there is an urgent need for a national reference laboratory, not only responsible for quality control of biologicals (vaccines and antigens) and diagnostic tests, but also equipped for isolating and identifying *Brucella* spp. and to provide scientific expert opinion.

Finally, a network of professionals, laboratories and institutions should guide private and public organisations to support and streamline their collaboration, trying to avoid the current situation of indiscriminate interventions. It should be supported by a national database, compiling information gathered from systematic nationwide epidemiological surveys and surveillance by regional laboratories under the supervision of a reference laboratory. Systematic mass vaccination campaigns of all domestic potential brucellosis reservoirs should be organised, registered and monitored and this effort should be supported by a national policy.

Elimination of brucellosis from animal production in Ecuador will not only be beneficial for the health of both farmers and consumers, but it will also decrease production losses of dairy products and meat, thereby ensuring a secure and safe source of animal protein for the benefit of the underprivileged rural population of Ecuador.

We once again state that a brucellosis control program must be structured on the basis of the participation of the different actors, among them: livestock owners, veterinary professionals, the livestock industry sector, the government animal health services, the academic research sector, diagnostic laboratories and biologics production laboratories, who may act in accordance with the regulations established by the international organisms in charge of animal health. Moreover a structural link with the public health authority should be developed (One health approach).

References

- ACHA P.N., PZYFRES B., 2005. Brucellosis. In: Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes Al Hombre y Los Animales. OPS & OMS editors. Nueva Editorial Interamericana, Washington.
- AGUILAR E., 2008. Casos de brucellosis humana reportados en Ecuador (1990-2007). Epidemiología. Reporte del MSP. EPI-2. Ecuador.

- ALBORNOZ G., 1970. Diagnóstico de brucelosis por la prueba de “Ring-test” en la provincia del Guayas a nivel de hacienda. Doctoral Thesis, Universidad Estatal de Guayaquil, Ecuador, 70 p.
- ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D., VERGER J.M., 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. 1st edn. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, France.
- ALVARADO C., 1959. Índice brucelósico en bovinos del cantón zaruma. Doctoral Thesis, Universidad Central del Ecuador, Ecuador, 117 p.
- ALVARADO L., 1995. Diagnóstico de brucelosis bovina en hembras sexualmente maduras por el método de card test en el cantón Paute, provincia del Azuay. Doctoral Thesis, Universidad de Cuenca, Ecuador, 74 p.
- ALVAREZ F., PILLACELA C., 1985. Estudio de prevalencia de enfermedades zoonóticas diagnosticadas en la ciudad de Cuenca durante los años 1974 – 1983. Doctoral Thesis, Universidad de Cuenca, Ecuador, 94 p.
- ARAGUNDI R., 1969. Diagnóstico de brucelosis por la prueba de “Ring Test” en la provincia de Los Ríos. Doctoral Thesis, Universidad Estatal de Guayaquil, Ecuador, 60 p.
- ARTEAGA A., 1983. Identificación de anticuerpos contra brucelosis en ganado portador y vacunado mediante el uso de antígeno tamponado: Rosa de Bengala en la zona central de la provincia de Manabí. Doctoral Thesis, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 53 p.
- ARTEAGA F., NAVAS C., OBANDO M., ZAMBRANO F., 2002. Estudio del personal en riesgo de brucelosis en la cabecera cantonal de Portoviejo (Matarifes). Informe de Investigación – Diplomado en enfermedades zoonóticas, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 77 p.
- BAILÓN A., MUÑOZ J., 2003. Prevalencia de brucelosis en bovinos sacrificados en el matadero del cantón Chone, mediante la prueba de seroaglutinación rápida en placa, desde diciembre del 2002 a marzo del 2003. Doctoral Thesis, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 80 p.
- BENÍTEZ-ORTÍZ W., 1982. Proyecto Caprino Zapotillo. Proyecto regional para desarrollo del sur de Ecuador – PREDESUR. Loja, Ecuador.
- BENÍTEZ-ORTÍZ W., Gómez I., Cruz K., 1986. Ganadería Caprina en Centro Loja. Centro Andino de Tecnología Rural – CATER. Universidad Nacional de Loja. Consejo Nacional de Universidades y Escuelas Politécnicas. Loja. Ecuador.

- BETANCOURT R., GUERRERO I., ROMÁN J., 2002. Incidencia de brucelosis en las mujeres embarazadas que acuden a las unidades operativas del Area N°1 de la dirección de salud de Manabí. Informe de Investigación – Diplomado en Enfermedades Zoonósicas, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 44 p.
- BRAND A., NOORDHUIZEN J.P.T.M., SCHUKKEN Y.H., 1996. Herd Health and Production Management in Dairy Practice. Wageningen Pers, The Netherlands.
- BRITO M., González C., 2001. Presencia de brucelosis bovina en el cantón Bolívar, provincia de Manabí. Tesis Licenciatura Enfermería, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador, 81 p.
- CASTRO E., ZHUNIO R., 1989. Prevalencia de brucelosis bovina por los métodos de seroaglutinación en placa y card test, en el cantón Lomón – Indanza. Doctoral Thesis, Universidad de Cuenca, Ecuador, 54 p.
- CHAMORRO A., 1972. Incidencia de la brucelosis en la provincia de Napo. Doctoral Thesis, Universidad Central del Ecuador, Ecuador, 32 p.
- CHAUVIN P., 1969. Diagnóstico de brucelosis en bovinos de la provincia de Loja, por el método cromatográfico de Castañeda, controlado por el método de Huddleson. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Loja, Ecuador 50 p.
- CORDERO J., 1978. Investigación de brucelosis bovina en los cantones Eloy Alfaro y Esmeraldas de la provincia de Esmeraldas. Doctoral Thesis, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 86 p.
- CÓRDOVA G., 1970. Diagnóstico de brucelosis por medio de la prueba Rring Test en la provincia del Guayas a nivel de haciendas. Tesis Doctoral, Universidad de Guayaquil, Ecuador, 52 p.
- CRESPO T., 1999. Diagnóstico de brucelosis en bovinos hembras sexualmente maduras a nivel de camal de Cuenca, por el método de card test. Doctoral Thesis, Universidad Católica de Cuenca, Ecuador, 73 p.
- DELGADO K., 1989. Diagnóstico de brucelosis bovina, mediante la prueba de aglutinación rápida y antígeno brucelar amortiguado. Doctoral Thesis, Universidad de Cuenca, Ecuador, 55 p.
- DELGADO P., 1992. Diagnóstico de brucelosis en trabajadores de centros de procesamiento de cárnicos de Cuenca, mediante seroaglutinación rápida en placa. Doctoral Thesis, Universidad de Cuenca, Ecuador, 61 p.
- DEMERA T., FARFÁN G., ORTEGA B., INTRIAGO A., 2002. Prevalencia de brucelosis bovina y porcina en los camales de las cabeceras cantorales de la provincia de Manabí.

- Informe de Investigación – Diplomado en Enfermedades Zoonósicas. Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 18 p.
- ENCALADA M., 1963. Investigación de la brucelosis en el cerdo, en muestras tomadas en el matadero municipal de Guayaquil. Doctoral Thesis, ,Universidad Estatal de Guayaquil, Ecuador, 50 p.
- ESTUPIÑÁN P., 1967. Incidencia de las leches positivas a brucelosis por “Ring-test” en las pasteurizadas de Quito y Cayambe. Doctoral Thesis, ,Universidad Central del Ecuador, Ecuador, 34 p.
- FALCONÍ C., 1972. Investigación de brucelosis bovina a nivel de haciendas en la costa norte de Manabí (Cojimíes, Pedernales, 10 de Agosto, Jama, San Vicente y Leonidas Plaza) por el método de milk ring test. Doctoral Thesis, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 60 p.
- FAO, OMS, 1986. Comité Mixte FAO/OMS d’Experts De La Brucellose. Sixieme Rapport. Organisation Mondiale de la Santé. Genève, Switzerland.
- FERNÁNDEZ F., PEÑA J., 1991. Diagnóstico de brucelosis en bovinos hembras sexualmente maduros a nivel de camal por el método de card test. Doctoral Thesis, Universidad de Cuenca, Ecuador, 52 p.
- GALÁN J., 1969. Determinación de la incidencia de brucelosis por medio de la prueba de suero aglutinación rápida, en la zona del cantón Daule. Doctoral Thesis, Universidad Estatal de Guayaquil, Ecuador, 63 p.
- GARCÍA M., 1970. Determinación de la brucelosis bovina, en los principales hatos lecheros del cantón Chone, Rocafuerte y Portoviejo por el método de “ring test”. Doctoral Thesis, Universidad de Portoviejo, Ecuador, 47 p.
- GARCÍA-CARRILLO C., 1987. Ecuador. In: La Brucelosis De Los Animales En América y Su Relación Con La Infección Humana. OIE. París, Francia, p 124-133.
- GERBIER G., GARIN-BASTUJI B., POUILLOT R., VÉRY P., CAU C., BERR V., DUFOUR B., MOUTOU F., 1997. False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in a field trial. *Veterinary Research*, **28**: 375-383.
- GIL A., SAMARTINO L., 2000. Zoonosis en los sistemas de producción animal en las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. Food and Agriculture Organization. Livestock Information and Policy Branch, AGAL.
- <http://www.Fao.Org/ag/AGA/LSPA/papers/policypapers02.pdf> 1-65.

- GODFROID J., MICHEL P., UYTTERHAEGEN L., DE SMEDT C., RASSENEUR F., BOELAERT F., SAEGERMAN C., PATIGNY X., 1994. Brucellose enzootique à *Brucella suis* biotype 2 chez le sanglier (*Sus scrofa*) en Belgique. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **138**: 263-268.
- GODFROID J., NIELSEN K., SAEGERMAN C., 2010. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian Medical Journal*, **51(4)**: 296-305.
- GÓMEZ T., 1964. Estudio de la epizootiología y el diagnóstico de la brucelosis bovina en el litoral Ecuatoriano. Doctoral Thesis, Universidad Estatal de Guayaquil, Ecuador, 63 p.
- GRANDA B., 1972. Incidencia de brucelosis caprina en el cantón Macará por el método de Huddleson. Doctoral Thesis, Universidad Nacional de Loja, Ecuador, 40 p.
- HALLING S., BOYLE S., 2002. Foreword (Editorial). *Veterinary Microbiology*, **90**: 1-4.
- HERRERA W., 2003. Diagnóstico de brucelosis en los hatos bovinos, mediante el método de sero aglutinación en la zona de Santo Domingo de los Colorados. Doctoral Thesis, Universidad Laica Eloy Alfaro – Extensión en El Carmen, Ecuador, 66 p.
- INEC, MAG, & SICA. (2002). ECUADOR - Agricultural Census 1999/2000 – Main Results. Retrieved July 20, 2016, from http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/ess_test_folder/World_Census_Agriculture/Country_info_2000/Reports_2/ECU_SPA_REP_2000.pdf
- INTRIAGO W., 1971. Investigación de brucelosis en porcinos sacrificados en el matadero de la ciudad de Portoviejo, mediante la prueba de sero-aglutinación en placa. Doctoral Thesis, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 151 p.
- LOOR S., MOREIRA S., 1986. Prevalencia de brucelosis bovina en el valle del río Portoviejo durante 1984 – 1985. Doctoral Thesis, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 58 p.
- LÓPEZ-MERINO A., 2002. *Brucella*. www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_10/Capitulo10.pdf (accessed on 24th March 2009).
- LUCERO N.E., AYALA S.M., ESCOBAR G.I., JACOB N.R., 2007. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiology and Infection*, **136 (4)**: 496-503
- MACÍAS F., 1977. Investigación de brucelosis humana a nivel de centros de salud y hospital regional de la ciudad de Portoviejo. Doctoral Thesis, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 103 p.
- MACMILLAN A., 1990. Conventional serological tests; In: *Animal Brucellosis*, Nielsen K., Duncan J., CRC Press, Boca Raton, p. 153-197.

- MAG-SESA, 1999. Prevención y control de la brucelosis bovina en Ecuador. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria.
- MALDONADO P.; SALGADO G., 1979. Diagnóstico de la brucelosis con antígeno tamponado y la prueba de inactivación por calor a 65°C, en muestras positivas y sospechosas a la aglutinación rápida en placa. Doctoral Thesis, Universidad Central del Ecuador, Ecuador, 35 p.
- MANZANO C., 1974. Índice de brucelosis, en tres zonas de la provincia de Tungurahua. Doctoral Thesis, Universidad Central del Ecuador, Ecuador, 30 p.
- MARTÍNEZ A., PROAÑO M., 1997. Determinación de la prevalencia de brucella canis en las clínicas veterinarias de la ciudad de Quito. Doctoral Thesis, Universidad Central del Ecuador, Ecuador, 77 p.
- MIKETTA L., 1980. Prevalencia de brucelosis en las ganaderías lecheras del catón Esmeraldas, mediante la prueba de suero-aglutinación en placa. Doctoral Thesis, Universidad de Guayaquil, Ecuador, 71 p.
- MORA E., 1971. Determinación de la brucelosis bovina por medio de la prueba de sero-aglutinación en placa, en las ganaderías de la parroquia San Antonio, del cantón Chone. Doctoral Thesis, Universidad de Portoviejo, Ecuador, 110 p.
- NIETO E., 1981. Investigación y diagnóstico de brucelosis en las ganaderías bovinas de los cantones Santa Rosa y Arenillas de la provincia de El Oro, mediante la prueba de ring test. Doctoral Thesis, Universidad de Guayaquil, Ecuador, 95 p.
- OIE. (2016a). CHAPTER 2.1.4 Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. mellitensis* and *B. suis*). Retrieved July 20, 2016, from http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf
- OIE. (2016b). WAHIS Interface. Retrieved July 20, 2016, from http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalpopulation
- OLLEAGUE O., 1969. Determinación de la incidencia de la brucelosis por medio de la prueba “ring test”, en las ganaderías de la provincia de El Oro. Doctoral Thesis, Universidad Estatal de Guayaquil, Ecuador, 60 p.
- Órgano del Gobierno Del Ecuador. Registro Oficial, Pub. L. No. 31 de Marzo - 409 (1981). Ecuador.
- Órgano del Gobierno Del Ecuador. Registro Oficial, Pub. L. No. 10 de Agosto 1008 (1996). Ecuador.

- ORTIZ F., 1962. Investigación de la brucelosis caprina en la provincia del Guayas. Doctoral Thesis, Universidad Estatal de Guayaquil, Ecuador, 33 p.
- PLAZA L., 1970. Diagnóstico del aborto de Bang en el ganado vacuno de los cantones Chone, Rocafuerte y Bolívar. Doctoral Thesis, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 145 p.
- PLAZA J., 1977. Diagnóstico de brucelosis bovina en la población del cantón Puján, provincia de Manabí, mediante la prueba de sero-aglutinación en placa. Doctoral Thesis, Universidad de Guayaquil, Ecuador, 61 p.
- PAPPAS G., AKRISTIDIS N., BOSILKSVSKI M., TSIANOS E., 2005. Brucellosis. The New England Journal of Medicine, **352**: 2325 – 2336.
- POUILLOT R., GARIN-BASTUJI B., GERBIER G., COCHE Y., CAU C., DUFOUR B., MOUTOU F., 1997. The Brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis. Veterinary Research, **28**: 365-374.
- QUINDE P., 1959. Diagnóstico de la brucelosis bovina de la hoya de Loja. Doctoral Thesis, Universidad Nacional de Loja, Ecuador, 63 p.
- RADOSTITS O.M., 2001. Herd Health – Food Animal Production Medicine. W.B. Saunders Company, New York.
- REGISTRO OFICIAL, 1981. Órgano del Gobierno Del Ecuador. Quito, 31 de Marzo de 1981. Número 409.
- REGISTRO OFICIAL, 1996. Órgano del Gobierno Del Ecuador. Quito, 10 de Agosto de 1996. Número 1.008.
- RIVADENEIRA R., 1980. Diagnóstico de la brucelosis bovina en las ganaderías lecheras del cantón Cuenca, provincia del Azuay, mediante los métodos “ring-test” sero-aglutinación en placa. Doctoral Thesis, Universidad de Guayaquil, Ecuador, 56 p.
- RIVADENEIRA B., 1981. Brucelosis y tricomoniasis bovina en el valle del Upano. Doctoral Thesis, Universidad Central del Ecuador, Ecuador, 47 p.
- ROBALINO A., 1966. Diagnóstico e Incidencia de brucelosis porcina en animales sacrificados en el camal municipal de Quito. Doctoral Thesis, Universidad Central del Ecuador Ecuador, 45 p.
- SAEGERMAN C., VO T.-K.O., DE WAELE L., GILSON D., BASTIN A., DUBRAY G., FLANAGAN P., LIMET J.N., LETTESON J.- J., GODFROID J. 1999. Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. Veterinary Research, **145**: 214-218.

- SAEGERMAN C., DE WAELE L., GILSON, D., GODFROID J., THIANGE P., MICHAEL P., LIMBOURG B., VO T.K.-O., LIMET J., LETESSON J-J., BERKVENNS D., 2004. Evaluation of tree serum i-ELISA using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Microbiology*, **100**: 91-105.
- SAEGERMAN C., BERKVENNS D., GODFROID J., WALRAVENS K., 2010. Chapter 77: Bovine brucellosis. *In: Infectious and Parasitic Disease of Livestock*. Lavoisier et Commonwealth Agricultural Bureau – International (ed.), France, p. 971-1001.
- SALDAÑA H., 1973. Incidencia de brucelosis bovina en el cantón Cuenca, por las pruebas del anillo y suero-aglutinación. Doctoral Thesis, Universidad Central del Ecuador, Ecuador, 25 p.
- SALTOS J.M., SALTOS J.E., 2001. Prevalencia de brucelosis en los hatos bovinos del catón San Vicente, mediante la prueba de suero-aglutinación macroscópica en placa rápida durante los meses de junio a octubre del 2001. Doctoral Thesis, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 133 p.
- SÁNCHEZ P., 1997. Diagnóstico de brucelosis caprina, en el catón Santa Isabel, mediante el método de aglutinación en placa, año 1996. Doctoral Thesis, Universidad de Cuenca, Ecuador, 108 p.
- SANTILLÁN F., 1971. Investigación sobre la presencia de brucelosis, mediante la prueba de “ring test” en las ganaderías de la provincia de Esmeraldas. Doctoral Thesis, Universidad Estatal de Guayaquil, Ecuador, 45 p.
- SEGARRA G., 1971. Investigación de brucelosis en bovinos de Loja, por los métodos de “Ring test” y Huddleson. Doctoral Thesis, Universidad Nacional de Loja, Ecuador, 45 p.
- TAPIA N., 1988. Prevalencia de brucelosis caprina en el área “Centro Loja”. Doctoral Thesis, Universidad Nacional de Loja, Ecuador, 105 p.
- THIMN B.M., 1982. Brucellosis in South America. *In: Brucellosis, Distribution in Man, Domestic and Wild Animals*. Spiringer-Verlag, New York, p. 31-34.
- TOBAR A., 1961. Estudio de la infección brucelar en ovinos, caprinos y porcinos sacrificados en el camal municipal de Quito. Doctoral Thesis, Universidad Central del Ecuador, Ecuador, 115 p.
- TORRES H., 2008. Control de Brucelosis Bovina – Programa Nacional. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), Servicio Ecuatoriano de Saniadad Agropecuaria (SESA). Quito, Ecuador, p. 30.

- VALDEZ I., BAZURTO Z., VERA Z., 2000. Diagnóstico de brucelosis en los hatos bovinos del cantón San Vicente, mediante prueba de suero-aglutinación macroscópica en placa rápida. Monografía Técnica, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 52 p.
- VALDIVIESO C., 1969. Determinación de la incidencia de brucelosis por medio de la prueba de sero-aglutinación en placa, en las ganaderías de la zona de Machala. Doctoral Thesis, Universidad Estatal de Guayaquil, Ecuador, 45 p.
- VÁSCONEZ-LÓPEZ E., 1960. Incidencia de la brucelosis en leches que se consumen en el cantón Quito, determinado por la prueba de “ring test”. Doctoral Thesis, Universidad Central del Ecuador, Ecuador, 171 p.
- VERA R., FLORES L., 2004. Diagnóstico y prevalencia de brucelosis mediante ring test en los hatos bovinos del cantón Chone en el año 2004. Doctoral Thesis, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 70 p.
- VIDAL L., 1992. Diagnóstico de brucelosis en los bovinos en las parroquias de Tarqui y Victoria del Portete. Doctoral Thesis, Universidad de Cuenca, Ecuador, 106 p.
- ZAMBRANO I., 1978. Investigación de brucelosis en caninos mediante el método de sero-aglutinación en placa en el cantón Rocafuerte. Doctoral Thesis, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 73 p.
- ZAMBRANO A., CEDEÑO N., 1995. Prevalencia de brucelosis bovina en el cantón El Carmen, zona Suma – Pedernales, por el método de suero-aglutinación. Doctoral Thesis, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, 76 p.
- ZAMBRANO M., 2002. Actividad realizada en el laboratorio agropecuario de la ULEAM, extensión en El Carme, exámenes coproparasitarios – brucelosis – hematozoarios en las diferentes zonas del cantón El Carmen. Informe de Actividades. Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, intención en El Carmen, Ecuador, 67 p.

OBJECTIFS

L'objectif général de cette thèse est de générer de l'information utile pour améliorer la connaissance de l'épidémiologie de la brucellose bovine en Equateur, de son impact sur la santé publique et des facteurs de risques associés à la maladie. Ces connaissances permettront le développement d'outils d'aide à la décision pour les organismes officiels en charge de la prévention et du contrôle de la maladie. Pour atteindre cet objectif général, quatre objectifs spécifiques ont été fixés par rapport à la brucellose animale et humaine dans la région nord-ouest de l'Equateur.

Dans un premier temps, l'information disponible sur la brucellose animale et humaine en Equateur a été recherchée, rassemblée et analysée sous la forme d'une revue de la littérature afin d'établir la situation actuelle de la brucellose en Equateur (**Objectif 1**; Article 1).

Dans un deuxième temps, des études épidémiologiques ont été menées chez les bovins et les chèvres (deux compartiments animaux), pour caractériser l'agent causal et déterminer la prévalence réelle de la brucellose dans ces réservoirs animaux et estimer la sensibilité et la spécificité des tests de diagnostic utilisés (**Objectif 2**; Articles 2 et 3). Par ailleurs, l'importance zoonotique de la brucellose en Equateur a également été investiguée (**Objectif 3**; Articles 4 et 6)

Dans un dernier temps, des lignes directrices sont proposées comme des fondements pour l'élaboration d'une stratégie de surveillance épidémiologique efficace des brucelloses bovine et humaine, adaptée aux conditions de la région nord-ouest de l'Equateur. (**Objectif 4**; Discussion générale).

SECTION EXPÉRIMENTALE

SECTION EXPÉRIMENTALE

Partie 1: Estimation de la sensibilité et la spécificité des tests de diagnostic et estimation de la prévalence réelle de la brucellose bovine dans le nord de l'Équateur

Prélèvement de sang chez les bovins



Source: Jorge Ron-Román
Cantón Espejo, provincia del Carchi – Ecuador
2012

ARTICLE 2

Bovine brucellosis in North-West Ecuador: typing of
Brucella spp., seroprevalence, and associated risk
factors.

J. Ron-Román, L. Ron-Garrido, C. Saegerman, A. Angulo-Cruz, A. Tufiño-Acosta,
Freddy Proaño-Pérez, María-Augusta Chávez-Larrea, W. Benítez-Ortíz,
J. Brandt & D. Berkvens.

Article soumis pour publication :

PLOS Neglected Tropical Diseases

Préambule

Les nombreux tests existants permettant de confirmer le diagnostic de brucellose chez l'animal sont non seulement liés à l'importance zoonotique de la maladie mais aussi aux problèmes qui persistent quant à la fiabilité des résultats, principalement en termes de sensibilité (Se) et de spécificité (Sp). A ce jour, il n'existe aucun test sérologique "gold standard". L'utilisation des résultats de tests imparfaits ne peut donner une appréciation réelle de la situation épidémiologique que s'ils sont combinés à une information *a priori*, dans le cadre d'un modèle basé sur le théorème de Bayes.

Résumé en français

Afin d'obtenir des informations épidémiologiques fiables sur la prévalence réelle de la brucellose bovine par zone (zone1=Sierra et zone2=Costa) et par province (Pichincha, Imbabura, Carchi, Esmeraldas et Manabí), ainsi que sur la performance des tests utilisés pour diagnostiquer la maladie en Equateur, une étude transversale a été menée entre 2005 et 2009 dans le nord-ouest de l'Equateur. Les résultats des tests sérologiques (n=3332) au rose bengale (RB), à la séroagglutination lente en tube en présence d'EDTA (SAT-EDTA), et au test immuno-enzymatique indirect (iELISA) ont été combinés à des informations *a priori* (avis d'experts) dans un contexte bayésien, lequel a pris en compte la possible dépendance conditionnelle entre les tests.

La prévalence réelle estimée était de 2,2%, tandis que les Se et Sp étaient les suivantes, pour chaque test: Se=84% et Sp=98% pour le RB, Se=85% et Sp=99% pour le SAT-EDTA et Se=89% et Sp=97 pour le test iELISA. Les facteurs de risque tels que le sexe (OR=3,91 pour les femelles), l'âge (OR=3,14 pour la classe des 25 à 60 mois), la zone (OR=4,19 pour la zone 1) et la province (OR=6,62 dans la province de Pichincha) ont été mis en évidence grâce à une enquête épidémiologique diligentée lors de la prise des échantillons. L'étude a mis en évidence que la différence de prévalence entre les zones d'échantillonnage ne se situait pas au niveau des fermes (21,89% dans la zone 1 et 25,17% dans la zone 2), mais étaient surtout liées à la prévalence intra-troupeau (12,46% dans la zone 1 et 3,28% dans la zone 2).

Brucella abortus biovar 1 et 4 a été isolée à partir du lait d'animaux ayant présenté des résultats fortement positifs (n=13). Elle a présenté des caractéristiques particulières, à

savoir l'inhibition de croissance en milieu coloré avec fuchsine (20 mg/ml) et safranine (100 µg/ml).

Les informations recueillies dans le cadre de cette étude pourraient servir de base pour les futurs programmes de contrôle et d'éradication de la brucellose en Equateur, spécialement en contextualisant les mesures prophylactiques et l'épidémiologie selon les particularités régionales et provinciales.

Bovine brucellosis in north-western Ecuador: seroprevalence, identification of circulating *Brucella* spp. and risk factors

Jorge Ron-Román^{1,2,3,4}, Lenin Ron-Garrido¹, Claude Saegerman³, David Fretin⁵, Alexandra Angulo-Cruz¹, Andrés Tufiño-Acosta¹, María-Augusta Chávez-Larrea^{1,6}, Freddy Proaño-Pérez^{1,6}, Washington Benítez-Ortíz^{1,7}, Marie-France Humblet⁸, Jef Brandt², Dirk Berkvens^{2*}.

¹ Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), Universidad Central del Ecuador, Quito Ecuador.

² Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp - Belgium.

³ Research Unit of Epidemiology and Risk analysis applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULg), Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Belgium.

⁴ Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. Sangolquí, Ecuador.

⁵ Department of Bacteriology and Immunology, Veterinary and Agrochemical Research Centre, Brussels - Belgium.

⁶ Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. Sangolquí, Ecuador.

⁷ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito - Ecuador.

⁸ Department for Occupational Safety and Health, Biosafety and Biosecurity Unit, University of Liege, Belgium.

* Corresponding author: Dirk Berkvens, Institute of Tropical Medicine, Department of Animal Health, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerp, Belgium; tel: +32 3 2476393; fax: +32 3 2476268; e-mail: dberkvens@itg.be

Summary

In order to collect reliable epidemiological information on true bovine brucellosis prevalence per area (1: Sierra [mountain], and 2: Costa [Coast]) and per province (Pichincha, Imbabura, Carchi, Esmeraldas y Manabí), as well as the performance of diagnostic tests, a transversal study was performed between 2005 and 2009 in northwestern Ecuador. Results of serological tests (n= 3,332), i.e. Rose Bengal (RB), Slow Agglutination Test with EDTA (SAT-EDTA) and indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (iELISA), were combined with *a priori* information (expert opinion) in a Bayesian approach, taking into account possible conditional dependence between the tests. The estimated prevalence was 2.2% and sensitivity (Se) and specificity (SP) were as follows: Se=84%, Sp=98% for RB; Se=85%, Sp=99% for SAT-EDTA; Se=89%, Sp=97% for iELISA.

The following risk factors were identified: sex (OR=3.91 for females), age (OR=3.14 for animals aged between 25 and 60 months), area (OR=4.19 for area 1) and province (OR=6.62 for Pichincha). The study highlighted that the difference observed between sampling areas was not related to herd prevalence (21.89% in area 1 vs. 25.17% in area 2), but rather to individual prevalence (12.46% in area 1 and 3.28% in area 2). *Brucella abortus* biotype 4 was isolated in milk (n = 13 animals) in large numbers, while its growth was inhibited in media coloured with basic fuchsin (20 µg/ml) and safranin (100 µg/ml).

The important information provided by our study should pave the way to future programmes of brucellosis control and eradication in Ecuador. Prophylaxis and epidemiological surveillance should be adapted to regional and provincial specificities.

Keywords: Ecuador, bovine brucellosis, risk factors, *Brucella abortus* biotype 4, Bayesian approach, Diagnostic tests, True prevalence.

Introduction

In Ecuador, a small country of South America, cattle husbandry is the second most important sector contributing to the national economic development, behind oil exportation; this activity is mainly located in rural areas, as reflected by the number of cattle (close to 4.5 million) and of agricultural production units (APU), approaching 1 million (INEC, MAG, and SICA 2000). Nevertheless, Ecuadorian cattle husbandry faces productive and reproductive concerns, as evidenced, for example, by the high rate of abortions (INEC, MAG, and SICA 2000). Brucellosis is one of the main causes of abortion, infertility and reduced animal production; the disease can hinder the economic development of a country, as it directly affects food security of most vulnerable populations. Brucellosis is a disease caused by bacterial species belonging to the genus *Brucella* spp. (OIE 2016a). Even if several nations (especially developed countries) achieved its eradication, it is still considered as the most widely distributed zoonosis worldwide, as referred to by international organisms such as the World Health Organization (WHO), the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the World Health Animal Organization (OIE) (Pappas et al. 2006; Saegerman et al. 2010; Godfroid, Nielsen, and Saegerman 2010; OIE 2016a). The disease affects several animal species, which play a role as natural reservoir; they are the sole source of infection for humans. Transmission routes are: direct contact with infected animals and indirect contact through the consumption of contaminated animal products (Rivera et al. 2003).

The importance of the disease is related on one hand to the severity of the human cases and on the other hand to its economic consequences. For example, in the United States, the treatment of a patient suffering from brucellosis without severe complications was estimated at 340 USD vs. 4,095 USD for patients developing severe complications (Gil and Samartino 2001).

In natural reservoirs, the disease results in abortions and retained placenta, epididymitis, orchitis, reduced milk production and bursitis (FAO and OMS 1986; Corbel 2006). Economic losses are not only associated with the negative impact on cattle husbandry due to clinical cases, but also with trade restrictions of animals and their products (Acha and Szyfres 2003). Owing to its consequence in public health, economy and food security (Nicoletti 2001; Memish and Balkhy 2004; Doganay et al. 2003) measures are

implemented all around the world for its control and eradication. These may be: complete or partial vaccination of animals, direct or indirect diagnosis of the disease and slaughter of infected animals (Corbel 2006; Godfroid, Nielsen, and Saegerman 2010; Saegerman et al. 2010; OIE 2016a; Olsen and Stoffregen 2005). Programmes implemented in developing countries face specific problems such as vaccine quality, management and unreliable results of diagnostic tests, but also a lack of national policy regarding vigilance and epidemio-surveillance of the zoonosis. Even if it is well accepted that *Brucella* spp. isolation and typing is the reference test for diagnosis, the lack of laboratories equipped appropriately and of staff sufficiently trained for handling such high-risk pathogen impair its routine application. Currently, direct (PCR) and indirect diagnostic tests (based on humoral immunity) are performed worldwide, advocated for their high sensitivity and specificity (Ouahrani-Bettache, Soubrier, and Liautard 1996; Nielsen 2002; Yu and Nielsen 2010). Unfortunately, as far as Ecuador is concerned, the localised character of the studies performed to date, the use of insensitive diagnostic tests and the absence of a policy for cattle vaccination (Ron-Román et al. 2014) have seriously hampered the assessment of the true situation of the disease. This step is the first one towards implementing future programmes of disease control and eradication.

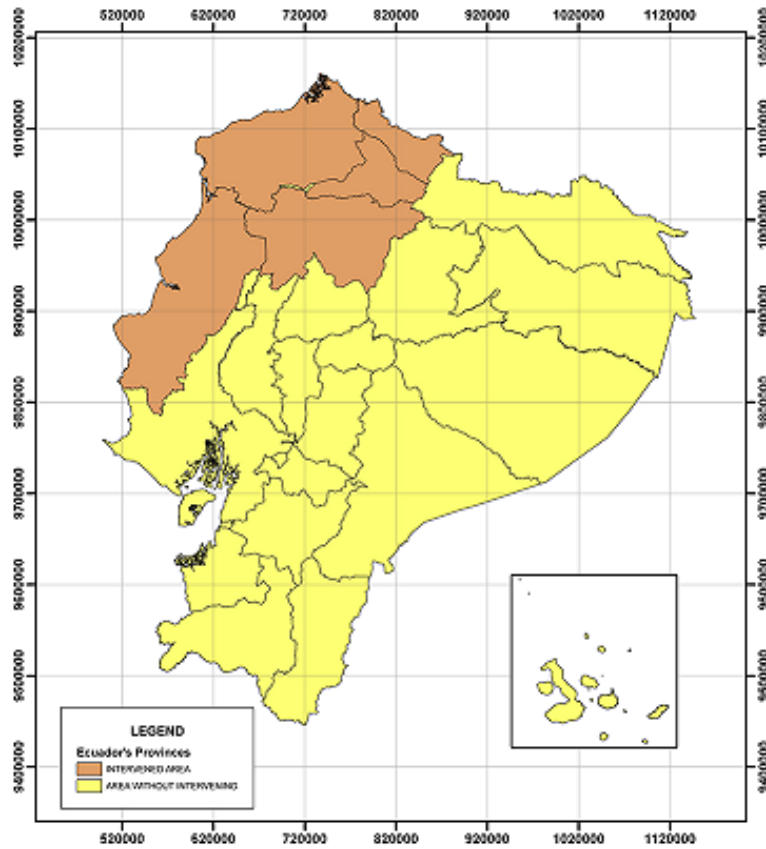
The aims of the present study were: (i) to describe the occurrence of cattle brucellosis in north-western Ecuador, (ii) to estimate its real prevalence as well as the diagnostic characteristics of the tests used and lastly (iii) to isolate and type *Brucella* spp. circulating in the area of study.

Materials and methods

Type of study and targeted geographic area

A transversal study was performed between 2005 and 2009 in five provinces of north-western Ecuador (Figure 1). Unvaccinated cattle (N = 3,332 animals) belonging to 344 animal production units (APUs) located in two climatically distinct geographic areas: the Mountain area (zone 1), which included Pichincha, Imbabura and Carchi provinces, and the Coast (zone 2), including Esmeraldas and Manabí provinces, as well as parts of Pichincha and Imbabura provinces.

Fig. 1: Study area



Cattle sampling

In Ecuador, extensive cattle husbandry predominates, but differences are observed between geographical regions (Figure 2.1 and 2.2 shows the cattle numbers and density distributions in Ecuador). In zone 2 (Coast), large dairy herds are maintained in vast properties where animals are not monitored daily. In contrast, in zone 1 (Mountain), even if husbandry is also extensive, each animal (mainly from dairy herds) is monitored daily, especially for what calving, mating/artificial insemination and vaccination are concerned. Blood was sampled in vacutainer tubes (10cc) from the caudal or jugular vein. Each sample was centrifuged, thereafter serum was distributed in two Eppendorf tubes (2 cc), each tube being identified and conserved at a temperature of -20°C until further analysis. Cattle were *Bos taurus* type in zone 1 and *Bos indicus* type in zone 2.

Fig. 2.1: Cattle population per canton

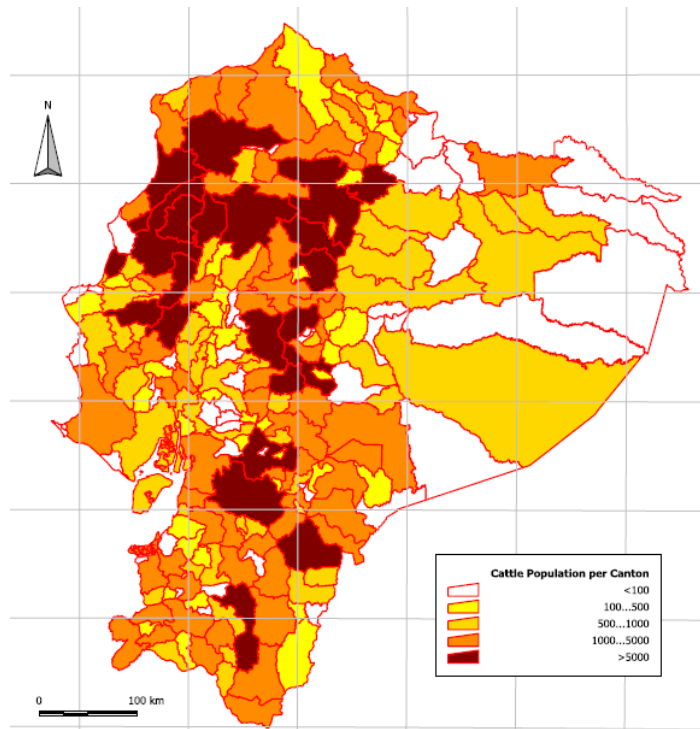
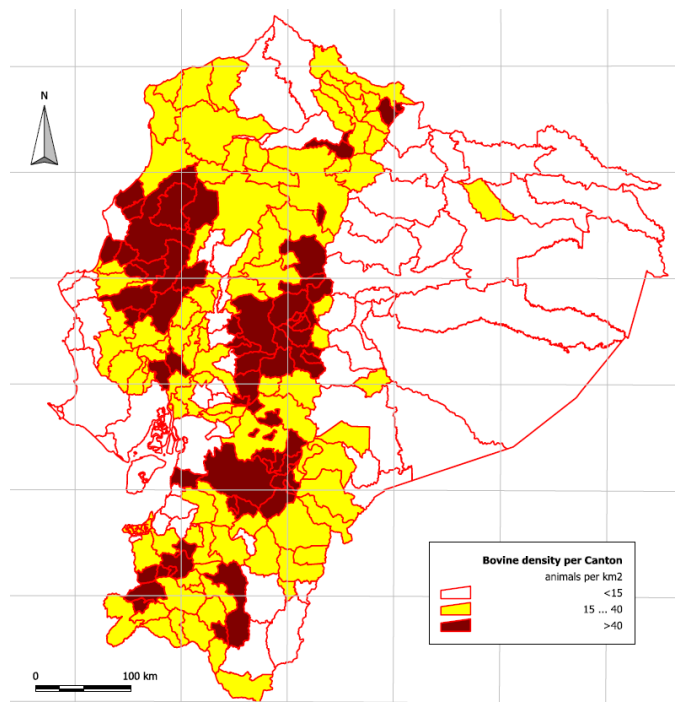


Fig. 2.2: Cattle density per canton



Analysis of blood samples

Three diagnostic tests were applied to detect antibodies against *Brucella* spp. in the samples: Rose Bengal plate agglutination test (RB), Slow Agglutination Test carried out with EDTA (SAT-EDTA), and indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (iELISA). Tests were performed as described by the manufacturer recommendations and in OIE guidelines (Alton et al. 1988; Limet et al. 1988; OIE 2016a).

Isolation and identification of *Brucella* spp.

In order to isolate the bacteria in milk, 50 cc-samples from 52 animals highly positive to at least one diagnostic test were centrifuged at 2,000 g during 15 minutes. Fractions of sediment and cream were sampled with a sterile swab and placed on selective Farrell culture medium (Columbia Agar Base [OXOID CM0331] with 5% heat inactivated horse serum [GIBCO Ref 16050-130] and *Brucella* Selective Supplement [OXOID SR0083A]). Suspect colonies were sub-cultured in a BASE medium (Columbia Agar Base with 5% horse serum, heat inactivated). The identification of *Brucella* was achieved through performing the following tests: gross observation of colonies, direct microscopic observation on slide, Gram staining, oxidase [DIFCO-BBL Ref 261181], catalase and urease. Procedures followed protocols previously described (Alton et al. 1988; Godfroid and Boelaert 1995).

Molecular identification of *Brucella* spp.

Colonies identified as being *Brucella* spp. through biochemical tests underwent two molecular tests (PCR): PCR IS6501 or PCR-IS711 (Primers: IS6501 3': 5'-gat-aga-agg-ctt-gaa-gct-tgc-gga-c-3'/IS6501 5': 5'-acg-ccg-gtg-tat-ggg-aaa-ggc-ttt-t-3') and Real-time PCR Bcsp31 (Primers: BCSP31F ctc-ggt-tgc-caa-tat-caa-tgc; BCSP31R ggg-taa-agc-gtc-gcc-aga-ag-, BCSP31sonde aaa-tct-tcc-acc-ttg-ccc-ttg-cca-tca).

Statistical analyses

At first, seroprevalence of the disease per APU, province and region were determined. An animal was considered seropositive when at least one test result was positive (parallel interpretation). An APU was considered positive when it contained at least one positive animal. The possible influence of several criteria, such as sex, age, province and region was investigated through a univariate analysis using a random effects logistic regression (APU as random effect). Variables identified as having a significant

effect in the univariate analysis were further tested in a multivariate model, also using a random effects logistic regression. Secondly, the true prevalence of the disease was estimated by means of a Bayesian analysis, taking into account the characteristics of diagnostic tests (sensitivity [Se] and specificity [Sp]) used in the study and allowing for the presence of conditional dependence (Berkvens et al. 2006; Lesaffre, Speybroeck, and Berkvens 2007). Statistical analyses were performed using R (<https://www.r-project.org>), WinBUGS (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/>) and Stata/MP 14.1 (StataCorp., 2015).

Results

A total of 3,332 bovines (mean age = 41.4 months old; range 1 to 180 months old) were sampled in north-western Ecuador. Animals sampled in Zone 1 (Mountain) represented 38.78% of the total (1,292/3,332), and belonged to 201 APUs (58.42%), while 61.22% of animals (2,040/3,332) originated from 143 APUs located in Zone 2 (Coast). A summary of the data is given in Table 1.

A total of 228 animals (i.e. 6.84%) tested positive to at least one of the three tests (RB, SAT-EDTA and iELISA). The numbers of positive test results are shown in Table 2.

Using a Bayesian framework, the true prevalence was estimated as 2.2%. Sensitivity and specificity of each test were calculated as well (RB [Se=0.84; Sp=0.98], SAT-EDTA [Se=0.85; Sp=0.99] and iELISA [Se=0.89; Sp=0.97]) (Table 3). Comparative results of the three tests are presented in Tables 4.1, 4.2 and 4.3.

The univariate analysis of the seroprevalence allowed identification of a significant effect of sex ($p < 0.01$ OR= 3.91 for females versus males; CI: 2.26-6.78) and age (group 2 [25 to 60 months; $p < 0.01$; OR=3.14; CI: 2.07-4.77] and group 3 [> 60 months; $p < 0.01$; OR=2.66; CI: 1.75-4.04] versus animals <24 months). Prevalence, CI and OR, as well as the number of positive animals, are summarised in Table 5.1 for each variable of study.

Table 1: Bovine brucellosis in north-western Ecuador; distribution of APUs and animals, as well as analysis of risk factors (Part 2: zones of study and provinces)

Parameter	Sample			Positive [†]			CI (%)	Odds ratio
Province	N	%	Mean*	N	%	Mean*		
Zone 1 (APUs)	201	58.42	-	44	21.89	-	(16.38 – 28.25)	-
Zone 1 (animals)	1292	38.78	6.43	161	12.46	3.66	(8.37 – 16.54)	-
Carchi (APUs)	81	23.55	-	14	17.28	-	(9.78 – 27.30)	-
Carchi (animals)	418	12.55	5.16	24	5.74	1.71	(2.18 – 9.29)	-
Imbabura 1 (APUs)	90	26.16	-	15	16.67	-	(9.63 – 26.00)	0.95 (0.43 – 2.12)
Imbabura 1 (animals)	540	16.21	6.0	41	7.59	2.73	(3.33 – 11.85)	1.35 (0.55 – 3.28)
Pichincha 1 (APUs)	30	8.72	-	15	50.00	-	(31.30 – 68.70)	4.78 (1.91 – 11.99)
Pichincha 1 (animals)	334	10.02	11.13	96	28.74	6.40	(19.37 – 38.12)	6.62 (2.99 – 14.65)
Zone 2 (APUs)	143	41.58	-	36	25.17	-	(18.29 – 33.11)	1.20 (0.70 – 2.05)
Zone 2 (animals)	2040	61.22	14.27	67	3.28	1.86	(2.00 – 4.58)	0.24 (0.16 – 0.36)
Esmeraldas (APUs)	48	13.95	-	6	12.5	-	(4.73 – 25.25)	0.68 (0.24 – 1.91)
Esmeraldas (animals)	420	12.61	8.75	7	1.67	1.17	(0.17 – 3.17)	0.28 (0.09 – 0.85)
Manabí (APUs)	26	7.56	-	14	53.85	-	(3.34 – 73.41)	5.58 (2.13 – 14.61)
Manabí (animals)	409	12.27	15.73	24	5.87	1.71	(3.68 – 8.05)	1.02 (0.48 – 2.19)
Imbabura 2 (APUs)	41	11.92	-	2	4.90	-	(0.6 – 16.53)	0.24 (0.05 – 1.13)
Imbabura 2 (animals)	620	18.61	15.12	2	0.32	1.0	(0.00 – 0.7)	0.05 (0.01 – 0.25)
Pichincha 2 (APUs)	28	8.14	-	14	50.00	-	(30.64 – 69.35)	4.78 (1.87 – 12.23)
Pichincha 2 (animals)	591	17.74	21.11	34	5.75	2.43	(2.19 – 9.31)	1.00 (0.40 – 2.51)
Total (APUs)	344	100	-	80	23.26	-	(18.90 – 28.10)	
Total (animals)	3332	100	9.69	228	6.84	2.85	(4.83 – 8.85)	

Mean*=mean number of animals per APU (sampled or positive)

[†] An animal is considered positive when at least one test result was positive (i.e. parallel interpretation)

Table 2: bovine brucellosis in north-western Ecuador: results of the three immunological tests

RB	SAT	iELISA	N
-	-	-	3,104
+	-	-	50
-	+	-	28
-	-	+	70
+	+	-	5
+	-	+	8
-	+	+	7
+	+	+	60
Total			3,332

RB: Rose Bengal; **SAT-EDTA:** Wright's Slow Agglutination Test with EDTA; **iELISA:** indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Table 3: Bovine brucellosis in north-western Ecuador: Bayesian analysis statistics and estimation of prevalence and test characteristics of the three immunological tests

Statistic	Bayes-p	0.49	
	DIC	47.489	
	pD	6.289	
Prevalence	0.022 (0.013 – 0.031)		
	RB	SAT-EDTA	iELISA
Sensitivity	0.84 (0.68 – 0.97)	0.85 (0.65 – 0.99)	0.89 (0.81 – 0.99)
Specificity	0.98 (0.97 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)	0.97 (0.97 – 0.98)

Bayes-p: posterior predictive check probability, **DIC:** Deviance Information Criterion; **pD:** number of parameters estimated; **RB:** Rose Bengal; **SAT-EDTA:** Wright’s Slow Agglutination Test; **iELISA:** indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay
In brackets: Bayesian credibility intervals

Table 4.1: bovine brucellosis in north-western Ecuador; contingency tables between RB and SAT-EDTA

SAT-EDTA	RB		Total
	Negative	Positive	
Negative	3,174	58	3,232
Positive	35	65	100
Total	3,209	123	3,332

RB: Rose Bengal; **SAT-EDTA:** Wright’s Slow Agglutination Test

Table 4.2: bovine brucellosis in north-western Ecuador; contingency tables between RB and iELISA)

iELISA	RB		Total
	Negative	Positive	
Negative	3,132	55	3,187
Positive	77	68	145
Total	3,209	123	3,332

RB: Rose Bengal; **iELISA:** indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Table 4.3: bovine brucellosis in north-western Ecuador; contingency tables between iELISA and SAT-EDTA

SAT-EDTA	iELISA		Total
	Negative	Positive	
Negative	3,154	78	3,232
Positive	33	67	100
Total	3,187	145	3,332

SAT-EDTA: Wright’s Slow Agglutination Test;
iELISA: indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Table 5.1: Bovine brucellosis in north-western Ecuador; distribution of samples and analysis of risk factors (Part 1: sex and age groups)

Parameter	Sample		Positive		% (95%CI)	p-value	Odds ratio
	Number	%	Number	%			
Sex						<0.01	-
Male	607	18.22	13	2.14	(1.24 – 3.67)	-	-
Female	2,725	81.78	215	7.89	(4.71 – 12.92)	-	3.91 (2.26 – 6.78)
Age group						<0.01	-
< 24 months	1,191	35.74	39	3.27	(2.40 – 4.45)	-	-
25 to 60 months	1,257	37.73	121	9.63	(5.07 – 17.5)	-	3.14 (2.07 – 4.77)
> 60 months	654	19.63	54	8.26	(3.91 – 16.59)	-	2.66 (1.75 – 4.04)

At APU level, no significant difference was observed between the two areas of study ($p > 0.05$). At animal level, a significant difference ($p < 0.01$) was observed between them, with a 4.19 OR (95% CI: 2.76-6.36) in zone 1 (Mountain) compared to zone 2. When considering Carchi province as a reference, the following four areas can be discerned (refer to Table 1 for OR and CI): (i) Carchi and Imbabura 1 are identical at APU and animal levels; (ii) Pichinchi 1 has OR significantly above one at both APU and animal levels; (iii) Esmeraldas and Imbabura 2 have OR significantly below one at animal level (no difference at APU level) and (iv) Manabi and Pichincha 2 have OR significantly above one at APU level (no difference at animal level).

The multivariate analysis is formally summarised in Table 5.2 allowing ranking of provinces according to the seroprevalence at animal level (females only) and APU level.

Table 5.2 Parallel Animal-level and farm-level seroprevalence (Females only)

Province	Animal-level		Farm-level	
	Prevalence	Rank	Prevalence	Rank
Carchi	0.067	b	0.184	b
Esmeraldas	0.021	bc	0.127	b
Imbabura 1	0.080	b	0.147	b
Imbabura 2	0.002	c	0.024	b
Manabi	0.068	b	0.538	a
Pichincha 1	0.310	a	0.636	a
Pichincha 2	0.061	bc	0.481	a

Thirteen bacterial isolations were performed through culture of milk samples. They were identified as *Brucella abortus* biovar 1 and 4 based on microbiological tests (gross observation, microscope observation and biochemical tests) and molecular analyses

(PCR-IS711 and PCR-Bcsp31). The mean age of females (n=13) of which *Brucella* spp. was isolated in milk, was 59.69 months (range 36-96 months). Ten cows out of 13 (76.92%) aborted. Cow n#2873 never gave birth to a live calf, but aborted three times during her 60 months of life. These animals were originating from 7 APUs, located in the cantons of Cayambe (N=1), Tulcán (N=3) and Quito (N=9), Pichincha and Carchi provinces (Zone 1-mountain).

Discussion

The objectives of our study were to estimate the true prevalence of bovine brucellosis in north-western Ecuador, as well as the characteristics (sensitivity [Se] and specificity [Sp]) of the following diagnostic tests: Rose Bengal (RB), Slow Agglutination Test with EDTA (SAT-EDTA) and indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (iELISA). Only cattle confirmed as not vaccinated were included in the study. Results of diagnostic tests were used for the Bayesian analysis. Furthermore, isolation and molecular typing of the causing agent circulating in the areas of study were performed.

Microbiological characterization of colonies remains the most specific test for the diagnosis of brucellosis (Bricker 2002). Nevertheless, due to difficulties and risks associated with performing this test in the Ecuadorian context, other options should be privileged: detection of antibodies offers possibilities for the diagnosis of bovine brucellosis. The lack of a gold standard for diagnosing animal brucellosis entails the use of an imperfect test, which automatically implies the estimation of a number of variables in excess of the number of degrees of freedom available. The analysis must proceed in a Bayesian framework, allowing the estimation of the true prevalence and the characteristics of diagnostic tests by combining *a priori* knowledge on parameters (published information or expert opinion) with the data collected experimentally (Enøe, Georgiadis, and Johnson 2000; Branscum et al. 2005; Geurden et al. 2006).

In order to better understand the true status and distribution of the disease, as well as to correctly interpret diagnostic tests results, we considered age and sex of animals sampled. Cattle were confirmed as not vaccinated in order to minimize cross-reactions (Dohoo et al. 1986). Cross-reactions with other Gram negative bacteria (due to the LPS epitope) should be considered (Alton et al. 1988; Godfroid et al. 2002; Saegerman et al.

2010) and they are generally considered as important in a low prevalence context (Corbel 2006).

The apparent prevalence estimated in our study reached 6.84% (228/3,332), and was similar to the official prevalence, i.e. 4-10.62% in the mountain area vs. 5.88%-10.62% in the coastal region, estimated during the unique national sampling campaign carried out previously (MAG-SESA 1999). The majority of positive animals were identified through the combination of several tests, rather than relying on one unique imperfect test, as already mentioned before (Table 1). The diagnostic test results were combined in a parallel fashion (animal is considered to be positive if at least one test results is positive). This increases the sensitivity and decreases the specificity of the overall test, possibly explaining the high proportion of false positive results (apparent prevalence of 6.8% versus true prevalence of 2.2%).

Combining known Se and Sp of diagnostic tests (Nielsen 2002) with data collected in our study allowed us to estimate a 2.2% true prevalence and characterizing each test (Table 3). The Bayesian analysis showed that iELISA offered the highest combination of Se and Sp and thus could be the most appropriate test for the Ecuadorian context. Each diagnostic test presented disadvantages, either due to the previous treatment of samples, protocol standardisation, cut-off determination, results analysis or economic aspects. Nevertheless, iELISA can overcome these disadvantages, reason why it was proposed since long ago in countries where brucellosis remains a problem (Saravi et al. 1995). Sensitivity and Sp of our iELISA test are comparable to previous reports in Ivory Coast (Thys et al. 2005; Sanogo et al. 2013) and Bangladesh (Rahman et al. 2013). Even if the RB test appeared to be the less efficient (Se=84% and Sp=98%), it should not be totally discarded for diagnosing bovine brucellosis, as it is easily performed and read.

As previously found in other studies (Saegerman et al. 2010), females had a higher seroprevalence than males and older animals showed a higher prevalence than younger animals. Females remain longer in the herd, which probably explain our observations.

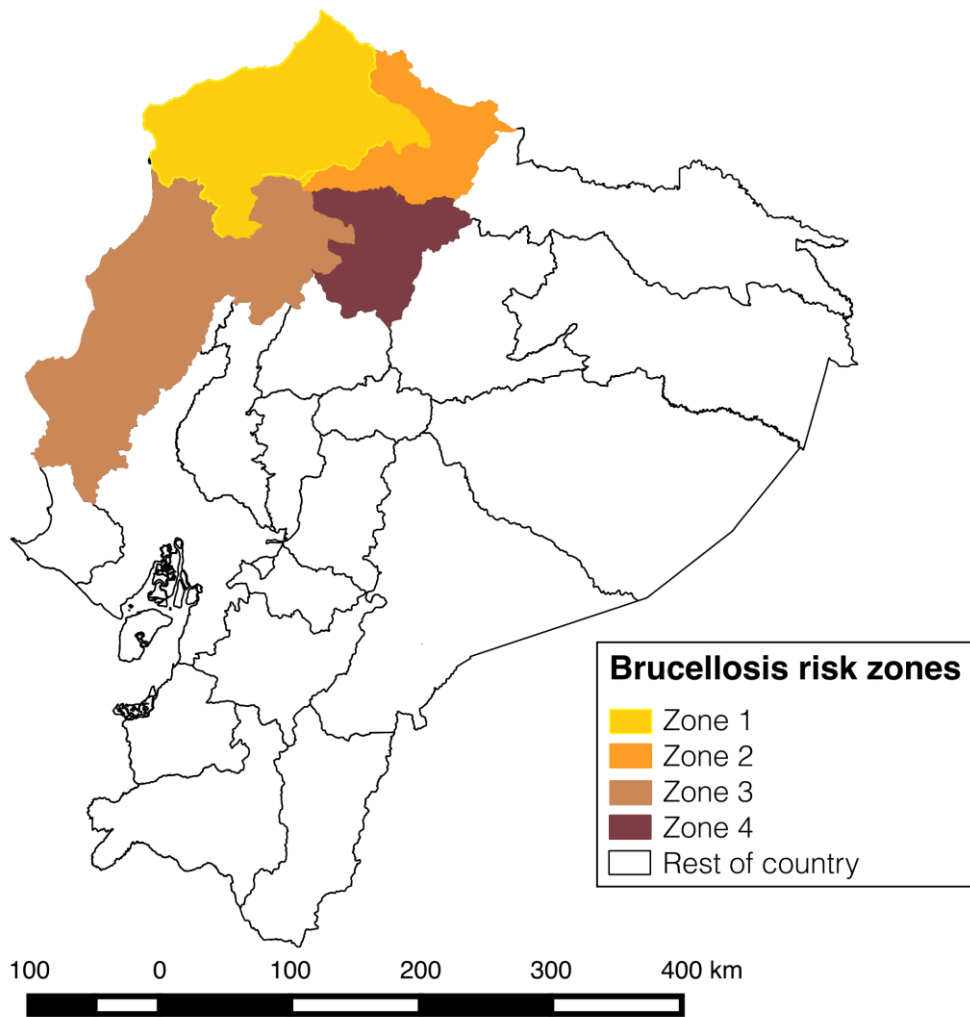
Traditionally, Ecuador is divided in three main zones (excluding the Galapagos Islands) when planning epidemiological studies on bovine brucellosis (MAG-SESA, 1999): Amazonia (not considered here because of low cattle population and low brucellosis

prevalence), Sierra (our zone 1, Mountain) and the coastal area (our zone 2, Coast). As shown in Figure 3, the original division of the study area in coastal and mountainous zones was probably not detailed enough. The differences found between the four proposed zones can possibly be explained (at least partly) by differences in herd sizes, management systems, sanitary programs on the farms, which has been reported previously by (Muma et al. 2007, Ragan 2002). Thus, it is not surprising to observe a higher prevalence at animal level in Pichincha 1, which is known for the highest average herd size (Poulsen et al. 2014). The present findings can serve as a basis for compartmentalisation and zoning of the area as proposed by OIE (2016b). However, it is at present not feasible to offer a full explanation for the differences observed at APU level and at animal level: it appears that prevalence at APU level is higher in the southern part of the study zone (Manabí and Pichincha provinces), whereas at animal level, there is a lower prevalence in the north-western part of the study zone (Esmeraldas province) and a high prevalence in the south-eastern part (Pichincha 1 province). A detailed study of animal movement (e.g. the influence of the impossibility to transport animals between Carchi and Esmeraldas provinces) is proposed.

The lack of control in animal movements between provinces and regions could be responsible for the endemic status of brucellosis in north-western Ecuador as a whole. Animal reservoirs are the primary source of infection for humans. Brucellosis appears to be present in 25% of farms in north-western Ecuador, explaining the high human antibody prevalence in the same area and period of study (2.1% in the Sierra zone *vs.* 1.4% in the Coastal zone), with slight differences observed when at province level (1.3% in Imbabura *vs.* 2.9% in Manabí) (Ron-Román et al. 2014).

Although bovine brucellosis has always been an issue in Ecuador, as reflected by the numerous studies and theses performed by different researchers, the true disease status has not been elucidated. Significant variations of prevalence were reported in cattle: 51.6% (Maldonado and Salgado 1979) using the RB test in 989 bovines (provinces of Pichincha, Imbabura, Carchi and Manabí), 0% (Vera and Flores 2004) resulting from the application of a Milk Ring Tests (MRT) on 807 milk samples from the province of Manabí, and 0% (Demera et al. 2002), based on the Huddleson agglutination test performed on 210 bovine blood samples.

Fig. 3. Farm-level and animal-level risk zone



Our study also allowed the isolation and typing the causing agent, i.e. *Brucella abortus* biovar 1 and 4. Our discovery confirmed the importance of brucellosis in cattle, and draws the attention on the ease with which bacteria can be isolated from milk samples, thereby emphasizing the serious risk for public health in Ecuador. In addition, we identified the primary source of infection in humans, as the biotype isolated in cattle, i.e. *Brucella abortus* biotype 4, which was also isolated in humans in the same area (Ron-Román et al. 2014), and in the patient had lived in Ecuador until the age of 63 years when he moved to USA (Herrick et al. 2014).

Isolating the causative agent clarified the epidemiological status of the disease and its routes of transmission, as *Brucella* species and biotypes show specificities in terms of geographic distribution and presence in animal reservoirs (Corbel 2006; Lucero et al.

2008). The isolation process reported here highlighted particular characteristics of the Ecuadorian *B. abortus* biotype 4 as it did not (or very slowly so) grow on coloured media with basic fuchsin (20 µg/ml), contrary to strains isolated in Canada and the United States (Alton et al. 1988). An unexpected observation was the lack of (or very slow) growth on coloured media with safranin (100 µg/ml). These two characteristics were also observed for *Brucella abortus* biotype 1 isolated in humans in Ecuador (Ron-Román et al. 2012), and also in cattle contrary to the assertions of Rodríguez-Hidalgo et al. 2015 (they erroneously named *B. abortus* biotype 1 as biotype 2 after isolation and Variable Number Tandem Repeat (VNTR) PCR). It is understood that our results must be confirmed (e.g.) by means of reference strains and the use of PCR-31 BCSP (real time PCR) and PCR-EN 711 (711 insertion PCR).

For many authors, abortion should not be considered as the pathognomonic sign of brucellosis. Nevertheless, in Ecuador, 53.85% of animals from which *Brucella* was isolated (7/13) had aborted at least once. Conserving animals that aborted (until 3 times), or that started their reproductive life with an abortion (Samples N[#]3135 and 3260), illustrate the ignorance of farmers with regard to brucellosis. It is surprising to observe that (Table 6) 30.6% (11/36) of the reported pregnancy ended in abortion.

Improving the knowledge on biotypes would allow a better comprehension of the disease (Roux 1979). Unfortunately, isolating bacteria is not easy, as it requires a high-security laboratory facility, which is why the number of isolates reported by a country is generally correlated to the level of development of its reference laboratories. Ecuador is no exception, as no official information is available either on the number of isolations performed or on the distribution of circulating strains. According to Thimn (1982), 794 *Brucella* isolations have been performed in 12 Latin American countries between 1965 and 1977, among them, 220 in Argentina, 160 in Mexico, 114 in Peru and 95 in Chili. Only 8 isolations were realised in Ecuador during the same period: one isolation of *B. abortus* biotype 1, 6 isolations of *B. abortus* biotype 4 and one isolation of *B. suis* biotype 1. Similarly, Lucero et al. 2008 reported that between 1968 and 2006, Ecuador only notified 3 isolations in cattle, one being *B. abortus* biotype 1 and the two others, *B. abortus* biotype 4.

Table 6: Additional information on animals in which *Brucella* spp. was isolated

Sample N°	Cow code	APU code	Zone	Province	Canton	Zootechnical information				Diagnostic test				
						Age	N calvings	N abortions	RB*	SAT-EDTA*	iELISA*	Isolation**	PCR IS711**	PCR Bcsp31**
2628	126	214	1	Pichincha 1	Cayambe	72	3	1	++	100	2.4	+	+	+
2873	U	294	1	Carchi	Tulcán	60	0	3	++	3200	3.7	+	+	+
2915	U	303	1	Carchi	Tulcán	48	2	0	++	1600	2.6	+	+	+
2917	U	303	1	Carchi	Tulcán	50	2	0	++	2560	2.8	+	+	+
3135	147	338	1	Pichincha 1	Quito	36	0	1	+	12800	4.2	+	-	+
3138	U	338	1	Pichincha 1	Quito	72	3	1	+++	800	60	+	+	+
3143	U	338	1	Pichincha 1	Quito	96	4	3	+++	3200	23.7	+	+	+
3220	167	341	1	Pichincha 1	Quito	84	4	1	++	80	13.0	+	+	+
3233	31	343	1	Pichincha 1	Quito	70	4	0	+++	3200	23.0	+	+	+
3260	11	343	1	Pichincha 1	Quito	40	0	1	+	25600	3.5	+	+	+
3261	28	343	1	Pichincha 1	Quito	50	1	0	+	100	2.1	+	-	+
3311	148	344	1	Pichincha 1	Quito	36	1	0	+++	40	22.0	+	-	+
3312	163	344	1	Pichincha 1	Quito	62	1	0	+++	50	14.4	+	-	+

U: Unknown, *: Indirect diagnosis; **: Direct diagnosis; **RB**: Rose Bengal; **SAT-EDTA**: Wright's Slow Agglutination Test with EDTA; **iELISA**: Enzyme Linked Immunosorbent Assay; **RT**: Real-time PCR; **IS711**: PCR insertion 711

Bovine brucellosis remains an issue in Ecuador, with serious implications for public health, contrary to the statement by Cartelle Gestal et al. 2015 and actions to control and possibly eradicate it should be adapted to its distribution (per region and province).

Our study clarified the situation of bovine brucellosis in the area of study and provides evidence for the necessity to adapt brucellosis control programmes to the specificities of each area and/or province. It highlights the urgent need to develop awareness programmes aimed at stockbreeders, traders and laboratory technicians. The general public should be made aware as a previous analysis estimated a 1% true prevalence in humans (unpublished results).

Acknowledgments The authors would like to thank all farmers who participated to the study.

Financial support: This work was supported by the Belgian Cooperation within the frameworks of a collaboration between the Institute of Tropical Medicine in Antwerp, Belgium, and the International Centre for Zoonoses (CIZ), Central University of Ecuador.

Compliance with ethical standards: CBM/COBI-001 (07-04-2006)

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Disclaimer: The views expressed in this article are those of the authors and do not necessarily reflect the official policy or position of the Central University of Ecuador.

Disclosure: None of the authors has financial or personal conflict of interest related to this study. References

References

- Acha, P., & Szyfres, B. (2003). Brucellosis. In Pan American Health Organization (Ed.), *Zoonosis and communicable diseases common to man and animal*. (3rd Ed, p. 382). Washington.
- Alton, G. ., Jones, L. ., Angus, R. ., & Verger, J. . (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. (I. N. de la recherche Agronomique, Ed.) (1st Ed). Paris.
- Berkvens, D., Speybroeck, N., Praet, N., Adel, A., & Lesaffre, E. (2006). Estimating Disease Prevalence in a Bayesian Framework Using Probabilistic Constraints. *Epidemiology*, 17(2), 145–153 [10.1097/01.ede.0000198422.64801.8d](https://doi.org/10.1097/01.ede.0000198422.64801.8d).
<http://doi.org/10.1097/01.ede.0000198422.64801.8d>

- Branscum, A., Gardner, I., Wagner, B., McInturff, P., & Salman, M. (2005). Effect of diagnostic testing error on intracluster correlation coefficient estimation. *Preventive Veterinary Medicine*, 69(1), 63–75. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.015>
- Bricker, B. J. (2002). Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Veterinary Microbiology*, 90(1), 433–434. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00227-4](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00227-4)
- Cartelle, M., Holban, A. M., Escalante, S., & Cevallos, M. (2015). Epidemiology of Tropical Neglected Diseases in Ecuador in the Last 20 Years. *PloS One*, 10(9), e0138311. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0138311>
- Corbel, M. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. Geneva Switzerland: World Health Organization.
- Demera, T., Farfán, G., Ortega, B., & Intriago, A. (2002). Prevalencia de brucelosis bovina y porcina en los camales de las cabeceras cantorales de la provincia de Manabí. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Doganay, M., Aygen, B., Corbel, M. J., Roux, J., Shapiro, D. S., Wong, J. D. (2003). Human brucellosis: an overview. *International Journal of Infectious Diseases*, 7(3), 173–182. [http://doi.org/10.1016/S1201-9712\(03\)90049-X](http://doi.org/10.1016/S1201-9712(03)90049-X)
- Dohoo, I. R., Wright, P. F., Ruckerbauer, G. M., Samagh, B. S., Robertson, F. J., & Forbes, L. B. (1986). A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire*, 50(4), 485–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3539295>
- Enøe, C., Georgiadis, M. P., & Johnson, W. O. (2000). Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive Veterinary Medicine*, 45(1), 61–81. [http://doi.org/10.1016/S0167-5877\(00\)00117-3](http://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00117-3)
- FAO, & OMS. (1986). Joint FAO/OMS Comité Mixte d'Experts de la brucelloses 6ème Rapport. Genève (Suisse).
- Geurden, T., Berkvens, D., Geldhof, P., Vercruyssen, J., & Claerebout, E. (2006). A Bayesian approach for the evaluation of six diagnostic assays and the estimation of *Cryptosporidium* prevalence in dairy calves. *Veterinary Research*, 37(5), 671–682. <http://doi.org/10.1051/vetres:2006029>

- Gil, A., & Samartino, L. E. (2001). Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina (Livestock Policy Discussion Paper No. 2).
- Godfroid, J., & Boelaert, F. (1995). Prescriptions pour le diagnostic sérologique de la brucellose. Belgium: CODA-CERVA (Ed.), 47.
- Godfroid, J., Nielsen, K., & Saegerman, C. (2010). Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian Medical Journal*, 51(4), 296–305. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718082>
- Godfroid, J., Saegerman, C., Wellemans, V., Walravens, K., Letesson, J.-J., Tibor, A., ... Garin-Bastuji, B. (2002). How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Veterinary Microbiology*, 90(1), 461–477. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00230-4](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00230-4)
- Herrick, J. A., Lederman, R. J., Sullivan, B., Powers, J. H., & Palmore, T. N. (2014). *Brucella* arteritis: clinical manifestations, treatment, and prognosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(6), 520–6. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70270-6](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70270-6)
- INEC, MAG, & SICA. (2002). ECUADOR - Agricultural Census 1999/2000 – Main Results. Retrieved July 20, 2016, from http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/ess_test_folder/World_Census_Agriculture/Country_info_2000/Reports_2/ECU_SPA_REP_2000.pdf
- Lesaffre, E., Speybroeck, N., & Berkvens, D. (2007). Bayes and diagnostic testing. *Veterinary Parasitology*, 148(1), 58–61. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.05.010>
- Limet, J.N., Kerkhofs, P. Wijffels, R. Dekeyser P. 1988. Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine par ELISA. *Ann. Méd. Vét.*, 132, pp. 565–575
- Lucero, N. E., Ayala, S. M., Escobar, G. I., & Jacob, N. R. (2008). *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiology and Infection*, 136(4), 496–503. <http://doi.org/10.1017/S0950268807008795>
- MAG-SESA. (1999). Prevención y control de la brucelosis bovina en Ecuadorle. Quito.
- Maldonado, P., & Salgado, G. (1979). Diagnóstico de la brucelosis con antígeno tamponado y la prueba de inactivación por calor a 65°C, en muestras positivas y sospechosas a la aglutinación rápida en placa. Universidad Central del Ecuador.
- Memish, Z. A., & Balkhy, H. H. (2004). Brucellosis and International Travel. *Journal of Travel Medicine*, 11(1).

- Muma, J. B., Godfroid, J., Samui, K. L., & Skjerve, E. (2007). The role of *Brucella* infection in abortions among traditional cattle reared in proximity to wildlife on the Kafue flats of Zambia. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 26(3), 721–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18293620>
- Nicoletti, P. (2001). Immune Responses and Vaccination. In M. Madkour (Ed.), *Madkour's Brucellosis* (pp. 267 – 274). Germany: Springer-Verlag.
- Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*, 90(1), 447–459. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00229-8](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00229-8)
- OIE. (2016a). CHAPTER 2.1.4 Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. mellitensis* and *B. suis*). Retrieved July 20, 2016, from http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCellosis.pdf
- OIE. 2016b. Terrestrial Animal Health Code. http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_bovine_brucellosis.htm
- Olsen, S. C., & Stoffregen, W. S. (2005). Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Review of Vaccines*, 4(6), 915–928. <http://doi.org/10.1586/14760584.4.6.915>
- Ouahrani-Bettache, S., Soubrier, M., & Liautard, J. (1996). IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 81(2), 154–160.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(2), 91–99. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6)
- Poulsen, K. P., Hutchins, F. T., McNulty, C. M., Tremblay, M., Zabala, C., Barragan, V., ... Bethel, J. W. (2014). Brucellosis in dairy cattle and goats in northern Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(4), 712–5. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0362>
- Rahman, A. K. M. A., Saegerman, C., Berkvens, D., Fretin, D., Gani, M. O., Ershaduzzaman, M., ... Emmanuel, A. (2013). Bayesian estimation of true prevalence, sensitivity and specificity of indirect ELISA, Rose Bengal Test and Slow Agglutination Test for the diagnosis of brucellosis in sheep and goats in

- Bangladesh. *Preventive Veterinary Medicine*, 110(2), 242–252.
<http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.11.029>
- Rivera, D. Y., Rueda, O. E., Calderon, C. P., Mariño, O. C., Gall, D., & Nielsen, K. (2003). [Comparative evaluation of the indirect enzyme-linked immunosorbant assay in milk for the detection of cattle infected with *Brucella abortus*, in herds located in the province of Cundinamarca, Colombia]. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 22(3), 1065–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15005563>
- Rodríguez-Hidalgo, R. I., Contreras-Zamora, J., Benitez Ortiz, W., Guerrero-Viracocha, K., Salcan-Guaman, H., Minda, E., & Ron Garrido, L. (2015). Circulating Strains of *Brucella abortus* in Cattle in Santo Domingo De Los Tsáchilas Province - Ecuador. *Frontiers in Public Health*, 3, 45.
<http://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00045>
- Ron-Román, J., Ron-Garrido, L., Abatih, E., Celi-Erazo, M., Vizcaíno-Ordóñez, L., Calva-Pacheco, J., ... Saegerman, C. (2014). Human Brucellosis in Northwest Ecuador: Typifying *Brucella* spp., Seroprevalence, and Associated Risk Factors. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(2), 124–133.
<http://doi.org/10.1089/vbz.2012.1191>
- Ron-Román, J., Saegerman, C., Minda-Aluisa, E., Benítez-Ortíz, W., Brandt, J., & Douce, R. (2012). First report of orchitis in man caused by *Brucella abortus* biovar 1 in Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(3), 524–8. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0341>
- Roux, J. (1979). [Epidemiology and prevention of brucellosis]. *Bulletin of the World Health Organization*, 57(2), 179–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/312154>
- Saegerman, C., Berkvens, D., Godfroid, J., & Walravens, K. (2010). Bovine brucellosis. In P. Lefèvre, J. Blancou, R. Chermette, & G. Uilenberg (Eds.), *Infectious and parasitic disease of livestock* (pp. 991–1021). France: Lavoisier.
- Sanogo, M., Thys, E., Achi, Y. L., Fretin, D., Michel, P., Abatih, E., ... Saegerman, C. (2013). Bayesian estimation of the true prevalence, sensitivity and specificity of the Rose Bengal and indirect ELISA tests in the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Journal*, 195(1), 114–120. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.007>
- Saravi, M. A., Wright, P. F., Gregoret, R. J., & Gall, D. E. (1995). Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and

- conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 47(1-2), 93–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8533303>
- Thimn, B. M. (1982). Brucellosis in South America. In *Brucellosis; Distribution in Man, Domestic And Wild Animals* (pp. 31–34). New York: Springer-Verlag.
- Thys, E., Yahaya, M. ., Walravens, K., Baudoux, C., Bagayoko, I., Berkvens, D., & Geerts, S. (2005). Etude de la prévalence de la brucellose bovine en zone forestière de la Cote d'Ivoire. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 58, 205–209.
- Vera, R., & Flores, R. (2004). Diagnóstico y prevalencia de brucelosis mediante ring test en los hatos bovinos del cantón Chone en el año 2004. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Yu, W. L., & Nielsen, K. (2010). Review of Detection of *Brucella* sp. by Polymerase Chain Reaction. *Croatian Medical Journal*, 51(4), 306. <http://doi.org/10.3325/cmj.2010.51.306>

SECTION EXPÉRIMENTALE

Partie 2: Brucellose caprine en Equateur

Échantillonnage chez les chèvres



Source: Jorge Ron-Román
Comunidad Tronco quemado, cantón Zapotillo, provincia de Loja – Ecuador
2011

ARTICLE 3

Unexpected discovery of *Brucella abortus* Buck B-19
vaccine in goats from Ecuador.

Jorge Ron-Román, Dirk Berkvens, Daniela Barzallo-Rivadeneira, Alexandra Angulo-Cruz,
Pablo González-Andrade, Elizabeth Minda-Aluisa, Washington Benítez-Ortíz,
Jef Brandt, Claude Saegerman.

Article soumis pour publication :

Tropical Animal Health and Production

Préambule

Comme *Brucella melitensis* n'a jamais été isolée en Equateur à ce jour, la réalisation d'une étude ciblant plusieurs régions et impliquant un grand nombre d'échantillons s'avérait nécessaire afin d'évaluer la prévalence de la brucellose chez cette espèce réservoir et le cas échant, de tenter d'isoler l'agent causal. De plus, les pratiques des vendeurs ambulants de lait de chèvre non pasteurisé pour soigner les malades nous ont posé la question du risque posé par celles-ci en cas de brucellose.

Résumé en français

A ce jour, très peu d'études sérologiques ont ciblé la brucellose caprine en Equateur, la plupart sont d'ailleurs relativement anciennes. Afin d'évaluer la situation épidémiologique actuelle, une étude sérologique transversale a été menée parmi les populations caprines des provinces de Carchi (n = 160 animaux), Pichincha (n = 224 animaux) et Loja (n = 2024 animaux). En outre, des échantillons de lait ont été prélevés sur 220 animaux dans la province de Pichincha. Seuls deux résultats positifs (RB négatif et SAT-EDTA \geq 400 UI / ml) ont été obtenus chez des chèvres en lactation, toutes deux appartenant à la même ferme de Quito. Cette étude démontre une prévalence apparente faible dans la province de Pichincha, et l'absence de la maladie dans les provinces de Carchi et Loja. Vingt-cinq échantillons de laits se sont révélés positifs au test de l'anneau (*Milk Ring Test* - MRT) dans la province de Pichincha, ce qui représente une prévalence de 11,16%. Les échantillons positifs ont été mis en culture. Tous les résultats ont été négatifs, à l'exception d'un animal de la région de Quito. Cet animal a présenté une culture positive pour *Brucella abortus* souche 19 (B19). Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour interpréter un tel résultat inattendu, la plus probable étant l'utilisation accidentelle chez cet animal d'une aiguille utilisée au préalable pour immuniser le bétail avec le vaccin B19. Cette hypothèse met en avant la nécessité d'implémenter des mesures de biosécurité pour prévenir de tels accidents.

The unexpected discovery of *Brucella abortus* Buck 19 vaccine in goats from Ecuador underlines the importance of biosecurity measures

Jorge Ron-Román^{1,2,3,4}, Dirk Berkvens², Daniela Barzallo-Rivadeneira¹, Alexandra Angulo-Cruz¹, Pablo González-Andrade¹, Elizabeth Minda-Aluisa¹, Washington Benítez-Ortíz^{1,5}, Jef Brandt², Claude Saegerman^{6*}

¹ Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), Universidad Central del Ecuador, Quito Ecuador.

² Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp - Belgium.

³ Research Unit of Epidemiology and Risk analysis applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULg), Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Belgium.

⁴ Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. Sangolquí, Ecuador.

⁵ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito - Ecuador.

⁷ Department of Bacteriology and Immunology, Veterinary and Agrochemical Research Centre, Brussels - Belgium.

Keywords: Brucellosis; Goats; Ecuador; Vaccine; Biosecurity.

*Corresponding author: Research Unit in Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULg), Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH) Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B42, Boulevard de Colonster 20, B-4000 Liège, Belgium; e-mail address claude.saegerman@ulg.ac.be; Tel.: +32-4-366-45-79; Fax: +32-4-366-42-61.

Abstract

Very few, mostly old and only preliminary serological studies of brucellosis in goats exist in Ecuador. In order to assess the current epidemiological situation, we performed a cross-sectional serological study in the goat populations of Carchi (n = 160 animals), Pichincha (n = 224 animals), and Loja provinces (n = 2 024 animals). Additionally, milk was sampled from 220 animals in Pichincha province. Only two positive serological results (RB negative and SAT-EDTA \geq 400 IU/ml) were obtained in lactating goats from the same farm in Quito. The present study indicates a low apparent prevalence in Pichincha province and absence in Carchi and Loja provinces. A total of 25 positive milk ring tests (MRT) were obtained in Pichincha province yielding a prevalence of MRT of 11.16%. Subsequent culture was performed on the positive MRT samples. All results were negative, apart from a single sample, obtained from a serological positive goat in Quito, that was positive for *Brucella abortus* strain 19 (B19). Several hypotheses are forwarded concerning this unexpected result. The most likely hypothesis is the possible accidental use of a needle, previously used for vaccination of cattle with the said vaccine, for the administration of drug treatment to the goat. This hypothesis underlines the necessity of biosecurity measures to prevent this type of accidents.

Introduction

Brucellosis is a worldwide disease with health and economic impacts (Castro et al., 2005). It is widely distributed in humans and animals, especially in developing countries. Its occurrence is related to the existence of animal reservoirs and high infection rates in livestock, especially in goats and sheep (Corbel, 2006).

The main cause of caprine brucellosis is *Brucella melitensis* (biovars 1, 2 and 3) (Godfroid et al., 2010) but some sporadic cases caused by *B. abortus* are documented (e.g., Leal-Klevezas et al., 2000). One or more of the following typically characterize the clinical form of the disease: abortion, retained placenta, orchitis, epididymitis and, more rarely, arthritis together with excretion of the organisms in uterine discharges and milk (OIE, 2016a).

Surveillance in goats by indirect diagnostic methods is not a common practice in most countries of South America (PANAFTOSA, 2000), where goat breeding is constrained in its development, because of conditions of overcrowding, poor or non-existent disease control measures and lack of technical assistance, which, together with rudimentary empirical management, permit the transmission of brucellosis (Ortega-Sánchez et al., 2009).

Caprine brucellosis due to *Brucella melitensis* is present in Mexico, Peru, Argentina, Paraguay and Bolivia (Aznar et al., 2014; PANAFTOSA, 2000). In Ecuador there are no records or *Brucella* spp. isolates in goats despite the fact that raising goats is a common practice in rural and peri-urban areas. The total number of goats is estimated between 178,000 (INEC et al., 2002) and 191 000 (OIE, 2016b) of which approximately 43 % (78,000) are found in the canton of Zapotillo in Loja province.

The marketing of goat milk in different parts of the Metropolitan District of Quito (two million inhabitants) has become a common activity and forms the basic income of several families engaged in this business. Ecuadorian law prohibits peddling unpasteurized milk, and although vendors work without government regulation, they try as much as possible to maintain minimum health standards, such as collecting animal droppings, washing the udder and selling milk in new and clean bottles.

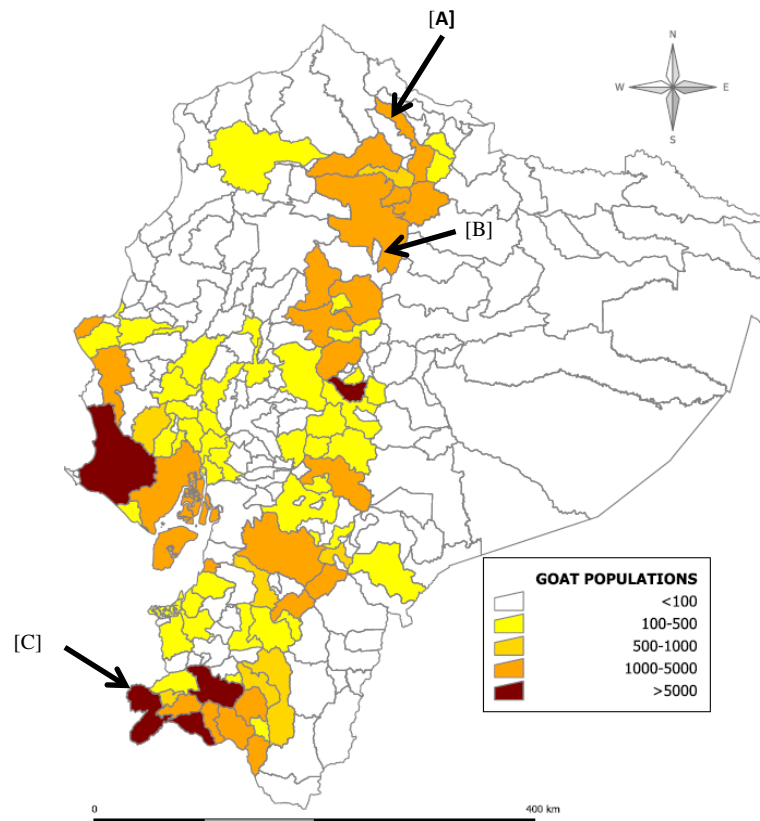
The very few serological studies of brucellosis in goats conducted in Ecuador are old and incomplete or preliminary (e.g., Poulsen et al., 2014). In order to determine the seroprevalence of *Brucella* spp. in goats in three selected areas of Ecuador, as well as isolate the causative agent, we conducted a cross-sectional study (serum and milk samples) in Carchi, Pichincha and Loja provinces.

Materials and methods

Selected areas

The selection of three areas for this study is based on the potential risks: Bolivar and Mira cantons of Carchi province (presence of bovine brucellosis in cattle and existence of mixed farms) (Ron-Román and collaborators, unpublished data), the urban and peri-urban Metropolitan District of Quito in Pichincha province (business of milk goats in Quito city and high density of inhabitants) and Zapotillo canton of Loja (high density of goats) provinces (**Figure 1**).

Fig 1: Goat population per Canton and localization of the study areas (INEC et al., 2002).



Legend: [A], Bolivar and Mira cantons of Carchi province (presence of bovine brucellosis in cattle and existence of mixed farms); [B], urban and peri-urban Metropolitan District of Quito in Pichincha province (business of milk goats in Quito city and high density of inhabitants); [C], Zapotillo canton of Loja province (high density of goats).

Sampling design

A survey with census sampling at farm level and convenience sampling at animal levels was performed in the three selected areas. In Carchi and Pichincha provinces (small herds), all herds and all animals present in a herd were sampled. In Zapotillo canton of Loja province (large herds), all herds were included and a random selection of 25% of animals present in a herd was sampled.

In Carchi, blood was sampled between December 2012 and February 2013 (n = 160 goats in 12 herds). In urban and peri-urban Quito (Pichincha province), blood and milk were sampled between December 2009 and April 2010 (n = 224 and 220 goats in 12 herds for blood and milk samples, respectively). In Zapotillo canton of Loja province, blood were sampled in July 2011 (n = 2 024 goats in 62 herds).

Samples

The goats sampled belonged to native, Nubian and Anglo-Nubian breeds. Jugular vein blood was sampled in vacutainer tubes (10 ml). Each sample was centrifuged; the serum was identified, analysed, and stored at -20 °C. In addition, 100 ml of milk was collected from each lactating goat sampled in peri-urban Quito. All milk samples were identified, stored in a cool box until analysis at the Centro Internacional de Zoonosis (CIZ, International Centre for Zoonoses, Central University of Ecuador).

Blood and milk analysis

Serum samples were analysed for the presence of antibodies against *Brucella* spp. using two diagnostic tests: slide agglutination test with Rose Bengal (RB) and the serum agglutination tube test with EDTA (SAT-EDTA). These tests were performed as previously described (Alton et al., 1988; OIE, 2016a). Milk samples were analysed by applying the modified technique of Milk Ring Test (MRT), also previously described (Díaz et al., 2001).

Isolation and identification of *Brucella* spp.

Milk samples from SAT-EDTA positive (n = 2) and MRT positive animals (n = 23) were centrifuged at 2,000 g for 15 minutes. The supernatant (cream) and sediment were grown in selective Farrell medium (Columbia Agar Base [Oxoid CM0331] with 5% decomplexed horse serum [GIBCO Ref-16050-130] and *Brucella* selective

supplement [OXOID SR0083A]) for the isolation of *Brucella* spp. Replicated colonies with BASE medium (Columbia Agar Base with 5% decomplexed horse serum) were identified and classified by means of: macroscopic and microscopic observation, Gram staining and oxidase [DIFCO-BBL Ref: 261181], catalase and urease tests. The procedures were performed as previously described (Alton et al., 1988; Godfroid & Boelaert, 1995).

Identification and molecular characterization of Brucella spp.

Once identified by biochemical tests, the *Brucella* colonies were analysed molecularly by three different PCR tests: the IS6501 PCR or PCR-IS711 (primers: IS6501 3': 5'-gat-aga-agg--gct-gaa ctt tgc-gga-c-3' / IS6501 5': 5'-acg-ccg-gtg-tat-ggg-aaa-ggc-ttt-t-3') for genus identification, AMOS PCR (Primers: *B. abortus*-specific: gac-gaa-cgg-aat-ttt-tcc-aat-ccc; *B. melitensis*-specific: aaa-tcg-cgt-cct-tgc-tgg-tct-ga; *B. ovis*-specific: cgg-gtt-ctg-gca-cca-tcg-tcg; *B. suis*-specific: cgc-cgg-ttt-tct-gaa-ggt-tca-gg; IS711-specific: tgc-cga-tca-ctt-aag-ggc-ctt-cat) (Bricker & Halling, 1994) for species determination and modified AMOS PCR (Primers: RB51/2308: ccc-cgg-aag-ata-tgc-ttc-gat-cc; eri primer 1: gcg-ccg-cga-aga-act-tat-caa; eri primer 2: cgc-cat-gtt-agc-ggc-ggt-ga) (Bricker & Halling, 1995) for the differentiation between vaccine strains and field strains.

Statistical analysis

The seroprevalence was estimated with a Binomial exact distribution and computed in Stata SE 12.1. version (StatCorp, College Station, Texas, USA).

Results

No serological RB test showed the presence of antibodies in any of the animals tested but some animals originating from Pichincha province (see below) tested positive for the SAT-EDTA.

The study demonstrated the absence of antibodies to *Brucella* spp in Bolivar and Mira cantons of Carchi province (Number of animals tested [Nt] = 160; seroprevalence of 0 % with 95 % confidence interval [CI]: 0-1.85 %) and Zapotillo canton of Loja province (Nt = 2024; seroprevalence of 0 % with 95 % CI: 0-0.15 %). The seroprevalence of brucellosis in the district of Quito in Pichincha province was quite low (Nt = 224; seroprevalence of 0.89 % with 95 % CI: 0.11-3.19 %).

Of the 220 MRT that were performed in Pichincha province, 25 were positive (milk prevalence of 11.16 % with 95 % CI: 7.35-16.03 %). Only two goats (out of 47 originating from the same farm in the Tiwinsa sector, urban Quito) were positive in SAT-EDTA (high antibody titres) and in MRT (**Table I**). From the two seropositive and lactating goats from Quito urban area, one *Brucella* was isolated on milk. This strain was future characterized and identified as *Brucella abortus* strain 19 (**Table II**). A further 23 lactating goats that were positive in MRT were negative in culture.

Table 1: Serology, culture and polymerase chain reaction (PCR) results of two SAT EDTA positive goats

Sample N°	Herd Code	Province	Canton	Method of diagnostic					
				RB	SAT-EDTA	Isolation	PCR IS711	AMOS PCR	mAMOS PCR
178	Tiw 3	Pichincha	Quito	-	400 IUA	-	-	-	-
184	Tiw 3	Pichincha	Quito	-	3200 IUA	+	+	+	+

Legend: **RB**, Rose Bengal test; **SAT – EDTA**, Serum agglutination test with EDTA; **IUA**, International Units of Agglutination **PCR-IS711**, Polymerase chain reaction with insertion 711; **AMOS PCR**, Abortus, Melitensis, Ovis and Suis; **mAMOS PCR**, AMOS modified (PCR for the differentiation of vaccine strains from field strains).

Discussion

Brucellosis is a contagious infectious disease, caused by bacteria of the genus *Brucella* spp., which affects both human and several animal species. Caprine brucellosis is mainly due to *B. melitensis* (Godfroid et al., 2010) and some cases of *B. abortus* was previously published (e.g. Leal-Klevezas et al., 2000)). The pathogenicity in humans for these two species of *Brucella* is high (Godfroid et al., 2010; Saegerman et al., 2010).

The use of SAT-EDTA, RB and MRT was previously evaluated for the diagnosis of caprine brucellosis (Falade, 1978). There was a good correlation between SAT-EDTA and RB when both tests were negative but RB failed to detect 80% of sera above 50 IU/ml in SAT-EDTA. Also, owing to the relatively poor milking potential of the goat and the false positive results with MRT, it was concluded that the SAT-EDTA offers a better serological diagnostic tool for caprine brucellosis. This study is in line with this previous information. Unfortunately, studies reporting serological test results in goats should be interpreted with caution, as most of the data have been obtained without isolation of *Brucella* (Díaz et al., 1999).

Several preliminary results are available in some Faculties of Veterinary Medicine in Ecuador. In Guayas province (west central part of Ecuador), 33 % of 800 individual milk samples were positive to MRT in 1970 but with no isolation of *Brucella* (Albornoz, 1970). Three other serological studies with Huddleson agglutination test in Macará (Granda, 1972), Loja (Tapia, 1998) and Azuay (Sánchez, 1997) provinces indicated a zero or very low seroprevalence.

The present study indicates a low prevalence in Pichincha province and absence in Carchi and Loja provinces.

The discovery of the *B. abortus* strain 19 (B19) in milk from a goat with a positive serology result (SAW-EDTA: 3,200 IU/ml; high IgM level) was unexpected. Several hypotheses can be postulated. The first hypothesis is the improper use of B19 vaccine in goats in addition to its advised use in cattle. The vaccine of choice for goats is Rev 1 and, as recommended, B19 is only mandatory in cattle in Ecuador and common in Pichincha province. The second hypothesis is a use of a needle, which was previously used for B19 vaccination in cattle, for the administration of a drug to goats.

Goats and other species present in a herd are commonly treated by drug injection with the same needle. The second serologically positive goat comes from the same herd, which may form an indication of possible serial use of the same needle. The third hypothesis is the consumption of milk by goats originating from B19 vaccinated cattle. Positive microbiological cultures were obtained during a period of three years from the milk of cows vaccinated with B19 (Meyer & Nelson, 1969), as well as in colostrum (Corner & Alton, 1981). Seropositive titres were observed for a period of one year after B19 vaccination of cows (Manthei, 1952). A study of oral vaccination with B19 showed the need of a large dose (500 billion cells) and all serological test were negative in heifers 82 days after vaccination (Nicoletti & Milward, 1983). Despite the fact that it cannot be excluded, this hypothesis is deemed unrealistic. The fourth hypothesis is the excretion of B19 in the environment by vaccinated bovines and the use of a same pasture by goats. The intermittent excretion of B19 strain was detected by PCR until 9 years in vaccinated cattle mainly in urine and also in milk samples, which confirmed its multiplication and persistence (Pacheco et al., 2012). However, in this study cultures were always negative. For identical reasons (large dose needed and short period of

positivity in serological tests) this hypothesis also appears improbable. In conclusion, the second hypothesis is retained as the most likely.

Conclusion

The study demonstrated the absence of antibodies to *Brucella* spp in Bolivar and Miracantons of Carchi province and Zapotillo canton of Loja province, the principal goat producing canton. Isolation of *Brucella abortus* strain 19 in a goat in Quito district demonstrates the possible cross-infection from vaccinated cattle (B19 vaccination is common here), probably through the accidental use of a needle previously used for vaccination of cattle with B19 vaccine. This finding highlights the necessity of stringent biosecurity measures and quality control of vaccination campaigns.

Acknowledgments This research was funded by the International Centre for Zoonoses, Central University of Ecuador, Quito, Ecuador; the Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium and the Research Unit of Epidemiology and Risk analysis applied to Veterinary Sciences, University of Liege, Belgium. The authors thank all farmers who participated in the study.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest: The authors declare that they have no competing interests.

Table 2 Characterization of the caprine *Brucella* spp. isolate

Bacteriological sample code	Catalase	Oxidase	Urease activity	CO ₂ requirement	H ₂ S production	Growth on colorants				Agglutination with serum	
						Thionin 20 µg	Thionin 10 µg	Basic Fuschin 20 µg	Safranin 100 µg	anti A	anti M
Ec-CIZ-Cap-1	+	+++	+(48 hr)	-(48 hr)	+++ (24 hr)	-	-	+	+	+	-
B2*	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
B9**	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
B1***	+	+	+	+ ^a	+	-	-	+	+	+	-

Legend: EC-CIZ-Cap-1 is the caprine *Brucella* isolate; * control *Brucella abortus* biovar 2; ** control *Brucella abortus* biovar 9; *** control *Brucella abortus* biovar 1; ^a positive for most strains.

References

- Albornoz, G., 1970. Diagnóstico de brucelosis por la prueba de “Ring-test” en la provincia del Guayas a nivel de hacienda. Universidad Estatal de Guayaquil.
- Alton, G. et al., 1992. Serological Methods. In INRA, ed. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, pp. 63–131.
- Anon, 2012. La leche de cabra se vende sin regulaciones Este contenido ha sido publicado originalmente por Diario EL COMERCIO en la siguiente dirección: <http://www.elcomercio.com/actualidad/quito/leche-de-cabra-se-vende.html>. Si está pensando en hacer uso del m. El Comercio. Available at: <http://www.elcomercio.com/actualidad/quito/leche-de-cabra-se-vende.html>.
- Aznar, M.N. et al., 2014. Bovine Brucellosis in Argentina and Bordering Countries: Update. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(2), pp.121–133. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/tbed.12018> [Accessed July 20, 2016].
- Bricker, B.J. & Halling, S.M., 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 32(11), pp.2660–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7852552> [Accessed July 19, 2016].
- Bricker, B.J. & Halling, S.M., 1995. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *Journal of clinical microbiology*, 33(6), pp.1640–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7650203> [Accessed July 20, 2016].
- Castro, H.A., González, S.R. & Prat, M.I., 2005. Brucellosis: una revisión práctica. *Acta bioquím. clín. latinoam*, 39(2), pp.203–216.
- Corbel, M.J., 2006. *Brucellosis in humans and animals*, Geneva Switzerland: World Health Organization.
- Corner, L.A. & Alton, G.G., 1981. Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Research in veterinary science*, 31(3), pp.342–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6805054> [Accessed July 20, 2016].
- Díaz Aparicio, E., Blasco Martínez, J.M. & Suárez Güemes, F., 1999. Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina. *Vet. Mex*, 30(4), p.307.
- Díaz, E. et al. eds., 2001. Introducción. In *Diagnóstico de brucelosis animal*. México: INIFAP, pp. 1–16.
- Falade, S., 1978. A comparison of three serological tests in the diagnosis of caprine

- brucellosis. *Research in veterinary science*, 24(3), pp.376–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/97740> [Accessed July 20, 2016].
- Godfroid, J. & Boelaert, F., 1995. Prescriptions pour le diagnostic sérologique de la brucellose. Belgium: CODA-CERVA (Ed.), 47.
- Godfroid, J., Nielsen, K. & Saegerman, C., 2010. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian medical journal*, 51(4), pp.296–305. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718082> [Accessed July 20, 2016].
- Granda, B., 1972. Incidencia de brucelosis caprina en el cantón Macará por el método de Huddleson. Universidad Nacional de Loja.
- Leal-Klevezas, D.S. et al., 2000. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats,
- MAG, 2016. ECUADOR - Agricultural Census 1999/2000 – Main Results. Proyecto Sistema de Información y Censo Agropecuario, p.2. Available at: http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/documents/world_census_of_agriculture/main_results_by_country/ecuador_2000.pdf [Accessed July 20, 2016].
- Manthei, C.A., 1952. Evaluation of vaccinal methods and doses of *brucella abortus* strain 19. Proceedings of the 56th Annual Meeting of Livestock Sanitation Association, pp.115–125.
- Meyer, M.E. & Nelson, C.J., 1969. Persistence of *Brucella abortus*, strain 19 infection in immunized cattle. In Proceedings, annual meeting of the United States Animal Health Association. p. 159.
- Nicoletti, P. & Milward, F.W., 1983. Protection by oral administration of *brucella abortus* strain 19 against an oral challenge exposure with a pathogenic strain of *Brucella*. *American journal of veterinary research*, 44(9), pp.1641–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6414347> [Accessed July 20, 2016].
- OIE, 2016a. CHAPTER 2.1.4 Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. mellitensis* and *B. suis*). OIE, p.44. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCellosis.pdf [Accessed July 20, 2016].
- OIE, 2016b. WAHIS Interface. Available at: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalpopulation [Accessed July 20, 2016].
- Ortega Sánchez, J.L. et al., 2009. Seroprevalencia de brucelosis caprina en el municipio de Tlahualilo, Durango. México. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria,

10(4).

- Pacheco, W.A. et al., 2012. Excretion of *Brucella abortus* vaccine B19 strain during a reproductive cycle in dairy cows. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 43(2), pp.594–601. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24031869> [Accessed July 20, 2016].
- PANAFTOSA, 2000. *Brucelosis y Tuberculosis, situación de los programas en las Américas*, Rio de Janeiro, Brasil.
- Poulsen, K.P. et al., 2014. Brucellosis in dairy cattle and goats in northern Ecuador. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 90(4), pp.712–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24591429> [Accessed July 20, 2016].
- Saegerman, C. et al., 2010. Bovine brucellosis. In P. Lefèvre et al., eds. *Infectious and parasitic disease of livestock*. France: Lavoisier, pp. 991–1021.
- Sánchez J., P., 1997. Diagnóstico de brucelosis caprina, en el Cantón Santa Isabel, mediante el método de aglutinación en placa, año 1996. Universidad de Cuenca. Available at: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/17994> [Accessed July 20, 2016].
- Tapia, N., 1998. Prevalencia de brucelosis caprina en el área “Centro Laja.” Universidad Nacional de Loja.

SECTION EXPÉRIMENTALE

Partie 3: Détermination de la séroprévalence, des facteurs de risque et des espèces et biovars de *Brucella* spp. chez l'homme en Equateur

Le prise de sang chez les humains



Source: Jorge Ron-Román
Comunidad La Esperanza, cantón Pedro Moncayo, provincia de Pichincha – Ecuador
2012

ARTICLE 4

Human brucellosis in North-West Ecuador: typifying of
Brucella spp., sero-prevalence, and associated risk
factors

Ron-Román J., Ron-Garrido L., Abatih E., Celi-Erazo M., Vizcaíno-Ordóñez L.,
Calva-Pacheco J., González-Andrade P., Berkvens D., Benítez-Ortíz W.,
Brandt J., Fretin D., Saegerman C.

Publié en 2014 Feb. dans :

Vector-Borne and Zoonotic Diseases 14(2):124-33

DOI: 10.1089/vbz.2012.1191

Préambule

L'évaluation du statut réel de la brucellose chez les réservoirs animaux est influencée par la fiabilité des résultats des tests diagnostiques appliqués. De plus, chez les bovins, l'existence de réactions croisées suite à la vaccination avec la souche 19 (B-19) complique encore l'interprétation des résultats. La prévalence d'anticorps contre l'agent causal, ainsi que l'isolement et la caractérisation des souches de *Brucella* sp. circulant chez l'homme, pourraient non seulement fournir des informations épidémiologiques à propos de cette zoonose, tant au niveau régional que national, mais également évaluer son impact sur la santé publique, car il n'existe aucun vaccin commercialisé chez l'homme.

Résumé en français

En Equateur, la brucellose humaine est sous-estimée et son diagnostic repose uniquement sur la surveillance passive. Depuis 2008, la brucellose a été retirée de la liste des maladies transmissibles dans le pays. Jusqu'à présent, la situation réelle de la brucellose humaine n'a pas encore été déterminée. Les objectifs de cette étude étaient de (i) déterminer la séroprévalence de la maladie, (ii) d'identifier les facteurs de risque associés à la séropositivité chez l'homme, et (iii) d'isoler les souches circulantes de *Brucella* spp. dans la partie nord-ouest de l'Equateur. Entre 2006 et 2008, une grande enquête de transect a été réalisée en Equateur, sur base de prélèvements sanguins réalisés chez l'homme dans la partie nord-ouest du territoire (n = 3733) et accompagnée d'une enquête épidémiologique. Les résultats de trois tests diagnostic utilisés en parallèle ont permis d'estimer une séroprévalence globale de 1,88% (intervalle de confiance [IC] 95%: 1,48-2,38). Une régression logistique multivariée a permis d'identifier les principaux facteurs de risque associés à la séropositivité chez l'homme: contact avec un élevage (odds ratio [OR] = 3,0; IC 1,25-7,08), consommation de fœtus et de placenta (OR = 2,5; IC 1,18 -5,22), et participation à des activités à risque (OR = 1,8; IC 1,00-3,35). Une variation notable de la séroprévalence a été observée entre les cantons. La souche en circulation était *Brucella abortus* biotype 4. Cette étude a souligné que, les contacts avec le bétail, la consommation de fœtus et de placenta et les activités professionnelles à risque, sont autant de facteurs jouant un rôle important dans la contamination par *Brucella* sp. chez les individus dans le nord-ouest de l'Equateur. L'implémentation de campagnes de sensibilisation contre la brucellose, en particulier dans les zones rurales où vit 36% de la population, en parallèle à la lutte contre la

maladie chez les animaux va directement bénéficier à la prévention chez l'homme, comme il n'existe pas de vaccin sûr et efficace contre la brucellose en médecine humaine.

Human Brucellosis in Northwest Ecuador: Typifying *Brucella* spp., Seroprevalence, and Associated Risk Factors

Jorge Ron-Román,^{1,3,6} Lenin Ron-Garrido,¹ Emmanuel Abatih,³ Maritza Celi-Erazo,¹
Laura Vizcaíno-Ordóñez,¹ Jaime Calva-Pacheco,^{1,2} Pablo González-Andrade,^{1,2} Dirk Berkvens,³
Washington Benítez-Ortiz,^{1,4} Jef Brandt,³ David Fretin,⁵ and Claude Saegerman⁶

Abstract

Human brucellosis in Ecuador is underreported and based only on passive surveillance. Since 2008, brucellosis was removed from the list of communicable diseases in the country. Until now, the true human brucellosis picture has not yet been determined. The aim of this study was to determine the seroprevalence of the disease, identify risk factors associated with brucellosis seropositivity in humans, and isolate circulating strains of *Brucella* spp. in the northwestern part of Ecuador. Between 2006 and 2008, a large transect survey was conducted, based on blood sampling of people from the northwestern part of Ecuador ($n=3733$) together with an epidemiological inquiry. On the basis of three diagnostic tests used in parallel, the overall seroprevalence was estimated as 1.88% (95% confidence interval [CI] 1.48–2.38). Based on a multivariable random effects logistic regression analysis, the main risk factors associated with human brucellosis seropositivity were contact with livestock (odds ratio [OR]=3.0; CI 1.25–7.08), consumption of fetus and placenta (OR=2.5; CI 1.18–5.22), and involvement in activities at risk for brucellosis infection (OR=1.8; CI 1.00–3.35). Noticeable variation in brucellosis seropositivity among humans within cantons was observed. The circulating strain was *Brucella abortus* biotype 4. This study emphasized that contact with livestock, consumption of fetus and placenta, and occupational hazard group were all significant risk factors for the transmission of brucellosis among individuals in the northwestern part of Ecuador. Alongside encouraging the launching of educational campaigns against brucellosis, especially in rural areas where 36% of the population lives, controlling this zoonotic disease in animals will directly benefit its prevention in humans, especially because there is no safe and efficacious vaccine against brucellosis in humans.

Key Words: Brucellosis—Human—Ecuador—Serological tests—True prevalence—Risk factors—*Brucella abortus* biotype 4.

Introduction

BRUCELLOSIS IS AN INFECTIOUS AND CONTAGIOUS disease caused by Gram-negative coccobacilli, which can survive in the cells of the immune system. It has a high tendency to cause chronic infections both in humans and in cattle (Moriyon 2001, Torres et al. 2004, Young 2007, Saegerman 2010). In many countries, brucellosis is an important disease

that causes serious economic losses in cattle production (FAO 2003, Guillén 2006, WHO 2006). In Ecuador these losses are estimated at 5.5 million US\$ per year (Torres 2008). In humans, this zoonosis mainly leads to losses in working time and costs related to diagnosis and treatment (Bowden 1996).

In Latin America, four in ten people live in areas where brucellosis is endemic in natural animal reservoirs (Alvarez 2001). However, the infection in humans is underestimated and

¹Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

³Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.

⁴Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

⁵Department of Bacteriology and Immunology, Veterinary and Agrochemical Research Centre, Brussels, Belgium.

⁶Research Unit of Epidemiology and Risk analysis applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULg), Department of Infections and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium.

often not reported (Dean et al. 2012), and only few reports exist concerning the identification of circulating strains of *Brucella* spp. (e.g., Deodato et al. 2011, Aznar et al. 2012, Ron-Román et al. 2012). In addition, the true incidence of this zoonosis has not yet been estimated (Lucero et al. 2008, Aznar et al. 2012).

In Ecuador, by means of diagnostic assays with low sensitivity, several authors have reported the presence of antibodies against *Brucella* spp., mainly among slaughterhouse workers. Intriago (1971) reported a prevalence of 4% (1/25), León (1979, cited by Delgado 1992) detected 10.90% (23/211), Zurita (1980, cited by Díaz 2001) detected 23.83% (56/235), and finally Delgado (1992) mentioned a seroprevalence of 2.32% (4/173).

Despite brucellosis being a communicable disease in Ecuador since 2007, the true incidence of human cases remains largely unknown. According to the Ministry of Health (MSP), only 111 human cases were reported between 1990 and 2007 (EPI-2 2008), whereas, the National Institute for Statistics and Census (INEC) registered 152 persons hospitalized for brucellosis between 1995 and 2007 (INEC 2008).

The aim of the present work was to obtain a realistic figure of the prevalence of human brucellosis by determining the seroprevalence of antibodies against *Brucella* spp., and by identifying the causal agent together with possible infection-associated risk factors among people living and/or working in the northwestern part of Ecuador.

Materials and Methods

Description of the study and selection of the study region

Between 2006 and 2008, a transect study was conducted, based on blood sampling of people from the northwestern part of Ecuador together with an epidemiological survey. After informed consents were obtained, blood samples were taken from persons inhabiting the high-altitude or Sierra provinces such as Carchi, eastern Imbabura, eastern Pichincha, and the coastal provinces such as Esmeraldas, Manabí, western Imbabura, and western Pichincha.

Selection of provinces was based on the high provincial-level seroprevalence of bovine brucellosis reported in Ecuador. Seroprevalence was officially estimated to be between 4.0% and 10.62% in the Sierra and between 5.88% and 10.62% in the Coast (MAG-SESA 1999, Torres 2008). Prior to this study, the seroprevalence was also estimated to be between 2.17% and 9.42% using the Rose Bengal (RB) test and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA), respectively, in bovines of Santo Domingo (Pichincha) and between 1.08 and 9.73% to RB and iELISA, respectively, in El Carmen (Manabí) (Angulo and Tufiño 2005). The selection of the study zone was also based on the occurrence of 41.30% (19/46) of the human cases, as reported by MSP between 1997 and 2007 (EPI-2 2008) and 51.97% (79/152) of the hospitalized brucellosis patients, as reported by INEC (2008). In addition, because sheep, goats, and camel populations are very small in the study area, only the link between brucellosis seroprevalence in bovines and humans was investigated. A map of the study area is shown on Figure 1.

Samples

After informed consent, a total of 3733 blood samples were taken from people with different occupational hazards. A first

possible high-risk group of people ($n=2444$) consisted of laborers at cattle farms, slaughterhouse workers, meat and organ traders, cattle traders, veterinarians, zoo workers, teachers and students from a faculty of animal production, and farm and slaughterhouse managers. A second possible low-risk group of people ($n=1289$) consisted of agricultural laborers, informal traders, public servants, school and college teachers and students, house workers, and transporters.

In addition to collecting blood samples, other information was collected through personal face-to-face interviews. The questionnaire recorded the following information for each subject: Age, sex, consumption of raw milk (yes or no), consumption of blood (yes or no), consumption of cheese (yes or no), region (Sierra or tropical), consumption of fetus or placenta (yes or no), occupational hazard group, contact with animals (yes or no), and presence of symptoms such as pyrexia, weakness, sweating, muscle pain, backache, and headache suggestive of brucellosis (Mantur et al. 2006). On the basis of results of the questionnaire, people were divided into two groups, *i.e.*, those working directly or indirectly in a slaughterhouse ($n=542$) and those who were not ($n=3191$). The full questionnaire is available upon request from the corresponding author.

Diagnostic assays

Three serological assays to detect antibodies against *Brucella* spp. were used: RB fast agglutination test (RB), Wright's slow agglutination test with EDTA (SAT-EDTA), and iELISA. Samples were processed and analyzed in the laboratory for immunodiagnosis at the International Centre for Zoonoses (CIZ) of the Central University of Ecuador (UCE).

RB fast agglutination test

The RB assay was used with Bengatest[®] antigen, *i.e.*, a concentrated suspension (4% vol/vol) of *Brucella abortus* Weybridge strain 19, heat- and phenol- (0.5%) inactivated, suspended in an acid buffer and stained with RB. Equal quantities (30 μ L) of serum and antigen were mixed in a well (4 min) on a glass plate, and any degree of agglutination was considered a positive reaction.

Wright's slow agglutination test with EDTA

For SAT-EDTA, the antigen (Antigen SAW[®], Synbiotics code #ASAW) was a concentrated suspension of *B. abortus* (strain 1119/3), heat and phenol (0.5%) inactivated, and suspended in a phenol buffer at 0.5%. The assay was performed as described by Godfroid and Boelaert (1995) with serum dilutions of 1/12.5, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12,800, and 1/25,600 in a constant volume (100 μ L) of antigen. Quantitative results were given as International Units of Agglutination (IU/mL). A value equal to or above 100 IU/mL, corresponding to 75% transparency of dilution 1/50, was considered as a positive reaction.

Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay

The assay was performed according to Godfroid and Boelaert (1995). Smooth *B. abortus* Weybridge strain 19 lipopolysaccharide (LPS) antigen was incubated on polystyrene plates for 3.5 h at 37°C and overnight at 4°C. Plates were washed five times with a washing solution (NaCl 0.9% + Tween

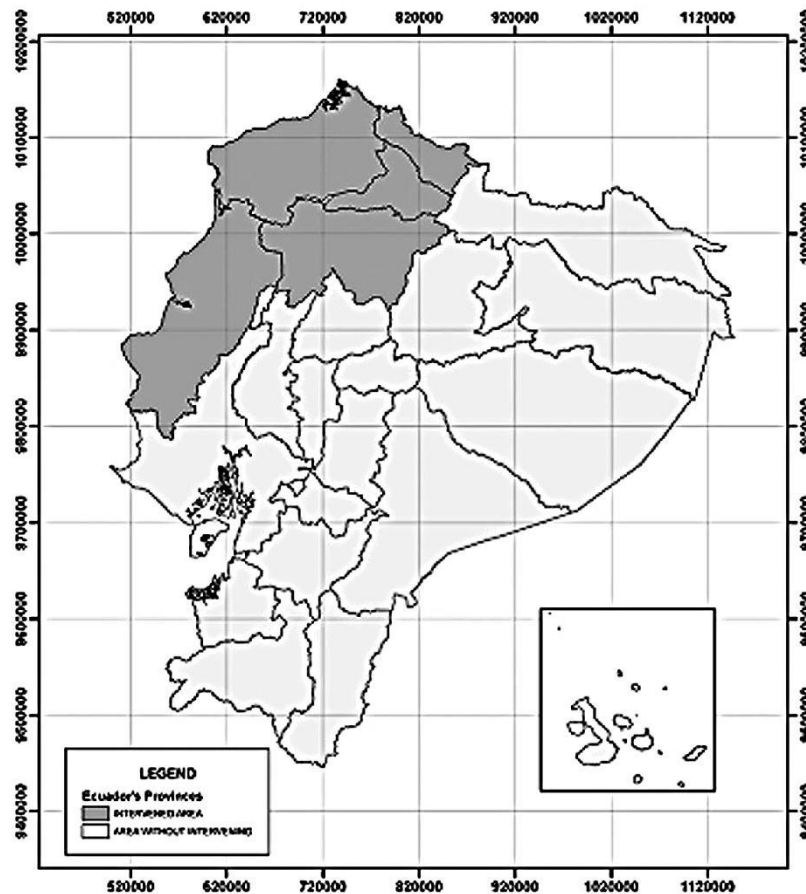


FIG. 1. Location of the study area.

20 at 0.01%). A 50- μ L amount of 1/50 diluted serum in glycine-EDTA-Tween 80 buffer (BB) was added per well and the calibration curve was determined at dilutions 1/270, 1/540, 1/1080, 1/2160, 1/4320, and 1/8640. After 1 h of incubation at ambient temperature, the solutions were discarded, plates were washed five times and 50 μ L of conjugate (Protein G-HRPO, Pierce CD47675, diluted at 1/1500 in G-HRPO + fetal calf serum [FCS] at 2%) was added to each well and left to incubate at ambient temperature for 1 h.

The same washing procedure was repeated, and 100 μ L of substrate solution (*i.e.*, *ortho*-phenylenediamine tablets [*o*-PD], Sigma P-8287; one tablet of 10 mg dissolved in 25 mL of citrate phosphate buffer Sigma P-4809 + 5 μ L hydrogen peroxidase [H_2O_2] at 30%) was added to each well. Plates were left to incubate for 20 min in the dark at ambient temperature. Subsequently the reaction was stopped by adding 25 μ L of H_2SO_4 (2 M) to each well. Optical densities (OD) were read by a spectrophotometer (STAT FX 2100), with filters between 492 nm and 630 nm. Mean OD values of the samples and the calibration curve were corrected by subtracting the mean BB (background blanco) from the mean OD.

A cut off value above which a sample was considered positive was set at or above 20 units (U)/mL. This cutoff value was established based on local epidemiological conditions

and to optimize the compromise between sensitivity and specificity (Franco et al. 2007, Gómez et al. 2008, Soubakhsh et al. 2009). Calculation of the units was based on the reference values of the curve, *i.e.*, 1.87 U, 3.75 U, 7.5 U, 15 U, 30 U, and 60 U, for dilutions 1/270, 1/540, 1/1080, 1/2160, 1/4320, and 1/8640, respectively.

Isolation and typing of Brucella spp. (according to Alton et al. 1988)

Due to the lack of standardized procedures in Ecuador, the isolation of the causal agent was based on blood cultures: BACTEC (three repetitions with 30-min intervals) from persons with high serotiters ($n=22$) (Yagupsky 1994, Cetin et al. 2007). Blood cultures were done at the Hospital Vozandes Quito, where they were maintained for 30 days, and after that timespan the cultures were considered as negatives.

Isolated *Brucella* were identified and typed by CIZ and also by Veterinary and Agrochemical Research Centre (VAR-CERVA) as a reference laboratory using: (1) Macroscopic and microscopic observation of the colonies in cultures, (2) biochemical assays (oxidase, catalase, and urease), (3) production of hydrogen sulfide (H_2S), (4) CO_2 growth requirement, (5) growth in stained media (thionine, basic fuchsin, safranin), (6)

agglutination with monospecific sera A and M, and (7) PCR-AMOS as described by Bricker and Halling (1994).

Statistical analysis

To determine the potential risk factors associated with human brucellosis seropositivity, a two-stage modeling approach was used. In this approach, individuals were considered positive if they tested positive in at least one serological test along with the presence of any of the clinical symptoms suggestive of brucellosis as previously mentioned.

First, a univariate analysis was performed using a random effects logistic regression model. The model was used as response, and the brucellosis status of the individuals (1 for positive and 0 for negative) and each risk factor or indicator variable in turn as the independent variable. The possible effects of variations in brucellosis seropositivity among the different provinces and cantons were accounted for by incorporating province and canton as a random effects in the model (VanLeeuwen et al. 2010).

Second, variables with a p value ≤ 0.25 in the univariate analysis were further analyzed in a multivariable random effects logistic regression model. A manual forward stepwise model building approach was employed with the Akaike information criterion (AIC) as the calibrating parameter to select the final model. The model with the smallest AIC is considered to be the most appropriate model. All two-way interaction terms of the variables remaining in the final model were assessed for significance. The effects of confounding were investigated by observing the change in the estimated coefficients of the variables that remain in the final model once a nonsignificance variable is included. When the inclusion of a nonsignificant variable led to a change of more than 25% of any parameter estimate, that variable was considered to be a confounder and was included in the model (Dohoo et al. 2003). The intraclass correlation coefficient (ICC), which is a measure of the degree of clustering of individuals belonging to the same province and canton, was computed (Snijders and Bosker 1999).

The models were built using the `xtmelogit` () function in STATA, v. 12, software (SataCorp LP, College Station, TX). Model selection was done using Laplacian approximation whereas parameter estimates from the final model were obtained using adaptive Gaussian quadrature (Twisck 2003). The robustness of the final model was assessed by increasing the number of quadrature (integration) points and monitoring changes in parameter estimates (Frankena et al. 2009).

Ethical considerations

The protocol was thoroughly reviewed and approved for ethics by the Bioethics Committee of the Biomedical Center, Central University of Ecuador. Prior to being included in the study, all participants provided informed written consent. For minors, parents/guardians provided consent on their behalf.

Results

Descriptive statistics

A total of 3733 persons, with a mean age of 30.03 ± 16.26 years (min = 3, max = 89 years) were sampled in five provinces in the northwestern part of Ecuador—Carchi, Imbabura, Esmeraldas, Manabí, and Pichincha. Seventy people with mean

TABLE 1. HUMAN BRUCELLOSIS IN NORTHWESTERN ECUADOR: RESULTS OF THREE DIAGNOSTIC ASSAYS

RB	SAT-EDTA	iELISA	SLA	OTH	Number (%)
–	–	–	516	3147	3663 (98.12)
–	–	+	2	5	7 (0.19)
–	+	–	0	0	0 (0)
–	+	+	1	1	2 (0.05)
+	–	–	1	10	11 (0.29)
+	–	+	17	14	31 (0.83)
+	+	–	1	0	1 (0.03)
+	+	+	4	14	18 (0.48)
Total			542	3191	3733 (100)

RB, Rose Bengal; SAT-EDTA, Wright's slow agglutination test with EDTA; iELISA, indirect enzyme-linked immunosorbent assay; SLA, people working in a slaughterhouse; OTH, other people.

age 37.86 ± 14.81 years (min = 10, max = 79 years) reacted positively to at least one of the three diagnostic tests, representing an overall seroprevalence of 1.88% (confidence interval [CI] 1.48–2.38). The proportion of seropositive people between groups (slaughterhouse workers vs. other people) was 4.8% (26/542) and 1.4% (44/3,191), respectively. This suggests a preferential repartition of seropositive people in slaughterhouse workers (Pearson chi-squared test = 29.4; $p < 0.001$).

The distribution of the number of individuals tested, the number and percentage of seropositives are presented in Table 1. Teenagers and children represented 20.84% (778/3733) of the sample, with only six of them being seropositive (three originating from farms). The information about this subpopulation is presented in the Table 2. This suggests a preferential repartition of seropositive cases among older people (Pearson chi-squared test = 6.50; $p = 0.01$).

Risk factors for human brucellosis seropositivity based on the univariate random effects logistic regression analysis

On the basis of the results of the univariate random effects logistic regression analysis with random intercepts for both province and canton, the factors age, sex, contact with livestock, contact with fetal secretions, consumption of fetus and placenta, and involvement in activities at risk were all statistically significantly associated with human brucellosis seropositivity ($p < 0.05$) (Table 3). On the other hand, consumption of raw cow milk and consumption of fresh blood were not significant at the 5% level but because their p values were ≤ 0.25 , they were considered as potential risk factors and were thus included in the multivariate random effects logistic regression analysis.

Final model based on multivariate random effects logistic regression analysis

Out of the potential risk factors initially considered in the multivariate random effects logistic regression model, three were included in the final model (*i.e.*, consumption of fetus and placenta, contact with livestock, and occupational hazard group). In addition, the results were not confounded by any of the variables not included in the final model. Increasing the number of quadrature points had no influence on the

TABLE 2. DETAILED INFORMATION FROM SIX SEROPOSITIVE PATIENTS UNDER 18 YEARS OLD

Number	Province	Canton	Age	Sex	Membership	Contact with livestock	Contact with fetal secretions	Consumption of milk	Consumption of placenta and fetus	Consumption of blood	RB	SAT-EDTA (IU/mL)	iELISA (LU/mL)
1	Pichincha	Mejía	10	M	farm	+	-	boiled	-	-	-	50	30
2	Pichincha	Mejía	16	F	farm	+	+	raw	-	-	-	30	30
3	Pichincha	Mejía	17	M	farm	+	-	boiled	-	-	+	80	60
4	Imbabura	Ibarra	11	F	rural community	-	-	raw	-	-	+	-	-
5	Imbabura	Ibarra	10	M	rural community	-	-	boiled	-	-	+	30	-
6	Imbabura	Urcuquí	17	F	rural community	+	+	boiled	-	-	+	30	-

RB, Rose Bengal test; SAT-EDTA, Wright's slow agglutination test with EDTA; iELISA, indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

TABLE 3. DISTRIBUTION OF SEROPOSITIVE RESULTS AND POTENTIAL RISK FACTORS FOR HUMAN BRUCELLOSIS IN THE NORTHWESTERN PART OF ECUADOR

Factor	Tested	Seropositives (%)	Odds ratio	95% CI	p value
Age (years)					
≤15	681	3 (0.4)	1	Ref	0.0252
From 16 to 45	2382	50 (2.1)	4.4	1.3–14.6	
≥46	667	17 (2.5)	4.5	1.3–16.0	
Sex					
Women	1570	22 (1.4)	1	Ref	0.0415
Men	2163	48 (2.2)	1.7	1.0–2.9	
Region					
Tropics	1185	16 (1.4)	1	Ref	0.1013
Sierra	2548	54 (2.1)	1.580.7	0.89–3.00	
Occupational hazard group ^a					
Low	3191	44 (1.4)	1	Ref	0.0027
High	542	26 (4.8)	2.5	1.4–4.4	
Contact with livestock					
No	724	7 (1.0)	1	Ref	0.0006
Yes	3009	63 (2.1)	3.7	1.6–8.6	
Contact with fetal secretions					
No	2159	27 (1.3)	1	Ref	0.0169
Yes	1574	43 (2.7)	1.9	1.1–3.1	
Consumption of raw milk					
No	2848	49(1.7)	1	Ref	0.1886
Yes	885	21(2.4)	1.5	0.8–2.5	
Consumption of cheese					
No	280	8 (2.9)	1	Ref	0.8277
Yes	3453	62 (1.8)	1.1	0.5–2.4	
Consumption of placenta and foetus					
No	3528	60(1.7)	1	Ref	0.0169
Yes	205	10(4.9)	2.7	1.3–5.5	
Consumption of blood					
No	3424	58(1.7)	1	Ref	0.0515
Yes	309	12(3.9)	2.0	1.0–4.0	
Province ^b					
Carchi	649	16 (2.5)			
Esmeralda	195	5 (2.6)			
Imbabura	1032	13 (1.3)			
Manabí	377	11 (2.9)			
Pichincha	1480	25 (1.7)			

The *p* values are based on the likelihood ratio test comparing the random intercepts-only model and the random effects model with each covariate in turn.

^aSee definition in Materials and Methods section.

^bThis variable was used as a random effect in the logistic regression analysis.

CI, confidence interval; Ref, reference category.

estimated fixed effects and the variance component parameters, indicating that the model is robust. The estimated odds ratios and their 95% CI are presented in Table 4. There was no variability in brucellosis seropositivity among provinces but rather a higher variability among people within provinces.

Typifying of circulating *Brucella* spp. in northwestern Ecuador

Detailed information about persons with positive blood cultures (*n* = 22) is given in Table 5 with the characteristics of

TABLE 4. FINAL MODEL OF RISK FACTORS ASSOCIATED WITH HUMAN BRUCELLOSIS SEROPOSITIVITY AMONG PEOPLE IN THE NORTHWESTERN PART OF ECUADOR BASED ON A MULTIVARIATE RANDOM EFFECTS LOGISTIC REGRESSION ANALYSIS

Risk factors	OR	p value	95% Confidence interval
Consumption of fetus and placenta			
No	1	—	Ref
Yes	2.5	0.016	(1.18-5.22)
Contact with livestock			
No	1	—	Ref
Yes	3.0	0.014	(1.25-7.08)
Occupational hazard group			
Low	1	—	Ref
High	1.8	0.049	(1.00-3.35)
Variance components			
	Estimate	SE	
Canton	1.15	0.81	(0.72-1.85)
Province	0.0	0.29	a

^a95% Confidence interval was not estimated by the model.

OR, odds ratio; CI, confidence interval; Ref, reference category; SE, standard error.

the isolates, bacteriological data and PCR in Table 6 and Figure 2, respectively. From three positive cases, *B. abortus* biotype 4 was isolated and typed. Blood cultures were only positive for patients with higher levels of immunoglobulin M (IgM) antibodies (SAT-EDTA) suggesting an acute brucellosis.

Retrospectively, seropositive persons ($n=70$) were queried about possible symptoms related to brucellosis. A summary of the outcome based on the questionnaire is presented in Table 7.

Discussion

The current study aimed to provide a reliable estimation of the seroprevalence based on the detection of antibodies against *Brucella* spp., the isolation and the identification of the circulating strain of *Brucella* spp., and the identification of possible risk factors related to the transmission and spread of brucellosis among people in the northwestern part of Ecuador.

Prevalence of human brucellosis in the northwestern part of Ecuador

In the current study an overall seroprevalence of 1.88% (CI 1.48-2.38) was found, which may be in sharp contrast with the official data of the Ecuadorian Ministry of Health (MSP), *i.e.*, only 67 cases between 2003 and 2007 (EPI-2 2008). The results of the present investigation, and additional observations described by Ron-Román et al. (2012) in humans, as well as a

TABLE 5. RESULTS OF BLOOD CULTURES FROM PATIENTS WITH HIGH SEROLOGICAL TITERS CONCOMITANT WITH BRUCELLOSIS PRESUMPTIVE CLINICAL SYMPTOMS (NORTHWESTERN ECUADOR)

No.	Province	Age (year)	Sex	Occupation	Contact with livestock	Contact with foetal secretions	Consumption of milk	Consumption of placenta and fetus	Consumption of blood	RB	SAT-EDTA (IU/mL)	iELISA (U/ml)	Blood culture
1	Pichincha	28	M	Farmer	+	+	Boiled	-	-	+	-	60	-
2	Pichincha	22	M	Farmer	+	+	Boiled	-	-	+	100	60	-
3	Pichincha	17	M	Student	+	-	Boiled	-	-	+	80	60	-
4	Pichincha	49	F	Farmer	+	+	Raw	-	-	-	80	-	-
5	Pichincha	28	M	Farmer	+	+	Boiled	-	-	-	-	30	-
6	Pichincha	49	F	Farmer	+	-	Raw	-	-	+	100	60	-
7	Pichincha	50	M	Farmer	+	+	Boiled	-	-	-	50	-	-
8	Pichincha	39	M	Farmer	+	+	Boiled	+	-	+	100	60	-
9	Pichincha	41	M	Veterinary lecturer	+	+	Boiled	-	-	+	80	60	-
10	Pichincha	26	M	Farmer	+	+	Raw	+	-	+	100	60	-
11	Pichincha	39	M	Farmer	+	+	Boiled	-	-	+	100	60	-
12	Pichincha	41	M	Farmer	+	+	Boiled	+	+	-	100	60	-
13	Pichincha	39	F	Slaughterhouse worker	+	+	Boiled	-	-	+	50	60	-
14	Carchi	42	M	Slaughterhouse worker	+	+	Boiled	-	-	+	40	60	-
15	Carchi	55	M	Transporter	+	-	Raw	-	-	+	-	50	-
16	Carchi	50	F	Slaughterhouse worker	+	+	Raw	-	-	+	-	48.6	-
17	Carchi	66	F	Slaughterhouse worker	+	+	Raw	+	+	+	60	60	-
18	Carchi	36	F	Slaughterhouse worker	+	+	Boiled	-	-	+	320	14.4	+
19	Carchi	35	M	Slaughterhouse worker	+	+	Boiled	-	-	+	100	26.2	-
20	Pichincha	27	M	Veterinary student	+	-	Boiled	-	-	+	1600	60	+
21	Carchi	58	M	Farmer	+	-	Raw	-	+	+	800	60	+
22	Carchi	21	M	Farmer	+	+	Raw	-	-	+	960	60	-

RB, Rose Bengal test; SAT-EDTA, Wright's slow agglutination test with EDTA; iELISA, indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

TABLE 6. *IN VITRO* CHARACTERISTICS OF THE ISOLATIONS (GROUP WITH PEOPLE UNDER HIGH RISK)

Sample code serology	Sample code bacteriology ^a	Urease activity	CO ₂ for growth	H ₂ S production	Growth on colorants				Agglutination with serum	
					Thionine 20 µg	Thionine 10 µg	Basic fuchsin 20 µg	Safranin 100 µg	A	M
SHB-Cam-Nor-152	Ec-CIZ-Hum1	+	+	+	-	-	+	+	-	+
SHB-Ay-10	Ec-CIZ-Hum2	+	+	+	-	-	-	-	-	+
SHB-Zon-Nor-370	Ec-CIZ-Hum3	+	+	+	+	-	+	+	-	+

^aBlood culture.

H₂S, hydrogen sulfide.

seroprevalence of 2% in bovines from the same study area, and numerous isolations of *Brucella* spp. from different animal reservoirs (bovines and canine; unpublished data), suggest an underreporting of human brucellosis in Ecuador, considering that 36% of the population lives in rural areas (Organización Panamericana de la Salud 2008).

Based solely on clinical symptoms, a correct diagnosis of brucellosis is not possible (Abdoel and Smits 2007, Saegerman et al. 2010), and even microbiological blood cultures are sometimes unreliable because sensitivity is too variable and too dependent on the stage of infection (*i.e.*, acute stage) and the *Brucella* species concerned (Casao et al. 2004). The difficulties related to the diagnosis and the often ambiguous or even absent clinical symptoms, also noted in the present study, are probably the principal reasons for the subnotification (Serra and Godoy 2000, Agasthya et al. 2007). The non-existence of a vaccine against brucellosis in humans or the difficulty to access a safe and efficacious vaccine implies that controlling this zoonotic disease in animals will directly benefit its prevention in humans especially to improve the biosecurity. A joint work between the Ecuadorian Ministries of Public Health (MSP) and the Livestock, Aquaculture and Fisheries (MAGAP) is needed to consolidate a "One Health" initiative.

Risk factors for human brucellosis in the northwestern part of Ecuador

The occupations that expose people to the infection are male dominated in this study region, thus the apparent in-

creased risk for infection. Several other studies have indicated gender as a significant risk factor for brucellosis (Wassif et al. 1992, Shehata et al. 2001, Mantur et al. 2007, Meky et al. 2007). The apparent elevated risk associated with older age groups could be explained simply by the fact that older people had more occasions to contract the disease (Cooper 1992, Kalaajieh 2000). Nevertheless, it is important to mention that three cases were also found in children below 15 years old, confirming the findings of Guevara et al. (2009) that children are indeed at risk and also do get the infection, *e.g.*, due to direct or indirect contact with animals when accompanying adults handling livestock (Minas et al. 2007) or through consumption of nonpasteurized dairy products (Issa and Jamal 1999).

Brucellosis is mainly an occupational disease, and the multivariate analysis indicated that the odds of brucellosis seropositivity among those working in slaughterhouses were higher than those of people in the general population. This is in line with the results of other studies (Omer et al. 2002, Rahman et al. 2012). The higher seroprevalence among slaughterhouse workers confirms the proposition that intimate contact with animals is more important than consumption of infected dairy products (McDevitt 1971).

According to the World Health Organization (2006), temperatures for pasteurization or boiling milk should be sufficiently high to eliminate bacteria and to render it fit for consumption. Nevertheless, the relation between transmission of brucellosis and raw milk consumption in the present study was not statistically significant, which is in line with Serra and Godoy (2000), who reported no link between the presence of antibodies against *Brucella* spp. and the

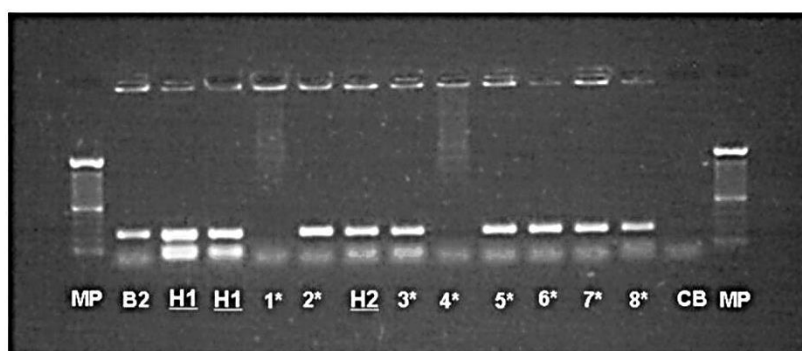


FIG. 2. PCR-AMOS of *Brucella* from blood cultures, isolated from positive persons. Lanes MP, molecular weight marker; B2, control *Brucella abortus* biotype 2; H1, human sample 1 (Ec-CIZ-Hum-1); H2, human sample 2 (Ec-CIZ-Hum-2); (*) samples from complementary studies at CIZ; CB, blank control.

TABLE 7. HUMAN BRUCELLOSIS: SYMPTOMS AND FREQUENCY (N=70 INHABITANTS SEROPOSITIVE TO AT LEAST ONE OF THE THREE DIAGNOSTIC TESTS FOR BRUCELLOSIS)

Symptoms	Positive cases	%
Muscular pain	29	41.43
Joint pain	25	35.71
Fever	17	24.29
Debility	17	24.29
Headache	16	22.86
Nocturnal sweating	13	18.57
Cardiac problems	10	14.29
Anorexia	4	5.71
Insomnia	4	5.71
No apparent symptoms	17	24.29

unhygienic consumption of milk. This lack of an association between consumption of milk or dairy products and infection may also be due to the low number of seropositive people found in our study that consumed these products.

The nonsignificance of the consumption of cheese squares with findings from Barroso-García et al. (2007), where it was observed that the consumption of cheese is not necessarily a source of infection of brucellosis because processing takes a few days or even weeks, affecting the number of bacteria, which was also indicated in this study. However, this information depends largely on the maturation process of each cheese considered and thus caution is recommended.

In general, the shedding of *B. abortus* in cows naturally infected is lower ($<10^3$ colony-forming units [cfu]/mL for several weeks but decreasing after the partum) than for *Brucella melitensis* in small ruminants (in general $>10^3$ cfu/mL during all the lactating period) (Carpenter and Boak 1928, Grilló et al. 1997, Hamdy and Amin 2002, Saegerman et al. 2010). In addition, the human pathogenicity of *B. abortus* appears lower than *B. melitensis* (Godfroid et al. 2010). These elements are other possible explanations for the lack of evidence found in this study considering the link between consumption of milk and dairy products and brucellosis infection.

Traditionally, milk and dairy consumption without any sanitary measures has been considered the most important route of transmission. However, recent reports stress the prominent role of transmission by direct contact with animal reservoirs (Barroso-García et al. 2007, Godfroid et al. 2010, Saegerman et al. 2010). A national program exists in Ecuador. The main objective is to obtain brucellosis-free farms on a voluntary basis. In fact, this program is restricted to some farmers that are able to pay for the vaccination of calves with the B19 or RB51 vaccine, to test animals every 6 months, and to eliminate infected animals without compensation (most often at the slaughterhouse). In addition, no control of animal movements is performed and control of dairy farms by milk ring test (MRT) is not systematized and suffers from the lack of availability of antigen. However, the milk marketed in the cities by companies is usually pasteurized. However, raw milk is sold frequently in rural and periurban areas. This study has not demonstrated the importance of raw milk consumption in the human brucellosis transmission in Ecuadorian conditions. However, serial isolation of *B. abortus* ($n \sim 100$) from bovine raw milk of the same area (Ron-Román

et al., unpublished data) indicates that the risk exists and needs future additional investigation.

Not surprisingly, the consumption of fetus or placentas was significantly associated with brucellosis seropositivity. This alimentary tradition, although largely obsolete, is still commonly used by rural families, and even in public restaurants that offer Ecuadorian typical dishes called fetus (locally known as "ville") or placentas (locally called "guagua mama-huagra mama"). This meat is cooked, but handling of this food item increases risk of exposure to *Brucella* spp. Unfortunately, the consumption of blood was not significantly associated with brucellosis seropositivity in Ecuadorian context. However, this practice can be at risk, but necessitates a donor in the acute phase of brucellosis, which is not frequent (Thiang et al. 1992).

Education and health campaigns should target the elimination of such practices. It has indeed been observed in the population of the northwestern part of Ecuador that risks related to eating habits are mostly due to a lack of basic knowledge about brucellosis and the modes of transmission.

Typifying of circulating *Brucella* spp. in northwestern Ecuador

Biotyping *Brucella* is important for the epidemiological knowledge, because it can reveal geographical characteristics (FAO and OMS 1986) and allows a better understanding of the spread of the disease (Roux 1979). Unfortunately, isolating and typing of *Brucella* spp. is not always possible because it requires high biosecurity laboratories and trained personnel. Furthermore, the low number of successful isolations in the present study is mainly due to the low number of patients with acute brucellosis (i.e., with high levels of IgM antibodies) and also partly due to the localization of the bacteria in specific tissues and organs like bone marrow, cerebrospinal fluid (CSF), liver, kidneys, and spleen, which renders isolation from blood very unlikely (Dogana and Aygen 2003).

In the present study, 24.29% of the persons with a positive seroreaction showed no apparent symptoms at all. This is lower than the 45.6% reported by Pila-Perez et al. (1997) and the 99% found in a retrospective study of the symptomatology by Hernández et al. (1999). Although according to Pappas et al. (2006), based only on few reported data, Ecuador was not considered an endemic country for human brucellosis, the present results based on factual data contradicts this statement, especially in rural areas where 36% of the population lives. A recent report presented a systematic review of the scientific literature published between 1990 and 2010 relating to the frequency of human brucellosis in the world indicated that underestimation of the disease could be related to barriers in accessing health care or to case mismanagement and misdiagnosis (Dean et al. 2012). In Latin America, according to the previous report, reliable information was found only for Argentina and Mexico at the subnational level.

Conclusions

The absence of a National Policy and differential diagnostic tests hinders the development of surveillance and control programs in high-risk areas for human brucellosis (especially in rural areas). Thus, it is difficult to have a realistic idea about the incidence of this disease. In the past, little attention was given to brucellosis in Ecuador. It is necessary to develop

programs to control (and eventually eradicate) brucellosis in the identified risk areas; highly sensitive diagnostic methods should be used both for humans and for animals with the objective of obtaining an early warning system and determining the correct prevalence at national level.

In view of the results of this study, there is an urgent need for information campaigns, especially in rural areas, about the risks involved following direct contact with livestock and consumption of fetus and placenta, and equally about the preventive care as to avoid infection. Also, more investigations to isolate and identify the biotypes of *Brucella* spp. circulating in Ecuador should take place. Finally, it is of utmost importance that evidence-based information be given to national and international donor organizations involved with future prevention and control and research programs on brucellosis.

Acknowledgments

We thank the patients for their willingness to participate in this study. This work was supported by the Belgian Cooperation in the framework of the Institutional Collaboration between the Institute of Tropical Medicine in Antwerpen, Belgium and the International Centre for Zoonoses (ICZ) of Central University of Ecuador.

Author Disclosure Statement

The authors declare that there are no competing financial interests.

References

- Abdoel TH, Smits HL. Rapid latex agglutination test for the serodiagnosis of human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57:123–128.
- Agasthya AS, Isloor S, Prabhudas K. Brucellosis in high risk group individuals. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25:28–31.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. 1st ed. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988.
- Alvarez P. Situación de la brucellosis en América: Panorama general. In: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B, eds. *Diagnóstico de Brucellosis Animal*. México: 2001:9–16.
- Angulo A, Tufiño A. Determinación de la Inmunoprevalencia de *Brucella* spp. en explotaciones ganaderas de los cantones Santo Domingo y El Carmen. [Thesis]. Quito: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador. 2005.
- Aznar MN, Samartino LE, Humblet M-F, Saegerman C. Bovine brucellosis in Argentina and bordering countries: Update. *Transboundary Emerging Diseases* 2012; in press. doi:10.1111/tbed.12018
- Barroso-García, P, Lucerna, M, Cortés, M, Toranzo, M, et al. Brote de brucellosis interprovincial por ingesta de queso fresco sin higienizar. *Medicina de Familia (And)*. 2007; 2:27–32.
- Bowden R. Género *Brucella*. In: Stanchi N, Martino P, Gentilini E, Reinoso E, Pennimpe E, eds. *Temas de Microbiología Veterinaria*, primera edición. Buenos Aires, Argentina: Ediciones Sur, 1996.
- Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2660–2666.
- Carpenter CM, Boak R. *Brucella abortus* in milk and dairy products. *Am J Public Health* 1928; 18:743–751.
- Casao MA, Navarro E, Solera J. Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis. *J Infect* 2004; 49:102–108.
- Cetin ES, Kaya S, Demirci M, Aridogan BC. Comparison of the BACTEC blood culture system versus conventional methods for culture of normally sterile body fluids. *Adv Ther* 2007; 24:1271–1277.
- Cooper CW. Risk factors in transmission of brucellosis from animals to humans in Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86:206–209.
- Dean AS, Crump L, Greter H, Schelling E, et al. Global burden of human brucellosis: A systematic review of disease frequency. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1865.
- Delgado P. Diagnóstico de brucellosis en trabajadores de centros de procesamiento de cárnicos de Cuenca, mediante seroaglutinación rápida en placa. Doctoral Thesis. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca. 1992; 61 pp.
- Deodato BN, Mortarini M, Garro S, Wallach JC. Retrospective analysis of human brucellosis cases attended in an Infectious Diseases Hospital of Buenos Aires City between years 2008 and 2011. In: Proceedings of the Brucellosis 2011 International Research Conference, September 21–23, 2011. Buenos Aires, Argentina; p. 34.
- Díaz R, Leiva J, Rubio M, Dorronsoro I. Diagnóstico de la brucellosis humana. In: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B, eds. *Diagnóstico de Brucellosis Animal*. México: INIFAP, 2001: 198–212.
- Doganay M, Aygen B. Human brucellosis: An overview. *Int J Infect Dis* 2003; 7:173–182.
- Dohoo IR, Martin W, Stryhn H. *Veterinary Epidemiologic Research*. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada: AVC Inc., 2003.
- EPI-2. Casos de brucellosis humana reportados en Ecuador (1990–2007). *Epidemiología. Reporte del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (EPI-2)*. 2008.
- FAO and OMS. Comité Mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose. Genève, Suisse: Sixieme Rapport. Organisation Mondiale de la Santé, 1986.
- FAO. Guidelines for Coordinated Human and Animal Brucellosis Surveillance. Rome: Empres Emergency Prevention Aystem, 2003.
- Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:775–786.
- Frankena K, Somers JG, Schouten WG, van Stek JV, et al. The effect of digital lesions and floor type on locomotion score in Dutch dairy cows. *Prev Vet Med*. 2009; 88:150–157.
- Grilló MJ, Barberán M, Blasco JM. Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lambs. *Vet Rec* 1997; 140:602–605.
- Godfroid J, Boelaert F. Prescriptions pour le diagnostic sérologique de la brucellose. Belgium: CODA-CERVA (Ed.), 1995:47.
- Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J* 2010; 51:296–305.
- Gómez MC, Nieto JA, Rosa C, Geijo P, et al. Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:1031–1033.
- Guevara, F, Fuentes J, Barrios, M. Brucellosis en niños, una causa de síndrome febril prolongado de difícil diagnóstico; revisión a partir de la presentación de un caso. *Revista Colombiana de pediatría, Hospital Universitario Pediátrico de la Misericordia*. Bogotá, Colombia. 2009. Available at www.encolombia.com/medicina/pediatria/pediatria35400brucellosis.htm Last accessed August 16, 2013.
- Guillén A. *Brucella melitensis* en el hombre: clínica, tratamiento y bioseguridad. In: Cocchione R, Durlach R, Larghi O, Martino P, eds. *Temas de Zoonosis III*. Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Zoonosis, 2006.

- Hamdy ME, Amin AS. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Vet J* 2002; 163:299–305.
- Hernández A, García P, Cruz A, Rojo J. Seroprevalencia de brucelosis en disponentes de sangre del Hospital General de México, vol. 62. México: Revista Médica del Hospital General de México S.S., 1999;107–112.
- INEC. Anuario de estadísticas hospitalarias. In: Informe Analítico. Quito, Ecuador, 2008:82, 92, 64.
- Intriago, W. Investigación de brucelosis en porcinos sacrificados en el matadero de la ciudad de Portoviejo, mediante la prueba de sero-aglutinación en placa. Doctoral Thesis. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Técnica de Manabí, 1971: 151.
- Issa H, Jamal M. Brucellosis in children in south Jordan. *East Mediterr Health J* 1999; 5:895–902.
- Kalaajieh WK. Epidemiology of human brucellosis in Lebanon in 1997. *Med Mal Infect* 2000; 30:43–46.
- Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol Infect* 2008; 136:496–503.
- MAG-SESA. Prevención y control de la brucelosis bovina en Ecuador. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria, 1999.
- Mantur BG, Biradar MS, Bidri RC, Mulimani MS, et al. Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years' experience in an endemic area. *J Med Microbiol* 2006; 55:897–903
- Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Ind J Med Microbiol* 2007; 25:188–202.
- Meky FA, Hassan EA, Elhafez A, Aboul FAM et al. Epidemiology and risk factors of brucellosis in Alexandria governorate. *East Mediterr Health J* 2007;13:677–685
- McDevitt DG. Brucellosis and the veterinary surgeon. *Vet Rec* 1971; 21:537–539
- Minas M, Minas A, Gourgulianis K, Stournara A. Epidemiological and clinical aspects of human brucellosis in Central Greece. *Jpn J Infect Dis* 2007; 60:362–366.
- Moriyón I, Díaz R, López-Goñi I. Bacteriología del género *Brucella*. In: Rodríguez T, Orduña A, Ariza X, Morrión I, Díaz R, et al., eds. *Manual de Brucelosis*. España: Junta de Castilla y León, 2001:21–30.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). *Perfil de Sistema de Salud: Ecuador, Monitoreo y Análisis de los Procesos de Cambio y Reforma*, 3rd ed. Washington DC: OPS (ed), 2008:68.
- Omer MK, Assefaw T, Skjerve E, Tekleghiorghis T, et al. Prevalence of antibodies to *Brucella* spp. and risk factors related to high-risk occupational groups in Eritrea. *Epidemiol Infect* 2002; 129:85–91.
- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou, L, et al. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:91–99.
- Pila-Perez R, Pila-Peláez R, Basulto M, Hernández O, et al. Estudio clínico de la brucelosis humana. *Revista Médica Uruguay* 1997; 13:110–117.
- Rahman A, Berkvens D, Fretin D, Saegerman C, et al. Seroprevalence and risk factors for brucellosis in high risk group individuals in Bangladesh. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9:190–197.
- Ron-Román J, Saegerman C, Minda-Aluisa E, Benítez-Ortíz, W, et al. Case report: First report of orchitis in man caused by *Brucella abortus* biovar 1 in Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87:524–528.
- Roux, J. Epidemiology and prevention of brucellosis. *Bull World Health Org* 1979; 57:179–194.
- Saegerman C, Berkvens D, Godfroid J, Walravens K. Chapter 77: Bovine brucellosis. In: *Infectious and Parasitic Disease of Livestock*. France: Lavoisier et Commonwealth Agricultural Bureau, International ed., 2010:971–1001.
- Serra J, Godoy P. Incidencia, etiología y epidemiología de la brucelosis en un área rural de la provincia de Lleida, *Rev Esp Salud Pública* 2000; 74:45–53.
- Shehata A, Salim MA, Al-Anzi AA. Risk factors and clinical presentation of brucellosis in Al-Jahra Hospital (1997–1999). *Kuwait Med J* 2001; 33:44–47
- Snijders TAB, Bosker RJ. *Multilevel Analysis: An Introduction to Basic and Advanced Multilevel Modeling*. London: SAGE Publications Ltd., 1999.
- Soudbakhsh A, Mortazav H, Hajiabdolbaghi M, Hasibi M, et al. Determination of the optimal cut-off point for ELISA test for diagnosis of brucellosis. *Tehran Univ Med J* 2009; 67:415–420.
- Thiange P, Saegerman C, Botton Y, Limet JN. Brucellose bovine: Le test d'agglutination en présence de facteur rhumatoïde après traitement du sérum par le dithiothreitol dans la différenciation des animaux vaccinés et infectés. *Annales de Médecine Vétérinaire* 1992; 136:471–476.
- Torres J, López A, García R, Gutiérrez J. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Brucella* en disponentes de sangre con fines terapéuticos en tres bancos de sangre del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Gac Méd Mex* 2004; 140:145–148.
- Torres H. Control de Brucellosis Bovina—Programa Nacional. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria (SESA). Quito, Ecuador, 2008:30.
- Twisck JWR. *Applied Longitudinal Data Analysis for Epidemiology: A Practical Guide*. Cambridge University Press, 2003
- VanLeeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, et al. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. *Prev Vet Med* 2010; 93:129–138
- Wassif SM, El-Samra AGH, El-Sabbagh F, Aboel-Seoud AR. Brucellosis in Shakira Governorate, an epidemiological study. *Egypt J Commun Med* 1992; 10:147–158
- WHO. World Health Organization. Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7. Geneva, Switzerland, 2006: 36–56.
- Yagupsky P. Detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR660 Blood Culture System. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1899–1901.
- Young E. Especies de *brucella*. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, eds. *Enfermedades Infecciosas Principios y Prácticas*, cuarta edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1997: 2230–2301.

Address correspondence to:

Claude Saegerman

Research Unit of Epidemiology and Risk Analysis Applied to

Veterinary Sciences (UREAR-ULg)

Department of Infections and Parasitic Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Liège

Boulevard de Colonster, 20, B43b

B-4000 Liège

Belgium

E-mail: claudesaegerman@ulg.ac.be

SECTION EXPÉRIMENTALE

Partie 4: Performance des tests utilisés pour le diagnostic de la brucellose humaine en Equateur

Les enfants, un groupe de risque!



Source: Jorge Ron-Román
Cantón Mejía, provincia de Pichincha – Ecuador
2006

ARTICLE 5

Bayesian evaluation of three serological tests for detecting antibodies against *Brucella* spp. among humans in the north-western part of Ecuador.

J. Ron-Román, L. Ron-Garrido, E. Abatih, M. Celi-Erazo, L. Vizcaíno-Ordóñez, J. Calva-Pacheco, P. González-Andrade, D. Berkvens, W. Benítez-Ortíz, J. Brandt, D. Fretin and C. Saegerman.

Article en révision dans : American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

Préambule

Une fois la prévalence apparente de la brucellose estimée chez l'homme et les facteurs de risque identifiés (3^{ème} partie du travail expérimental), les résultats des tests diagnostiques imparfaits ont été combinés avec des informations *a priori* (avis d'experts), dans un modèle bayésien, afin d'évaluer les performances (Se et Sp) du test utilisé chez l'homme.

Résumé en français

Dans de nombreux pays, la brucellose reste une zoonose majeure mais négligée, qui est responsable de pertes économiques sévères tant pour le secteur de l'élevage, que pour la santé publique (temps de travail et coûts liés au diagnostic et à des traitements de longue durée). Une condition préalable à tout programme de prévention et / ou de contrôle consiste à estimer la prévalence réelle de la maladie et à identifier la souche de *Brucella* spp. circulant dans les différents compartiments. Le but de cette étude a été d'estimer la prévalence réelle chez l'homme, via l'utilisation de trois tests sérologiques, en tenant compte de leur sensibilité et spécificité. Les prélèvements ont été réalisés dans le nord-ouest de l'Equateur, et les résultats analysés via une approche bayésienne ajustée pour les dépendances entre tests multiples, dans le but d'éviter toute erreur d'interprétation. En outre, l'agent causal de la brucellose humaine dans cette région a été identifié. Un total de 3733 échantillons humains a été prélevé dans cette région de l'Equateur entre 2006 et 2008. La prévalence de la brucellose humaine et les caractéristiques des tests de diagnostic, à savoir (i) l'agglutination rapide au Rose Bengal (RBT), (ii) la séro-agglutination lente de Wright avec EDTA (SAT-EDTA) et (iii) un test immunoenzymatique indirect (iELISA), ont été estimées grâce à une approche bayésienne. La prévalence réelle de la brucellose humaine a été estimée à 1% (intervalle de crédibilité: 0,4 à 1,6). Les sensibilités des tests iELISA et RBT étaient plus élevées mais très similaires (respectivement 95,1% et 95,0 %,) en comparaison à celle de la SAT-EDTA (60,8 %). Même si tous les tests ont présenté une spécificité élevée (> 99,0 %), celle du SAT-EDTA était la plus importante (99,9 %). La souche circulant dans cette zone d'étude a été identifiée comme étant *Brucella abortus* biotype 4. Les tests RBT et iELISA sont recommandés pour estimer la prévalence réelle de la brucellose humaine dans le cadre des programmes de surveillance au vu de leur sensibilité et spécificité élevées. La stratégie proposée doit se baser sur des données factuelles, dont les

décideurs doivent tenir compte pour mettre en place des programmes appropriés de prévention et de contrôle de la brucellose dans le monde entier

.

**Bayesian evaluation of three serological tests for detecting antibodies against
Brucella spp. among humans in the north-western part of Ecuador**

Jorge Ron-Román^{1,2,3,4}, Lenin Ron-Garrido¹, Emmanuel Abatih³, Maritza Celi-Eraza¹,
Laura Vizcaíno-Ordóñez¹, Jaime Calva-Pacheco¹⁻⁵, Pablo González-Andrade¹⁻⁵,
Dirk Berkvens³, Washington Benítez-Ortíz¹⁻⁶, Jef Brandt³,
David Fretin⁷ and Claude Saegerman^{2*}

¹ Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), Universidad Central del Ecuador, Quito Ecuador.

² Research Unit of Epidemiology and Risk analysis applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULg), Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH) Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Belgium.

³ Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp - Belgium.

⁴ Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. Sangolquí, Ecuador.

⁵ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito - Ecuador.

⁶ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito - Ecuador.

⁷ Department of Bacteriology and Immunology, Veterinary and Agrochemical Research Centre, Brussels - Belgium.

* Address correspondence to Claude Saegerman, Research Unit of Epidemiology and Risk analysis applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULg), Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège. Boulevard de Colonster, 20, B43b, B-4000 Liège, Belgium. Tel: 003243664579 ; Fax: 003243664261; E-mail: claude.saegerman@ulg.ac.be

Abstract

In many countries brucellosis is an important but neglected zoonosis that causes serious economic losses in livestock but also in human (working time and costs related to diagnosis and long treatment durations) compartments. A prerequisite for any preventive and/or control programme consists in the estimation of the true prevalence of the disease and the identification of circulating strain of *Brucella* sp. in these compartments. The aim of the present study was to estimate this true prevalence together with diagnostic sensitivity and specificity of three serological tests in humans of the north-western part of Ecuador using a Bayesian approach adjusted for the dependencies among the multiple tests to avoid any misinterpretation. In addition, the causal agent responsible for human brucellosis in this region will be identified. Using a total of 3,733 samples collected from humans in the north-western part of Ecuador between 2006 and 2008, the prevalence of human brucellosis and the diagnostic test characteristics of the Rose Bengal fast agglutination test (RBT), Wright's Slow Agglutination Test with EDTA (SAT-EDTA) and indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (iELISA) were estimated using a Bayesian approach. The estimated true prevalence of human brucellosis was 1% (credibility interval: 0.4-1.6). The sensitivities of iELISA and RBT were higher and very similar (95.1 and 95.0% respectively) compared to that of SAT-EDTA (60.8%). Even though all tests indicated a high specificity (>99.0%), the specificity of SAT-EDTA was highest (99.9%). The circulating strain in this study area was identified to be *Brucella abortus* biotype 4. The RBT and the iELISA are recommended for estimating the true prevalence of human brucellosis and/or for surveillance programs following their high sensibilities and specificities. The proposed strategy supports evidence-based medicine for clinicians and policy-makers to ensure appropriate preventive and control programme of brucellosis worldwide.

Key words: Brucellosis, Ecuador, *Brucella abortus* biotype 4, Bayesian approach, Diagnostic tests, True prevalence.

INTRODUCTION

Brucellosis is an infectious and contagious disease caused by Gram-negative coccobacilli, which can survive in the cells of the immune system. It has a high tendency to cause chronic infections both in humans and in cattle (Orduña et al., 2000; Saegerman et al., 2010; Young, 1997).

In many countries brucellosis is an important disease that causes serious economic losses in cattle production (Corbel, 2006). In Ecuador these losses are estimated at 5.5 million US\$ per year (Torres, 2008). In humans, this zoonosis causes mainly losses in working time and costs related to diagnosis and long treatment durations (Bowden, 1996).

Brucellosis is transmitted to man by direct contact with blood, placentas, foetuses or vaginal secretions of infected animals and through consumption of products of animal origin, mainly raw milk, cheese or yoghurt. The disease may show variable symptoms in humans with a tendency for recurrence, even though many times the infection is asymptomatic (Saegerman et al., 2010; Sarguna et al., 2002). The incubation period varies between one and four weeks, in some cases even longer. The disease can develop sub-clinically, acutely or as a lasting condition with variable progress (Díaz et al., 2001).

Despite brucellosis being declared a communicable disease in Ecuador until 2007, the true incidence of human cases remains largely unknown. According to the Ministry of Health (MSP), only 111 human cases were reported between 1990 and 2007 whereas, the National Institute for Statistics and Census (INEC) registered 152 persons hospitalized because of brucellosis between 1995 and 2007.

The most reliable diagnosis in humans consists in detecting the presence of the bacteria by bacteriological examination. However, the high cost and the risk for human contamination during *in vitro* cultures prevents this method from becoming the standard diagnostic tool. Therefore, common immunological assays such as the Rose Bengal fast agglutination test (RBT), Wright's Slow Agglutination Test with EDTA (SAT-EDTA) and indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (iELISA) based on the detection of

antibodies against *Brucella* spp. have mostly been used in combination for an early diagnosis of the disease. Since each diagnostic assay has its characteristic sensitivity (Se) and specificity (Sp), which varies according to its detectable immunoglobulin isotype, the results of the multiple tests have usually been assumed to follow a multinomial distribution and a Bayesian approach used to simultaneously estimate the true prevalence and diagnostic Se and Sp (Berkvens et al., 2006; Branscum et al., 2005; Dendukuri & Joseph, 2001).

An important consideration in the evaluation of multiple diagnostic tests is whether or not the tests can be assumed conditionally independent of each other given the true disease status. It has been demonstrated that the assumption of conditional independence may lead to biased estimates for test characteristics if in fact the tests are conditionally dependent (Vacek, 1985). Since RBT, SAT-EDTA and iELISA are based on sera and considered to be conditionally dependent on each other, any estimation procedure should adjust for the dependencies among the tests (Branscum et al., 2005; Dendukuri & Joseph, 2001).

The aim of the present study was to estimate the true prevalence of human brucellosis together with diagnostic Se and Sp of RBT, SAT-EDTA and iELISA applied to humans in the north-western part of Ecuador using a Bayesian approach. In addition, the causal agent responsible for human brucellosis in this region will be identified.

METHODS

Ethical considerations

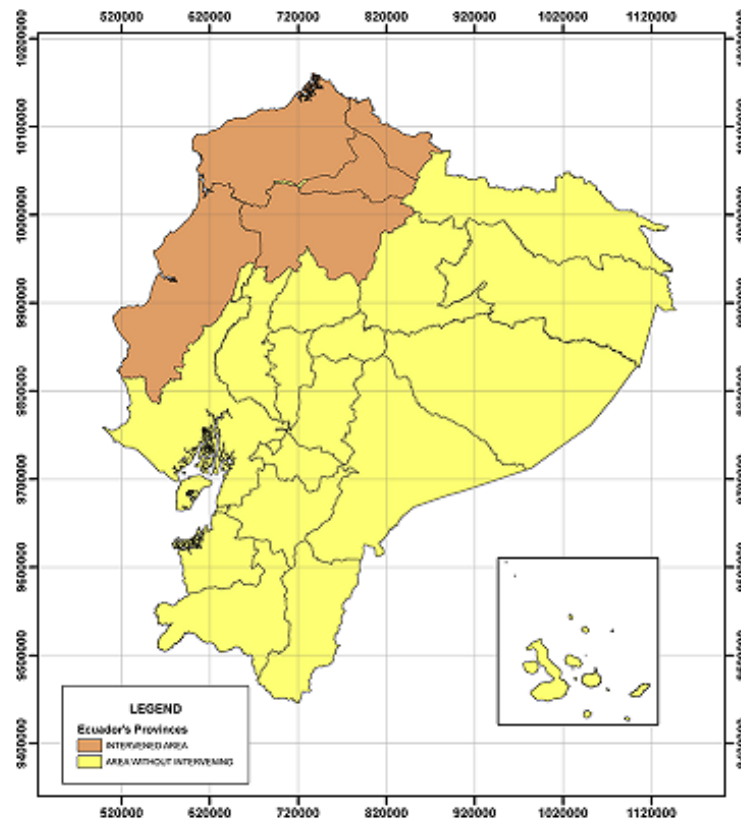
The protocol was thoroughly reviewed and approved for ethics by the Bioethics Committee of the Biomedical Center, Central University of Ecuador. Prior to being included in the study, all participants provided informed written consent. For minors, parents/guardians provided written consent on their behalf.

Description of the study and the study region

Between 2006 and 2008 a transect study was conducted, based on blood sampling of people from NW Ecuador together with an epidemiological survey of brucellosis. After informed consent, blood samples were taken from persons inhabiting the high-altitude

or Sierra provinces such as Carchi, eastern Imbabura and eastern Pichincha and the coastal provinces such as Esmeraldas, Manabí, western Imbabura and western Pichincha. Selection of the zones was based on their high prevalence of bovine brucellosis i.e. between 4.0% and 10.62% in the Sierra and between 5.88% and 10.62% in the Coast(Torres, 2008) and the occurrence of 41.30% (19 of 46) of the human cases, as reported by MSP between 1997 and 2007 and 51.97% (79 of 152) of the hospitalized brucellosis patients, as reported by INEC in 2008. A map of the study zone is shown on Figure 1.

Figure 1. Location of the study area



Samples

A total of 3,733 blood samples were collected from people with occupational hazards. Individuals were divided into two groups: a group of people under high risk for brucellosis infections such as labourers at cattle farms, slaughterhouse workers, meat and organ traders, cattle traders, veterinarians, zoo workers, teachers and students from

a faculty of animal production and farm and slaughterhouse managers, and a group of people under relatively low risks for brucellosis infections such as agricultural labourers, informal traders, public servants, school and college teachers, students, house workers and transporters.

Diagnostic assays

Three serological assays to detect antibodies against *Brucella* spp. were used: Rose Bengal fast agglutination test (RBT), Wright's Slow Agglutination Test with EDTA (SAT-EDTA) and indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (iELISA) (Godfroid & Boelaert, 1995). The protocols are available in Appendix A. Samples were processed and analysed in the laboratory for immunodiagnosis at the International Centre for Zoonoses (CIZ) of the Central University of Ecuador.

Isolation and typing of *Brucella* spp.

The isolation of the causal agent was based on blood cultures - BACTEC (3 repetitions with 30 minutes-intervals) from persons with high serotitres. Blood cultures were done at the "Hospital Vozandes Quito". Isolated *Brucella* were typed in CIZ and the Veterinary and Agrochemical Research Centre (VAR-CERVA) by (1) macroscopic and microscopic observation of the colonies in cultures, (2) biochemical assays (oxydase, catalase and urease), (3) production of H₂S, (4) CO₂ growth requirement, (5) growth in stained media (thionine, basic fuchsin, safranin), (6) agglutination with mono-specific sera A and M and (7) performance of PCR – AMOS (Bricker & Halling, 1994).

Statistical analysis

Model building and diagnostics

Using the crossed classified test results for the three tests, it was assumed that the resulting cell frequencies/counts followed a multinomial distribution. Using the models developed by Branscum et al. (2005) and Berkvens et al. (2006), the corresponding multinomial cell frequencies were expressed in terms of the true prevalence of human brucellosis in the population, the Se and Sp of RBT, SAT-EDT and iELISA and additional terms to account for the conditional dependence between each pair of tests (Appendix B). In this scenario, including all parameters and possible interactions between the three individual tests requires fifteen parameters to be estimated namely;

the prevalence, the sensitivity and specificity of the first test, two conditional Se and two conditional Sp for the second test, and finally four conditional Se and four conditional Sp for the third test. This model is in fact inestimable since the data only allows seven parameters to be estimated. As none of the three tests is considered a gold standard test and the tests are not conditionally independent, constraints have to be imposed on a subset of the parameters in order to reduce the number of parameters to be estimated (Berkvens et al., 2006).

By combining the results of the applied assays (RBT, SAT-EDTA and iELISA), the prevalence of this zoonosis among humans in the north-western part of Ecuador was estimated together with the sensitivity and the specificity of each of the tests. To evaluate the goodness of fit of the models, the Bayesian p-value, Deviance Information Criterion (DIC) (Spiegelhalter et al., 2002) and the number of effectively estimated parameters (pD) (Berkvens et al., 2006) were used as calibrating parameters. Briefly, the DIC ensures that the most parsimonious model is used. It is calculated as $DIC = pD + D$ with D the mean posterior deviance and pD the number of parameters effectively estimated by the model. Models with a smaller DIC should be preferred over models with larger DIC. The Bayesian p-value is a posterior predictive check that detects lack-of-fit of the model to the data. It is based on the difference between the deviance of the observations and the deviance of observations generated randomly from the currently fitted model and should have a value around 0.50. The values of pD and DIC evaluated based on the posterior means of the multinomial probabilities and those based on the posterior means of the parameters should be as close as possible (Berkvens et al., 2006).

Modeling conditional dependence

Using the model that assumes conditional independence (CID) among the three tests given the true disease status of individuals as the baseline model, conditional dependence (CD) between each pair of tests was estimated using different parameterizations of the model that assumed CD between tests (Berkvens et al., 2006; Branscum et al., 2005; Nérette et al., 2008). Essentially, in the first parameterization, the CD between iELISA and RBT was modeled and the data used was based on crossed classified test results with iELISA on the first column, RBT on the second column and SAT-EDTA on the third column (Table 1).

Table 1: Cross-classified test results for human brucellosis in cattle in the North western part of Ecuador based on RBT, SAT-EDTA and iELISA

RBT	SAT-EDTA	iELISA	Number
0	0	0	3,663
0	0	1	7
0	1	0	0
0	1	1	2
1	0	0	11
1	0	1	31
1	1	0	1
1	1	1	18
Total			3,733

Legend: RBT: Rose Bengal test; SAT-EDTA: Wright's Slow Agglutination Test with EDTA; iELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay 1=Positive and 0=Negative.

The remaining two parameterizations involving CD between two tests were obtained by switching columns for iELISA with RBT and SAT-EDTA in turn. In addition, three models were constructed with CD between the pairs: iELISA/RBT and iELISA/SAT-EDTA, iELISA/RBT and RBT/SAT-EDTA and between iELISA/SAT-EDTA and RBT/SAT-EDTA respectively (Nérette et al., 2008). Finally a model with CD among all the three tests was considered (all pairs inclusive) separately among infected and non-infected individuals and combined.

The models can be summarized as follows:

- Model 1: CID
- Model 2: CD between RBT and SAT-EDTA
- Model 3: CD between iELISA and RBT
- Model 4: CD between iELISA and SAT-EDTA
- Model 5: CD between iELISA and SAT-EDTA and between RBT and SAT-EDTA
- Model 6: CD between iELISA and RBT and between iELISA and SAT-EDTA
- Model 7: CD between iELISA and SAT-EDTA and between RBT and SAT-EDTA
- Model 8: CD among all tests for infected subjects i.e. between iELISA and SAT-EDTA, between iELISA and RBT, and between RBT and SAT-EDTA
- Model 9: CD among all tests for non-infected subjects i.e. between iELISA and SAT-EDTA, between iELISA and RBT, and between RBT and SAT-EDTA

- Model 10: CD among all tests i.e. between iELISA and SAT-EDTA, between iELISA and RBT, and between RBT and SAT-EDTA.

Representing the CD between pairs of tests among infected animals by a and among the non-infected population by b , posterior estimates were obtained along with their 95% Credibility intervals (Cr. I.). If the Cr. I. includes zero, it will imply that the data does not provide enough evidence against the null hypothesis of CID whereas if the interval excludes zero, the CID assumption between the two tests will be rejected in favor of the alternative hypothesis of CD. All models were compared using the DIC. To be considered significantly different, the reduction in DIC between any two models should be more than three units. In situations where the difference in DIC was smaller than three units, the models were assumed to be similar and selection was based on parsimony (Spiegelhalter et al., 2002).

Prior distributions for parameters

In Ecuador, the prevalence, sensitivities and specificities of the three tests used are not known. Priors were therefore introduced based on similar studies among humans in different countries found in the literature. The average prevalence of brucellosis among humans ranged between 0 and 0.2 (Araj & Azzam, 1996; Kadri et al., 2000), sensitivity and specificity ranged between 0.88 and 1 and between 0.93 and 1, respectively for iELISA, 0.49 and 1 and between 0.97 and 1 for SAT-EDTA, respectively and lastly 0.9 and 1 and 0.95 and 1, respectively for RBT (Gómez et al., 2008; Memish et al., 2002; Orduña et al., 2000; Rahman et al., 2012). The lower and upper limits of these ranges were used to define Uniform distributions for the parameters.

Prior information on the eight covariance parameters (four for infected and four for the non-infected individuals) were not available so their ranges were generated based on priors for the sensitivities and specificities for the three tests (See Appendix B). Uniform prior distributions were then assumed based on the ranges (Branscum et al., 2005).

Model diagnostics

All models were run using three chains, a burn-in period of 10,000 iterations and another 20,000 iterations (with thinning applied) to obtain the posterior estimates. Trace plots were simultaneously combined with autocorrelation plots to explore the convergence of the model. A more formal test for convergence, the Brooks, Gelman and Rubin convergence statistic was used to assess model convergence and only properly converged models were further considered (Gelman & Rubin, 1992). The WinBugs code used is found in Appendix B.

Sensitivity analyses

Several studies have indicated that for the CD model, the prior information influences the posterior estimates (Branscum et al., 2005; Haley et al., 2011; Praud et al., 2012). The influence of prior information on the posterior estimates was assessed by conducting a sensitivity analysis. This was done by using non-informative priors and slight perturbations (in steps of 10 or 15%) of the prior intervals (Haley et al., 2011).

The following sets of priors were considered:

- Non-informative prior (NIP) for the prevalence and information priors (IP) for the Ses and Sps
- NIP for the prevalence and for the Ses and IPs for the Sps
- NIP for the prevalence and for the Sps and IPs for the Ses
- IP for the prevalence and NIP s for the Ses and Sps
- IP for the prevalence and for the Ses and NIPs for the Sps
- IP for the prevalence and for the Sps and NIPs the Ses
- Perturbations of the prior interval.

For each set of alternative prior distributions considered for the parameters, the model was run with the same number of chains and similar diagnostics were performed. It is also known that inferences based on multinomial data with zero cell frequencies may lead to slow convergence or non-convergence and hence inaccurate results especially when the total sample size is small (Enøe et al., 2000). Since there are no immediate

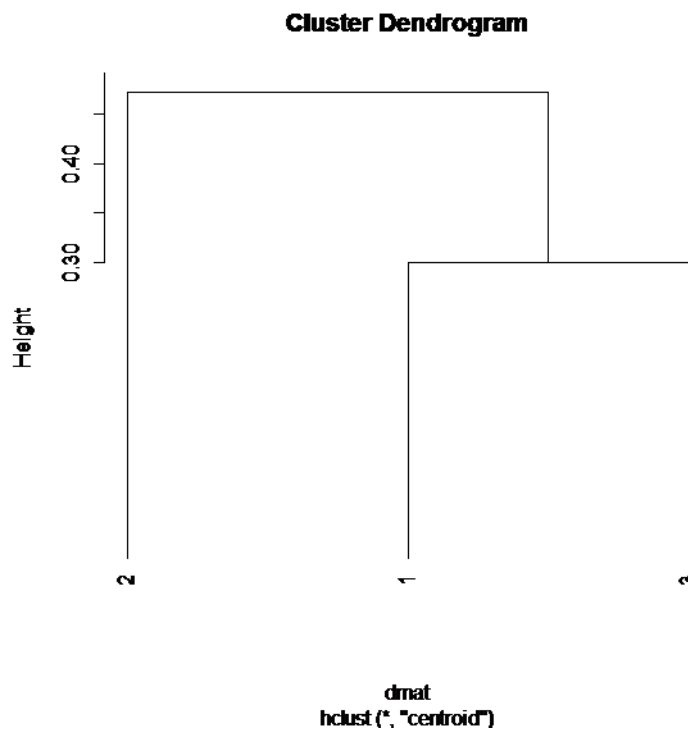
corrections or exact methods, the effects of zero-multinomial frequencies on the estimates were evaluated by replacing each zero frequency with a one.

RESULTS

Apparent prevalence and correlation analysis

The cross classified test results of the three serological tests on the 3,733 samples are shown on Table 1. The apparent prevalence was 0.56% (95% CI: 0.35-0.85) based on SAT-EDTA, 1.63% (95% CI: 1.25-2.09) based on RBT and 1.55% (95% CI: 1.18-2.00) based on iELISA. The prevalence of brucellosis based on the three tests was 1.88% (1.46-2.36) following a parallel interpretation. The prevalence based on RBT was observed to be similar to that obtained based on iELISA. A correlation analysis (Figure 2) yielded a high similarity index of 0.7 between the results obtained based on RBT (Test 1) and iELISA (Test 3). In addition, between RBT (Test 1) and SAT-EDTA (Test 2) and between SAT-EDTA (Test 2) and iELISA (Test 3), the similarity indices appeared to be lower (0.54 and 0.55 respectively).

Figure 2: Similarity analysis of the results of RB, SAT-EDTA and iELISA, for the detection of *Brucella* spp.



Legend: **1:** Rose Bengal test (RB); **2:** Wright's Slow Agglutination Test with EDTA (SAT-EDTA); **3:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay (iELISA).

Model selection

The estimated DIC, pD and Bayesian p-values for the different models are presented in Table 2. A remarkable observation from the models was the closeness of the Bayesian p-values to 0.5 (values ranged between 0.4817 and 0.5636) indicating that all the models we tested provided acceptable fit to the data. All the DIC values were fairly close to each other with differences smaller than three. Using the conditional independence model as the baseline model (DIC=34.230), the only other model that yielded a slightly higher reduction in DIC compared to the baseline model was Model 9 (DIC=31.955); the model with conditional dependence among the three tests (Table 2). Due to the borderline-significance of the difference in DIC (difference=2.3), the selection of the most appropriate model was based on parsimony and completeness (the fewer the number estimated parameters the better). Model 9 appeared to be more parsimonious since its pD , 4.376 is slightly lower than that of model 10 ($pD=4.597$) (Table 3). The final model was therefore based on the model with conditional dependence among the three tests for non-infected individuals (Model 9).

True prevalence, accuracy and conditional dependence

The posterior mean estimates of the prevalence, the Se, Sp and the dependency coefficients for the three tests among non-infected subjects are shown on Table 3. According to the results, the true prevalence of brucellosis among humans was 1.0 % (95% Credibility Interval: 0.40-1.60). The performances of iELISA and RBT were very similar with estimated Ses and Sps of 95.1% (88.7-99.8), 95.0% (90.3-99.7) and 99.3% (98.7-99.8), 99.2% (98.6-99.7), respectively. SAT-EDTA had the lowest sensitivity of 60.8 % (40.7-96.6) and the highest specificity of 99.9% (99.8-1).

The 95% probability intervals for the conditional dependency coefficients among the three tests for the non-infected humans excluded zero implying that the hypothesis of conditional independence among the three tests is rejected in favour of the alternative hypothesis of conditional dependence. The highest conditional dependence coefficient was observed between the specificities of iELISA and RBT (0.005) whereas a lower conditional dependence was observed between iELISA and SAT-EDTA and between SAT-EDTA and RBT (0.0004) (Table 3).

Table 2: Deviance information criterion (DIC), number of estimated parameters (pD) and Bayesian p-values for the model assuming conditional independence, models assuming condition dependence between each of two tests, models including pairs of conditional dependence and a model with condition dependence between all the three tests

Type of model	DIC	pD	Bayesian p-value
Model 1: conditional independence model	34.230	3.822	0.5357
Model 2: conditional dependence between RBT and SAT-EDTA	34.666	4.359	0.5354
Model 3: conditional dependence between iELISA and RBT	34.610	4.888	0.4887
Model 4: conditional dependence between iELISA and SAT-EDTA	34.472	4.259	0.5357
Model 5: conditional dependence: between iELISA and RBT and between SAT-EDTA and RBT	34.480	4.513	0.5021
Model 6: conditional dependence: between iELISA and RBT and between iELISA and SAT-EDTA	34.437	4.690	0.4817
Model 7: conditional dependence: between iELISA and SAT-EDTA and between RBT and SAT-EDTA	32.664	4.226	0.5636
Model 8: conditional dependence: between iELISA and SAT-EDTA and between RBT and SAT-EDTA among infected subjects	35.563	4.525	0.5515
Model 9: conditional dependence: between iELISA and SAT-EDTA and between RBT and SAT-EDTA among non-infected subjects	31.955	4.376	0.4865
Model 10: conditional dependence: between iELISA, SAT-EDTA and between iELISA and RBT and between RBT and SAT-EDTA among all subjects	32.007	4.597	0.5059

Legend: **DIC**: Deviance information criterion; **pD**: number of estimated parameters.

Table 3: Posterior mean estimates and 95% Credibility Intervals of the Prevalence, Sensitivities (Se) and Specificities (Sp) of iELISA, SAT-EDTA and RBT and conditional dependence coefficients between the three tests

Test	Parameter	Posterior mean (Cr. I.)
RBT	Se	0.950 [0.903-0.997]
	Sp	0.992 [0.986-0.997]
SAT-EDTA	Se	0.608 [0.407-0.966]
	Sp	0.999 [0.998-1]
iELISA	Se	0.951 [0.887-0.998]
	Sp	0.993 [0.987-0.998]
	Prevalence	0.010 [0.004-0.016]
iELISA and SAT-EDTA	Conditional dependence	0.0004 [0.00001-0.00156]
iELISA and RBT	Conditional dependence	0.0046 [0.00022-0.00956]
RBT and SAT-EDTA	Conditional dependence	0.0004 [0.00001-0.00147]
	DIC	31.916
	pD	4.372
	Bayesp	0.4817

Legend: RBT: Rose Bengal test; SAT-EDTA: Wright's Slow Agglutination Test with EDTA; iELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Cr.I.: Credibility Intervals; Se: Sensitivities; Sp: Specificities; DIC: Deviance information criterion; pD : number of estimated parameters; Bayesp: Bayesian p-values.

Sensitivity analysis

When a NIP was used for the prevalence and IPs used for the Ses and Sps, or IPs used for the Sps and NIPs used for the Sps, the results were quite similar. On the other hand, when NIPs were used for the prevalence and the Ses and IPs were used for the Sps, there were slight but non-significant differences in the estimated prevalence and Ses. Similarly, when using an IP for the prevalence and NIPs for the Ses and Sps, or IPs used for the Sps and NIPs were used for the Ses, there were slight but non-significant differences (Cr. Is overlap) in the estimated prevalence and Ses. The results were quite similar when IPs was used for the prevalence and the Ses and NIPs were used for the Sps.

Decreasing the lower limits of all the prior intervals by 10% had no influence on the estimated parameter values and their 95% Cr. I. However, when both the lower and upper limits of the prior interval were decreased by 10%, the model did not converge ($pD=2.57$ and $DIC=688.54$). In addition, the Bayesian p-value was 1 indicating a considerable lack of fit of the data to the model.

Finally, replacing the zero observed frequencies with 1 and running all the different models, none of the models appeared to be doing better than the conditional independence model. However, the model with conditional dependence between the specificities yielded a DIC that was closest to that of the conditional independence model (data not shown). Based on this model, the estimated prevalence, Ses, Sps, and dependence coefficients were quite similar (Cr. Is overlap, data not shown).

Typifying of circulating *Brucella* spp. in North-West Ecuador

From three positive cases, *Brucella abortus* biotype 4 was isolated. Blood cultures were only positive for patients with higher levels of IgM antibodies (SAT-EDTA). Detailed information about these persons with positive blood cultures (n=22) is given in Table 4 with the characteristics of the isolations, bacteriological data and PCR in Table 5 and Figure 3 respectively. Retrospectively, positive persons were queried about possible symptoms related to brucellosis and results are presented in Table 6.

Table 4: Results of blood cultures from patients with high serological titres concomitant with brucellosis presumptive clinical symptoms (North-West Ecuador)

Nº	ID	Sample code	Age	Sex	Occupation	RB	SAT-EDTA (UI/ml)	iELISA (U/ml)	Blood culture
1	93	SHB-Ma-93	28	M	Farmer	+	-	60	-
2	104	SHB-Ma-104	22	M	Farmer	+	100	60	-
3	146	SHB-Ma-146	17	M	Student	+	80	60	-
4	187	SHB-Ma-187	49	F	Farmer	-	80	-	-
5	198	SHB-Ma-198	28	M	Farmer	-	-	30	-
6	325	SHB-Ma-325	49	F	Farmer	+	100	60	-
7	344	SHB-Ma-344	50	M	Farmer	-	50	-	-
8	372	SHB-Ma-372	39	M	Farmer	+	100	60	-
9	820	SHB-IA-1	41	M	Veterinary lecturer	+	80	60	-
10	821	SHB-IA-2	26	M	Farmer	+	100	60	-
11	822	SHB-IA-3	39	M	Farmer	+	100	60	-
12	825	SHB-IA-6	41	M	Farmer	-	100	60	-
13	2202	SHB-Cam-Nor-5	39	F	Slaughterhouse worker	+	50	60	-
14	2330	SHB-Cam-Nor-133	42	M	Slaughterhouse worker	+	40	60	-
15	2331	SHB-Cam-Nor-134	55	M	Transporter	+	-	50	-
16	2343	SHB-Cam-Nor-146	50	F	Slaughterhouse worker	+	-	48.6	-
17	2348	SHB-Cam-Nor-151	66	F	Slaughterhouse worker	+	60	60	-
18	2349	SHB-Cam-Nor-152	36	F	Slaughterhouse worker	+	320	14.4	+
19	2353	SHB-Cam-Nor-156	35	M	Slaughterhouse worker	+	100	26.2	-
20	2356	SHB-Ay-10	27	M	Veterinary student	+	1,600	60	+
21	3144	SHB-Zon-Nor-370	58	M	Farmer	+	800	60	+
22	3409	SHB-Zon-Nor-635	21	M	Farmer	+	960	60	-

Legend: ID: Identification number; RBT: Rose Bengal test; SAT-EDTA: Wright's Slow Agglutination Test with EDTA; iELISA: indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

Table 5: In vitro characteristics of the isolations

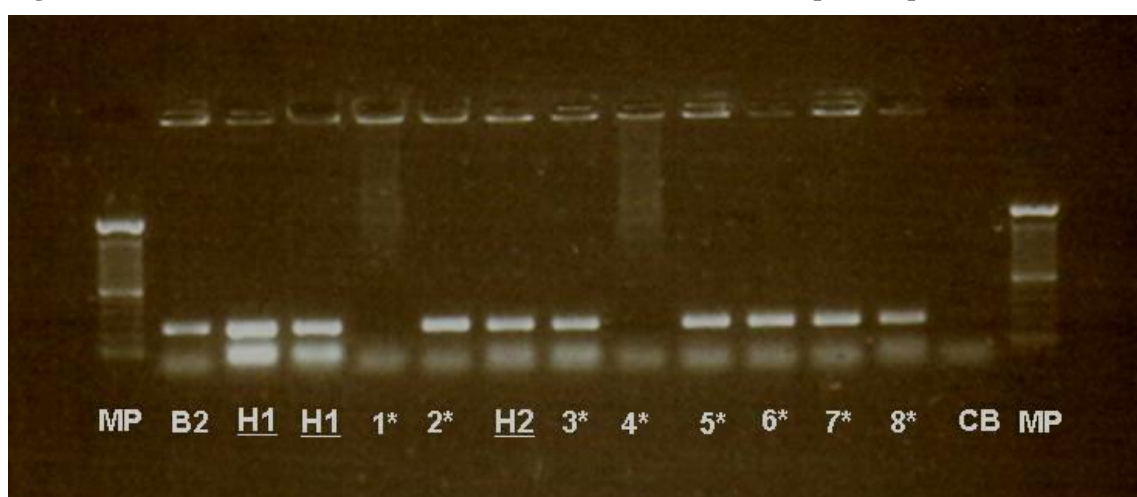
Sample code serology	Sample code bacteriology*	Urease activity	CO ₂ for growth	H ₂ S production	Growth on colorants				Agglutination with serum	
					Thionine 20 µg	Thionine 10 µg	Basic fuchsin 20 µg	Safranin 100 µg	A	M
SHB-Cam-Nor-152	Ec-CIZ-Hum1	+	+	+	-	-	+	+	-	+
SHB-Ay-10	Ec-CIZ-Hum2	+	+	+	-	-	-	-	-	+
SHB-Zon-Nor-370	Ec-CIZ-Hum3	+	+	+	+	-	+	+	-	+
B2**		+	+	+	-	-	-	-	+	-
B9***		+	-	+	+	+	+	+	-	+

Legend: *: blood culture; **: control *Brucella abortus* biotype 2; *** : control *Brucella abortus* biotype 9.

Table 6: Human brucellosis: symptoms and frequency.

Symptoms	Positive cases	Percentage
Muscular pain	29	41.43
Joint pain	25	35.71
Fever	17	24.29
Debility	17	24.29
Headache	16	22.86
Nocturnal sweating	13	18.57
Cardiac problems	10	14.29
Anorexia	4	5.71
Insomnia	4	5.71
No symptoms	17	24.29

Figure 3: PCR – AMOS of *Brucella* from blood cultures, isolated from positive persons



Legend: **MP**: Molecular weight marker; **B2**: control *Brucella abortus* biotype 2; **H1**: Human sample 1 (Ec-CIZ-Hum-1); **H2**: Human sample 2 (Ec-CIZ-Hum-2); *****: Samples from complementary studies at CIZ; **CB**: Blank control.

DISCUSSION

Given that the main objective of an epidemiological survey on human brucellosis should include the identification of brucellosis cases together with the determination of the source of infection, i.e. occupational or alimentary (Robinson, 2003), the current study aimed to provide a reliable estimate of the prevalence based on the detection of antibodies against *Brucella* spp., and the isolation and identification of the causal agent among humans in the north-western part of Ecuador.

The estimation of the true prevalence and diagnostic test characteristics was done using a Bayesian approach in the absence of a standard reference test and with no knowledge about the true disease status of individuals. The method allowed for the incorporation of prior knowledge about prevalence of human brucellosis, test sensitivities and specificities based on previous studies or expert opinions and also the estimation of the dependence between the three tests conditional on the true disease status. Different models were constructed based on different combinations of the dependencies between the tests. Using appropriate model diagnostic tools such as the DIC, pD and Bayesian p -values, it was demonstrated that the models incorporating the different covariance structures did not perform significantly better than the conditional independence model. However, the model with conditional dependence among non-infected individuals was chosen for completeness.

In the current study an overall seroprevalence of 1.88% (C.I. 1.48 - 2.38) (70 of 3,733) was found in the entire study region, which is in sharp contrast with the official data of the Ecuadorian Ministry of Health (MSP) i.e. only 67 cases between 2003 and 2007. The true prevalence was however estimated to be 1% (Cr. I: 0.4-1.6). The results of the present investigation, of previous studies and the observations described by Ron-Román et al. (2014), indicate a serious underreporting of human brucellosis in Ecuador and a rather high seroprevalence of this zoonosis. In several American countries, human brucellosis does not seem to be very important yet the reported figures may not reflect the real situation. The difficulties related to the diagnosis and the often ambiguous or even absent clinical symptoms are probably the principal reasons for the sub-notification (Robinson, 2003; Alvarez & García, 2000). The highly variable clinical reactions due to brucellosis, contributing to the difficulties in recognising the disease, (Saegerman et al., 2010; Sarguna et al., 2002), were also noted in the present study and underline the need for reliable diagnostic tests (Young, 1997).

The reasonable similarity between the results of RBT and iELISA may be due to the fact that both assays detect IgG and to their similar estimated sensitivity levels. The lower correlation found between RBT and SAT-EDTA and between SAT-EDTA and iELISA may be due to the lower estimated sensitivity of SAT-EDTA plus its ability to rather detect IgM.

The use of the Bayesian approach is incomplete without an assessment of variations in the prior information and the data on the estimated parameters using a sensitivity analysis (Caraguel et al., 2012; Enøe et al., 2000; Haley et al., 2011). Sensitivity analyses indicated that the use of diffused priors had no significant influence on the estimated prevalence and test sensitivities and specificities. It was also found that replacing the zero frequencies with 1's yielded estimates that were similar to those based on the original data. This in turn suggests that the results of our study were dominated by the data as compared to the prior information and thus are reliable.

The causal agent, i.e *Brucella abortus* biotype 4, was isolated and characterized in patients with high level of antibodies. Biotyping *Brucella* is important for the epidemiological knowledge, since it can reveal geographical characteristics and allow a better understanding of the spread of the disease (Roux, 1979). Unfortunately isolating and typing of *Brucella* spp. is not always possible since it requires high biosecurity laboratories and trained personnel. Furthermore, the low number of successful isolations in the present study is partly due to the localisation of the bacteria in specific tissues and organs like bone marrow, cerebrospinal fluid (CSF), liver, kidneys and spleen, which renders isolation from blood very unlikely (Doganay et al., 2003).

In the present study 24.29% of the persons with a positive sero-reaction showed no symptoms at all (Table 6). This is lower than the 45.6% reported by Pila-Pérez et al. (1997) and the 99% found in a retrospective study of the symptomatology by Hernández-Bastida and collaborators (1999). This absence of typical symptoms is obviously one of the reasons for underreporting and the lack of data about the disease (Saegerman et al., 2010).

The absence of a National Policy and differential diagnostic tests hinders the development of surveillance and control programmes in high-risk areas. It is thus difficult to have a realistic idea about incidence of the disease. In the past, little attention was given to brucellosis in Ecuador and it is necessary to develop programmes to control (and eventually eradicate) brucellosis in the identified risk areas whereby highly sensitive diagnostic methods will be used both for humans and for animals with the

objective of obtaining an early warning system and to determine the correct prevalence at national level.

Livestock owners should take preventive measures to control brucellosis through an integrated programme to benefit their workforce. Such a programme should encompass education, routine medical and veterinary evaluation and should provide the means for adequate protection.

In view of the results of this study, there is an urgent need for information campaigns about the risks involved by direct contact with infected animals through blood, meat and excretions and equally about the preventive care as to avoid infection. For the protection of the health of slaughterhouse workers, managers should receive instructions on how to maintain minimum biosecurity levels, including providing protective equipment, this was evidenced by Ron-Román et al. (2012). Also, investigations to isolate and identify the biotypes of *Brucella* spp., endemic to Ecuador should be continued.

Ecuador cannot be considered an endemic country for human brucellosis based on reported data by Pappas et al. (2006) although the results of the present study, based on factual data, prove quite the opposite. Underreporting and the absence of an active epidemiological vigilance may be the main reason for underestimation in supposedly brucellosis free regions.

Finally, it is of utmost importance that evidence-based information be given to national and international donor organisations involved with future prevention, control and research programmes on brucellosis.

Ethical considerations: Prior to being included in the study, participants were asked for verbal and written consent.

Acknowledgements: We thank the patients for their willingness to participate in this study

Financial support: This work was supported by the Belgian Cooperation in the framework of the Institutional Collaboration between the Institute of Tropical Medicine in Antwerp, Belgium and the International Centre for Zoonoses (CIZ) of Central University of Ecuador.

Disclaimer: The views expressed in this article are those of the authors and do not necessarily reflect the official policy or position of the Central University of Ecuador.

Disclosure: None of the authors has financial or personal conflict of interest related to this study.

Author's addresses: Jorge Ron-Román, Lenin Ron-Garrido, Maritza Celi-Erazo, Laura Vizcaíno-Ordóñez, Jaime Calva-Pacheco, Pablo González-Andrade, Washington Benítez-Ortíz¹, International Center for Zoonoses, Central University of Ecuador, Ciudadela Universitaria, P.O.Box 17-03-100, Quito, Ecuador, E-mail: jorgeronroman@gmail.com, leninron@agro.uba.ar, mceli@uce.edu.ec, lauravizcainoord@outlook.com, jimmyfran2000@yahoo.com, pdgonzalezandrade@gmail.com, wbenitez@uce.edu.ec; Jorge Ron-Román, Carra de Ingeniería Agropecuaria, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. Av. General Rumiñahui s/n. Sangolquí, Ecuador. P.O.BOX: 171-5-231. + 593 02.398.9400; jwron@espe.edu.ec; Emmanuel Abatih, Dirk Berkvens, Jef Brandt, Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Nationalestraat 155, Antwerpen, Belgium; enjiabatih@itg.be, DBerkvens@itg.be, jbrandt@telenet.be; David Fretin, Departement of Bacteriology and Immunology, Veterinary and Agrochemical Reserch Centre, Goeselenberg 99, B-1180 Brussels, Belgium, David.Fretin@coda-cerva.be; Claude Saegerman, Research Unit of Epidemiology and Risk analysis applied to Veterinary Sciences (UREAR), Department of Infections and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege. Boulevard de Colonster, 20, B43b, B-4000 Liège, Belgium, E-mail: claude.saegerman@ulg.ac.be.

Reprint requests: Jorge Ron-Román, International Center for Zoonoses, Central University of Ecuador. P.O.Box 17-03-100, Quito-Ecuador. Telefax. +59322904801 E-mail: jwron@espe.edu.ec

REFERENCES

- Araj, G. F., & Azzam, R. A. (1996). Seroprevalence of brucella antibodies among persons in high-risk occupation in Lebanon. *Epidemiology and Infection*, 117(2), 281–288. <http://doi.org/10.1017/S095026880000145X>
- Berkvens, D., Speybroeck, N., Praet, N., Adel, A., & Lesaffre, E. (2006). Estimating Disease Prevalence in a Bayesian Framework Using Probabilistic Constraints. *Epidemiology*, 17(2), 145–153. [10.1097/01.ede.0000198422.64801.8d](http://doi.org/10.1097/01.ede.0000198422.64801.8d)
<http://doi.org/10.1097/01.ede.0000198422.64801.8d>
- Bowden, R. (1996). Temas de Microbiología Veterinaria. In Stanchi, B. Brihuega, P. Martino, E. Gentilini, & E. Reinoso (Eds.), *Sur (Primera)*, pp. 159–175). Buenos Aires Argentina.
- Branscum, A., Gardner, I., Wagner, B., McInturff, P., & Salman, M. (2005). Effect of diagnostic testing error on intracluster correlation coefficient estimation. *Preventive Veterinary Medicine*, 69(1), 63–75. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.015>
- Bricker, B. J., & Halling, S. M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2660–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7852552>
- Caraguel, C., Stryhn, H., Gagné, N., Dohoo, I., & Hammell, L. (2012). Use of a third class in latent class modelling for the diagnostic evaluation of five infectious salmon anaemia virus detection tests. *Preventive Veterinary Medicine*, 104(1), 165–173. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.10.006>
- Corbel, M. J. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. Geneva Switzerland: World Health Organization.
- Dendukuri, N., & Joseph, L. (2001). Bayesian Approaches to Modeling the Conditional Dependence Between Multiple Diagnostic Tests. *Biometrics*, 57(1), 158–167. <http://doi.org/10.1111/j.0006-341X.2001.00158.x>
- Díaz, R., Leiva, J., Rubio, M., & Dorronsoro, L. (2001). Diagnóstico de la brucelosis humana. In E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, & B. Arellano (Eds.), *Diagnóstico de brucelosis animal* (pp. 198–212). México: INIFAP.
- Doganay, M., Aygen, B., Corbel, M. J., Roux, J., Shapiro, D. S., Wong, J. D., ... al., et. (2003). Human brucellosis: an overview. *International Journal of Infectious*

- Diseases, 7(3), 173–182. [http://doi.org/10.1016/S1201-9712\(03\)90049-X](http://doi.org/10.1016/S1201-9712(03)90049-X)
- Enøe, C., Georgiadis, M. P., & Johnson, W. O. (2000). Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive Veterinary Medicine*, 45(1), 61–81. [http://doi.org/10.1016/S0167-5877\(00\)00117-3](http://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00117-3)
- Gelman, A., & Rubin, D. B. (1992). Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. *Statistical Science*, 7(4), 457–472. <http://doi.org/10.1214/ss/1177011136>
- Godfroid, J., & Boelaert, F. (1995). Prescriptions pour le diagnostic sérologique de la brucellose. Belgium: CODA-CERVA (Ed.), 47.
- Gómez, M. C., Nieto, J. A., Rosa, C., Geijo, P., Escribano, M. A., Muñoz, A., & López, C. (2008). Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 15(6), 1031–3. <http://doi.org/10.1128/CVI.00424-07>
- Haley, C., Wagner, B., Puvanendiran, S., Abrahante, J., & Murtaugh, M. P. (2011). Diagnostic performance measures of ELISA and quantitative PCR tests for porcine circovirus type 2 exposure using Bayesian latent class analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 101(1), 79–88. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.05.001>
- Hernández-Bastida, A., García-Ramírez, P., Cruz-Estrada, A., & Rojo, J. (1999). Seroprevalencia de brucelosis en disponentes de sangre del Hospital General de México. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 62(2), 107–112.
- Kadri, S. M., Rukhsana, A., Laharwal, M. A., & Tanvir, M. (2000). Seroprevalence of brucellosis in Kashmir (India) among patients with pyrexia of unknown origin. *Journal of the Indian Medical Association*, 98(4), 170–1. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11016178>
- Memish, Z. A., Almuneef, M., Mah, M. W., Qassem, L. A., & Osoba, A. O. (2002). Comparison of the Brucella Standard Agglutination Test with the ELISA IgG and IgM in patients with Brucella bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 44(2), 129–132. [http://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00426-1](http://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00426-1)
- Nérette, P., Stryhn, H., Dohoo, I., & Hammell, L. (2008). Using pseudogold standards and latent-class analysis in combination to evaluate the accuracy of three diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, 85(3), 207–225.

<http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.01.011>

- Orduña, A., Almaraz, A., Prado, A., Gutierrez, M. P., Garcia-Pascual, A., Dueñas, A., ... Torres, A. R. (2000). Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4000–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060059>
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(2), 91–99. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6)
- Pila-Pérez, R., Pila-Peláez, R., Paulino-Basulto, M., Hernández-Pupo, O., Gacía-Peña, J. G., & del Sol-Torres, G. (1997). Estudio clínico de la brucelosis humana. *Rev Med Urug*, 110–117.
- Praud, A., Gimenez, O., Zanella, G., Dufour, B., Pozzi, N., Antras, V., ... Garin-Bastuji, B. (2012). Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 104(1), 94–100. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.10.014>
- Rahman, A. K. M. A., Dirk, B., Fretin, D., Saegerman, C., Ahmed, M. U., Muhammad, N., ... Abatih, E. (2012). Seroprevalence and Risk Factors for Brucellosis in a High-Risk Group of Individuals in Bangladesh. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2011.1029>.
- Robinson, A. (2003). *Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance*. Rome, Italy: FAO.
- Ron-Román, J., Saegerman, C., Minda-Aluisa, E., Benítez-Ortíz, W., Brandt, J., & Douce, R. (2012). First report of orchitis in man caused by *Brucella abortus* biovar 1 in Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(3), 524–8. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0341>
- Roux, J. (1979). [Epidemiology and prevention of brucellosis]. *Bulletin of the World Health Organization*, 57(2), 179–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/312154>
- Saegerman, C., Berkvens, D., Godfroid, J., & Walravens, K. (2010). Bovine brucellosis. In P. Lefèvre, J. Blancou, R. Chermette, & G. Uilenberg (Eds.), *Infectious and parasitic disease of livestock* (pp. 991–1021). France: Lavoisier.
- Sarguna, P., Bilolikar, A. K., Rao, A., & Mathur, D. R. (2002). Brucellosis in

- association with HIV infection- a case report. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 20(4), 221–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17657076>
- Serra Alvarez, J., & Godoy García, P. (2000). [Incidence, etiology and epidemiology of brucellosis in a rural area of the province of Lleida]. *Revista Española de Salud Pública*, 74(1), 45–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10832390>
- Spiegelhalter, D. J., Best, N. G., Carlin, B. P., & van der Linde, A. (2002). Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 64(4), 583–639. <http://doi.org/10.1111/1467-9868.00353>
- Torres, H. (2008). *Control de Brucelosis Bovina—Programa Nacional*. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura Y Pesca (MAGAP), Servicio Ecuatoriano de Saniidad Agropecuaria (SESA). Quito, Ecuador, 30.
- Vacek, P. M. (1985). The effect of conditional dependence on the evaluation of diagnostic tests. *Biometrics*, 41(4), 959–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3830260>
- Young, E. J. (1997). *Especies de brucella*. In G. Mandell, J. Bennett, & R. Dolin (Eds.), *Enfermedades Infecciosas, Principio y Practica* (Cuarta, pp. 2300–2320). Buenos Aires Argentina: Editorial Medica Paramericana SA.

Appendix A. Protocols for serological assays

Rose Bengal fast agglutination test (RBT)

The RB assay was used with Bengatest[®] antigen i.e. a concentrated suspension (4% v/v) of *B. abortus* Weybridge strain 19, heat and phenol (0.5%) inactivated, suspended in an acid buffer and stained with Rose Bengal. Equal quantities (30 µl) of serum and antigen were mixed in a well (4 min) on a glass plate and any degree of agglutination was considered a positive reaction.

Wright's Slow Agglutination Test with EDTA (SAT-EDTA)

For SAT-EDTA, the antigen (Antigen SAW[®], Synbiotics code # ASAW) was a concentrated suspension of *B. abortus* (strain 1119/3), heat and phenol (0.5%) inactivated and suspended in a phenol-buffer at 0.5%. The assay was performed as described by Godfroid and Boelaert¹³ with serum dilutions of 1/12.5, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800 and 1/25600 in a constant volume (100 µl) of antigen. Quantitative results were given as International Units of Agglutination (IU/ml). A value equal to or above 100 IU/ml, corresponding to 75% transparency of dilution 1/50 was considered as a positive reaction.

Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (iELISA)

The assay was performed according to Godfroid & Boelaert, (1995). Smooth *B. abortus* Weybridge strain 19 lipopolysaccharide (LPS) antigen was incubated on polystyrene plates for 3.5 h at 37°C and overnight at 4°C. Plates were washed 5 times with a washing solution (NaCl 0.9% + Tween 20 at 0.01%).

Then, 50 µl of 1/50 diluted serum in glycine-EDTA-Tween 80 buffer (BB) was added per well and the calibration curve was determined at dilutions 1/270, 1/540, 1/1080, 1/2160, 1/4320, 1/8640. After one hour incubation at ambient temperature, the solutions were discarded, plates were washed 5 times and 50 µl conjugate (Protein G-HRPO, Pirce CD47675, diluted at 1/1500 in G - HRPO + FCS at 2%) was added to each well and left to incubate at ambient temperature for 1 hour.

The same washing procedure was repeated and 100 µl substrate solution (i.e. *o*-PD Ortho-phenyldiamine tablets, SIGMA P-8287, one tablet of 10 mg dissolved in 25 ml citrate phosphate buffer SIGMA P-4809 + 5 µl H₂O₂ at 30%) was added to each well.

Plates were left to incubate for 20 min in the dark at ambient temperature. Subsequently the reaction was stopped by adding 25 μ l H_2SO_4 (2M) to each well. Optical densities (OD) were read by a spectrophotometer (STAT FX 2100), with filters between 492nm and 630nm. Mean OD values of the samples and the calibration curve were corrected by subtracting the mean BB from the mean OD.

A cut off value, above which a sample was considered positive, was set at or above 20 units. Calculation of the units was based on the reference values of the curve i.e. 1.87 U, 3.75 U, 7.5 U, 15 U, 30 U, and 60 U, for dilutions 1/270, 1/540, 1/1080, 1/2160, 1/4320, 1/8640 respectively.

Appendix B. WinBUGS Code

```
#Model specification
model
{
r[1:8] ~ dmulti(p[1:8], n)
## p[1] = p(111); p[8] = p(000); pr = true prevalence; a_ijk = sigma; b_ijk = sigma^prime

p[1] <- pr*(se[1]*se[2]*se[3]) + (1-pr)*((1-sp[1])*(1-sp[2])*(1-sp[3])+(1-sp[1])*b23+(1-sp[2])*b13+(1-sp[3])*b12)

p[2] <- pr*(se[1]*se[2]*(1-se[3])) + (1-pr)*((1-sp[1])*(1-sp[2])*sp[3]-(1-sp[1])*b23-(1-sp[2])*b13+sp[3]*b12)

p[3] <- pr*(se[1]*(1-se[2])*se[3]) + (1-pr)*((1-sp[1])*sp[2]*(1-sp[3])-(1-sp[1])*b23+sp[2]*b13-(1-sp[3])*b12)

p[4] <- pr*(se[1]*(1-se[2])*(1-se[3])) + (1-pr)*((1-sp[1])*sp[2]*sp[3]+(1-sp[1])*b23-sp[2]*b13-sp[3]*b12)

p[5] <- pr*((1-se[1])*se[2]*se[3]) + (1-pr)*(sp[1]*(1-sp[2])*(1-sp[3])+sp[1]*b23-(1-sp[2])*b13-(1-sp[3])*b12)

p[6] <- pr*((1-se[1])*se[2]*(1-se[3])) + (1-pr)*(sp[1]*(1-sp[2])*sp[3]-sp[1]*b23+(1-sp[2])*b13-sp[3]*b12)

p[7] <- pr*((1-se[1])*(1-se[2])*se[3]) + (1-pr)*(sp[1]*sp[2]*(1-sp[3])-sp[1]*b23-sp[2]*b13+(1-sp[3])*b12)

p[8] <- pr*((1-se[1])*(1-se[2])*(1-se[3])) + (1-pr)*(sp[1]*sp[2]*sp[3]+sp[1]*b23+sp[2]*b13+sp[3]*b12)
#Prior specification
pr ~ dunif(0,0.2)
se[1] ~ dunif(0.88,1)
se[2] ~ dunif(0.4,1)
se[3] ~ dunif(0.9,1)
sp[1] ~ dunif(0.93,1)
sp[2] ~ dunif(0.99,1)
sp[3] ~dunif(0.95,1)
#Lower and upper limits for covariance parameters based on proposed priors
ll1 <- max(-(1-se[1])*(1-se[2]), -se[1]*se[2])
```



```

ul1 <- min(se[1]*(1-se[2]),(1-se[1])*se[2])
a12 ~ dunif(l11,ul1)
l12 <- max(-(1-se[1])*(1-se[3]), -se[1]*se[3])
ul2 <- min(se[1]*(1-se[3]),(1-se[1])*se[3])
a13 ~ dunif(l12,ul2)
l13 <- max(-(1-se[2])*(1-se[3]), -se[2]*se[3])
ul3 <- min(se[2]*(1-se[3]),(1-se[2])*se[3])
a23 ~ dunif(l13,ul3)
l14 <- max(-(1-sp[1])*(1-sp[2]), -sp[1]*sp[2])
ul4 <- min(sp[1]*(1-sp[2]),(1-sp[1])*sp[2])
b12 ~ dunif(l14,ul4)
l15 <- max(-(1-sp[1])*(1-sp[3]), -sp[1]*sp[3])
ul5 <- min(sp[1]*(1-sp[3]),(1-sp[1])*sp[3])
b13 ~ dunif(l15,ul5)
l16 <- max(-(1-sp[2])*(1-sp[3]), -sp[2]*sp[3])
ul6 <- min(sp[2]*(1-sp[3]),(1-sp[2])*sp[3])
b23 ~ dunif(l16,ul6)
l171 <- -(se[1]*se[2]*se[3]+se[1]*a23+se[2]*a13+se[3]*a12)
l172 <- -((1-se[1])*(1-se[2])*se[3]-(1-se[1])*a23-(1-se[2])*a13+se[3]*a12)
l173 <- -((1-se[1])*se[2]*(1-se[3])-(1-se[1])*a23+se[2]*a13-(1-se[3])*a12)
l174 <- -(se[1]*(1-se[2])*(1-se[3])+se[1]*a23-(1-se[2])*a13-(1-se[3])*a12)
l17 <- max(max(l171, l172), max(l173, l174))
ul71 <- (1-se[1])*se[2]*se[3]+(1-se[1])*a23-se[2]*a13-se[3]*a12
ul72 <- se[1]*(1-se[2])*se[3]-se[1]*a23+(1-se[2])*a13-se[3]*a12
ul73 <- se[1]*se[2]*(1-se[3])-se[1]*a23-se[2]*a13+(1-se[3])*a12
ul74 <- (1-se[1])*(1-se[2])*(1-se[3])+se[1]*a23+(1-se[2])*a13+(1-se[3])*a12
ul7 <- min(min(ul71, ul72), min(ul73, ul74))
l11 <- min(l17,ul7)
u11 <- max(l17,ul7)
l181 <- -(sp[1]*sp[2]*sp[3]+sp[1]*b23+sp[2]*b13+sp[3]*b12)
l182 <- -((1-sp[1])*(1-sp[2])*sp[3]-(1-sp[1])*b23-(1-sp[2])*b13+sp[3]*b12)
l183 <- -((1-sp[1])*sp[2]*(1-sp[3])-(1-sp[1])*b23+sp[2]*b13-(1-sp[3])*b12)
l184 <- -(sp[1]*(1-sp[2])*(1-sp[3])+sp[1]*b23-(1-sp[2])*b13-(1-sp[3])*b12)
l18 <- max(max(l181, l182), max(l183, l184))
ul81 <- (1-sp[1])*sp[2]*sp[3]+(1-sp[1])*b23-sp[2]*b13-sp[3]*b12
ul82 <- sp[1]*(1-sp[2])*sp[3]-sp[1]*b23+(1-sp[2])*b13-sp[3]*b12
ul83 <- sp[1]*sp[2]*(1-sp[3])-sp[1]*b23-sp[2]*b13+(1-sp[3])*b12
ul84 <- (1-sp[1])*(1-sp[2])*(1-sp[3])+sp[1]*b23+(1-sp[2])*b13+(1-sp[3])*b12
ul8 <- min(min(ul81, ul82), min(ul83, ul84))
l21 <- min(l18,ul8)

```

```
u2l <- max(l18,u18)
```

```
r2[1:8] ~ dmulti(p[1:8],n)
```

```
for ( i in 1:8)
```

```
{
```

```
####d[i] <- r[i]*log(max(r[i],1)/(p[i]*n))
```

```
d[i] <- (pow(r[i]-p[i]*n,2)/(p[i]*n))
```

```
####d2[i] <- r2[i]*log(max(r2[i],1)/(p[i]*n))
```

```
d2[i] <- (pow(r2[i]-p[i]*n,2)/(p[i]*n))
```

```
}
```

```
bayesp <- step(sum(d[]) - sum(d2[]))
```

```
}
```

```
#data specification
```

```
list(r=c(18,2,31,7,1,0,11,3663), n=3733)
```

```
# Specification of initial values for the three chains used
```

```
list(pr=0.05, se=c( 0.9 , 0.912 , 0.956 ), sp=c( 0.966 , 0.999 , 0.97 ), a12= 0.0352 ,a13= 0.0176 ,a23=  
0.018128 ,b12= 0.000466 ,b13= 0.01398 ,b23= 0.00047 ,r2=c(18,2,31,7,1,0,11,3663))
```

```
list(pr=0.15, se=c( 0.93 , 0.638 , 0.9728 ), sp=c( 0.935 , 0.9995 , 0.985 ), a12= 0.009659999999999999  
,a13= 0.011696 ,a23= 0.0037536 ,b12= 0.00002174999999999976 ,b13= 0.006525000000000001 ,b23=  
0.00002424999999999973 , r2=c(18,2,31,7,1,0,11,3663))
```

```
list(pr=0.1, se=c( 0.98 , 0.858 , 0.9216 ), sp=c( 0.988 , 0.993 , 0.995 ), a12= 0.007160000000000001  
,a13= 0.008432000000000001 ,a23= 0.0280672 ,b12= 0.003416 ,b13= 0.00244 ,b23= 0.002465 ,  
r2=c(18,2,31,7,1,0,11,3663))
```

SECTION EXPÉRIMENTALE

Parti 5: Évaluation de l'importance zoonotique de la
brucellose en Equateur

Importance de l'enquête épidémiologique



Source: Jorge Ron-Román
Comunidad Cabeza de Toro, cantón Zapotillo, provincia Loja – Ecuador
2011

ARTICLE 6

First report of orchitis in man, caused by *Brucella abortus* biotype 1 in Ecuador

Ron-Román J., Saegerman C., Minda-Aluisa E., Benitez-Ortiz W., Brandt J., Douce R.

Publié en 2012 Sep dans: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 5; 87(3)

doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0341

Préambule

Les suivis sérologique et épidémiologique d'un cas clinique humain apportent des informations afin de mieux cerner la problématique d'une zoonose. En effet, ce type d'outil nous permet d'avoir un aperçu de la situation d'un point de vue complètement différent, non pas celui du vétérinaire mais plutôt celui du médecin.

Résumé en français

Cette étude de cas présente un homme de 44 ans issu d'une communauté rurale du nord de l'Equateur et qui a travaillé dans une ferme d'élevage. Il prenait part aux soins vétérinaires de base, dont l'assistance lors des naissances (ou vêlages), lors de rétentions placentaires et lors d'inséminations artificielles, sans prendre de précautions particulières. En Septembre 2009, il a brusquement développé de l'asthénie et de l'hypersomnie sans cause apparente, ainsi que des signes cliniques tels que fièvre, frissons, et sueurs nocturnes. Le 14 novembre 2009, il a présenté de la douleur et de l'œdème au niveau du testicule droit, signes qui ont coïncidé avec une douleur abdominale. Les recherches clinique, sérologique et bactériologique ont confirmé le premier cas d'orchite unilatérale causée par *Brucella abortus* biovar 1 chez l'homme, en Équateur. Comme la brucellose est une maladie négligée, une attention particulière devrait lui être accordée dans le cadre des formations médicale et vétérinaire.

Case Report: First Report of Orchitis in Man Caused by *Brucella abortus* Biovar 1 in Ecuador

Jorge Ron-Román, Claude Saegerman,* Elizabeth Minda-Aluisa, Washington Benítez-Ortíz, Jef Brandt, and Richard Douce
International Center for Zoonoses (CIZ), Central University of Ecuador, Quito, Ecuador; Research Unit of Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences (UREAR), Department of Infections and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Liege, Belgium; The Royal Society for Zoology of Antwerp (RSZA), Antwerp, Belgium;
Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Hospital Vozandes Quito, Quito, Ecuador

Abstract. We present a 44-year-old man from a rural community in northern Ecuador who worked on a cattle farm where he was involved with primary veterinary care, including assistance during births (or calving) and placenta retention and artificial insemination, with minimal precautions. In September of 2009, quite abruptly, he developed asthenia and hypersomnia without any apparent cause or symptoms like fever, chills, or night sweats. On November 14, 2009, he suffered from pain and edema in the right testicle that coincided with pain in the abdomen. Clinical, serological, and bacteriological investigations confirmed the first case of unilateral orchitis in man in Ecuador caused by *Brucella abortus* biovar 1. Because brucellosis is a neglected disease, special attention should be given to it in the training of medical and veterinary students.

INTRODUCTION

Brucellosis is a bacterial infection with severe repercussions on human and animal health, causing heavy losses worldwide.¹ In man, it can start as an acute disease with recurrent fever, sweating, general discomfort, headache, muscle pain, and arthritis. The infection is acquired through direct or indirect contact with infectious material from animal origin (i.e., aborted fetuses, placentas, and vaginal secretions) as well as accidental inoculation of vaccine, inhalation of aerosols, or consumption of non-pasteurized dairy products (mostly affecting slaughterhouse or laboratory staff).²

The frequency of human infections is directly related to the prevalence in animal reservoirs.³ In countries where adequate control or eradication programs are implemented, this zoonosis is a professional hazard, whereas in developing countries, the entire population is at risk, including tourists or other visitors of contaminated ranches.⁴

Complications such as spondylitis, arthritis, hepatosplenomegaly, and endocarditis are often observed in humans with genitourinary inflammations (epididymitis, orchitis, and prostatitis) reported in 2–20% of positive cases.⁵ *Brucella melitensis* is reported to be the most pathogenic species in man and responsible for most of the clinical cases in man.

According to official reports, the annual incidence of human brucellosis in Ecuador remains rather low (i.e., between 1990 and 2007, it affected no more than 0.21 per 100,000 persons),⁶ whereas in the same time span, in Carchi (the province where the present case has been described), four positive cases were detected (0.62 per 100,000 persons).⁶ In the absence of an official reference laboratory in Ecuador, routine isolation and biotyping of *Brucella* spp. are not done; for this reason, the existence of possible reservoirs remained completely unknown.

In contrast, preliminary studies by the International Center for Zoonosis (CIZ) suggest that the seroprevalence of brucellosis in man can be around 2% in the northwestern provinces

of Ecuador. The main risk factors are the consumption of boiled milk (odds ratio [OR] = 4.69, confidence interval [CI] = 1.45–15.18) or raw milk (OR = 5.13, CI = 1.52–17.29) and contact with fetal and placental tissue (OR = 2.10, CI = 1.02–4.33) from cattle (Ron-Román J and others, unpublished data).

CASE REPORT

A male patient (44 years old, married, and born and living in Cuaspud, a rural community in Huaca canton, Carchi province, in the north of Ecuador) worked as a cattle farm laborer for the last 3 years. As such, he was actively involved with primary veterinary healthcare, including assistance during births and placenta retention and artificial insemination in the cantons Huaca, Montufar, Bolívar, and Tulcán in Carchi province with minimal hygienic precautions.

In September of 2009, quite abruptly, he developed asthenia and hypersomnia without any apparent cause or symptoms like fever, chills, or night sweats. On November 14, 2009, he suffered from pain and oedema in the right testicle and abdominal pain. He consulted a general practitioner in the city of Tulcán who empirically prescribed 75 mg sodium diclofenac (during 7 days), 10 mg sodium naproxen (during 7 days), and 200 mg cefpodoxime (during 7 days). This treatment, however, brought no relief, and as suggested by a veterinarian, a brucellosis agglutination test (Febrile Antigen Agglutination Test; Becton Dickinson, Sparks, MD) was performed in a private laboratory in Tulcán. This test showed a positive titer of 1/320 (cutoff $\geq 1/160$) for *Brucella* spp. On November 22, he started to suffer from lumbalgia, testicular edema, and generalized asthenia. During this period, he had unprotected sex with his wife.

On November 23, he came to the CIZ of Central University of Ecuador with the diagnosis of unilateral right orchitis, lumbosacral pains, general asthenia, and positive diagnosis of brucellosis by the Febrile Antigen Agglutination Test (Becton Dickinson).

At CIZ, two serological tests showed these results: fast agglutination plate assay was Rose Bengal (RB) positive (++) and Wright's slow agglutination test with ethylenediamine-tetraacetic acid (SAT-EDTA) was positive (1,280 international units of agglutination [IAU], dilution 1/800, cutoff $\geq 1/25$). On November 26, a blood culture (4 days incubation; Bactec System) was positive for the presence of *Brucella* spp. in Hospital Vozandes Quito (HVQ).

*Address correspondence to Claude Saegerman, Research Unit of Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences (UREAR), Department of Infections and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Boulevard de Colonster, 20, B43b, B-4000 Liège, Belgium. E-mail: claude.saegerman@ulg.ac.be

TABLE 1
Case report of a patient with brucellosis-related epididymo-orchitis: Hematological and biochemical values

	Results			Units	Reference range
	12/3/2009	12/17/2009	1/8/2010		
Sedimentation rate	24*	5	ND	mm/hour	0–20
Leukocytes	7.93	5.22	5.06	K/ μ L	4.80–10.80
Neutrophils	52.0	41.2*	40.9*	%	43.0–65.0
Lymphocytes	35.3	50.6*	50.0*	%	20.5–45.5
Monocytes	12.0*	6.3	7.1	%	1.9–9.0
Eosinophils	0.4*	1.1	1.4	%	1.0–5.0
Basophils	0.3	0.8	0.6	%	0.2–1.0
Erythrocytes	5.36	5.52	5.51	M/ μ L	4.5–6.0
Hemoglobin	16.0	16.5	16.4	g/dL	14.0–18.0
Hematocrit	47.3	47.7	48.6	%	41.0–51.0
Mean corpuscular volume	88.2	86.4	88.2	fL	80.0–90.0
Mean corpuscular HB	29.9	29.9	29.8	pg	27.0–31.0
Mean corpuscular HB concentration	33.8	34.6	33.7	g/dL	32–36
Distribution width RDW SD	42.8	41.6	43.0	fL	37.0–54.0
Distribution width RDW CV	14.1	13.9	14.0	%	11.5–15.5
Platelets	308	282	252	K/ μ L	100–500
Mean platelet volume	8.7	8.4	8.9	fL	7.2–9.5
C-reactive protein	56.9*	0.66	0.36	mg/L	0.00–5.00
Creatinine	0.86	0.98	ND	mg/dL	0.70–1.20

* Values outside reference range.
ND = not done; HB = hemoglobin; RDW = red cell distribution width; SD = standard deviation; CV = coefficient variation.

On December 3 in the outpatient clinic of the same hospital, the medical staff opted for the treatment regimen recommended by the World Health Organization⁷ of doxycycline (100 mg, BID) for 6 weeks and gentamicin (320 mg intravenously daily) for 10 days. Vital signs seemed to be normal: blood pressure (BP) = 110/60 mmHg, pulse (P) = 71/minute, oral temperature (OT) = 37°C, and weight = 57.5 kg; on rectal examination, no evidence of prostatitis was observed. High values for C-reactive protein (56.9 mg/L; normal values are between 0.00 and 5.00 mg/L) indicated an inflammatory process; hematological, biochemical, and serological results are presented in Table 1.

In the laboratory for microbiology of CIZ, culture of the patient's semen in Farrell's medium (Columbia Blood Agar Base CM0331 [Oxoid] + horse serum [reference 16050–130; Gibco] + modified *Brucella* Selective Supplement SR0209E [Oxoid]) isolated *Brucella* sp. Subsequently, both strains from blood (Ec-CIZ-Hum-6) and semen (Ec-CIZ-Hum-7) were typified as *B. abortus* biovar 1 (field strain) by biochemical assays (Table 2) and Abortus, Melitensis, Ovis and Suis (AMOS)-polymerase chain reaction (Figure 1).^{8–10}

Two blood samples (taken on 12/3/2009 and 3/26/2010) of the patient's wife yielded negative results in the RB and SAT-EDTA assays; hence, no sexual transmission occurred.

On December 17 at a clinical follow-up in the hospital, the patient's status was improved, with receding orchitis, low back pain, and asthenia. Vital signs were stable (BP = 100/70 mmHg, P = 78/minute, OT = 37°C, and weight = 61.5 kg). Immunological assays showed the presence of *Brucella* sp. antibodies (RB +++ and SAT-EDTA = 1,280 IAU); *Brucella* sp. remained persistent in the blood circulation as shown by blood culture. Additional results are presented in Table 1. On January 8, 2010, a decrease in circulating immunoglobulin M (IgM) was shown by SAT-EDTA (400 IAU), but the RB assay remained highly positive (+++). Additional values are presented in Table 1. The third visit showed a complete recovery of the patient: BP = 120/90 mmHg, P = 67/minute, OT = 36.5°C, and weight = 60 kg. The patient was declared to be cured, and a monthly serological follow-up to detect relapses was recommended.

As presented in Table 3, the results of the serological assays showed a fast decline of IgM levels (as detected by SAT-EDTA), whereas the levels of IgG (by RB) remained high.

In August of 2010, the patient reported a mild pain in the lumbosacral joint that deteriorated in time. Based on a clinical examination and laboratory results (Table 3) showing a steep rise in IgM and IgG (i.e., by SAT-EDTA on 7/14/2010 and much later on 12/1/2010 by RB), the infectious diseases

TABLE 2
Case report of a patient with brucellosis-related epididymo-orchitis: Characteristics of bacterial isolations

Bacteriological sample	Sample	Growth on colorants							Agglutination with serum	
		Urease activity	CO ₂ requirement	H ₂ S production	Thionin (20 μ g)	Thionin (10 μ g)	Basic fuchsin (20 μ g)	Safrani (100 μ g)	Anti-A	Anti-M
Ec-CIZ-Hum-6	Blood	+	–	+	–	–	+	+	+	–
		(20 hour)	(48 hour)	(24 hour)			(6 day)	(48 hour)		
Ec-CIZ-Hum-7	Semen	+	–	+	–	–	+	+	+	–
		(20 hour)	(48 hour)	(24 hour)			(6 day)	(48 hour)		
B2*		+	+	+	–	–	–	–	+	–
B9†		+	–	+	+	+	+	+	–	+
B1		+	+‡	+	–	–	+	+	+	–

* Control *B. abortus* biovar 2.
† Control *B. abortus* biovar 9.
‡ Positive for the most of the strains.
EC-CIZ-Hum-6 and -7 are the *Brucella* isolates from the patient.

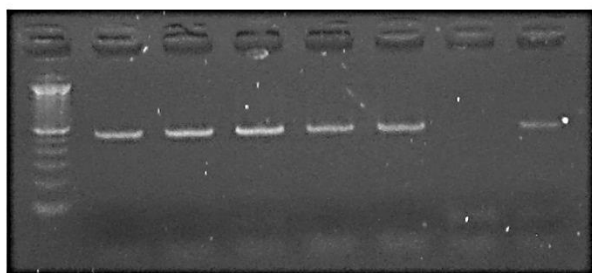


FIGURE 1. Case report of a patient with brucellosis-related epididymo-orchitis: AMOS-polymerase chain reaction results. CN = negative control; CP = positive control; H-19 = human sample 19 (Ec-CIZ-Hum-7); H-21 = human sample 21 (Ec-CIZ-Hum-6); MP = molecular weight marker. *Samples from additional studies at CIZ.

specialist of HVQ decided to start the treatment again to treat a possible relapse.

On November 7, 2010, the following treatment was used: doxycycline (100 mg every 12 hours) for 6 weeks plus gentamicin (320 mg daily intravenously) for 2 weeks. At that time, blood and semen cultures were negative for *Brucella* sp.

DISCUSSION

The official reports concerning the surveillance, control, and eradication of brucellosis in Ecuador state the limited importance of this zoonosis,⁶ and as such, these reports are accepted in the international literature¹¹; however, they seem to be far from reality. Studies performed by the CIZ show more realistic numbers of cases that are not only in persons living or working in high-risk conditions (Ron-Román J and others, unpublished data).

Epididymo-orchitis is frequently observed in regions where *B. melitensis* is endemic,¹² and it has been described in 2–20% of the infected patients^{12–14} (mostly younger patients).^{12,14,15}

TABLE 3

Case report of a patient with brucellosis-related epididymo-orchitis: Results of the serological assays

Sample number	Date	RB	SAT-EDTA (IAU)
1	11/23/2009	++	1,280
2	12/17/2009	++	960
3	1/8/2010	++	480
4	2/14/2010	+	160
5	3/26/2010	+	120
6	4/24/2010	+	120
7	5/31/2010	+	100
8	7/14/2010	+	200
9	8/17/2010	+	240
10	9/21/2010	+	400
11	10/18/2010	+	240
12	12/1/2010	++	200
13	1/14/2011	++	200
14	2/11/2011	+	100
15	3/17/2011	+	100
16	4/27/2011	+	100
17	6/6/2011	+	80
18	7/14/2011	+	60
19	8/11/2011	+	60
20	10/21/2011	+	50
21	12/12/2011	+	30

IAU = international units of agglutination; RB = Rose Bengal test; SAT-EDTA = Wright's slow agglutination test with EDTA.

However, the present study is the first report in Ecuador with *B. abortus* as the causative agent.

Usually, brucellosis-related epididymo-orchitis is unilateral,^{12,16–19} but bilateral infections have been reported.^{20,21} As in the present case, the majority of cases (53–69%) were confirmed by positive blood cultures.¹³

Isolation of *Brucella* by epididymal aspiration was performed in 6.7% of the patients with epididymo-orchitis²²; in the present study, *B. abortus* was isolated from semen, which warranted the possibility of sexual transmission, but paired serology taken from his wife with an interval of 16 weeks remained negative by RB and SAT-EDTA. The isolation of *B. melitensis* in semen from a patient with epididymo-orchitis has been reported²³; also, *Brucella* sp. has been isolated from blood culture.²⁴

Several works have promoted leucocytosis as an indicator to differentiate epididymo-orchitis caused by *Brucella* spp.^{14,15,18,20,25–27} from non-specific orchitis, but it was not observed in this case. In non-specific orchitis, signs of inflammation are very clear (i.e., dermatitis of the scrotal skin). In *Brucella* spp.-induced orchitis, the fever is undulating and lower than in nonspecific orchitis; also, in the present case, the patient never reported fever or chills.²⁸

Although the final diagnosis of brucellosis is based on the isolation of the causal agent, usually from blood samples or other bodily fluids, the use of standardized immunodiagnostic assays would be a great contribution to the diagnosis. Cases of brucellosis confirmed by blood culture with negative serological results have been reported, albeit they are rare.^{29,30}

When bacterial isolation is negative but serological results are positive or suspected, this zoonosis has to be taken into account, even more so when there is a history of risk, such as contact with natural carriers, dubious hygienic standards, living in an endemic area, or symptoms associated with brucellosis.

In endemic regions, the slightest suspicion should be sufficient to start treatment in anticipation of the confirmation by laboratory tests.¹³ Therefore, a detailed anamnesis together with a correct risk assessment is of the utmost importance to underpin the diagnosis and specific treatment of epididymo-orchitis, and it will help to avoid complications such as testicular abscesses or atrophy leading to infertility.^{31–33} In patients with epididymo-orchitis, the differential diagnosis should include brucellosis when living in an endemic region such as Ecuador, especially when these patients belong to a high-risk population. In this respect, it is interesting to note that, in 2008, epididymo-orchitis was reported in 983,286 hospitalized patients in Ecuador, but only 369 (0.037%) cases were ascribed to brucellosis (diagnostic codes N.45.0–N.45.9 according to International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems).³⁴ However, the 369 cases, provisionally attributed to brucellosis, were not confirmed by the isolation of the causal agent because of the lack of a diagnostic strategy and laboratory infrastructure for this zoonosis.

Given the intracellular localization of *Brucella* spp. mostly in the reticulo endothelial cells, the choices of the antibiotic, its dose, and duration of the treatment are crucial. The combined use of antibiotics for the treatment of brucellosis is often recommended, specifically when complications like epididymo-orchitis are involved, and it might help to reduce the chances of relapses.³⁵ The synergy of several antibiotics (doxycycline, rifampicin, and streptomycin) has shown efficacy in the treatment of this zoonosis.¹⁷

Relapse of uncomplicated cases has been reported in 5–10% of cases,³⁶ and it generally occurs weeks or months after the end of the treatment; it should be confirmed by the isolation of *Brucella* from blood or other bodily fluids or tissues.³⁷ However, in the present case, thanks to the continuous serological follow-up, the event of a possible relapse could be anticipated. As such, a complementary treatment was justified, thus avoiding septicemia and clinical complications.

For RB, the intensity of reaction was expressed as negative (–; absence of reaction) or + to ++++ (degree of agglutination), which *a posteriori* enables comparison with other quantitative assays such as i-enzyme-linked immunosorbent assay.

A possible relapse could not be confirmed by isolation of the causal agent (i.e., a negative blood and semen culture until 10/7/2010), but given the history of orchitis, it was decided to start a second treatment to minimize the risk for a relapse or development of a chronic localized brucellosis. Furthermore, the results of the SAT-EDTA assay (Table 3) and the symptoms reported by the patient underpinned the decision for a second treatment. However, despite the detection of antibodies on 7/14/2010, at that time, the medical specialist did not consider this result to be a sufficient criterion to start a second treatment. It only began when the pain in the lumbosacral region started to rise combined with an increase of antibodies, mainly detected by SAT-EDTA.

The observations made during the follow-up of the present case emphasize the need to accurately identify the causal agent of the disease and not rely solely on symptomatic treatment. As pointed out in previous studies by the CIZ, brucellosis is an important zoonosis in Ecuador; therefore, it is essential that, in primary healthcare, the clinical and serological tools to diagnose this infection should be available. In addition, because it is a neglected disease, special attention should be given to it in the training of medical and veterinary students.

To minimize as much as possible the risk for the human population to contract brucellosis in Ecuador, efforts should be made to control (eradicate) brucellosis in its natural reservoirs, and therefore, a solid control (eradication) program is needed. In anticipation of this program, it is necessary to implement an education program, covering topics related to the transmission, prevention, control, and diagnosis of brucellosis in man and animals, at least for the population at risk and its medical staff. Finally, we want to emphasize that no control or eradication program for the brucellosis in Ecuador will bring satisfactory results at the desired time without the compromise and joint work between the different actors at national level. Medical doctors and veterinarians should focus and shore up the One Health initiative.

Received May 28, 2011. Accepted for publication February 3, 2012.

Acknowledgments: Special thanks to the patient and his wife who participated in the study. We also want to thank to Drs. Carlos Ron Román and Katherine Pérez Rivadeneira for assisting during drafting the paper.

Financial support: This study was supported by the International Center for Zoonoses (CIZ) of Central University of Ecuador and the Belgian Development Agency (BTC-CTB).

Disclaimer: The views expressed in this article are the views of the authors and do not necessarily reflect the official policy or position of the Central University of Ecuador or Hospital Vozandes Quito. Before being included in the study, participants were asked for verbal and written consent. None of the authors has financial or personal conflict of interest related to this study.

Authors' addresses: Jorge Ron-Román, Elizabeth Minda-Aluisa, and Washington Benítez-Ortiz, International Center for Zoonoses, Central University of Ecuador, Ciudadela Universitaria, Quito, Ecuador, E-mails: jron-ciz@uce.edu.ec, eminda-ciz@uce.edu.ec, and wbenitez-ciz@uce.edu.ec. Claude Saegerman, Research Unit of Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences (UREAR), Department of Infections and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Liège, Belgium, E-mail: claude.saegerman@ulg.ac.be. Jef Brandt, The Royal Society for Zoology of Antwerp (RSZA), Antwerp, Belgium, E-mail: jbrandt@telenet.be. Richard Douce, Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Hospital Vozandes Quito, Quito, Ecuador, E-mail: rdouce@hcejb.org.ec.

Reprint requests: Jorge Ron-Román, International Center for Zoonoses, Central University of Ecuador, PO Box 17-03-100, Quito, Ecuador, E-mail: jron-ciz@uce.edu.ec.

REFERENCES

1. Acha PN, Szyfres B, 2003. *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, Tome I. Bacterioses and Mycoses*, 3rd Ed. Washington, DC: Pan American Health Organization.
2. Gil A, Samartino L, 2000. *Food and Agriculture Organization. Livestock Information and Policy Branch, AGAL*. Available at: <http://www.Fao.Org/ag/AGA/LSPA/papers/policypapers02.pdf>. Accessed September 2004.
3. American Public Health Association, 2004. Brucellosis. Heyman D.L., ed. *Control of Communicable Diseases Manual*. American Public Health Association, Washington, DC: 75–78.
4. Alapont Alacreu JM, Gomez LL, Delgado F, Palmero Marti JL, Pacheco JJ, Pontones Moreno JL, Jimenez Cruz JF, 2004. Brucellar orchiepididymitis. *Actas Urol Esp* 28: 774–776.
5. Ibrahim AI, Awad R, Shetty SD, Saad M, Bilal NE, 1988. Genitourinary complications of brucellosis. *Br J Urol* 61: 294–298.
6. Aguilar E, 2009. *Casos de brucelosis humana reportados en Ecuador (1990–2008)*. *Epidemiología. Reporte del Ministerio de Salud Pública*. Quito, Ecuador.
7. World Health Organization, 2006. *Brucellosis in Humans and Animals. Food and Agriculture Organization of the United Nation, World Organization for Animal Health, and World Health Organization*. Available at: <http://www.who.int/resources/publications/Brucellosis.pdf>. Accessed November 21, 2011.
8. 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: 2660–2666.
9. Bricker BJ, Halling SM, 1995. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 33: 1640–1642.
10. Ewalt DR, Bricker BJ, 2000. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J Clin Microbiol* 38: 3085–3086.
11. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV, 2006. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 6: 91–99.
12. Navarro-Martínez A, Solera J, Corredoira J, Beato JL, Martínez-Alfaro E, Atienzar M, Ariza J, 2001. Epididymo-orchitis due to *Brucella melitensis*: a retrospective study of 59 patients. *Clin Infect Dis* 33: 2017–2022.
13. Papatouris AG, Mpadra FA, Karamouzis MV, Frangides CY, 2002. Endemic brucellar epididymo-orchitis: a 10-year experience. *Int J Infect Dis* 6: 309–313.
14. Khan MS, Humayoon MS, Al Manee MS, 1989. Epididymo-orchitis and brucellosis. *Br J Urol* 63: 87–89.
15. Kadikoylu G, Tuncer G, Bolaman Z, Sina M, 2002. Brucellar orchitis in Innerwest Anatolia Region of Turkey. A report of 12 cases. *Urol Int* 69: 33–35.
16. Memish ZA, Venkatesh S, 2001. Brucellar epididymo-orchitis in Saudi Arabia: a retrospective study of 26 cases and review of the literature. *BJU Int* 88: 72–76.
17. Akinci E, Bodur H, Cevik MA, Erbay A, Eren SS, Ziraman I, Balaban N, Atan A, Ergul G, 2006. A complication of brucellosis: epididymo-orchitis. *Int J Infect Dis* 10: 171–177.

18. Ibrahim AI, Awad R, Shetty SD, Saad M, Bilal NE, 1988. Genitourinary complications of brucellosis. *Br J Urol* 61: 294–298.
19. Gul HC, Akyol I, Sen B, Adayener C, Haholu A, 2009. Epididymoorchitis due to *Brucella melitensis*: review of 19 patients. *Urol Int* 82: 158–161.
20. Turan T, Tuncay OL, Aybek Z, Bozbay C, 1999. Bilateral epididymoorchitis secondary to brucellosis. *Int Urol Nephrol* 31: 117–118.
21. Mantur BG, Mulimani MS, Mangalagi SS, Patil AV, 2001. Brucellar epididymoorchitis—report of five cases. *Indian J Med Microbiol* 19: 208–211.
22. Al Tawfiq JA, 2006. *Brucella* epididymo-orchitis: a consideration in endemic area. *Int Braz J Urol* 32: 313–315.
23. Sozen EE, Aksoy F, Aydin K, Koksai I, Yilmaz G, Aksoy HZ, 2007. Isolation of *Brucella melitensis* from ejaculate culture of a brucellosis patient with epididymoorchitis. *Mikrobiyol Bul* 41: 465–468.
24. Yurdakul T, Sert U, Acar A, Karalezli G, Akcetin Z, 1995. Epididymo-orchitis as a complication of brucellosis. *Urol Int* 55: 141–142.
25. Crosby E, Llosa L, Miro QM, Carrillo C, Gotuzzo E, 1984. Hematologic changes in brucellosis. *J Infect Dis* 150: 419–424.
26. Gallego VD, Povo MI, Gimeno AV, Bosquet M, Rivadulla SI, Martinez RD, Gallego GJ, 2008. *Brucella* spp. orchiepididymitis. *Arch Esp Urol* 61: 442–444.
27. Afsar H, Baydar I, Sirmatel F, 1993. Epididymo-orchitis due to brucellosis. *Br J Urol* 72: 104–105.
28. Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, Sanchez-de-Mora D, Delgado M, Causse M, Martin-Farfan A, Juarez C, 1997. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. *Medicine* 75: 195–211.
29. Corbel MJ, 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 3: 213–221.
30. Solera J, Lozano E, Martinez-Alvaro E, Espinosa A, Castillejos ML, Abad L, 1999. Brucellar spondylitis: review of 35 cases and literature survey. *Clin Infect Dis* 29: 1440–1449.
31. Cesur S, Ciftci A, Sozen TH, Tekeli E, 2003. A case of epididymo-orchitis and paravertebral abscess due to brucellosis. *J Infect* 46: 251–253.
32. Mevorach RA, Lerner RM, Dvoretzky PM, Rabinowitz R, 1986. Testicular abscess: diagnosis by ultrasonography. *J Urol* 136: 1213–1216.
33. Castillo JL, Bravo de Rueda C, 1994. Brucellosis genital. Causa rara de absceso testicular. *Arch Esp Urol* 47: 533–536.
34. World Health Organization, 2011. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision (ICD-10). Version for 2007*. Available at: <http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>. Accessed April 26, 2011.
35. Yetkin MA, Erdinc FS, Bulut C, Tulek N, 2005. Epididymoorchitis due to brucellosis in central Anatolia, Turkey. *Urol Int* 75: 235–238.
36. Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, Colmenero JD, Corbel MJ, Falagas ME, Memish ZA, Roushan MR, Rubinstein E, Sipsas NV, Solera J, Young EJ, Pappas G, 2007. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. *PLoS Med* 4: 1872–1878.
37. Young EJ, 1995. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 21: 283–289.

DISCUSSION GÉNÉRALE

4.1.- Etudes préliminaires ayant justifié le travail de thèse

Deux études préliminaires ont justifié le présent travail de thèse. Ces études sont citées car elles permettent de mieux percevoir la pertinence des objectifs de la thèse.

4.1.1.-Étude préliminaire dans le canton Mejía, province Pichincha - Equateur, en 2003 (Annexe 1)

En 2003, une étude transversale a été réalisée chez les bovins (n = 516) appartenant à 23 Unités de Production Agricole (UPA) dans le canton Mejía, province de Pichincha, Equateur. L'objectif était d'estimer la prévalence de la brucellose bovine et la fiabilité des tests de diagnostic utilisés en Equateur. Les premiers résultats mesurés sur les bovins non vaccinés (n = 99) ont montré une forte prévalence en anticorps (44%) en réponse à sept tests de diagnostic (voir tableau 4.1).

Tableau 4.1 Résultats des tests réalisés dans le cadre du diagnostic de brucellose chez les animaux non vaccinés

RB*	BPAT*	SAT**	SAT - EDTA**	iELISA**	CFT*	ST*	N° d'observations
-	-	-	-	-	-	-	55
-	-	-	-	-	-	+	5
-	-	+	-	-	-	-	2
-	-	+	-	-	-	+	1
-	-	-	+	-	-	-	7
-	-	-	+	-	-	+	1
-	-	-	-	-	+	-	1
-	-	-	-	+	-	-	2
-	-	-	-	+	-	+	1
-	-	+	+	-	+	-	1
-	+	-	-	+	-	-	1
-	+	+	+	+	-	-	1
-	+	+	+	+	+	-	1
-	+	+	+	+	+	+	2
+	+	+	+	-	+	+	0
+	+	+	+	+	-	+	1
+	+	-	-	+	+	-	1
+	+	+	+	+	+	-	10
+	+	+	+	+	+	+	6
TOTAL							99

Légende : *: tests effectués aux CIZ - Equateur, **: tests effectués aux CERVA - Belgique, **RB**: Rose de Bengale, **BPAT**: Épreuve d'agglutination sur lame à l'antigène tamponné, **SAT**: Test d'agglutination lente, **SAT – EDTA**: Test d'agglutination lente en présence d'EDTA, **iELISA**: Test d'immuno-absorption enzymatique indirect, **CFT**: Test de fixation du complément ", **ST**: Test cutané.

Une analyse bayésienne a permis d'estimer la prévalence réelle (28%), son intervalle de crédibilité et les paramètres des tests diagnostiques utilisés, à savoir sensibilité (Se) et spécificité (Sp) (voir tableau 4.2), tout en tenant compte d'une spécificité supérieure à 99% pour le test cutané (ST).

Tableau 4.2 Estimations de la sensibilité et de la spécificité des tests appliqués dans le cadre du diagnostic de la brucellose bovine

Bayes p	DIC	pD	prev	I Cr	Parámetro	ST*	RB	iELISA	SAT-EDTA
0.46	61.68	5.86	0.28	0.16 - 0.45	Se*	0.74	0.48	0.61	0.59
					I Cr (2.5%)	0.57	0.28	0.43	0.39
					I Cr (97.5%)	0.92	0.68	0.85	0.78
					Sp*	1.00	0.91	0.86	0.82
					I Cr (2.5%)	-	0.86	0.77	0.64
					I Cr (97.5%)	-	0.97	0.93	0.93

Légende : **Bayes p**: probabilité de Bayes; **DIC**: *Deviance Information Criterion* ou critère d'information de déviance; **prev**: prévalence estimée; **I Cr**: intervalle de crédibilité; **Se***: sensibilité moyenne; **Sp***: spécificité moyenne; **ST**: Test cutané; **RB**: Rose Bengale; **iELISA**: Test d'immuno-absorption enzymatique indirect; **SAT – EDTA**: Test de séro-agglutination lente en présence d'EDTA; **ST***: Test cutané, avec seuil fixé à 2mm.

Les tests microbiologiques ayant permis d'isoler et de caractériser l'agent causal ont contribué à l'étude initiale. L'analyse d'échantillons de lait provenant de 4 animaux séropositifs a permis de mettre en évidence la présence de *Brucella abortus* biotype 4 dans la zone d'étude. Des informations détaillées sur les animaux chez qui l'agent causal avait été isolé et les résultats des tests diagnostiques sont présentés dans le Tableau 4.3.

En considérant une prévalence en anticorps élevée chez des animaux apparemment non vaccinés, ainsi que l'isolement d'une souche de *B. abortus* biotype 4 chez un animal vacciné avec la souche B-19, puis revacciné avec la souche RB-51, il était justifié de s'interroger à propos de la qualité des vaccins et des protocoles de vaccination mis en place. Cette étude initiale nous a permis de réaliser que le vaccin produit localement (B-19) et généralement utilisé jusqu'alors en Equateur, contenait 200 fois moins d'unités formant colonies que les exigences émises par les Organisations Internationales. Il était évident que le contenu ne correspondait pas à ce qui était indiqué sur la fiole (60×10^9 bactéries viables). A l'opposé, le vaccin importé RB51 répondait de manière satisfaisante aux prescriptions (Tableau 4.4).

Les résultats partiels de l'étude ont été présentés sous la forme d'un poster (Annexe 1) au Congrès mondial de brucellose qui s'est tenu à Pampelune, en Espagne, en 2003.

Tableau 4.3 Information complémentaire concernant les animaux chez lesquels *Brucella abortus* biotype 4 a isolée

N echantillon	Vaccination		Test de diagnostic								
	1 ^{ère} fois	Rappel	RB	BPAT	SAT	SAT - EDTA	iELISA	CFT	ST*	MRT	ELISA - L
15	NC	NC	+	+	> 100	> 100	> 60	> 25600	3 mm	-	+
33	NC	NC	+	+	> 100	> 100	18	> 25600	1 mm	NI	+
60	NC	NC	+	+	> 100	> 100	18	>25600*	5.5 mm	+	+
94	B-19	RB-51	+	+	> 100	> 100	18	6400	1 mm	+	+

Légende : **N**: nombre; **NC**: Non connu; **NI**: résultat non interprétable; **RB**: Rose de Bengale; **BPAT**: Épreuve d'agglutination sur lame à l'antigène tamponné; **SAT**: Test de séro-agglutination; **SAT – EDTA**: Test de séro-agglutination lente en présence d'EDTA; **iELISA**: Test d'immuno-absorption enzymatique indirect; **CFT**: Test de fixation du complément; **ST**: Test cutané; **MRT**: Épreuve de l'anneau sur le lait; **ELISA-L**: Test d'immuno-absorption enzymatique indirect réalisé sur le lait; *: seuil fixé à 2mm.

Tableau 4.4 Résultats du suivi des vaccins contre la brucellose bovine utilisés dans la zone d'étude

Type de vaccin	N lot	Concentration initiale pas dose	Volume par dose ⁽¹⁾	Facteur de dilution ⁽²⁾	Volume utilisé ⁽³⁾	N UCF	N <i>Brucella</i> par ml ⁽⁴⁾	N <i>Brucella</i> par dose ⁽⁵⁾
B-19	02-2933	60 x 10⁹	3 ml	1 x 10 ⁶	0.1 ml	15	1.1 x 10 ⁸	3.3 x 10⁸
					0.1 ml	10		
					0.1 ml	12		
					0.1 ml	7		
						11*		
RB-51	2044	1 x 10⁹	2	1 x 10 ⁶	0.1 ml	220	2.17 x 10 ⁹	4.34 x 10⁹
					0.1 ml	240		
					0.1 ml	180		
					0.1 ml	230		
						217.5*		
RB-51	1678	1 x 10⁹	2	1 x 10 ⁶	0.1 ml	300	3.27 x 10 ⁹	6.54 x 10⁹
					0.1 ml	330		
					0.1 ml	350		
					0.1 ml	330		
						327.5*		

Légende : **UCF**: Unités Formant des Colonies; *Nombre moyen de *Brucella* par 0,1 ml; la concentration finale du vaccin (5) est obtenue en multipliant le volume par dose administrée (1), par le facteur de dilution (2), par le volume utilisé (3) (0,1 ml), et par le nombre de UCF/ml (*).

L'étude initiale a permis de confirmer la nécessité de mettre en œuvre une «batterie de tests de diagnostic» afin d'identifier et de localiser un maximum d'animaux positifs, mais a également soulevé des questions quant à la situation épidémiologique de cette zoonose en Equateur. Bien qu'en 2003 l'Equateur disposait déjà d'une technologie de pointe en matière de diagnostics sérologique, microbiologique et moléculaire des brucelloses humaine et animale au travers du *Centro Internacional de Zoonosis* (CIZ, inclus dans l'Université Centrale de Quito), cela n'a pas suffi en raison principalement d'une vaccination anarchique des bovins. Au moment de cette étude, la prévalence réelle chez les bovins et l'impact en santé publique n'était pas encore clairement établis.

4.1.2.- Étude complémentaire chez les chiens, réalisée en 2008 dans une zone d'endémie de brucellose bovine (Canton Mejía, province de Pichincha) (Annexe 2)

En complément aux études réalisées chez les bovins, les caprins et chez l'homme, une étude à petite échelle a été réalisée chez les chiens (n=151) de 34 exploitations laitières situées en zone d'endémie de brucellose bovine (province de Pichincha). Les résultats ont démontré que cette espèce pouvait jouer le rôle de réservoir pour la bactérie (Annexe 2), en particulier via la transmission des souches en phase lisse, comme c'est le cas pour *B. abortus*. La prévalence s'élevait à 11,92% et 15,89%, après analyse avec respectivement les tests SAT-EDTA et RB. Même l'analyse préliminaire par iELISA, avec utilisation du LPS de *B. abortus*, a montré que la prévalence pouvait atteindre 23,85%. Les contacts étroits et fréquents avec le bétail (85,43%) ainsi que la consommation de produits d'avortements (64%) expliquent, non seulement la prévalence élevée observée chez les chiens, mais surtout l'isolement de *B. abortus* biotype 4 chez les chiens abattus (n=5) après consentement de leur propriétaire.

L'étude a montré que les efforts entrepris en Équateur (canton Mejía, province de Pichincha) pour contrôler et éradiquer la brucellose bovine sont mal compris car les éleveurs considèrent à tort que les bovins sont le seul réservoir potentiel de la bactérie dans leur exploitation et ce, en raison des pertes financières conséquentes causées par la maladie chez cette espèce.

4.2.- Rappel des objectifs du travail.

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse avait pour objectif de générer des informations fiables sur la situation épidémiologique de la brucellose bovine et son impact en santé publique dans le nord-ouest de l'Equateur, mais aussi d'identifier de potentiels facteurs de risque de la maladie. Ces données contribuent à rendre plus fiables les informations officielles rapportées par les Organismes en charge de la surveillance de cette zoonose en Equateur, en contextualisant le problème. À cette fin, quatre objectifs spécifiques ont été fixés.

Avant cette thèse, peu de données relatives à la brucellose animale et humaine en Equateur étaient disponibles dans les bases de données bibliographiques internationales. Néanmoins, une revue de la littérature existante, principalement constituée par des thèses réalisées dans les Facultés de Médecine Vétérinaire et d'Ingénierie Agricole des universités équatoriennes, a déjà permis de fournir un premier aperçu de la situation. La brucellose a toujours suscité un intérêt scientifique en Equateur, et ce, malgré le manque évident de ressources techniques pour l'étudier et comprendre son épidémiologie de façon optimale.

Dans le cas de la brucellose, la seule source d'infection pour l'homme est constituée par les réservoirs animaux. Des études visant à estimer la prévalence de cette infection chez les bovins et les caprins et à évaluer la performance des tests diagnostiques utilisés ont été réalisées dans le nord-ouest de l'Equateur. Ces travaux ont également permis de rechercher les potentiels facteurs de risque d'infection.

Des études sur la prévalence et les facteurs de risques chez l'homme ont mis en évidence l'impact de cette infection au sein de la population équatorienne. Néanmoins, ces travaux ont souligné le caractère faiblement prioritaire de cette zoonose dans le cadre du système de santé équatorien.

Enfin, une stratégie possible de surveillance épidémiologique de la brucellose en Equateur, tant chez l'homme que chez les bovins, a été proposée. Il est indispensable que cette stratégie soit adaptée aux conditions du nord-ouest de l'Equateur.

4.3.-Contextualisation générale du problème de la brucellose dans le nord-ouest de l'Equateur et principaux résultats des travaux réalisés

4.3.1.- Une revue de la bibliographie locale a démontré que la brucellose a toujours été une préoccupation en Equateur

En Equateur, grâce à la diversité climatique, l'élevage de différentes espèces animales est pratiqué depuis l'antiquité dans le but premier de subvenir aux besoins des populations rurales, mais aussi pour l'exportation de produits animaux. La répartition et l'élevage des espèces animales telles que les bovins, ovins, caprins, porcins et camélidés est basée sur l'adaptation de différentes races au climat rencontré dans les différentes régions naturelles du pays (plaine côtière, montagne, amazonie et région insulaire) et aux ressources alimentaires dont elles disposent.

D'après l'INEC et al. (2002), l'Equateur comptabilisait en 2002, 4.486.020 bovins, répartis au sein de 427.514 Unités de Production Agricole (UPAs) et 178.367 caprins répartis entre 16.405 UPAs. En ce qui concerne les bovins, 50.69% des animaux se concentraient dans la "Sierra" ou zone montagneuse, dans 339.555 UPAs, ce qui représente 79.42% de l'ensemble des UPAs au niveau national.

Toujours en 2002, si l'on considère le type d'élevage, 54,33% des UPAs pratiquaient le pâturage au piquet, 44,22% le pâturage libre et 1,43% un autre système. Il faut mentionner que le système traditionnel de pâturage au piquet consiste en l'amarrage des animaux à un piquet dans des terrains en friche, le long des chemins et des routes, mais aussi dans des lieux publics. L'animal étant maintenu attaché au piquet au moyen d'une corde, ses mouvements sont limités (INEC et al., 2002).

Une coutume largement implantée en Equateur est la commercialisation d'animaux dans de petites foires aux bestiaux, où différentes espèces partagent des espaces communs, ce qui représente un facteur de risque non négligeable en termes de transmission de maladies (Acha & Szyfres, 2003; Muma et al., 2007). De plus, il existe de grands marchés aux bestiaux, tel celui de de Santo Domingo de los Tsáchilas dans la plaine côtière, pour lesquels les animaux sont déplacés entre régions ce qui constitue un risque additionnel pour la dissémination des maladies.

La brucellose a toujours été un centre d'intérêt en Equateur, car suite aux premières notifications chez les bovins par Salvestroni en 1926 (Alvarado, 1959) et chez l'homme par Valenzuela en 1934 (Vásconez-López, 1960), de nombreuses études ont été réalisées, principalement chez les espèces animales réservoirs. Le rôle du vétérinaire de terrain vis-à-vis de cette zoonose a d'ailleurs été mis en avant.

La situation réelle de la brucellose humaine en Equateur, telle que rapportée au niveau international, est erronée. En effet, selon les rapports officiels, soit la maladie ne serait pas présente, soit il n'existerait aucune information fiable sur la situation (Pappas et al., 2006), soit elle serait contrôlée (Cartelle et al., 2015). Cela s'explique par le peu d'études menées chez l'homme. La plupart de ces dernières ont été réalisées dans le but de rechercher la maladie uniquement chez les groupes à risque. En effet, dans le contexte équatorien, la surveillance de la maladie humaine est uniquement passive et repose sur les déclarations des cas hospitalisés (Ron-Román et al., 2013; Ron-Román et al., 2014). De plus, les professionnels de la santé publique ne lui accordent que peu d'importance, ce qui est confirmé par la faible place qu'elle occupe tout au long de la formation médicale (Ron-Román, 2012, communication personnelle). Ce manque de sensibilisation des professionnels de la santé représente un frein au dépistage correct de la maladie dans la patientèle de tous les jours, à tel point que ce sont les vétérinaires qui conseillent aux personnes présentant un tableau clinique suspect de se soumettre à des tests de diagnostic (Ron-Román et al., 2012).

Selon les Organisations Panaméricaine (OPS) et Mondiale de la Santé (OMS), les connaissances en matière de brucellose humaine en Amérique sont manquantes, notamment à cause des lacunes en matière de diagnostic et du non rapportage de cas. Néanmoins, des données rapportées entre 1994 et 1998 sont disponibles. Au cours de cette période, 29132 cas ont été rapportés par 20 pays d'Amérique; parmi ces notifications, 54,5% émanaient d'Amérique du Sud. Selon les données officielles, l'Equateur a seulement notifié 52 cas humains durant cette période (Cartelle et al., 2015).

4.3.2.- Détermination de la prévalence apparente et des facteurs de risque de brucellose chez les bovins.

Il est fort probable que la prévalence élevée chez l'homme soit consécutive à la présence de l'infection chez au moins un des réservoirs naturels, tels que les bovins, caprins ou ovins, car ce sont des espèces fréquemment rencontrées dans les exploitations en Equateur, comme la circulation de *Brucella* sp. Notre étude a en effet montré une prévalence élevée de l'infection chez les bovins dans la région ciblée (6,84%; 228/3332; IC:4,83-8,85). Une telle prévalence rejoindrait les rapports officiels émis par l'Agence Equatorienne d'Assurance Qualité de l'Agriculture, AGROCALIDAD (Torres, 2008): des prévalences allant de 0,4% (4/1000) dans la province de Manabí jusqu'à 51,6% (510/989) dans le nord-ouest de l'Equateur avaient été estimées (Maldonado & Salgado, 1979; Plaza, 1977). Des prévalences inter-troupeaux presque identiques ont été mesurées dans la zone andine (*Sierra*; 21,89%; 44/201) et dans la plaine côtière (*Costa*; 25,17% 36/143). La plus grande différence se situait au niveau de la prévalence intra-troupeau, puisqu'elle atteignait 12,46% (161/1292) en zone andine et 3,28% (67/2040) dans la plaine côtière. Le sexe (OR=3,91; femelle) et l'âge (OR=3,14; classe des 25 à 60 mois) se sont avérés êtres des facteurs de risque, confirmant de la sorte les résultats d'une étude antérieure (Asiimwe et al. 2015).

L'étude a permis de démontrer que la brucellose était présente dans les deux régions (zone andine et plaine côtière), mais que la différence de prévalence au niveau intra-troupeau pouvait être liée au système d'élevage des animaux, ce qui a été mis en évidence antérieurement. Une telle différence de prévalence entre régions avait déjà été observée lors d'études antérieures, qui avaient mis en évidence une prévalence de 51,6% en zone andine (Maldonado & Salgado, 1979) et de seulement 13,3% dans la plaine côtière (Bailon & Muñoz, 2003), au moyen de tests sérologiques (respectivement le test au RB et le test d'Huddleson) comparables à ceux utilisés dans le cadre de cette thèse. Des prévalences très élevées, à savoir 68,8% en zone andine et 57% dans la plaine côtière ont été estimées au moyen du MRT (Estupiñan, 1967; Olleagu, 1969). Le MRT est un test largement utilisé pour détecter la présence de brucellose dans les troupeaux laitiers (Ragan, 2002). Malheureusement, la fiabilité de ses résultats dépend de nombreux facteurs principalement liés à la qualité de l'échantillon de lait et à son

degré de dilution (OIE, 2016a). L'application de ce test, très utile pour le suivi épidémiologique en zone laitière, ne peut donner une idée précise de l'ampleur du problème car ses sensibilité et spécificité sont faibles (Nielsen, 2002) et le type d'échantillon peut générer un biais.

Des biais d'autre nature peuvent être responsables d'une appréciation erronée du problème, comme dans l'étude de Rodríguez-Hidalgo et al (2015) qui avaient estimé une prévalence de 7,6% dans des fermes confirmées positives antérieurement en cherchant à isoler et typer des souches circulantes de *Brucella* spp. à Santo Domingo de los Tsáchilas.

En toutes circonstances, il est indispensable de considérer que le diagnostic de la brucellose et l'estimation de la prévalence réelle chez les bovins ne sont pas choses faciles surtout en raison de l'existence de réactions croisées et ce, notamment, après la vaccination avec le vaccin B-19 (Godfroid et al., 2002). Poulsen et collaborateurs (2014) ont justement observé une différence entre la prévalence rapportée chez les bovins non vaccinés (2,6%) et celle estimée en considérant l'ensemble des échantillons collectés (5,5%).

Grâce à l'expérience acquise lors de l'étude de 2003 réalisée en province de Pichincha (zone andine), au cours de laquelle une prévalence élevée en Ac (44%) avait été estimée sur des animaux garantis comme non vaccinés (n=99), le travail développé tout au long de notre recherche a renforcé la nécessité de travailler avec des animaux réellement non vaccinés contre la brucellose, afin de minimiser le problème de réactions croisées avec les tests sérologiques utilisés, dues à la vaccination. Les échantillons bovins récoltés au cours de cette étude antérieure ont été exclus de l'analyse finale.

Il est important de préciser que l'étude présentée ici s'est basée sur le diagnostic chez les animaux à n'importe quel stade de l'infection grâce à trois tests de diagnostic qui détectent des Ac différents: le RB détecte surtout les IgG et IgM, le SAT-EDTA détecte les IgM et l'iELISA détecte les IgG (Alton et al., 1988; Godfroid & Boelaert, 1995; Nielsen, 2002; Saegerman et al., 2010).

Bien que des tests de diagnostic complémentaires tels que le test de fixation du complément (CFT) et le test cutané (ST) aient été utilisés lors de l'étude antérieure, ceux-ci n'ont pas été incorporés à la batterie de tests réalisés ultérieurement, suite au manque de réactifs (globules rouges de mouton indemne de brucellose pour le CFT et antigène dans le cas du ST). Au contraire des tests sérologiques détectant les Ac (Alton et al., 1988), le ST se base sur l'hypersensibilité de type IV (Bercovich, 2000); il ne présente donc pas de réactions croisées avec d'autres bactéries Gram négatives telle que *Yersinia enterocolitica* 0:9 (OIE, 2016a; Saegerman et al., 1999; Saegerman et al., 2010). Bien que l'équipement nécessaire à la réalisation de ce test ne soit pas élaboré, le problème principal réside en l'exécution correcte de la procédure. De plus, il nécessite du temps, surtout quand il faut réaliser deux inspections chez chaque animal (Pouillot et al., 1997). Les réactions inflammatoires sévères sont faciles à visualiser et à interpréter. Néanmoins, il faut être attentif aux réactions légères car elles peuvent passer inaperçues (OIE, 2016a). Le site d'injection de l'Ag doit être identifié avec précision et chaque animal doit être examiné minutieusement à la recherche du moindre signe d'inflammation, d'abord par inspection visuelle et palpation, puis en mesurant correctement l'épaisseur de la peau (Saegerman et al., 1999). Dans l'étude de 2003, nous avons observé, non seulement des réactions légèrement positives (épaisseur de la peau comprise entre 2 et 3 mm), mais aussi des réactions très sévères (épaisseur de la peau >12 mm).

Les observations réalisées au cours de ce travail ont permis d'identifier certaines pratiques pouvant jouer un rôle important dans la transmission de la maladie, comme déjà décrit par d'autres auteurs:

- (a) L'existence de différents systèmes d'élevage bovin dans la zone d'étude, ce qui est un frein à la mise en place d'un programme global de contrôle et/ou éradication de la maladie (Acha & Szyfres, 2003; Arnaud-Bosq, 1977; Sanogo et al., 2008);
- (b) La forte concentration d'animaux dans les UPAs de la zone 1, facteur qui favorise la dissémination de l'infection au sein d'un même troupeau par l'augmentation des possibilités de contact entre animaux (Domenech et al., 1980);
- (c) La présence de taureaux utilisés comme mâles reproducteurs d'une UPA déterminée, et leur "prêt/location" temporaire à d'autres; ils sont alors responsables d'un grand nombre d'infections chez les femelles;

- (d) La présence d'autres espèces animales réceptives dans l'UPA: ovins, porcins, chiens, camélidés sud-américains et chevaux;
- (e) L'achat d'animaux de remplacement dont les statuts sanitaire et vaccinal vis-à-vis de la brucellose sont inconnus;
- (f) L'absence de quarantaine avant d'introduire de nouveaux animaux dans un troupeau (Blood et al., 1987);
- (g) La fréquence élevée d'avortements dans les UPAs, et la gestion inappropriée des produits d'avortement;
- (h) La présence de chiens dans les fermes; ces derniers peuvent jouer le rôle de vecteurs mécaniques de la brucellose dans les exploitations en transférant des morceaux de placenta ou d'avorton d'un endroit à un autre;
- (i) Le risque d'utiliser du sperme contaminé, si aucun contrôle adéquat du sperme produit localement ou importé n'est réalisé;
- (j) L'inexistence d'un système uniforme de vaccination; en effet, dans la zone d'étude, il a été observé que certaines UPAs ne pratiquaient pas la vaccination, tandis que d'autres vaccinaient soit avec la souche B-19 soit avec la RB51, en fonction des disponibilités de ces produits dans les magasins vétérinaires;
- (k) L'élimination incorrecte des animaux positifs et
- (l) Ne pas écarter la possibilité que les médecins vétérinaires peuvent jouer un rôle dans la dissémination de l'infection (Arnaud-Bosq, 1977).

4.3.3.- La découverte de la souche vaccinale B-19 chez les chèvres pourrait-elle confirmer la situation anarchique de la vaccination chez les bovins?

Dans le cas des maladies zoonotiques, l'élevage en zone péri-urbaine ou urbaine augmente le risque de transmission suite à la production de déchets tels que urines, matières fécales, sécrétions diverses et avortons qui peuvent contaminer l'environnement (Samartino et al., 2000; Thys et al., 2006). L'étude ciblant les chèvres dans les provinces de Carchi (n=160), Pichincha (n=224) et Loja (n=2024) a seulement permis d'identifier deux animaux faiblement positifs, ce qui va à l'encontre du rapport de (Poulsen et al., 2014) qui avait estimé une prévalence de 17,8% chez cette espèce. Bien que l'étude ait mis en évidence une faible prévalence en brucellose chez cette espèce, elle tire la sonnette d'alarme suite à l'isolement et au typage de la souche vaccinale B-19 (*Brucella abortus* biovar 1) habituellement utilisée pour la vaccination

des bovins. Même si cette observation a déjà été rapportée antérieurement, elle met en évidence la problématique liée à l'utilisation d'un vaccin vivant (Lambert et al., 1964). Il est indispensable de former et sensibiliser les utilisateurs de vaccins contre la brucellose aux normes relatives à leur transport, reconstitution, stockage, dosage, administration et élimination des déchets, telles que précisées par les fabricants et surtout selon les exigences de l'OIE (OIE, 2016a).

Selon Poulsen et. al (2014), la prévalence basée sur le test au RB chez les chèvres (17.8%) serait trois fois supérieure à celle rencontrée chez les bovins (5.5%) dans la même étude; si c'était le cas, la situation de cette zoonose serait simplement incontrôlable. Il s'agit probablement d'une surestimation du problème car les tests d'agglutination au RB ne sont pas très fiables chez cette espèce et nécessitent des modifications du protocole usuel.

4.3.4.- Détermination de la prévalence apparente et des facteurs de risque de brucellose chez l'homme

Les travaux de terrain et de laboratoire entrepris au cours de ce travail ont mis en évidence une prévalence apparente chez l'homme de 1,88% (71/3733) (IC: 1,48-2,38) dans le Nord-Ouest du pays. La prévalence estimée grâce à cette épidémiologie active va à l'encontre des conclusions du rapport officiel transmis par le service d'Epidémiologie de l'Institut National d'Investigations en Santé Publique (anciennement Ministère de la Santé Publique). Celui-ci mentionnait seulement 14 cas confirmés de brucellose au niveau national pour la période de 2006 à 2008 (Cartelle et al., 2015). Dans notre étude, une variation de la prévalence en fonction de la province d'origine a pu être observée (2,5% dans la province de Carchi ; 2,6% dans la province d'Esmeraldas ; 1,3% dans la province d'Imbabura ; 2,9% dans la province de Manabí et 1,7% dans la province de Pichincha). La recherche active d'indicateurs de la maladie, comme par exemple le taux d'anticorps, permettrait d'avoir un aperçu du statut réel de la maladie chez l'homme (Corbel, 2006; Doganay et al., 2003). Nos observations sont en lien direct avec celles de Ron-Román et al., (2013), qui avaient mentionné antérieurement que les foyers d'infection enregistrés dans cette région entre 2006 et 2008 étaient localisés dans les provinces citées ci-dessus. Elles rejoignent également les résultats d'études de prévalence réalisées auprès de 700 patients d'un hôpital de

Portoviejo et chez 70 personnes travaillant dans des exploitations bovines de Santo Domingo de los Tsáchilas, avec respectivement 2,4% et 1,43% (Cuenca, 2013; Macías, 1977).

Les observations chez l'homme ont permis d'identifier et de quantifier les facteurs de risque de brucellose tels que: l'âge (OR=4,5 pour la classe d'âge des ≥ 46 ans), le sexe (OR=1,7 pour les hommes), des contacts avec les animaux (OR=3,7), la consommation de placenta et de fœtus (OR=2,7) et la consommation de sang frais (OR=2,0). Ces facteurs seraient en lien direct, non seulement avec les modes d'élevage traditionnels toujours existant en Equateur (surtout pour les troupeaux de taille réduite), mais aussi avec les habitudes alimentaires liées à la consommation de produits d'origine animale dans des conditions peu hygiéniques. Cette observation avait déjà été rapportée antérieurement (Ariza et al., 1995; Pasquereau, 1980; Roux, 1979). Tel est le cas d'un patient aux Etats-Unis, qui a déclaré avoir consommé du sang frais des animaux, tout en travaillant dans un abattoir en Equateur (Herrick et al., 2014).

Les personnes interrogées associent généralement les syndromes fébriles, les douleurs musculaires ou articulaires et les céphalées à une simple grippe. De plus, les études épidémiologiques ciblant la brucellose humaine sont rares en Equateur et les méthodes fréquemment utilisées détectent seulement une partie des cas. Considérant tous ces facteurs, il est plus que probable que la prévalence de la brucellose humaine soit fortement sous-estimée.

L'origine d'un syndrome fébrile prolongé chez l'homme est difficilement diagnostiqué. Afin d'établir son étiologie précise, une étude complexe et coûteuse est généralement nécessaire (Buzgan et al., 2010; Hasanjani Roushan et al., 2016). Néanmoins, il est fondamental que le médecin de campagne confronté à un syndrome à étiologie variable suspecte la brucellose et effectue une bonne anamnèse auprès du patient, en collectant des informations sur son occupation, le type et la fréquence de contacts avec les animaux ainsi que sur les habitudes alimentaires.

Une étude épidémiologique sur la brucellose ne doit pas seulement inclure des personnes exposées, à savoir en contact régulier avec une ou des sources d'infection,

mais aussi une population non exposée (habitants de la zone urbaine) (Doganay et al., 2003; Massenet et al., 1993).

A l'heure actuelle, un autre mécanisme d'infection a été identifié dans la population, à savoir que les personnes résidant en zone indemne de brucellose contractent l'infection lorsqu'elles voyagent dans des régions/pays où la maladie présente une prévalence élevée. Dans ce cas, les signes cliniques se déclenchent une fois que les patients retournent chez eux (FAO & OMS, 1986). La cause principale serait liée au fait que les voyageurs adoptent les habitudes alimentaires des régions ou pays visités (Wade et al., 1998). Il est donc primordial que tous les pays mettent en place des plans de prévention et de contrôle contre cette zoonose.

4.3.5.- Détermination des prévalences réelles de la brucellose humaine et bovine et des performances des tests de diagnostic utilisés, au moyen du théorème de Bayes

La brucellose pourrait certainement être la maladie pour laquelle le plus grand nombre de tests a été développé pour le diagnostic indirect. Ceux-ci vont d'une simple agglutination rapide sur plaque comme le RB aux tests de polarisation de fluorescence, en passant par l'ELISA (indirect et de compétition). Ils obéissent à la complexité du diagnostic direct basé sur l'isolement de *Brucella* sp., et au risque élevé de contamination lors des manipulations. La performance d'un test indirect basé sur la détection d'Ac contre le LPS (Alton et al., 1988; Garin-Bastuji, 1993; Godfroid & Boelaert, 1995; Saegerman et al., 2010) dépend non seulement de son principe de base mais aussi du type d'échantillon sur lequel il est effectué (sang entier, sérum, plasma, lait ou lactosérum).

Comme déjà mentionné antérieurement, il n'existe aucun test sérologique de référence (*gold standard*) pour diagnostiquer la brucellose chez l'homme et les différentes espèces animales (Corbel, 2006; Godfroid et al., 2010). Dans ce contexte, un modèle Bayésien combinant l'information collectée sur le terrain avec l'information a priori (opinions d'experts) a permis d'estimer la prévalence réelle de la brucellose chez l'homme et dans l'espèce bovine. Cette démarche a permis d'éviter de répéter les erreurs commises en appliquant l'équation de Rogan & Gladen (1978) (Lesaffre et al., 2007). En effet, l'application de cette équation aurait conduit à une estimation de la

prévalence réelle de 7,2% chez les bovins dans le nord de l'Equateur (Poulsen et al. (2014). Dans cette équation, ont été considérées une prévalence apparente de 5,5% et des valeurs de Se et de Sp de respectivement 72,2% et 99,6% (Fosgate et al., 2002). Cette probable surestimation de la prévalence pourrait alarmer les éleveurs qui seraient alors tentés d'adopter des moyens de prévention et de contrôle sans fondement épidémiologique (par exemple, la vaccination anarchique). Au contraire, notre étude a permis, dans un contexte bayésien, d'estimer une prévalence réelle de 1% chez l'homme et 2,1% chez les bovins, ainsi que la Se et la Sp des tests utilisés (RB, SAT-EDTA et iELISA). Le modèle a d'ailleurs identifié l'iELISA comme étant le meilleur test pour le diagnostic de la brucellose chez l'homme et l'animal. Néanmoins, la Sp du test ELISA dépend du type de conjugué utilisé (Saegerman et al., 2004). Le test RB ne devrait toutefois pas être écarté car c'est un des tests les plus utilisés dans le diagnostic de cette maladie car il est facile à réaliser, peu coûteux, ses résultats sont faciles à lire, et il présente une haute Se (Manger, 2002). Ce test permet d'obtenir une appréciation sérologique rapide, tant au niveau individuel qu'à l'échelle du troupeau (OIE, 2016a). Néanmoins, il convient de garder à l'esprit la possibilité de réactions croisées avec des bactéries Gram négatives telle que *Yersinia enterocolitica* O:9 et après vaccination avec la souche B-19 (Saegerman et al., 1999; Godfroid et al., 2002; Godfroid et al., 2010; Saegerman et al., 2010).

4.3.6.- Le rôle des chiens dans la transmission de la brucellose bovine en zone endémique.

L'importance du chien comme réservoir potentiel de l'infection (phase lisse de *Brucella*) dans les exploitations bovines a été mise en évidence grâce à l'étude ciblant cette espèce, au vu de la haute prévalence mesurée via les tests SAT-EDTA (11,92%; 18/151) et RB (15,89%; 21/151). Une étude de 1978 avait rapporté une prévalence de 3,5% (14/400) en province de Manabí (Zambrano, 1978). Un lien pourrait être établi entre la prévalence élevée rencontrée chez les chiens et le nombre élevé d'avortements chez les bovins en Equateur (INEC et al., 2002), comme confirmé dans ce travail. Ces observations confirment le rôle biologique que peuvent jouer les chiens dans une maladie telle que la brucellose (Baek et al., 2003; Wareth et al., 2016).

4.3.7.- Isolement et typage des souches de *Brucella abortus* chez différents réservoirs en Equateur

Des inquiétudes subsistent dans de nombreux pays, dans lesquels la brucellose a été déclarée comme présente suite à la réalisation de tests sérologiques sans que les souches de *Brucella* spp. circulantes n'aient encore pu être identifiées (Roux, 1979). Comme le suggèrent la FAO et l'OMS (FAO & OMS, 1986), chaque fois qu'il est possible de le faire, l'identification de l'agent causal doit être entreprise jusqu'au niveau du biotypage, car des souches présentent fréquemment une distribution géographique particulière. La connaissance plus précise des biotypes impliqués permet de mieux comprendre la propagation de la maladie (Corbel, 2006; Roux, 1979; Saegerman et al., 2010). Malheureusement, l'isolement des germes n'est pas une tâche aisée, requiert un laboratoire spécialisé et de haute sécurité. C'est la raison pour laquelle le nombre d'isollements rapportés par pays est en relation directe avec le degré de développement des laboratoires de références. L'Equateur n'échappe pas à la règle car, à l'heure actuelle, il n'existe aucune information officielle sur le nombre d'isollements réalisés ni sur la distribution des souches de *Brucella* spp. circulant en Equateur. Selon Thimn (1982), entre 1965 et 1977, 794 isollements de *Brucella* ont été réalisés dans 12 pays d'Amérique, dont l'Argentine (n=220), le Mexique (n=160), le Pérou (n=114) et le Chili (n=95). En Equateur, seuls 8 isollements ont été rapportés au cours de cette période: un isolement de *B. abortus* biotype 1, six isollements de *B. abortus* biotype 4 et un isolement de *B. suis* biotype 1. Néanmoins, les rapports officiels notifiaient, pour la même époque, une prévalence supérieure à 25% chez les bovins (en cause: *B. abortus*), de 6 et 15% respectivement chez les caprins (en cause: *B. melitensis*) et les ovins (en cause: *B. ovis* et *B. melitensis*), et enfin, supérieure à 25% chez les porcs (en cause: *B. suis*). Il est notoire que ces données sont très éloignées de la réalité vu le nombre si faible d'isollements et que de surcroît *B. melitensis* et *B. ovis* n'ont encore jamais été identifiés en Equateur. Le même rapport de Thimn (1982) fait référence à l'absence totale d'information concernant la brucellose chez d'autres espèces telles que les chiens, les chevaux et les camélidés sud-américains. De plus, l'équipe de Lucero a rapporté qu'entre 1968 et 2006, seuls 3 isollements avaient été réalisés chez les bovins, dont un de *B. abortus* biotype 1 et deux de *B. abortus* biotype 4 (Lucero et al., 2008).

Concernant la présence de la brucellose chez les porcs, les quelques études existantes sont anciennes (Tobar, 1961; Escalante, 1963; Robalino, 1966) et ont toujours été réalisées grâce à des tests de faible sensibilité, comme le test d'agglutination de Huddleson. Les études récentes, basées sur le même test, n'ont pas montré la présence d'anticorps contre la brucellose dans ce type de réservoir animal (Demera, et al., 2002). A ce jour, aucune souche *B. suis* n'a été isolée en Equateur.

L'existence à l'état endémique de la brucellose tant chez l'homme que chez les bovins a été mis en exergue au cours de ce travail. De même, l'isolement de l'agent causal a facilement été identifié chez chacun des réservoirs étudiés. Pour isoler et caractériser l'agent causal, différents échantillons ont été utilisés, selon le réservoir étudié: sang et sperme chez l'homme, lait chez les bovins et les caprins, ainsi qu'organes internes chez les chiens. Tous les échantillons positifs ont présenté une réponse très significative aux tests sérologiques. Dans le contexte équatorien, la présence d'hygroma n'a jamais été observée chez les bovins, raison pour laquelle l'isolement dans ce type de liquide n'a pas été entrepris, contrairement au contexte africain (Bankole et al., 2010; Boukary et al., 2013; Saegeman et al., 2010).

Sur base des stratégies décrites ci-dessus, basées sur l'optimisation des ressources et la diminution des risques de contamination (fréquentes lorsqu'on travaille avec une bactérie présentant un tel risque biologique) (Corbel, 2006; Godfroid et al., 2010; OIE, 2016a; Saegerman et al., 2010), 26 souches ont été isolées: 17 chez les bovins, 1 chez les caprins, 4 chez l'homme et 4 chez les chiens. *Brucella abortus* biotype 4 était majoritaire. Une souche isolée chez une chèvre s'est avérée être *B. abortus* biotype 1 souche vaccinale (B-19) et un isolement chez un cas humain a révélé une souche de terrain *B. abortus* biotype 1. Quelques-unes de souches de *B. abortus* biotype 4 isolées chez les bovins et chez l'homme, ainsi que la souche de terrain *B. abortus* biotype 1 isolée chez deux patients humains, ont présenté certaines particularités lors du typage, notamment l'inhibition de croissance en milieu coloré avec la safranine (100 µg/ml) et la fuchsine (20 µg/ml). Ces observations ont déjà été rapportées (Alton et al., 1988), tout comme le profil métabolique différent en réponse au test d'oxydase, comme les souches isolées en Afrique (Sanogo et al., 2013). Ces particularités pourraient être

responsables de notifications erronées de la présence de *B. abortus* biotype 2 en Equateur, comme mentionné par Rodríguez-Hidalgo et. al. (2015).

La mise en place en Equateur de l'isolement et du typage microbien au travers des tests bactériologiques (observations macro- et microscopiques), des tests biochimiques (oxydase, catalase et uréase), des exigences en CO₂, de la production d'H₂S, de la croissance en présence de colorants (fuchsine, thionine et safranine), de l'agglutination en présence de sérums monospécifiques (A – M) et du typage moléculaire via PCR (711, AMOS, AMOS modifié) ont permis de réaliser 50% des isolements et typages dans le pays d'origine. Le développement de ces capacités diagnostiques permettrait d'éviter le transfert de matériel contaminant dans un pays indemne de brucellose comme la Belgique. C'est une valeur ajoutée au travail réalisé durant cette thèse. L'utilisation de protocoles standardisés pour l'isolement et le typage de souches selon les procédures décrites par Bricker & Halling (1994 et 1995) et l'obtention de contrôles d'ADN nous a permis de garantir ces résultats.

4.3.8.- Directives de base pour le Programme National de Contrôle de la Brucellose Bovine en Equateur

A l'heure actuelle, l'humanité est confrontée à la mondialisation qui permet, entre autre, la diffusion ou l'échange rapide de connaissances et d'informations entre personnes, pays et continents. La mondialisation commerciale ne permet pas seulement l'échange et les mouvements des produits animaux, mais aussi des agents infectieux, qui peuvent maintenant «voyager» facilement entre zones et/ou pays à statut sanitaire différent vis-à-vis d'une maladie déterminée.

Dans ce contexte, maintenant plus que jamais, l'OIE a lancé un appel aux pays afin qu'ils renforcent leurs systèmes de vigilance et suivi épidémiologiques, afin de détecter de manière précoce les agents infectieux et de proposer des solutions rapides, efficaces et appropriées aux problèmes sanitaires chez les animaux. Les nouvelles stratégies et législations devant être adoptées par les pays membres de l'OIE se doivent d'être coordonnées afin d'éviter les problèmes et de permettre une détection rapide des maladies (Roux, 1979). Selon Luna-Martínez et Mateos (2001), les programmes de contrôle ont répondu, soit à l'enthousiasme d'un groupe de chercheurs, soit à la

disponibilité des moyens financiers temporaires. Une véritable politique durable ne transparaît pas au travers des programmes de contrôle, ce qui explique pourquoi peu de pays ont réellement mis en place des programmes permanents de prévention et de contrôle de la brucellose.

Premièrement, la lutte contre la brucellose doit se conceptualiser de manière généralisée, à savoir en travaillant sur toutes les espèces animales sensibles et bien évidemment en incluant l'homme. La collaboration entre les organismes officiels de contrôle (MSP et MAG), les laboratoires publics et privés, les propriétaires d'UPAs et les marchands de bestiaux sera le pilier fondamental pour la réussite d'un programme de prévention, de contrôle et d'éradication de la maladie.

La stratégie de prévention, de contrôle et d'éradication de la brucellose dans une zone déterminée repose sur quatre axes: (i) suivi et surveillance épidémiologique de la brucellose, (ii) élimination et indemnisation des animaux infectés, (iii) prévention de l'infection, via la vaccination des animaux sensibles, le contrôle des facteurs de risque et (iv) l'éducation de la population.

(1) Suivi épidémiologique: le suivi efficace de la maladie est fondamental afin d'arriver à la comprendre, et de la sorte, arriver à la prévenir et la contrôler. Petit à petit, l'Equateur a travaillé sur un système national, ou au moins régional, qui assure ce suivi épidémiologique, élément-clé au moment de la prise de décision en santé publique et animale. Lors de l'élaboration d'un programme de contrôle de telle ou telle maladie, il faut se baser sur la connaissance de sa prévalence, des facteurs associés à sa manifestation mais aussi aux moyens requis à mettre en œuvre à l'aide d'études coûts-bénéfices. Un pré-requis du suivi épidémiologique est une identification correcte des exploitations, des animaux et des opérateurs de la filière (Saegerman et al., 2010).

(2) Élimination des animaux infectés: l'élimination des animaux infectés est sans aucun doute le moyen le plus efficace pour contrôler et éradiquer la brucellose au sein d'un troupeau (Vargas, 2002). Comme précisé antérieurement, il est d'une importance capitale qu'une fois les animaux infectés identifiés, de les éliminer correctement. Il

ne servira à rien de se défaire de l'animal en le vendant à son voisin. A cet égard, le gouvernement central ou les gouvernements provinciaux devront jouer un rôle clef en cherchant la formule idéale pour indemniser les éleveurs des futures pertes engendrées par l'abattage de leurs animaux. Comme l'ont mentionné Blood et al. (1987), il convient de rappeler que la motivation qui incite au contrôle et à l'éradication de la brucellose, plus que les pertes économiques causées dans le secteur de l'élevage, devrait être la perte de vies humaines et les implications en santé publique. Indubitablement, le contrôle définitif de la brucellose chez l'homme dépendra de l'élimination de la maladie chez les réservoirs naturels (OPS & OMS, 2001; Saegerman et al., 2010).

- (3) Prévention de l'infection: conformément au principe selon lequel la vaccination à elle seule ne peut venir à bout du problème, l'élimination des animaux infectés y arrivera (Corbel, 2006). Néanmoins, pour réaliser une élimination graduelle chez les animaux, il convient de protéger d'une façon ou d'une autre les animaux sains, et là, la vaccination joue un rôle. Il est évident que beaucoup de travail reste à faire concernant la planification d'un calendrier de vaccination, la formation du personnel sur la gestion correcte des registres et des vaccins (avant, pendant et après l'injection), mais aussi sur le contrôle rigoureux de la qualité des vaccins utilisés. Si un de ces points venait à faillir, l'animal ne serait pas correctement immunisé ou des problèmes d'interprétation des résultats des tests de diagnostic pourraient se poser.
- (4) Éducation de la population: l'éducation de la population servira de mécanisme de prévention de la zoonose (Corbel, 2006; Doganay et al., 2003). Les points essentiels à traiter seraient: le danger de consommer le lait et les produits laitiers non pasteurisés, une attention particulière dans la gestion et manipulation des avortons et produits d'avortement, l'importance de la notification des cas humains et animaux (avortements), le danger lié à la manipulation des vaccins, l'éducation du personnel des abattoirs sur l'importance de l'utilisation de gants et d'un équipement de protection et le danger de consommer des aliments et/ou de fumer en manipulant des animaux. La FAO et l'OMS (1986) mettent l'accent sur l'éducation sanitaire des personnes comme moyen de prévention. Il est donc indispensable d'éduquer les propriétaires des UPAs à l'importance de la brucellose, non seulement pour leurs

animaux et l'économie de leurs exploitations, mais aussi pour leurs proches, leur communauté et le pays en général.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans le cadre des zoonoses, à savoir des infections ou maladies transmissibles de l'animal vertébré à l'homme, et inversement, de nombreuses recherches menées de par le monde démontrent que la brucellose est loin d'être sous contrôle, surtout dans les zones où elle est présente sous forme endémique. Toutefois, sa situation et sa distribution réelle ne sont pas clairement établies, notamment dans les régions où les rapports officiels sont basés sur un suivi épidémiologique passif (cas rapportés). L'appréciation erronée de la situation épidémiologique de la brucellose en Equateur, tant chez l'homme que chez les animaux, n'a pas permis de comprendre et d'apprécier l'ampleur du problème représenté par cette zoonose, qui est un aspect fondamental si des solutions adaptées à la réalité doivent être développées. Ce travail de thèse a éclairci, au travers de la revue de la littérature locale et de quatre sections expérimentales, la situation épidémiologique réelle de la brucellose bovine et son impact en santé publique, dans le nord-ouest de l'Equateur. Il a pu mettre en évidence que les brucelloses humaine et animale sont des maladies négligées en Equateur, et apporte l'information de base nécessaire afin de faire évoluer cet état des choses. La complexité du tableau clinique de la maladie chez l'homme, le sous-rapportage des cas, l'absence d'études épidémiologiques, l'utilisation d'un nombre limité de techniques diagnostiques (sans que les résultats soient validés par des laboratoires de référence internationaux), mais aussi le peu d'isolements et de typages de *Brucella* spp, sont tous des facteurs démontrant que la situation de la brucellose est méconnue en Equateur.

La combinaison des résultats obtenus grâce à l'application de tests multiples de diagnostic dans un modèle statistique basé sur le théorème de Bayes, a permis d'estimer les prévalences réelles des brucelloses bovine et humaine et les paramètres (sensibilité et spécificité) de chaque test inclus dans le modèle. Même si l'utilisation de tests multiples a permis de détecter un plus grand nombre d'animaux infectés, cette stratégie ne sera pas applicable, car trop onéreux, pour le diagnostic de routine de la maladie en Equateur. Les résultats nous ont permis de conclure que l'iELISA serait le test de choix pour diagnostiquer la maladie, mais le test au Rose Bengale de devrait pas être mis de côté, au vu de sa réalisation aisée et de son très faible coût.

Les observations réalisées au cours de ce travail ont permis de démontrer l'existence de facteurs de risque qui pourraient influencer l'introduction et/ou le maintien de

l'infection dans les exploitations; elles établissent aussi les bases permettant de contextualiser les actions à inclure dans les futurs programmes de contrôle en fonction de la zone épidémiologique (montagne et plaine côtière). L'information collectée répond à l'appel de l'OIE sur la possible compartimentation d'un territoire comme stratégie de contrôle et d'éradication d'une maladie. De plus, ce travail de thèse déclenche la sonnette d'alarme sur les conséquences de la vaccination anarchique des bovins et sur la circulation de *Brucella* spp. au sein des diverses espèces réservoirs potentielles. Les études ne devraient pas se limiter à des examens sérologiques, mais au contraire devraient aller jusqu'à l'isolement et au typage de *Brucella* spp. afin d'améliorer la compréhension des voies de transmission.

Ce travail de thèse met en avant que les efforts développés par les organismes officiels de contrôle et surtout par les propriétaires, se focalisent uniquement sur les bovins, chez qui les pertes économiques sont évidentes. L'existence d'autres réservoirs possibles, tels que, par exemple, les chiens, n'est pas considérée. Les enquêtes épidémiologiques ciblant la brucellose devraient être entreprises chez les réservoirs de l'infection, en standardisant la réalisation et l'interprétation des tests de diagnostic. Ce type d'investigation épidémiologique devrait être entrepris chez toutes les espèces sensibles et au sein de la population humaine (à risque ou non).

La brucellose humaine ne disparaîtra pas tant qu'elle n'est pas éradiquée chez les réservoirs animaux. Comme toute contamination humaine implique l'existence d'un foyer de l'infection, il est indispensable de coordonner les actions entre organismes officiels de contrôle vétérinaires et de santé publique (concept d'une seule santé prôné par l'OIE – *One Health*). Il est fondamental qu'un laboratoire de référence national soit mis sur pied en Equateur, lequel devrait être en charge du contrôle de qualité des réactifs et des vaccins utilisés et des tests de diagnostic utilisés par les laboratoires publics et privés. La collaboration avec les laboratoires internationaux permettrait de disposer de sérums et souches de contrôle, mais favoriserait aussi le partage des connaissances et des savoirs-faire.

Pour conclure, l'information récoltée met en évidence que les brucelloses humaine et animale sont toujours un problème en Equateur. Une stratégie contextualisée, adaptée à

la situation épidémiologique de chaque zone, devrait être élaborée pour contrôler la brucellose en Equateur.

RÉFÉRENCES

- Acha, P., & Szyfres, B. (2003). Brucellosis. In Pan American Health Organization (Ed.), *Zoonosis and communicable diseases common to man and animal*. (3rd Ed, p. 382). Washington.
- Albornoz, G. (1970). *Diagnóstico de brucelosis por la prueba de "Ring-test" en la provincia del Guayas a nivel de hacienda*. Universidad Estatal de Guayaquil.
- Alton, G. ., Jones, L. ., Angus, R. ., & Verger, J. . (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. (I. N. de la recherche Agronomique, Ed.) (1st Ed). Paris.
- Alvarado, C. (1959). *Indice brucelósico en bovinos del cantón Zaruma*. Universidad Central del Ecuador.
- Alvarado, L. (1995). *Diagnóstico de brucelosis bovina en hembras sexualmente maduras por el método de card test en el cantón Paute, provincia del Azuay*. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Alvarez, F., & Pillacela, C. (1985). *Estudio de prevalencia de enfermedades zoonóticas diagnosticadas en a ciudad de Cuenca durante los años 1974 – 1983*. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Alvarez, P. (2001). Situación de la brucelosis en América: panorama general. In *Diagnóstico de brucelosis animal* (pp. 9–16). México.
- André, L., De Vel, V., Bcz-Cbl, P., Axelle, B., Renaat, D., Eddy, L., ... Guy, V. (2013). Monitoring de la durabilité de la production laitière. Retrieved October 10, 2016, from http://www.ikm.be/content/files/010576_BCZ_Monitor
- Aragundi, R. (1969). *Diagnóstico de brucelosis por la prueba de "Ring Test" en la provincia de Los Ríos*. Universidad Estatal de Guayaquil. Ecuador.
- Araj, G. F., & Azzam, R. A. (1996). Seroprevalence of brucella antibodies among persons in high-risk occupation in Lebanon. *Epidemiology and Infection*, *117*(2), 281–288. <http://doi.org/10.1017/S095026880000145X>
- Ariza, J., Corredoira, J., Pallares, R., Viladrich, P. F., Rufi, G., Pujol, M., & Gudiol, F. (1995). Characteristics of and Risk Factors for Relapse of Brucellosis in Humans. *Clinical Infectious Diseases*, *20*(5), 1241–1249. <http://doi.org/10.1093/clinids/20.5.1241>
- Arnaud-Bosq, C. (1977). Modélisation mathématique de l'épiméologie d'une anthroozoonose : la brucellose. *Rev.Epidém. et Santé Publ.*, *25*, 387–395.
- Arteaga, A. (1983). *Identificación de anticuerpos contra brucelosis en ganado portador y vacunado mediante el uso de antígeno tamponado: Rosa de Bengala en la zona central de la provincia de Manabí*. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.

- Arteaga, F., Navas, C., Obando, M., & Zambrano, F. (2002). *Estudio del personal en riesgo de brucelosis en la cabecera cantonal de Portoviejo (Matarifes)*. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Asiimwe, B. B., Kansiime, C., & Rwego, I. B. (2015). Risk factors for human brucellosis in agro-pastoralist communities of south western Uganda: a case-control study. *BMC Research Notes*, 8, 405. <http://doi.org/10.1186/s13104-015-1361-z>
- Aznar, M. N., Samartino, L. E., Humblet, M. F., & Saegerman, C. (2014). Bovine Brucellosis in Argentina and Bordering Countries: Update. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(2), 121–133. <http://doi.org/10.1111/tbed.12018>
- Baek, B. K., Lim, C. W., Rahman, M. S., Kim, C.-H., Oluoch, A., & Kakoma, I. (2003). *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire*, 67(4), 312–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14620870>
- Bailon, A., & Muñoz, J. (2003). *Prevalencia de brucelosis en bovinos sacrificados en el matadero del cantón Chone, mediante la prueba de seroaglutinación rápida en placa, desde diciembre del 2002 a marzo del 2003*. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Bankole, A. A., Saegerman, C., Berkvens, D., Fretin, D., Geerts, S., Ieven, G., & Walravens, K. (2010). Phenotypic and genotypic characterisation of *Brucella* strains isolated from cattle in the Gambia. *The Veterinary Record*, 166(24), 753–6. <http://doi.org/10.1136/vr.b4862>
- Bautista, M., & Ochoa, V. (2001). Técnicas de inmunoenzayo ligadas a enzimas. In E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, & B. Arellano (Eds.), *Diagnóstico De Brucelosis Animal* (pp. 92–95). México.
- Benítez-Ortiz, W., Gómez, I., & Cruz, K. (1986). *Ganadería Caprina en Centro Loja*. (C. A. de T. R. – CATER, Ed.). Loja. Ecuador: Universidad Nacional de Loja. Consejo Nacional de Universidades y Escuelas Politécnicas.
- Benítez-Ortiz, W. (1982). *Proyecto Caprino Zapotillo*. Loja, Ecuador: Proyecto regional para desarrollo del sur de Ecuador – PREDESUR.
- Bercovich, Z. (2000). The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: a review. *The Veterinary Quarterly*, 22(3), 123–30. <http://doi.org/10.1080/01652176.2000.9695040>

- Bercovich, Z., Haagsma, J., van Lipzig, J. H., & Taaijke, R. (1993). Specificity of the skin delayed-type hypersensitivity test in brucellosis free cattle tested with a Brucella allergen. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*, 40(8), 582–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8122447>
- Bercovich, Z., & Lagendijk, W. (1978). A modified milk ring test for detecting Brucella agglutinins in bulk tank coolers. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, 103(8), 407–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/417422>
- Bercovich, Z., & Taaijke, R. (1990). Enzyme immunoassay using mouse monoclonal anti-bovine antibodies for the detection of Brucella abortus antibodies in cow milk. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*, 37(10), 753–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2127977>
- Berkvens, D., Speybroeck, N., Praet, N., Adel, A., & Lesaffre, E. (2006). Estimating Disease Prevalence in a Bayesian Framework Using Probabilistic Constraints. *Epidemiology*, 17(2), 145–153. doi:10.1097/01.ede.0000198422.64801.8d. <http://doi.org/10.1097/01.ede.0000198422.64801.8d>
- Betancourt, R., Guerrero, I., & Román, J. (2002). *Incidencia de brucelosis en las mujeres embarazadas que acuden a las unidades operativas del Area N°1 de la dirección de salud de Manabí*. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Bhonghibhat, N., Elberg, S., & Chen, T. H. (1970). Characterization of Brucella Skin-Test Antigens. *Journal of Infectious Diseases*, 122(1-2), 70–82. <http://doi.org/10.1093/infdis/122.1-2.70>
- Birhanu, H., Fikru, R., Said, M., Kidane, W., Gebrehiwot, T., Hagos, A., ... Büscher, P. (2015). Epidemiology of Trypanosoma evansi and Trypanosoma vivax in domestic animals from selected districts of Tigray and Afar regions, Northern Ethiopia. *Parasites & Vectors*, 8. <http://doi.org/10.1186/s13071-015-0818-1>
- Blasco, J. M. (2001). Profilaxis médica de la brucelosis en los rumiantes: las vacunas clásicas y las nuevas vacunas. In E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, & B. Arellano (Eds.), *Diagnóstico De Brucelosis Animal* (pp. 158–179).
- Blood, D., Henderson, J., & Radostits, O. (1987). Enfermedades causadas por diversas especies de Brucella. In *Medicina Veterinaria* (pp. 522–540). México: Intramericana.

- Boukary, A. R., Saegerman, C., Abatih, E., Fretin, D., Alambédji Bada, R., De Deken, R., ... Thys, E. (2013). Seroprevalence and potential risk factors for *Brucella* spp. infection in traditional cattle, sheep and goats reared in urban, periurban and rural areas of Niger. *PloS One*, 8(12), e83175. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0083175>
- Bowden, R. (1996). Temas de Microbiología Veterinaria. In Stanchi, B. Brihuega, P. Martino, E. Gentilini, & E. Reinoso (Eds.), *Sur* (Primera, pp. 159–175). Buenos Aires Argentina.
- Branscum, A., Gardner, I., Wagner, B., McInturff, P., & Salman, M. (2005). Effect of diagnostic testing error on intracluster correlation coefficient estimation. *Preventive Veterinary Medicine*, 69(1), 63–75. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.015>
- Bricker, B. J. (2002). Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Veterinary Microbiology*, 90(1), 433–434. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00227-4](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00227-4)
- Bricker, B. J., & Halling, S. M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2660–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7852552>
- Bricker, B. J., & Halling, S. M. (1995). Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(6), 1640–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7650203>
- Brito, M., & González, C. (2001). *Presencia de brucelosis bovina en el cantón Bolívar, provincia de Manabí*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Buzgan, T., Karahocagil, M. K., Irmak, H., Baran, A. I., Karsen, H., Evirgen, O., & Akdeniz, H. (2010). Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(6), e469–e478. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.06.031>
- Caraguel, C., Stryhn, H., Gagné, N., Dohoo, I., & Hammell, L. (2012). Use of a third class in latent class modelling for the diagnostic evaluation of five infectious salmon anaemia virus detection tests. *Preventive Veterinary Medicine*, 104(1),

- 165–173. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.10.006>
- Cartelle, M., Holban, A. M., Escalante, S., & Cevallos, M. (2015). Epidemiology of Tropical Neglected Diseases in Ecuador in the Last 20 Years. *PloS One*, *10*(9), e0138311. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0138311>
- Carter, G. . (1985). Brucellosis. In *Bacteriología y Micología Veterinaria* (pp. 230–238). México: El Manual Moderno.
- Castro, E., & Zhunbio, R. (1989). *Prevalencia de brucelosis bovina por los métodos de seroaglutinación en placa y card test, en el cantón Lomón – Indanza*. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Castro, H. A., González, S. R., & Prat, M. I. (2005). Brucellosis: una revisión práctica. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam*, *39*(2), 203–216.
- Chamorro, A. (1972). *Incidencia de la brucelosis en la provincia de Napo*. Universidad Central del Ecuador.
- Chauvin, P. (1969). *Diagnóstico de brucelosis en bovinos de la provincia de Loja, por el método cromatográfico de Castañeda, controlado por el método de Huddleson*. Universidad Nacional de Loja. Ecuador.
- Chukwu, C. C. (1985). Evaluation of brucellin skin test for bovine brucellosis. *International Journal of Zoonoses*, *12*(1), 6–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3932248>
- Cobos, L., Peña, G., Romero, C., Velázquez, F., Velázquez, M., Vicencio, M., ... Betancourt, X. (2001). Fijación de Complemento. In E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, & B. Arellano (Eds.), *Diagnóstico De Brucelosis Animal* (pp. 56–79). México.
- Collin, J. C. (1976). [The role of the different immunoglobulins in the milk ring test used for the detection of brucellosis (author's transl)]. *Annales de Microbiologie*, *127B*(2), 177–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/999126>
- Corbel, M. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. Geneva Switzerland: World Health Organization.
- Corbel, M. J. (1985). Recent advances in the study of Brucella antigens and their serological cross-reactions. *Vet. Bull.*, *55*, 927–942.
- Cordero, J. (1978). *Investigación de brucelosis bovina en los cantones Eloy Alfaro y Esmeraldas de la provincia de Esmeraldas*. Universidad Técnica de Manabí.
- Córdova, G. (1970). *Diagnóstico de brucelosis por medio de la prueba Rring Test en la*

- provincia del Guayas a nivel de haciendas*. Universidad de Guayaquil. Ecuador.
- Corner, L. A., & Alton, G. G. (1981). Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Research in Veterinary Science*, 31(3), 342–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6805054>
- Crawford, R., Huber, J., & Adams, B. (1990). Epidemiology and surveillance. In K. Nielsen & J. R. Duncan (Eds.), *Animal Brucellosis* (pp. 131–151). Boca Raton: CRC.
- Crespo, T. (1999). *Diagnóstico de brucelosis en bovinos hembras sexualmente maduras a nivel de camal de Cuenca, por el método de card test*. Universidad Católica de Cuenca. Ecuador.
- Cuenca, D. (2013). *Estudio epidemiológico de brucelosis humana y animal en la Hacienda San Antonio, ESPE Santo Domingo*. Universidad de las Fuerzas Armadas.
- De Bolle, X., Crosson, S., Matroule, J.-Y., & Letesson, J.-J. (2015). *Brucella abortus* Cell Cycle and Infection Are Coordinated. *Trends in Microbiology*, 23(12), 812–821. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2015.09.007>
- Delgado, K. (1989). *Diagnóstico de brucelosis bovina, mediante la prueba de aglutinación rápida y antígeno brucelar amortiguado*. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Delgado, P. (1992). *Diagnóstico de brucelosis en trabajadores de centros de procesamiento de cárnicos de Cuenca, mediante seroaglutinación rápida en placa*. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Demera, T., Farfán, G., Ortega, B., & Intriago, A. (2002). *Prevalencia de brucelosis bovina y porcina en los camales de las cabeceras cantorales de la provincia de Manabí*. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Dendukuri, N., & Joseph, L. (2001). Bayesian Approaches to Modeling the Conditional Dependence Between Multiple Diagnostic Tests. *Biometrics*, 57(1), 158–167. <http://doi.org/10.1111/j.0006-341X.2001.00158.x>
- Díaz, E., Blasco, J. M., & Suárez, F. (1999). Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina. *Vet. Mex*, 30(4), 307.
- Díaz, E., Hernández, L., Valero, G., & Arellano, B. (Eds.). (2001). Introducción. In *Diagnóstico de brucelosis animal* (pp. 1–16). México: INIFAP.
- Díaz, R., Leiva, J., Rubio, M., & Dorransoro, L. (2001). Diagnóstico de la brucelosis

- humana. In E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, & B. Arellano (Eds.), *Diagnóstico de brucelosis animal* (pp. 198–212). México: INIFAP.
- Doganay, M., Aygen, B., Corbel, M. J., Roux, J., Shapiro, D. S., Wong, J. D., ... al., et. (2003). Human brucellosis: an overview. *International Journal of Infectious Diseases*, 7(3), 173–182. [http://doi.org/10.1016/S1201-9712\(03\)90049-X](http://doi.org/10.1016/S1201-9712(03)90049-X)
- Dohoo, I. R., Wright, P. F., Ruckerbauer, G. M., Samagh, B. S., Robertson, F. J., & Forbes, L. B. (1986). A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire*, 50(4), 485–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3539295>
- Domenech, J., Lucet, P., Vallat, C., & Stewart, B. (1980). La brucellose bovine en Afrique central. II: Étude clinique et épidémiologique: particularités régionales et problèmes de lélevage semi-intensif. *Rev. Élev. Méd. Vét. Pays. Trop.*, 33, 277–284.
- Dorneles, E. M. S., Lima, G. K., Teixeira-Carvalho, A., Araújo, M. S. S., Martins-Filho, O. A., Sriranganathan, N., ... Lage, A. P. (2015). Immune Response of Calves Vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51 and Revaccinated with RB51. *PLoS One*, 10(9), e0136696. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0136696>
- Dorny, P., Phiri, I. ., Vercruyssen, J., Gabriel, S., Willingham, A. ., Brandt, J., ... Berkvens, D. (2004). A Bayesian approach for estimating values for prevalence and diagnostic test characteristics of porcine cysticercosis. *International Journal for Parasitology*, 34(5), 569–576. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.11.014>
- Doutre, M Fensterban, R Sagna, F. (1977). Etude de la brucellose bovine dans un village de Basse-Casamance (Sénégal). *Rev. Élev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 30, 345–351.
- Encalada, M. (1963). *Investigación de la brucelosis en el cerdo, en muestras tomadas en el matadero municipal de Guayaquil*. Universidad Estatal de Guayaquil. Ecuador.
- England, T., Kelly, L., Jones, R. ., MacMillan, A., & Wooldridge, M. (2004). A simulation model of brucellosis spread in British cattle under several testing regimes. *Preventive Veterinary Medicine*, 63(1), 63–73. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.01.009>
- Enøe, C., Georgiadis, M. P., & Johnson, W. O. (2000). Estimation of sensitivity and

- specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive Veterinary Medicine*, 45(1), 61–81. [http://doi.org/10.1016/S0167-5877\(00\)00117-3](http://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00117-3)
- Estupiñan, P. (1967). *Incidencia de las leches positivas a brucelosis por “Ring-test” en las pasteurizadas de Quito y Cayambe*. Universidad Central del Ecuador.
- Falade, S. (1978). A comparison of three serological tests in the diagnosis of caprine brucellosis. *Research in Veterinary Science*, 24(3), 376–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/97740>
- Falconí, C. (1972). *Investigación de brucelosis bovina a nivel de haciendas en la costa norte de Manabí (Cojimés, Pedernales, 10 de Agosto, Jama, San Vicente y Leonidas Plaza) por el método de milk ring test*. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- FAO, & OMS. (1986). *Joint FAO/OMS Comité Mixte d’Experts de la brucelloses 6ème Rapport*. Genève (Suisse).
- Farrell, I. D. (1974). The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Research in Veterinary Science*, 16(3), 280–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4369280>
- Fensterbank, R., & Pardon, P. (1977). [Allergic diagnosis of bovine brucellosis. 1. Conditions for the use of a purified protein allergen: brucellin (author’s transl)]. *Annales de Recherches Vétérinaires. Annals of Veterinary Research*, 8(2), 187–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/413466>
- Fernández, F., & Peña, J. (1991). *Diagnóstico de brucelosis en bovinos hembras sexualmente maduros a nivel de camal por el método de card test*. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Fosgate, G. T., Adesiyun, A. A., Hird, D. W., Johnson, W. O., Hietala, S. K., Schurig, G. G., & Ryan, J. (2002). Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). *American Journal of Veterinary Research*, 63(11), 1598–605. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12428673>
- Galán, J. (1969). *Determinación de la incidencia de brucelosis por medio de la prueba se suero aglutinación rápida, en la zona del cantón Daule*. Universidad Estatal de Guayaquil. Ecuador.
- García, M. (1970). *Determinación de la brucelosis bovina, en los principales hatos*

- lecheros del cantón Chone, Rocafuerte y Portoviejo por el método de “ring test.”*
Universidad de Portoviejo. Ecuador.
- García-Carrillo, C. (1987). *La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana*. Office international des épizooties.
- Garin, B., Trap, D., & Gaumont, R. (1985). Assessment of the EDTA seroagglutination test for the diagnosis of bovine brucellosis. *The Veterinary Record*, 117(17), 444–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3934838>
- Garin-Bastuji, B. (1993). Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés. Le cas des sérologie atypiques en brucellose bovine. *Point. Vét.*, 25, 115–124.
- Gavazzi, G., Prigent, D., Baudet, J. M., Banoita, S., & Daoud, W. (1997). [Epidemiologic aspects of 42 cases of human brucellosis in the Republic of Djibouti]. *Médecine Tropicale : Revue Du Corps de Santé Colonial*, 57(4), 365–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612778>
- Gelman, A., & Rubin, D. B. (1992). Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. *Statistical Science*, 7(4), 457–472. <http://doi.org/10.1214/ss/1177011136>
- Gerbier, G., Garin-Bastuji, B., Pouillot, R., Véry, P., Cau, C., Berr, V., ... Moutou, F. (1997). False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in a field trial. *Veterinary Research*, 28(4), 375–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9257445>
- Geurden, T., Berkvens, D., Geldhof, P., Vercruyse, J., & Claerebout, E. (2006). A Bayesian approach for the evaluation of six diagnostic assays and the estimation of *Cryptosporidium* prevalence in dairy calves. *Veterinary Research*, 37(5), 671–682. <http://doi.org/10.1051/vetres:2006029>
- Gil, A., & Samartino, L. E. (2001). *Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina* (Livestock Policy Discussi on Paper No. 2).
- Godfroid, J., & Boelaert, F. (1995). Prescriptions pour le diagnostic sérologique de la brucellose. *Belgium: CODA-CERVA (Ed.)*, 47.
- Godfroid, J., Cloeckart, A., Liautard, J.-P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., ... Letesson, J.-J. (2005). From the discovery of the Malta fevers agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary Research*, 36(3), 313–326.

<http://doi.org/10.1051/vetres:2005003>

- Godfroid, J., & Käsbohrer, A. (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Veterinary Microbiology*, *90*(1), 135–145. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00217-1](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00217-1)
- Godfroid, J., Michel, P., Uytterhaegen, L., De Smedt, C., Rasseneur, F., Boelaert, F., Saegerman, C., Patigny, X. (1994). Brucellose enzootique à *Brucella suis* biotype 2 chez le sanglier (*Sus scrofa*) en Belgique. *Annales de Médecine Vétérinaire*, *138*, 263–268.
- Godfroid, J., Nielsen, K., & Saegerman, C. (2010). Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian Medical Journal*, *51*(4), 296–305. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718082>
- Godfroid, J., Saegerman, C., Wellemans, V., Walravens, K., Letesson, J.-J., Tibor, A., ... Garin-Bastuji, B. (2002). How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Veterinary Microbiology*, *90*(1), 461–477. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00230-4](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00230-4)
- Gómez, M. C., Nieto, J. A., Rosa, C., Geijo, P., Escribano, M. A., Muñoz, A., & López, C. (2008). Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, *15*(6), 1031–3. <http://doi.org/10.1128/CVI.00424-07>
- Gómez, T. (1964). *Estudio de la epizootiología y el diagnóstico de la brucelosis bovina en el litoral Ecuatoriano*. Universidad Estatal de Guayaquil. Ecuador.
- Granda, B. (1972). *Incidencia de brucelosis caprina en el cantón Macará por el método de Huddleson*. Universidad Nacional de Loja.
- Haley, C., Wagner, B., Puvanendiran, S., Abrahante, J., & Murtaugh, M. P. (2011). Diagnostic performance measures of ELISA and quantitative PCR tests for porcine circovirus type 2 exposure using Bayesian latent class analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, *101*(1), 79–88. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.05.001>
- Halling, S., & Boyle, S. (2002). Foreword (Editorial). *Vet. Microbiol.*, *90*, 1–4.
- Hasanjani Roushan, M. R., Ebrahimpour, S., & Moulana, Z. (2016). Different Clinical Presentations of Brucellosis. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *9*(4), e33765. <http://doi.org/10.5812/jjm.33765>

- Hernández-Bastida, A., García-Ramírez, P., Cruz-Estrada, A., & Rojo, J. (1999). Seroprevalencia de brucelosis en disponentes de sangre del Hospital General de México. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 62(2), 107–112.
- Herrera, W. (2003). *Diagnóstico de brucelosis en los hatos bovinos, mediante el método de sero aglutinación en la zona de Santo Domingo de los Colorados*. Universidad Laica Eloy Alfaro – Extensión en El Carmen. Ecuador.
- Herrick, J. A., Lederman, R. J., Sullivan, B., Powers, J. H., & Palmore, T. N. (2014). Brucella arteritis: clinical manifestations, treatment, and prognosis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 14(6), 520–6. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70270-6](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70270-6)
- Huber, J., & Nicoletti, P. (1986). Comparison of the results of card, rivanol, complement fixation and milk ring test with the isolation rate of Brucella abortus from cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 47, 1529–1531.
- INEC, MAG, & SICA. (2002). ECUADOR - Agricultural Census 1999/2000 – Main Results. Retrieved July 20, 2016, from http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/ess_test_folder/World_Census_Agriculture/Country_info_2000/Reports_2/ECU_SPA_REP_2000.pdf
- Intriago, W. (1971). *Investigación de brucelosis en porcinos sacrificados en el matadero de la ciudad de Portoviejo, mediante la prueba de sero-aglutinación en placa*. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Jimenez de Bagues, M.-P., Dudal, S., Dornand, J., & Gross, A. (2005). Cellular bioterrorism: how Brucella corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clinical Immunology*, 114(3), 227–238. <http://doi.org/10.1016/j.clim.2004.07.010>
- Kadri, S. M., Rukhsana, A., Laharwal, M. A., & Tanvir, M. (2000). Seroprevalence of brucellosis in Kashmir (India) among patients with pyrexia of unknown origin. *Journal of the Indian Medical Association*, 98(4), 170–1. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11016178>
- Kang, G. J., Gunaseelan, L., & Abbas, K. M. (2014). Epidemiological Modeling of Bovine Brucellosis in India. *Proceedings : ... IEEE International Conference on Big Data. IEEE International Conference on Big Data, 2014*, 6–10. <http://doi.org/10.1109/BigData.2014.7004420>
- Kelser, R., & Schoening, H. (1946). Orden “Eubacteriales”, familia “Parvobacteriaceae” (continuación), tribu “Brucelleae”. Organismos del género “Brucella.” In *Manual*

- De Bacteriología Veterinaria* (pp. 224–240). Madrid - España.
- Lambert, G., Deyoe, B. L., & Painter, G. M. (1964). POSTVACCINAL PERSISTENCE OF BRUCELLA ABORTUS STRAIN 19 IN TWO BULLS. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *145*, 909–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14231083>
- Leal-Klevezas, D. S., Martínez-Vázquez, I. O., García-Cantú, J., López-Merino, A., & Martínez-Soriano, J. P. (2000). *Use of polymerase chain reaction to detect Brucella abortus biovar 1 in infected goats. Veterinary Microbiology* (Vol. 75). [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00200-5](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00200-5)
- Lesaffre, E., Speybroeck, N., & Berkvens, D. (2007). Bayes and diagnostic testing. *Veterinary Parasitology*, *148*(1), 58–61. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.05.010>
- Loor, S., & Moreira, S. (1986). *Prevalencia de brucelosis bovina en el valle del río Portoviejo durante 1984 – 1985*. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Lord, V., Rolo, M., & Cherwonogrodsky, J. (1989). Evaluation of humoral immunity to *Brucella* sp. in cattle by use of an agar gel immunodiffusion test containing polysaccharide antigen. *Am. J. Vet. Res.*, *50*, 1813–1816.
- Lucero, N. E., Ayala, S. M., Escobar, G. I., & Jacob, N. R. (2008). *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiology and Infection*, *136*(4), 496–503. <http://doi.org/10.1017/S0950268807008795>
- Luna-Martínez, J. E., & Mejía-Terán, C. (2002). Brucellosis in Mexico: Current status and trends. *Veterinary Microbiology*. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00241-9](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00241-9)
- Luna-Martínez, J., & Mateos, A. (2001). Campaña de control de la brucelosis. In E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, & B. Arellano (Eds.), *Diagnóstico de brucelosis animal* (pp. 213–216). México.
- Macías, F. (1977). *Investigación de brucelosis humana a nivel de centros de salud y hospital regional de la ciudad de Portoviejo*. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador .
- Macmillan, A. (1990). Conventional serological tests. In K. Nielsen & J. Duncan (Eds.), *Animal Brucellosis* (pp. 153–197). Boca Raton: CRC.
- MAG-SESA. (1999). *Prevención y control de la brucelosis bovina en Ecuadorle*. Quito.
- Maldonado, P., & Salgado, G. (1979). *Diagnóstico de la brucelosis con antígeno*

- tamponado y la prueba de inactivación por calor a 65°C, en muestras positivas y sospechosas a la aglutinación rápida en placa.* Universidad Central del Ecuador.
- Mammerickx, M. (1990). Cronin et l'histoire des brucelloses. *Ann. Méd. Vét.*, 134, 77–79.
- Manthei, C. A. (1952). Evaluation of vaccinal methods and doses of brucella abortus strain 19. *Proceedings of the 56th Annual Meeting of Livestock Sanitation Association*, 115–125.
- Manzano, C. (1974). *Indice de brucelosis, en tres zonas de la provincia de Tungurahua.* Universidad Central del Ecuador.
- Marín, C., & Blasco, J. (2001). Diagnóstico bacteriológico de la brucelosis animal. In E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, & B. Arellano (Eds.), *Diagnóstico De Brucelosis Animal* (pp. 28–55). Máxico.
- Martínez, A., & Proaño, M. (1997). *Determinación de la prevalencia de brucella canis en las clínicas veterinarias de la ciudad de Quito.* Universidad Central del Ecuador.
- Massenet, D., Djime, O., & Karifene, R. (1993). Enquête séroépidémiologique sur la brucellose, chez le personnel des abattoirs de N'Djamena (TCHAD). *Med. Tropical*, 53, 253–255.
- Maquart, M., Le Fleche, P., Foster, G., Tryland, M., Ramisse, F, Djonne, B., Dahouj, S. A., Jacques, I., Neubauer, H., Walravens, K, Godfroid, J., Cloeckert, A., & Vergnaud, G. (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 pinnipedialis. *BMC Microbiol.* , 9, 145.
- Mellado, A. (1996). Género Brucella, Legionella y Pasteurella. In J. García-Rodríguez & J. Picazo (Eds.), *Microbiología Médica* (pp. 267–278). España.
- Memish, Z. A., & Balkhy, H. H. (2004). Brucellosis and International Travel. *Journal of Travel Medicine*, 11(1).
- Memish, Z., Almuneef, M., Mah, M. W., Qassem, L. A., & Osoba, A. O. (2002). Comparison of the Brucella Standard Agglutination Test with the ELISA IgG and IgM in patients with Brucella bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 44(2), 129–132. [http://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00426-1](http://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00426-1)
- Meyer, M. E., & Nelson, C. J. (1969). Persistence of Brucella abortus, strain 19 infection in immunized cattle. In *Proceedings, annual meeting of the United States*

Animal Health Association (Vol. 73, p. 159).

- Mora, E. (1971). *Determinación de la brucelosis bovina por medio de la prueba de sero-aglutinación en placa, en las ganaderías de la parroquia San Antonio, del cantón Chone*. Universidad de Portoviejo. Ecuador.
- Moreno, E. (2002). Brucellosis in Central America. *Veterinary Microbiology*, 90(1), 31–38. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00242-0](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00242-0)
- Moriyón, I., & López-Goñi, I. (2001). Estructura, genética y fisiología del género *Brucella*. In E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, & B. Arellano (Eds.), *Diagnóstico De Brucelosis Animal* (pp. 17–27). México.
- Muma, J. B., Godfroid, J., Samui, K. L., & Skjerve, E. (2007). The role of *Brucella* infection in abortions among traditional cattle reared in proximity to wildlife on the Kafue flats of Zambia. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 26(3), 721–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18293620>
- Nérette, P., Stryhn, H., Dohoo, I., & Hammell, L. (2008). Using pseudogold standards and latent-class analysis in combination to evaluate the accuracy of three diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, 85(3), 207–225. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.01.011>
- Nicoletti, P. (1980). The epidemiology of bovine brucellosis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, 24, 69–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6779513>
- Nicoletti, P. (1981). Prevalence and persistence of *Brucella abortus* strain 19 infections and prevalence of other biotypes in vaccinated adult dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 178(2), 143–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6782064>
- Nicoletti, P. (2001). Immune Responses and Vaccination. In M. Madkour (Ed.), *Madkour's Brucellosis* (pp. 267 – 274). Germany: Springer-Verlag.
- Nicoletti, P. (2002). A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 90(1), 5–9. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00209-2](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00209-2)
- Nicoletti, P., & Milward, F. W. (1983). Protection by oral administration of *brucella abortus* strain 19 against an oral challenge exposure with a pathogenic strain of *Brucella*. *American Journal of Veterinary Research*, 44(9), 1641–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6414347>

- Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*, 90(1), 447–459. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00229-8](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00229-8)
- Nieto, E. (1981). *Investigación y diagnóstico de brucelosis en las ganaderías bovinas de los cantones Santa Rosa y Arenillas de la provincia de El Oro, mediante la prueba de ring test*. Universidad de Guayaquil. Ecuador.
- OIE. (2000). Brucellose. In OIE (Ed.), *Histoire De La Surveillance Et Du Contrôl Des Maladies Animales Transmissibles*. Office International des Epizooties (pp. 261–262). Paris - France.
- OIE. (2016a). CHAPTER 2.1.4 Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. mellitensis* and *B. suis*). Retrieved July 20, 2016, from http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCellosis.pdf
- OIE. (2016b). WAHIS Interface. Retrieved July 20, 2016, from http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalpopulation
- Olleague, O. (1969). *Determinación de la incidencia de la brucelosis por medio de la prueba “ring test”, en las ganaderías de la provincia de El Oro*. Universidad Estatal de Guayaquil. Ecuador.
- Olsen, S. C., & Stoffregen, W. S. (2005). Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Review of Vaccines*, 4(6), 915–928. <http://doi.org/10.1586/14760584.4.6.915>
- OPS, & OMS. (2001). *Panel: Zoonosis de importancia para la economía y para la salud pública. Brucelosis y Tuberculosis bovina: Control o eliminación. XII Reunión a nivel ministerial en salud y agricultura*. Brasil.
- Orduña, A., Almaraz, A., Prado, A., Gutierrez, M. P., Garcia-Pascual, A., Dueñas, A., ... Torres, A. R. (2000). Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4000–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060059>
- Órgano del Gobierno Del Ecuador. Registro Oficial, Pub. L. No. 31 de Marzo - 409 (1981). Ecuador.
- Órgano del Gobierno Del Ecuador. Registro Oficial, Pub. L. No. 10 de Agosto 1008 (1996). Ecuador.

- Ortega-Sánchez, J. L., Martínez-Romero, A., García-Luján, C., & Rodríguez-Martínez, R. (2009). Seroprevalencia de brucelosis caprina en el municipio de Tlahualilo, Durango. México. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(4).
- Ortiz, F. (1962). *Investigación de la brucelosis caprina en la provincia del Guayas*. Universidad Estatal de Guayaquil. Ecuador.
- Ouahrani-Bettache, S., Soubrier, M., & Liautard, J. (1996). IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 81(2), 154–160.
- Pacheco, W. A., Genovez, M. E., Pozzi, C. R., Silva, L. M. P., Azevedo, S. S., Did, C. C., ... Gambarini, M. L. (2012). Excretion of *Brucella abortus* vaccine B19 strain during a reproductive cycle in dairy cows. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 43(2), 594–601. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200022>
- PANAFTOSA. (2000). *Brucelosis y Tuberculosis, situación de los programas en las Américas* (No. 1). Rio de Janeiro, Brasil.
- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., & Tsianos, E. (2005). Brucellosis. *New England Journal of Medicine*, 352(22), 2325–2336. <http://doi.org/10.1056/NEJMra050570>
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(2), 91–99. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6)
- Pasquereau, C. (1980). La brucellose. In G. Bretenet, G. Delclos, M. Mombard, R. Lignères, & C. Pasquereau (Eds.), *La Santé Anmale* (pp. 74–141). Frances.
- Pila-Pérez, R., Pila-Peláez, R., Paulino-Basulto, M., Hernández-Pupo, O., Gacía-Peña, J. G., & del Sol-Torres, G. (1997). Estudio clínico de la brucelosis humana. *Rev Med Urug*, 110–117.
- Plaza, J. (1977). *Diagnóstico de brucelosis bovina en la población del cantón Puján, provincia de Manabí, mediante la prueba de sero-aglutinación en placa*. Departamento de. Universidad de Guayaquil. Ecuador.
- Plaza, L. (1970). *Diagnóstico del aborto de Bang en el ganado vacuno de los cantones Chone, Rocafuerte y Bolívar*. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Pouillot, R., Garin-Bastuji, B., Gerbier, G., Coche, Y., Cau, C., Dufour, B., & Moutou, F. (1997). The Brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological

- reactions in bovine brucellosis. *Veterinary Research*, 28(4), 365–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9257444>
- Poulsen, K. P., Hutchins, F. T., McNulty, C. M., Tremblay, M., Zabala, C., Barragan, V., ... Bethel, J. W. (2014). Brucellosis in dairy cattle and goats in northern Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(4), 712–5. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0362>
- Praud, A., Gimenez, O., Zanella, G., Dufour, B., Pozzi, N., Antras, V., ... Garin-Bastuji, B. (2012). Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 104(1), 94–100. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.10.014>
- Quinde, P. (1959). *Diagnóstico de la brucelosis bovina de la hoya de Loja*. Universidad Nacional de Loja. Ecuador.
- Radostits, O. (2001). *Herd Health – Food Animal Production Medicine*. New York: W.B. Saunders Company.
- Ragan, V. E. (2002). The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. *Veterinary Microbiology*, 90(1), 11–18. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00240-7](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00240-7)
- Rahman, A. K. M. A., Dirk, B., Fretin, D., Saegerman, C., Ahmed, M. U., Muhammad, N., ... Abatih, E. (2012). Seroprevalence and Risk Factors for Brucellosis in a High-Risk Group of Individuals in Bangladesh. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2011.1029>.
- Rahman, A. K. M. A., Saegerman, C., Berkvens, D., Fretin, D., Gani, M. O., Ershaduzzaman, M., ... Emmanuel, A. (2013). Bayesian estimation of true prevalence, sensitivity and specificity of indirect ELISA, Rose Bengal Test and Slow Agglutination Test for the diagnosis of brucellosis in sheep and goats in Bangladesh. *Preventive Veterinary Medicine*, 110(2), 242–252. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.11.029>
- Rivadeneira, R. (1980). *Diagnóstico de la brucelosis bovina en las ganaderías lecheras del cantón Cuenca, provincia del Azuay, mediante los métodos “ring-test” seroaglutinación en placa*. Universidad de Guayaquil. Ecuador.
- Rivera, D. Y., Rueda, O. E., Calderon, C. P., Mariño, O. C., Gall, D., & Nielsen, K. (2003). [Comparative evaluation of the indirect enzyme-linked immunosorbant assay in milk for the detection of cattle infected with *Brucella abortus*, in herds

- located in the province of Cundinamarca, Colombia]. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 22(3), 1065–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15005563>
- Robalino, A. (1966). *Diagnóstico e Incidencia de brucelosis porcina en animales sacrificados en el camal municipal de Quito*. Universidad Central del Ecuador.
- Robinson, A. (2003). *Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance*. Rome, Italy: FAO.
- Rodríguez-Hidalgo, R. I., Contreras-Zamora, J., Benitez Ortiz, W., Guerrero-Viracocha, K., Salcan-Guaman, H., Minda, E., & Ron Garrido, L. (2015). Circulating Strains of *Brucella abortus* in Cattle in Santo Domingo De Los Tsáchilas Province - Ecuador. *Frontiers in Public Health*, 3, 45. <http://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00045>
- Rogan, W. J., & Gladen, B. (1978). Estimating prevalence from the results of a screening test. *American Journal of Epidemiology*, 107(1), 71–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/623091>
- Rojas, X., & Alonso, O. (1994). ELISA for the diagnosis and epidemiology of *Brucella abortus* infection in cattle in Chile. *IAEA TECDOC*, 77–82.
- Ron-Román, L., Benitez, W., Speybroeck, N., Ron, J., Saegerman, C., Berkvens, D., & Abatih, E. (2013). Spatio-temporal clusters of incident human brucellosis cases in Ecuador. *Spatial and Spatio-Temporal Epidemiology*, 5, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.sste.2013.02.001>
- Ron-Román, J., Ron-Garrido, L., Abatih, E., Celi-Eraza, M., Vizcaíno-Ordóñez, L., Calva-Pacheco, J., ... Saegerman, C. (2014). Human Brucellosis in Northwest Ecuador: Typifying *Brucella* spp., Seroprevalence, and Associated Risk Factors. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(2), 124–133. <http://doi.org/10.1089/vbz.2012.1191>
- Ron-Román, J., Saegerman, C., Minda-Aluisa, E., Benítez-Ortíz, W., Brandt, J., & Douce, R. (2012). First report of orchitis in man caused by *Brucella abortus* biovar 1 in Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(3), 524–8. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0341>
- Roux, J. (1979). [Epidemiology and prevention of brucellosis]. *Bulletin of the World Health Organization*, 57(2), 179–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/312154>

- Ruiz Castañeda, M. (1954). [Bovine brucellosis, problem of national interest]. *La Prensa Médica Mexicana*, 19(11), 255–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14357228>
- Saegerman, C., Berkvens, D., Godfroid, J., & Walravens, K. (2010). Bovine brucellosis. In P. Lefèvre, J. Blancou, R. Chermette, & G. Uilenberg (Eds.), *Infectious and parasitic disease of livestock* (pp. 991–1021). France: Lavoisier.
- Saegerman, C., De Waele, L., Gilson, D., Godfroid, J., Thiange, P., Michel, P., ... Berkvens, D. (2004). Evaluation of three serum i-ELISAs using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 100(1), 91–105. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.003>
- Saegerman, C., Vo, T. K., De Waele, L., Gilson, D., Bastin, A., Dubray, G., ... Godfroid, J. (1999). Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. *The Veterinary Record*, 145(8), 214–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499853>
- Saldaña, H. (1973). *Incidencia de brucelosis bovina en el cantón Cuenca, por las pruebas del anillo y suero-aglutinación*. Universidad Central del Ecuador.
- Saltos, J. M., & Saltos, J. E. (2001). *Prevalencia de brucelosis en los hatos bovinos del catón San Vicente, mediante la prueba de suero-aglutinación macroscópica en placa rápida durante los meses de junio a octubre del 2001*. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Samartino, L. E., & Enright, F. M. (1993). Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 16(2), 95–101. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8319440>
- Samartino, L. E., Fort, M., Gregoret, R., & Schurig, G. G. (2000). Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, 45(3), 193–199. [http://doi.org/10.1016/S0167-5877\(00\)00130-6](http://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00130-6)
- Samartino, L., Gregoret, R., Gall, D., & Nielsen, K. (1999). Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *J. Immunoassay*, 20, 115–120.
- Sánchez J., P. (1997). *Diagnóstico de brucelosis caprina, en el Cantón Santa Isabel, mediante el método de aglutinación en placa, año 1996*. Universidad de Cuenca.

Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/17994>

- Sanogo, M., Abatih, E., Thys, E., Fretin, D., Berkvens, D., & Saegerman, C. (2013). Importance of identification and typing of Brucellae from West African cattle: a review. *Veterinary Microbiology*, *164*(3-4), 202–11. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.009>
- Sanogo, M., Cisse, B., Ouattara, M., Walravens, K., Praet, N., Berkvens, D., & Thys, E. (2008). Etude de la prévalence de la brucellose bovine dans le centre de la Côte d'Ivoire. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, *61*, 147–151.
- Sanogo, M., Thys, E., Achi, Y. L., Fretin, D., Michel, P., Abatih, E., ... Saegerman, C. (2013). Bayesian estimation of the true prevalence, sensitivity and specificity of the Rose Bengal and indirect ELISA tests in the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Journal*, *195*(1), 114–120. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.007>
- Santillán, F. (1971). *Investigación sobre la presencia de brucelosis, mediante la prueba de "ring test" en las ganaderías de la provincia de Esmeraldas*. Universidad Estatal de Guayaquil. Ecuador.
- Saravi, M. A., Wright, P. F., Gregoret, R. J., & Gall, D. E. (1995). Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *47*(1-2), 93–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8533303>
- Sarguna, P., Bilolikar, A. K., Rao, A., & Mathur, D. R. (2002). Brucellosis in association with HIV infection- a case report. *Indian Journal of Medical Microbiology*, *20*(4), 221–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17657076>
- Scholz, H.C., Nockler, K., Gollner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Kampfner, P., Cloeckart, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J., De B.K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, *60*, 801-808.
- Schurig, G. G., Roop, R. M., Bagchi, T., Boyle, S., Buhrman, D., & Sriranganathan, N. (1991). Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology*, *28*(2), 171–188. [http://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90091-S](http://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90091-S)

- Segarra, G. (1971). *Investigación de brucelosis en bovinos de Loja, por los métodos de "Ring test" y Huddleson*. Universidad Nacional de Loja. Ecuador.
- Serra Alvarez, J., & Godoy García, P. (2000). [Incidence, etiology and epidemiology of brucellosis in a rural area of the province of Lleida]. *Revista Española de Salud Pública*, 74(1), 45–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10832390>
- Spiegelhalter, D. J., Best, N. G., Carlin, B. P., & van der Linde, A. (2002). Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 64(4), 583–639. <http://doi.org/10.1111/1467-9868.00353>
- Spînu, I., Vasilescu, T., Pop, A., & Dobrescu, A. (1966). [Studies on human morbidity from brucellosis among the personnel of a large abattoir]. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentales et de Microbiologie*, 25(3), 749–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6009231>
- Stemshorn, B., Forbes, L., Eaglesome, M., Nielsen, K., Robertson, F., & Samagh, B. (1985). A comparison of the standard serological tests for diagnosis of bovine brucellosis. *Can. J. Comp. Med.*, 19, 391–394.
- Suárez, F. (2001). Introducción. In E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, & B. Arellano (Eds.), *Diagnóstico de brucelosis animal* (pp. 1–8). México.
- Sutherland, S. S., Evans, R. J., & Bathgate, J. (1986). Application of an enzyme-linked immunosorbent assay in the final stages of a bovine brucellosis eradication program. *Australian Veterinary Journal*, 63(12), 412–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3099740>
- Sutra, L., Caffin, J. P., & Dubray, G. (1986). Role of milk immunoglobulins in the Brucella milk ring test. *Veterinary Microbiology*, 12(4), 359–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3097917>
- Tapia, N. (1998). *Prevalencia de brucelosis caprina en el área "Centro Laja"*. Universidad Nacional de Loja.
- Thimn, B. M. (1982). Brucellosis in South America. In *Brucellosis; Distribution in Man, Domestic And Wild Animals* (pp. 31–34). New York: Spiringer-Verlag.
- Thys, E., Schiere, H., Van Huylebroeck, G., Mfoukou-Ntsakala, A., Oueadraogo, M., & Geerts, S. (2006). Three approaches for the integrated assessment of urban household livestock production systems: Cases from Sub-Saharan Africa. *Outlook*

- on Agriculture*, 35, 7–18.
- Thys, E., Yahaya, M. ., Walravens, K., Baudoux, C., Bagayoko, I., Berkvens, D., & Geerts, S. (2005). Edude de la prévalence de la brucelloses bovine en zone forestière de la Cote d’Ivoire. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 58, 205–209.
- Tobar, A. (1961). *Estudio de la infección brucelar en ovinos, caprinos y porcinos sacrificados en el camal municipal de Quito*. Universidad Central del Ecuador.
- Toma, B., Dufour, B., Bénét, J., Sanaa, M., Shaw, A., & Moutou, F. (2010a). Determinacion de la cause d’une maladie. In *Epidemiologie appliquee á la litte collective contre les amaladies annimales trnasmissibles majeures* (3ème ed., pp. 247–298). France: AEEMA.
- Toma, B., Dufour, B., Bénét, J., Sanaa, M., Shaw, A., & Moutou, F. (2010b). La depistage des maladies infectieuses animales. In *Epidemiologie appliquee á la litte collective contre les amaladies annimales trnasmissibles majeures* (3ème ed., pp. 105–155). France: AEEMA.
- Torres, H. (2008). Control de Brucelosis Bovina—Programa Nacional. *Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura Y Pesca (MAGAP), Servicio Ecuatoriano de Saniadad Agropecuaria (SESA). Quito, Ecuador, 30*.
- Vacek, P. M. (1985). The effect of conditional dependence on the evaluation of diagnostic tests. *Biometrics*, 41(4), 959–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3830260>
- Valdez, I., Bazurto, Z., & Vera, Z. (2000). *Diagnóstico de brucelosis en los hatos bovinos del catón San Vicente, mediante prueba de suero-aglutinación macroscópica en placa rápida*. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Valdivieso, C. (1969). *Determinación de la incidencia de brucelosis por medio de la prueba de sero-aglutinación en placa, en las ganaderías de la zona de Machala*. Universidad Estatal de Guayaquil. Ecuador.
- Van Aert, A., Brioen, P., Dekeyser, P., Uytterhaegen, L., Sijens, R. J., & Boeyé, A. (1984). A comparative study of ELISA and other methods for the detection of *Brucella* antibodies in bovine sera. *Veterinary Microbiology*, 10(1), 13–21. [http://doi.org/10.1016/0378-1135\(84\)90052-X](http://doi.org/10.1016/0378-1135(84)90052-X)
- Vargas O, F. J. (2002). Brucellosis in Venezuela. *Veterinary Microbiology*, 90(1), 39–44. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00243-2](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00243-2)
- Vásconez-Lópeez, E. (1960). *Incidencia de la brucelosis en leches que se consumen en*

- el cantón Quito, determinado por la prueba de "ring test."* Universidad Central del Ecuador.
- Vera, R., & Flores, R. (2004). *Diagnóstico y prevalencia de brucelosis mediante ring test en los hatos bovinos del cantón Chone en el año 2004.* Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Vidal, L. (1992). *Diagnóstico de brucelosis en los bovinos en las parroquias de Tarqui y Victoria del Portete.* Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Verger, J.-M., Grayon, M., & Fernández-Lago, L. (2000). DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes and Infection*, 2(9), 1089–1100. [http://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01263-6](http://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01263-6)
- Wade, B., Arteaga, C., Morillon, M., Kraemer, P., Maslin, J., Molinier, S., & Perret, J.-L. (1998). Brucellose d'importation: un nouveau risque pour le voyageur? *Médecine Tropicale*, 58, 205–206.
- Wareth, G., Melzer, F., El-Diasty, M., Schmoock, G., Elbauomy, E., Abdel-Hamid, N., ... Neubauer, H. (2016). Isolation of *Brucella abortus* from a Dog and a Cat Confirms their Biological Role in Re-emergence and Dissemination of Bovine Brucellosis on Dairy Farms. *Transboundary and Emerging Diseases*. <http://doi.org/10.1111/tbed.12535>
- Whatmore, A.M., Davison, N., Cloeckert, A., Al Dahouk, S., Zygmuny, M.S., Brew, S.D., Perrett, L.L., Koylass, M.S., Vergnaud, G., Quance, C., Scholz, H.C., Dick, E.J., Hubbard, G., Schlabritz-Loutsevitch, N.E. *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014, *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(Pt 12):4120-4128.
- Young, E. J. (1997). Especies de brucella. In G. Mandell, J. Bennett, & R. Dolin (Eds.), *Enfermedades Infecciosas, Principio y Practica* (Cuarta, pp. 2300–2320). Buenos Aires Argentina: Editorial Medica Paramericana SA.
- Yu, W. L., & Nielsen, K. (2010). Review of Detection of *Brucella* sp. by Polymerase Chain Reaction. *Croatian Medical Journal*, 51(4), 306. <http://doi.org/10.3325/cmj.2010.51.306>
- Zambrano, I. (1978). *Investigación de brucelosis en caninos mediante el método de sero-aglutinación en placa en el cantón Rocafuerte.* Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.
- Zambrano, M., & Manabí, U. L. "Eloy A. de. (2002). *Actividad realizada en el*

laboratorio agropecuario de la ULEAM, extensión en El Carme, exámenes coproparasitarios – brucelosis – hematozoarios en las diferentes zonas del cantón El Carmen.

ANNEXES

POSTER 1

**Validation of diagnostic test to detect brucellosis and
epidemiological survey in the Ecuadorian Andes**

Ron-Román J., Godfroid J., Saegerman C., Walravens K., Benítez Ortiz W., Brandt J.,
Utterhaegen L., De Smedt C., Michel P., Berkvens D.

Brucellosis 2003 International Research Conference (56th Brucellosis Research Conference)
September 15-17, 2003 – University of Navarra, Pamplona (Spain)

Préambule

Le travail effectué tout au long de cette thèse de doctorat a débuté par une enquête séro-épidémiologique à petite échelle dans la zone qui s'est révélée être à forte prévalence en brucellose bovine. L'objectif initial était d'investiguer la situation de la brucellose bovine sur base du transfert de technologie dans le cadre d'une Coopération Nord - Sud.

Cette coopération entre le Centre d'Études Vétérinaires et Agrochimiques (CODA-CERVA), l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (IMT-ITG), le Centro Internacional de Zoonosis et l'Université de Liège a permis de développer des outils de diagnostic sérologique, intradermique, microbiologique, moléculaire et épidémiologiques afin d'étudier les brucelloses animale et humaine en Equateur.

Bien que le résumé de ces travaux ait été présenté à la Conférence Internationale sur la Brucellose qui s'est tenue lors de la 56^{ième} Conférence de Recherche sur la Brucellose en 2003, à Pampelune en Espagne, nous avons attendu d'avoir approfondi les études à plus large échelle (visant une plus large représentativité) ciblant la maladie avant de diffuser les résultats.

Résumé en français

Une enquête épidémiologique ayant pour objectif de déterminer la prévalence de la brucellose chez les bovins et les travailleurs agricoles a été réalisée dans 23 fermes des Andes équatoriennes entre Octobre 2002 et Avril 2003. Les sérums provenaient de bovins laitiers (n= 516) et de travailleurs agricoles (n= 98) et ont été testés au Rose Bengale (RB), par Agglutination Lente de Wright (SAW) avec EDTA, par le test de Fixation du Complément (CFT) et par un test immuno enzymatique indirect (iELISA). Par ailleurs, le test cutané (ST) réalisé avec un allergène purifié (Brucellergen, Synbiotics) a été réalisé sur les animaux. Des tests microbiologiques ont été réalisés sur 103 échantillons de lait prélevés chez 27 animaux provenant d'exploitations infectées.

Une analyse bayésienne utilisant les résultats des quatre tests (RB, SAW-EDTA, ELISA et ST) pratiqués chez les animaux non vaccinés (n= 99) a été réalisée. Étant donné que le ST présente une Sp de 100%, le taux de prévalence des animaux a été estimé entre 35% et 40%. Les caractéristiques des autres tests ont été évaluées: Se=84% et Sp=100% pour le ST,

Se=47% et Sp=87% pour l'iELISA, Se=58% et Sp=85% pour le SAW-EDTA, et Se=40% et Sp=90% pour le RB.

Brucella abortus biotype 4 a été isolée dans le lait de 4 animaux. L'un des échantillons provenait d'une vache vaccinée avec B19 et revacciné avec RB51. Six personnes vivant dans les fermes infectées étaient positives aux tests SAW-EDTA, iELISA et CFT. La notification officielle de 183 cas humains rapportés entre 1960 et 2000 laisserait supposer une probable sous-déclaration des cas humains de brucellose en Equateur.

Ces résultats aideront le Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) à formuler des recommandations au Ministère de l'Agriculture et de l'Elevage et au Ministère de la Santé Publique en ce qui concerne le diagnostic et la prévention et le contrôle de la brucellose en Equateur.

VALIDATION OF DIAGNOSTIC TEST TO DETECT BRUCELLOSIS AND EPIDEMIOLOGICAL SURVEY IN THE ECUADORIAN ANDES.

Ron-Román J¹., Godfroid J²., Saegerman C³., Walravens K²., Benítez Ortiz W¹., Brandt J⁴., Utterhaegen L²., De Smedt C²., Michel P²., Berkvens D⁴.

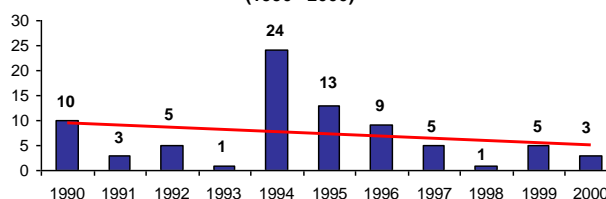


(1) Universidad Central del Ecuador, Centro Internacional de Zoonosis (CIZ). Quito, Ecuador.
(2) Veterinary and Agrochemical Research Center (CERVA). Brussels, Belgium.
(3) Ministry of Health, Consumer's protection and Environment. Brussels, Belgium.
(4) "Prince Leopoldo" Institute of Tropical Medicine, Department of Animal Health. Antwerp, Belgium.

Introduction

Brucellosis, the most widely distributed zoonosis, is highly prevalent in traditional husbandry systems, where sanitary standards are poor. In Ecuador, information on brucellosis in man and his livestock is scarce i.a. because standardised diagnostic methods are lacking.

Official reports of human brucellosis in Ecuador (1990 - 2000)



Source: MSP (2002)

Materials and Methods

Sera from bovines (n=516) and farm workers (n=98) from 23 dairy farms in the northern Sierra of Ecuador (Pichincha Province) were analysed by the following assays: Rose Bengal (RB), Buffered Plate Agglutination Test (BPAT), Serum Agglutination Test (SAT-EDTA), Complement Fixation Test (CFT), Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (iELISA) in addition to the Skin Test (ST) applied on bovines.

A Bayesian analysis on the results of RB, SAT-EDTA, iELISA and ST of non vaccinated animals (n=99) was carried out.

Brucella sp. was isolated from milk samples from seropositive bovines and the strain characterised. A vaccine, B-19, locally produced was submitted to a quality control.

Results

Results obtained in the laboratory in Ecuador (CIZ) corresponded well with those obtained in Brussels (CERVA), none of the farms appeared to be free of brucellosis.

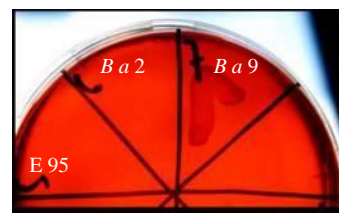
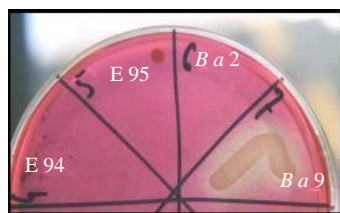
Given a specificity of 100% for the ST, prevalence of bovine brucellosis can be estimated between 16% and 45%. Estimations of the sensitivity and specificity of each assay are respectively 0.74 and 1 for ST, 0.61 and 0.86 for iELISA, 0.59 and 0.82 for SAT-EDTA and 0.48 and 0.91 for RB.

Brucella abortus biotype 4, was isolated from 4 bovines, one of these being vaccinated with B-19 and boosted with RB-51. The locally available vaccine, proved to contain about 3.3×10^8 germs (should have been 60×10^9). Isolated strains did not grow in stained media i.e. Basic Fuschin and Safranin.

In sharp contrast to the official reports, six persons working and living in farms were seropositive in SAT-EDTA, iELISA and CFT.



Positive ST (>12 mm)



Positive *Brucella abortus* isolates from bovine milk from Ecuador (E 94 and E95), vs. control samples (B a 2 and B a 9) in Fuschin (left) and Safranin (right).

Conclusion

- In contrast to official reports, brucellosis in man and livestock is a seriously underestimated zoonosis in Ecuador.
- Multiple tests allow for the detection of most of the infections.
- An independent national reference laboratory for quality control of reagents and vaccines and for assisting the authorities on diagnosis, prevention and control of brucellosis, is a major requisite in countries like Ecuador.

POSTER 2

Dogs as potential mechanical vector of transmission of
brucella spp. in dairy cattle in the sierra of Ecuador

Benítez-Capistros F., Ron-Román J., González-Andrade P., Minda-Aluisa E.,
Berkvens D., Saegerman C., Benítez Ortiz W.

Joint Colloquium on Zoonoses and Neglected Infectious Diseases in Africa – 2011
1 to 4 November 2011 Johannesburg, South Africa

Préambule

Au cours de cette étude, la prévalence élevée au niveau des troupeaux bovins et des animaux dans la Sierra équatorienne, ajouté à la forte prévalence des avortements chez les bovins, et à la facilité d'isolement de *Brucella* spp. à partir de leur lait, a rapidement soulevé la question du rôle potentiel des chiens en tant que réservoir de l'infection. Il était indispensable de rechercher l'infection chez cette espèce et d'identifier les espèces et biotypes de *Brucella*, afin de voir s'il s'agit des mêmes que ceux circulant dans les populations bovine et humaine de la même zone d'étude.

Résumé en français

En 2008, une étude réalisée dans plusieurs élevages bovins localisés dans une région endémique d'Equateur a été menée dans le but de déterminer si les chiens hébergeaient des *Brucella* spp. Des sérums de chiens (n = 151) vivant dans des exploitations bovines (n = 34) du canton Mejía (province de Pichincha) ont été testés grâce à l'utilisation d'anticorps anti-*Brucella* en phase lisse au moyen de trois tests sérologiques. Cinq chiens hautement positifs ont été euthanasiés et des échantillons de ganglions lymphatiques et de divers organes ont été prélevés dans le but d'isoler l'agent causal. D'autre part, des sérums bovins (n=93) provenant d'une exploitation laitière dans laquelle les chiens avaient réagi positivement ont été analysés au moyen de deux tests sérologiques. De plus, l'isolement de *Brucella* spp. a été entrepris sur des échantillons de lait provenant des vaches séropositives (n = 7). Les isolats ont été caractérisés au moyen de tests microbiologiques et par PCR-711.

La majorité des chiens (85,43%) avaient des contacts avec le bétail et ingéré du lait cru. D'autre part, 64,24% d'entre eux mangeaient régulièrement les produits d'avortement. Au total, 43 chiens (30,46%) ont réagi positivement à au moins un test diagnostic. Pris individuellement, les tests ont fourni les résultats suivants: (i) 15,89% des chiens étaient positifs au test d'agglutination rapide au RB, (ii) 11,92% étaient positifs au SAT-EDTA et (iii) 23,85% étaient positifs au test iELISA. Seuls 13 chiens (8,6%) avaient réagi positivement aux trois tests. Quatre bovins (4,30%) étaient positifs aux tests RB et SAT-EDTA. *Brucella abortus* biotype 4 a été identifiée par essais microbiologiques et PCR-711, à partir des prélèvements de chiens (n= 5) et de bovins (n= 1).

Les résultats démontrent que le contrôle de la brucellose ne devrait pas se limiter uniquement à l'espèce bovine, chez qui les pertes économiques sont évidentes. Davantage d'attention devrait être portée aux autres espèces animales comme par exemple les chiens de ferme, en tant que réservoir potentiel de la maladie.



UNIVERSITEIT VAN PRETORIA
UNIVERSITY OF PRETORIA
YUNIBESITHI YA PRETORIA
Faculty of Veterinary Science



Joint Colloquium on Zoonoses and Neglected Infectious Diseases in Africa – 2011 IMT/DVTD

DOGS AS POTENTIAL MECHANICAL VECTOR OF TRANSMISSION OF BRUCELLA spp., IN DAIRY CATTLE IN THE SIERRA OF ECUADOR.

Benítez-Capistros, F.,¹⁻² Ron-Román, J.,¹⁻³⁻⁴ González-Andrade, P.,¹ Minda-Aluisa, E.,¹ Berkvens, D.,³ Saegerman C.,⁴ Benítez-Ortíz, W.¹⁻⁵

¹ Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador; ² Facultad de Ciencias Exáctas y Naturales. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador; ³ Department of Animal Health, Prince Leopold Institut of Tropical Medicine (ITG-IMT), Antwerp, Belgium; ⁴ Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Belgique; ⁵ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador;

Abstract

In 2008 a study in cattle farms in Ecuador was set up to determine whether dogs harboured strains of *Brucella* spp., endemic at the region. Serum samples from dogs (n=151) living on farms (n=34) in Mejía canton in Pichincha province, Ecuador, were tested for antibodies against smooth *Brucella* spp., by three immunodiagnostic assays. Highly positive dogs (n=5) were euthanized in order to cultured samples of lymph nodes and organs. From a dairy farm with positive dogs, sera from cows (n=93) were analysed by two immunodiagnostic assays and milk samples from seropositive cows (n=7) were cultured. In addition, isolates were investigated by PCR-711.

85.43% of the dogs had contact with cattle and drank raw milk, 64.24% regularly ate aborted material. In total 43 dogs (30.46%) reacted positive at least to one serodiagnostic test; individual tests showed 15.89% positive reactions when tested by the Rose Bengal test (RB), 11.92% by the Wright's Slow Agglutination Test[®] (SAT-EDTA) and 23.85% by the indirect Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (iELISA). Only 13 (8.60%) dogs tested positive in all three tests. Four bovines (4.30%) were positive on RB and SAT-EDTA. *Brucella* spp. was identified in isolations from dogs (n=5) and bovines (n=1), by routine biochemical assays and PCR-711.

Our results demonstrate that control of brucellosis should not be restricted to bovines, for which economic losses are obvious. Equal attention should be given to other animals, among them dogs living on farms or in the neighbourhood of farms, as potential mechanical vector of transmission of this zoonosis.



Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège
4000 Liège (Belgique)

D / 2016 / 0480 / 23
ISBN 978-2-87543-095-3



9 782875 430953