

# Proyectos interuniversitarios y multidisciplinarios relacionados con el patógeno zoonótico *Brucella abortus* realizados en el CIB

Interuniversity and multidisciplinary research projects about the zoonotic pathogen *Brucella abortus* developed in the CIB

Olga Rivas-Solano<sup>1</sup>

---

Rivas-Solano, O. Proyectos interuniversitarios y multidisciplinarios relacionados con el patógeno zoonótico *Brucella abortus* realizados en el CIB. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 77-84.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4630>



<sup>1</sup> Ingeniera en Biotecnología, Máster en Microbiología. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo Electrónico: orivas@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0003-0990-149X>

## Palabras clave

*Brucella* spp.; identificación; virulencia; especificidad de hospedero.

## Resumen

Desde el año 2009, el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del TEC ha venido desarrollando varios proyectos de investigación interuniversitarios y multidisciplinarios relacionados con la bacteria *Brucella abortus*. Estos proyectos se hicieron en conjunto con el Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (UNA) y el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (UCR). La mayoría de estos proyectos contaron principalmente con financiamiento de los Fondos Especiales para la Educación Superior (FEES) del Consejo Nacional de Rectores (CONARE). Durante la última década, el financiamiento recibido del FEES, permitió crear y equipar el Laboratorio de Bacteriología en el CIB; realizar trabajos finales de graduación y tesis de licenciatura, maestría y doctorado, en las áreas de biotecnología, microbiología, medicina veterinaria y ciencias biomédicas. También se han publicado artículos científicos en revistas indexadas y se están elaborando manuscritos, como resultado de las tesis doctorales en ejecución.

## Keywords

*Brucella* spp.; identification; virulence; host specificity.

## Abstract

Since 2009, the “Centro de Investigación en Biotecnología” (CIB) of “TEC”, has carried out several interuniversity and multidisciplinary research projects about the bacterium *Brucella abortus*. CIB has collaborated with the “Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET)” from “Escuela de Medicina Veterinaria” of “Universidad Nacional (UNA)” and the “Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales” from “Facultad de Microbiología” of “Universidad de Costa Rica”. Most of the projects received funding from “Fondos Especiales para la Educación Superior (FEES)” of “Consejo Nacional de Rectores (CONARE)”. During the last decade, FEES-funding allowed the creation and equipment of a bacteriology laboratory, as well as the development of several bachelor, master and doctoral thesis in the fields of biotechnology, microbiology, veterinary medicine and biomedical sciences. All that work was accompanied with the publication and writing of scientific articles.

## *Brucella* y brucelosis

La enfermedad causada por *Brucella* spp. se denomina brucelosis y es endémica en países de Centro y Suramérica, la cuenca mediterránea, el Norte y el Este de África, el Medio Oriente y Asia [1]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la brucelosis como una de las siete zoonosis más extendidas a nivel mundial y menos priorizada por los sistemas de salud [2], con aproximadamente 500 000 casos al año [3].

El género *Brucella* está constituido por doce especies que infectan mamíferos: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. inopinata*, *B. paponis* y *B. vulpis*. La mayoría de ellas presenta alta especificidad de hospedero

y algunas pueden también infectar a los humanos con mayor o menor grado de virulencia según la especie. Recientemente se han reportado aislamientos atípicos de *Brucella* sp en anfibios [4].

*Brucella abortus* es un patógeno zoonótico, intracelular facultativo que afecta principalmente al ganado vacuno. En las hembras, la bacteria ocasiona abortos, retención de placenta, infertilidad y disminución en la producción de leche. En los machos causa epididimitis y orquitis o atrofia testicular. La transmisión de animal a animal ocurre por consumo del feto abortado. La transmisión de animal a humano se da por exposición a los animales infectados con *B. abortus* y por consumo de leche y derivados lácteos contaminados con la bacteria. El personal de fincas y mataderos, así como el personal de laboratorios que manipulan muestras contaminadas, puede contraer la enfermedad al exponerse a la bacteria durante la realización de sus labores, por lo que la brucelosis en humanos se considera una enfermedad ocupacional. La brucelosis humana se conoce también con el nombre de “Fiebre de Malta” y presenta inicialmente una fase aguda que se caracteriza por síntomas inespecíficos como fiebre ondulante, fatiga, anorexia y postración, entre otros. En ausencia de tratamiento, estos síntomas pueden persistir por semanas o meses, de manera que la infección puede volverse crónica y evolucionar a complicaciones osteoarticulares, gastrointestinales, hepatobiliares, pulmonares, genitourinarias, cardiovasculares y neurológicas, entre otras consecuencias potencialmente mortales [1], [5].

### Brucelosis en Costa Rica: ¿por qué es pertinente la investigación en este tema?

En Costa Rica, se han reportado aislamientos de *B. abortus* en ganado bovino y en humanos, *B. suis* en cerdos, *B. canis* en perros, *B. neotomae* en humanos y *B. ceti* en delfines. Se considera que la brucelosis bovina está diseminada por todo el territorio y la brucelosis humana es endémica desde principios del siglo XX [6].

El primer caso de brucelosis humana en Costa Rica fue diagnosticado en 1940 por hemocultivo y seroaglutinación. Sin embargo, los primeros aislamientos en humanos datan de 1915 y se le atribuyen al Dr. Clodomiro Picado Twright, aunque dichos aislamientos no fueron formalmente identificados como *Brucella*, ya que en esa época aún no se conocía que la brucelosis animal se transmitía a los humanos [7].

El pasado 25 de julio 2018, el Gobierno de la República reformó el Reglamento para la Intervención de la Brucelosis Bovina, decreto N°-34858- MAG, para reforzar las medidas de control, con miras a mejorar el combate de la enfermedad y así lograr su erradicación. Dicho reglamento establece en su artículo 1 que “se declara la brucelosis bovina como una enfermedad de combate oficial obligatorio, bajo normativa, protocolos específicos y fiscalización del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) (...) en coordinación con otras instituciones públicas”. Por otro lado, el artículo 10 menciona que “el destino de los animales positivos será únicamente el sacrificio en un matadero oficialmente reconocido” y que además “no existirá ninguna responsabilidad indemnizatoria por parte del SENASA”. El artículo 20 indica que todo resultado positivo debe ser notificado de forma obligatoria a SENASA y el artículo 32 establece que “la venta de leche y sus derivados sólo será permitida si se demuestra que proviene de hatos en saneamiento o libres de Brucelosis”. El Programa Nacional de Brucelosis Bovina del SENASA tiene como objetivo controlar la enfermedad mediante el diagnóstico y eliminación de animales positivos para continuar con la fase de erradicación y declarar el país libre de brucelosis bovina [8]. En América Central, la prevalencia de brucelosis bovina oscila entre un 4% y 8%, con pérdidas económicas de aproximadamente US\$25 millones por año. Costa Rica no escapa de esta situación y posee las prevalencias más altas de la región [9].

Desde 1980, la Universidad Nacional (UNA) ha sido pionera en desarrollar investigaciones científicas con *B. abortus* a cargo del Dr. Edgardo Moreno. El Dr. Moreno realizó su doctorado

en la Universidad de Wisconsin, bajo la tutoría del Dr. David Berman, un experto en brucelosis e inmunología que fue uno de los responsables de erradicar la brucelosis en el estado de Wisconsin y en los Estados Unidos. Cuando el Dr. Moreno regresó al país trabajó en la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA y en el INCIENSA. Antes de su llegada, en Costa Rica se realizaba solamente diagnóstico serológico de la brucelosis. El Dr. Moreno realizó la primera identificación de aislamientos de *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* en Costa Rica y su primer proyecto de investigación científica consistió en estudiar las actividades biológicas y las características químicas del lipopolisacárido de *Brucella* (E. Moreno, comunicación personal).

Posteriormente, la UNA comenzó a realizar proyectos conjuntos con otros centros de investigación a nivel nacional e internacional. A nivel nacional destacan el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (UCR) y más recientemente el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Escuela de Biología del TEC, el cual incursionó en este tema hace una década. A nivel internacional destacan la Universidad de Navarra en España, el Centro de Inmunología de Marseille-Luminy en Francia, el Instituto Sanger de la Wellcome Trust (WTSI) en Inglaterra y la Universidad de Namur en Bélgica, entre otros.

Debido a que la enfermedad aún no ha sido erradicada y dada su importancia económica, aún sigue siendo pertinente desarrollar investigaciones científicas sobre brucelosis en Costa Rica.

## Proyectos de investigación desarrollados en el TEC en conjunto con la UNA y la UCR durante la última década

### Elaboración de un protocolo para la identificación de bacterias del género *Brucella* que representan un riesgo para la salud pública, veterinaria y la vigilancia epidemiológica en Costa Rica: 2009-2011

El género *Brucella* ha representado un reto desde el punto de vista taxonómico, debido a que las especies que lo conforman poseen alrededor de un 98% de identidad a nivel de secuencia de ADN. La principal característica que distingue a una especie de otra es la preferencia por su hospedero natural [10]. Sin embargo, para efectos clínicos y epidemiológicos, es necesario contar con una identificación precisa a nivel de género y especie, ya que dicha información orienta al personal de salud a tomar las medidas necesarias para controlar la infección, ya sea desde el punto de vista del tratamiento para el paciente, para la instauración de medidas sanitarias efectivas e incluso para prevenir la propagación de la enfermedad. El objetivo de este proyecto fue elaborar, estandarizar y validar un protocolo que permitiera identificar, a nivel de especie, bacterias de este género en nuestro país. El protocolo de identificación generado permitió identificar, como *B. abortus*, *B. canis* y *B. ceti*, aislamientos de *Brucella* existentes en las universidades públicas. Los aislamientos de *B. ceti* provenían del Pacífico costarricense y representaron un nuevo genotipo a nivel mundial que no se había reportado antes [11]. El protocolo de identificación fue transferido a SENASA. Este proyecto generó dos Trabajos Finales de Graduación para optar por el grado de Bachillerato Universitario en Ingeniería en Biotecnología del ITCR, una Tesis de Licenciatura en Microbiología, Parasitología y Química Clínica de la UCR; tres Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria de la UNA, una Tesis de Maestría Académica en Enfermedades Tropicales de la UNA y cuatro publicaciones en revistas indexadas. Además, permitió crear y equipar el Laboratorio de Bacteriología del CIB. Como parte de este proyecto de investigación, también se organizaron talleres dirigidos a profesionales de la salud, líderes comunales y autoridades locales para capacitarlos en el diagnóstico de la enfermedad y el adecuado manejo de los encallamientos de cetáceos en el país. Se realizaron dos talleres, uno en el Refugio de Vida Silvestre en Playa Dominical y otro en

el Hospital Monseñor Sanabria, en Puntarenas. Para lograr una mayor participación, se coordinó con los responsables del Refugio de Vida Silvestre, con la Fundación Keto y con el encargado de Salud Ambiental del Hospital Monseñor Sanabria. Además, se elaboró material divulgativo y se publicó un artículo en Investigatec [12] y otro en Tecnología en Marcha [13].

#### **Estudio de la regulación de genes implicados en la virulencia, estructura e inmunogenicidad de *Brucella abortus*: 2012-2013**

Este proyecto contó con financiamiento de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del TEC. El objetivo general fue estudiar la regulación de genes implicados en la virulencia, estructura e inmunogenicidad de la bacteria *B. abortus*, con el fin de contribuir al entendimiento del proceso de invasión y vida intracelular de la bacteria. La virulencia de *Brucella* spp., radica en su habilidad para sobrevivir y replicarse dentro de las células infectadas [14]. Por lo tanto, una caracterización más profunda de las interacciones entre los factores de transcripción de la bacteria y los genes esenciales para su virulencia, estructura e inmunogenicidad, podría contribuir a contar con mejores herramientas terapéuticas y preventivas [15]. Los resultados son parte de la tesis doctoral de la autora y serán publicados próximamente en una revista indexada. Además, se escribió un artículo divulgativo en Investigatec [16] y un artículo de revisión en Tecnología en Marcha [5].

#### **Terapia génica para el tratamiento de las enfermedades infecciosas: 2013-2014**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades infecciosas son la segunda causa de muerte a nivel mundial [17]. Sin embargo, el combate de las mismas se ha retrasado por la aparición de cepas de microorganismos resistentes a los antibióticos [18]. La OMS reconoce esta situación como un problema de salud pública y ha dictaminado pautas generales a seguir para evitar la propagación y aparición de nuevos microorganismos resistentes [19]. El proyecto “Terapia génica para el tratamiento de las enfermedades infecciosas” pretendió desarrollar, a manera de prueba de concepto, un modelo de terapia génica para el tratamiento de enfermedades infecciosas como una alternativa al uso de antibióticos. Para ello se utilizó como modelo microbiano *B. abortus*, ya que para esta bacteria se conocían con cierto detalle los mecanismos de regulación génica de la virulencia, por lo que se diseñaron moléculas capaces de interrumpir la expresión de genes de virulencia, mediante competencia con las moléculas reguladoras. Para el transporte de estas moléculas dentro de la bacteria, se diseñaron oligonucleótidos mutados y se generaron nanopartículas de sílica mesoporosa en suficiente cantidad para acoplar los oligonucleótidos mutados. Este proyecto generó nueve ponencias en congresos y simposios a nivel nacional e internacional; una estancia corta de investigación en la Universidad de Madrid, España; dos Trabajos Finales de Graduación de Ingeniería en Biotecnología; una tesis de Licenciatura en Microbiología; Parasitología y Química Clínica de la UCR, una tesis de Maestría Académica en Microbiología de la UCR y un artículo divulgativo en la revista Investigatec [20].

#### **Mecanismos moleculares de adaptación a la vida intracelular de *Brucella abortus*: 2014-2015**

Como se mencionó, la virulencia de *Brucella* spp., radica en su habilidad para sobrevivir y replicarse dentro de las células infectadas, para lo cual resultan fundamentales el sistema de dos componentes (TCS) BvrR/BvrS y el sistema de secreción de tipo IV (T4SS) VirB. Las bacterias con mutaciones en el primero son muy atenuadas pues no logran entrar ni transitar dentro de la célula hospedera; mientras que las bacterias con mutaciones en el segundo no pueden llegar al nicho replicativo de *Brucella* spp., que es el retículo endoplásmico. En este proyecto se estudiaron los eventos moleculares que tienen lugar en las bacterias durante las primeras horas de la infección y se encontró que, *in vitro*, el TCS BvrR/BvrS regula transcripcionalmente el T4SS

VirB y su regulador positivo VjbR. Se confirmó que el TCS BvrR/BvrS es un regulador maestro que detecta el cambio de medio ambiente desde el medio extracelular hasta el interior de la célula hospedera. Este evento culmina con la activación por fosforilación del TCS BvrR/BvrS. Seguidamente aumenta la expresión de VirB, lo cual se acompaña de la secreción de efectores que modulan el tráfico intracelular de las bacterias. También se determinó que las señales que activan al TCS BvrR/BvrS son la limitación de nutrientes y la acidificación. Adicionalmente se demostró que una vez activado, BvrR forma un homodímero que es el que funcionalmente se une a las secuencias promotoras para regular la expresión génica [21]. Este proyecto generó una tesis de Licenciatura en Microbiología, Parasitología y Química Clínica, dos ponencias en congresos internacionales, dos artículos científicos en revistas indexadas y un artículo de divulgación en la revista Investigatec [22].

### Regulación transcripcional de la virulencia de *Brucella abortus*: 2016-2017

Como se mencionó el TCS BvrR/BvrS es fundamental para el ciclo de vida intracelular *Brucella* spp., ya que controla factores asociados con el tránsito de la bacteria hacia el retículo endoplásmico de la célula eucariota que parasita. A pesar de que se conocían algunos de los genes regulados por BvrR/BvrS, como por ejemplo *omp25*, *vjbR* y *virB*, era necesario descifrar todo el regulón asociado al mismo con el fin de comprender mejor como controla eventos tan importantes para la patogénesis de la brucelosis. El proyecto permitió conocer en detalle el panorama transcripcional controlado por BvrR/BvrS, mediante la técnica de ChIP-seq, para lo cual se procedió a inmunoprecipitar y secuenciar el ADN unido a BvrR. El análisis bioestadístico y bioinformático de los datos de secuenciación, permitió conocer la globalidad de los genes regulados por BvrR y así mismo realizar una comparación bioinformática con los regulones recientemente reportados para CtrA y VjbR [23], [24]. El primero es un regulador global de *Brucella* spp., que controla el ciclo celular y parece tener cierta intersección con BvrR, sobretodo con respecto a proteínas de membrana externa. El segundo es otro regulador transcripcional de *Brucella* spp., que es importante para el tránsito intracelular. Por último, se verificó por métodos bioquímicos que BvrR se une a las secuencias promotoras de algunos de los genes identificados por bioinformática. Este proyecto generó una ponencia en un congreso internacional, un trabajo final de graduación de Ingeniería en Biotecnología, una tesis de Licenciatura en Microbiología, Parasitología y Química Clínica; dos tesis de Maestría Académica en Microbiología; diez artículos científicos publicados en revistas indexadas y un artículo divulgativo publicado en Investigatec [25].

### Descifrando la especificidad de hospedero: el caso de las bacterias del género *Brucella*: 2018-2019

Como se mencionó, las especies que conforman el género *Brucella* son muy específicas de hospedero pero muestran gran similitud genómica entre sí. La mayoría de estudios genómicos en *Brucella* se enfocan en las semejanzas de los organismos analizados. Sin embargo, dado que los genomas de *Brucella* presentan más de un 96% de similitud [26], la explicación de la especificidad de hospedero y su variación en virulencia debe encontrarse en ese ~4% de discrepancia. El proyecto es novedoso pues se enfoca en diferencias y no en similitudes. Ante la homogeneidad que presentan las especies de *Brucella*, se requiere el uso de herramientas de alto poder de resolución para la detección de variaciones. Este es el caso de las técnicas de secuenciación de ADN de nueva generación. El proyecto pretende que, con el análisis genómico de diversas especies de *Brucella*, provenientes de distintos hospederos y de distintos sitios anatómicos de un mismo hospedero se contribuya a establecer si la presencia de SNPs, pseudogenes, regiones repetitivas, entre otros, son importantes en la adaptación de *Brucella* a su hospedero. Al finalizar el proyecto se espera también la conclusión de al menos dos tesis doctorales, incluyendo la de la autora.

## Conclusión

Costa Rica ocupa el quinto lugar a nivel mundial de todas las publicaciones que se han hecho en brucelosis desde 1950 [27], por encima de países como Argentina, Australia, Bélgica y Alemania, entre otros. Además, el país ocupa el segundo lugar en publicaciones clásicas de brucelosis más leídas, lo cual en palabras del Dr. Moreno “es un gran logro para un país tan pequeño” (E. Moreno, comunicación personal). En la última década, los distintos proyectos mencionados han permitido que el CIB forme parte de un grupo de investigación multidisciplinario e interuniversitario muy fuerte que trabaja en temas de vanguardia en el campo de la brucelosis, por lo cual a futuro las perspectivas de continuar trabajando en este tema son muy alentadoras.

## Referencias

- [1] M. J. Corbel, *Brucellosis in Humans and Animals*. 2006.
- [2] World Health Organization, “No title,” *Seven Neglected Endemic Zoonoses—some Basic Facts*, 2014.
- [3] G. Pappas *et al*, “The new global map of human brucellosis,” *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 6, (2), pp. 91-99, 2006.
- [4] S. Al Dahouk *et al*, “*Brucella* spp. of amphibians comprise genomically diverse motile strains competent for replication in macrophages and survival in mammalian hosts,” *Scientific Reports*, vol. 7, pp. 44420, 2017.
- [5] O. Rivas-Solano, “*Brucella abortus*: patogénesis y regulación génica de la virulencia,” *Revista Tecnología En Marcha*, vol. 28, (2), pp. 73, 2015.
- [6] G. Hernández-Mora *et al*, “Brucellosis in mammals of Costa Rica: an epidemiological survey,” *PloS One*, vol. 12, (8), pp. e0182644, 2017.
- [7] J. Zeledón-Alvarado, “Primera historia clínica de brucelosis humana en Costa Rica,” *Rev. Med.*, vol. 72, pp. 153-167, 1940.
- [8] J.C. Jiménez, “FICHA PROGRAMA NACIONAL DE BRUCELOSIS BOVINA,” 2009.
- [9] E. Moreno, “Brucellosis in central America,” *Vet. Microbiol.*, vol. 90, (1-4), pp. 31-38, 2002.
- [10] E. Moreno, A. Cloeckart and I. Moriyón, “*Brucella* evolution and taxonomy,” *Vet. Microbiol.*, vol. 90, (1-4), pp. 209-227, 2002.
- [11] G. Hernández-Mora *et al*, “Epidemiology of bovine brucellosis in Costa Rica: Lessons learned from failures in the control of the disease,” *PloS One*, vol. 12, (8), pp. e0182380, 2017.
- [12] C. Zúñiga-Vega and O. Rivas-Solano, “Buscan atender problemática asociada al encallamiento de cetáceos y su relación con la brucelosis marina,” 2015.
- [13] O. Rivas-Solano and C. Zúñiga-Vega, “Posible impacto en la salud pública del encallamiento de cetáceos en Costa Rica,” *Revista Tecnología En Marcha*, vol. 26, (2), pp. 40, 2013.
- [14] R. Sieira *et al*, “Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* *virB* operon,” *Mol. Microbiol.*, vol. 54, (3), pp. 808-822, 2004.
- [15] C. Viadas *et al*, “Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system” . *PLoS One*, vol. 5, (4), pp.1-8, 2010.
- [16] O. Rivas-Solano, “Proyecto de investigación básica genera conocimiento sobre virulencia de *Brucella abortus*,” 2015.
- [17] World Health Organization, “ *The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance: Options for Action: Executive Summary*, 2012.
- [18] S. Qazi *et al*, “Global action plan for the prevention and control of pneumonia (GAPP): Report of an informal consultation: La Mainaz, Gex, France, 5-7 March 2007,” 2008.
- [19] World Health Organization, “ *WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*, 2001.
- [20] O. Rivas-Solano, “Proyecto exploró opciones de terapia génica para el tratamiento de enfermedades infecciosas,” 2017.
- [21] P. Altamirano-Silva *et al*, “*Brucella abortus* senses the intracellular environment through the two-component system BvrR/BvrS allowing the adaptation to its replicative niche,” *Infect. Immun.*, pp. 17, 2018.



- [22] O. Rivas-Solano, "Proyecto interdisciplinario de investigación genera conocimiento sobre los mecanismos de adaptación a la vida intracelular de *Brucella abortus*," 2018.
- [23] N. Francis *et al*, "CtrA controls cell division and outer membrane composition of the pathogen *Brucella abortus*," *Mol. Microbiol.*, vol. 103, (5), pp. 780-797, 2017.
- [24] C. L. Kleinman *et al*, "ChIP-seq analysis of the LuxR-type regulator VjbR reveals novel insights into the *Brucella* virulence gene expression network," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, (10), pp. 5757-5769, 2017.
- [25] O. Rivas-Solano, "Proyecto de investigación genera conocimiento sobre la regulación transcripcional de la virulencia en el patógeno zoonótico *Brucella abortus*," 2018.
- [26] J. VERGER *et al*, "*Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 35, (3), pp. 292-295, 1985.
- [27] F. G. Bakri, H. M. AlQadiri and M. H. Adwan, "The Highest Cited Papers in Brucellosis: Identification Using Two Databases and Review of the Papers' Major Findings," *BioMed Research International*, vol. 2018, 2018.