

11661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

IDENTIFICACIÓN DE *Brucella canis* POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN MUESTRAS CLÍNICAS DE PERROS

P R E S E N T A:
M.V.Z. ROBERTO RESENDIZ MARTINEZ
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
ÁREA MICROBIOLOGIA

A S E S O R E S:

DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO
M. en C. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO

282311



V N A M

MÉXICO

2000.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ASUNTO. VOTOS APROBATORIOS.

BIOL. FRANCISCO INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION DE POSGRADO
DE LA DIRECCION GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
Presente

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que el alumno RESENDIZ MARTINEZ ROBERTO, con No. de Cta. 7334410-2 y No de Exp. 100941007 de quien consideramos ha cumplido con todos los requisitos de las actividades en el plan de estudios (481), por lo cual no encontramos inconveniente alguno para que proceda a presentar examen de grado de Maestría en Microbiología, con la tesis titulada "Identificación de Brucella canis por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en muestras clínicas de perros" Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

_____ a _____ de _____ de _____

NOMBRE DE LOS SINODALES

PRESIDENTE: DR ABEL CIPRIAN CARRASCO Abel Carrasco

VOCAL: DRA AHIDE LOPEZ MERINO Ahide Lopez Merino

SECRETARIO: DR FRANCISCO SUAREZ GUEMES Francisco Suarez Gumes

PRIMER SUPLENTE: DR EFREN DIAZ APARICIO Efren Diaz Aparicio

SEGUNDO SUPLENTE: MC GUILLERMO VALDIVIA ANDA Guillermo Valdivia Anda

Realización del trabajo

Este trabajo se realizó en el Laboratorio del CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR, Proyecto de Brucelosis. Con el apoyo del Dr. Efrén Díaz Aparicio.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial al Dr. Efren Díaz Aparicio por todo el apoyo brindado para que esta tesis concluyera.

Al Honorable jurado, por su loable labor y dedicación para la revisión de este trabajo.

A la M.C. Beatriz Arellano Reynoso por su invaluable apoyo y disposición brindada durante este trabajo y por su amistad.

A la M.C. Laura Hernández Andrade por su apoyo y colaboración para la realización de esta investigación.

A la M.C. Laura Jaramillo y al M.C. Raúl Segura por sus consejos y el apoyo incondicional.

Al Dr. Víctor Tenorio Gutiérrez por los consejos brindados en esta investigación.

Al Lic. Jorge Chávez Ramírez por el invaluable apoyo brindado y por su sincera amistad.

Al Dr. Rafael Campos Enríquez, agradezco infinitamente, su apoyo y paciencia en la culminación de esta tesis.

Al CENID-Proyecto Brucelosis-INIFAP-SAGAR, Palo Alto, México, D.F. Por permitirme trabajar este proyecto de investigación.

A todas las personas y amigos que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

A EVA KEYLA

Mi esposa por todos estos momentos que hemos compartidos juntos, por el apoyo brindado durante este y todos los tiempos, por todo lo que representas para mi y por tu amor, gracias.

A MIS HIJOS

Areli Jaén y Roberto Arturo, con todo mi amor, por ser el estímulo constante en mi vida, por ser la alegría presente todos los días y por todo lo que representan en mi vida, gracias.

A IVAN, A LA SRA. CARMEN Y AL SR. ARTURO

Por todo el apoyo que me han brindado, comparto hoy esta alegría con ustedes. Gracias.

Resumen

Roberto Reséndiz Martínez. **IDENTIFICACION DE *Brucella canis* POR MEDIO DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN MUESTRAS CLINICAS DE PERROS.** Bajo la dirección de Efrén Díaz Aparicio y Beatriz Arellano Reynoso

El objetivo del presente trabajo fue la identificación del ADN de *Brucella canis* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de tejidos. En este estudio se realizó un muestreo de 170 perros, en donde se encontraron 12 cánidos serológicamente positivos a brucelosis, seguidamente se colectaron los testículos y el bazo de estos animales de estudio. Se realizó el método Fenol-CTAB de extracción de ADN y posteriormente se implementaron dos metodologías de PCR con dos juegos de iniciadores, los cuales fueron diseñados a partir del gen *omp2* de *Brucella abortus*. Estas metodologías fueron: PCR 1, con un juego de iniciadores que amplifica un fragmento de 440 pb y PCR 2, con un juego de iniciadores que amplifica un fragmento de 193 pb. La estandarización de la amplificación del PCR anidado se realizó a partir de las diluciones de una suspensión de *Brucella canis*, en donde la cantidad de bacteria mínima que se amplificó fue hasta de 10×10^8 UFC/ml, amplificando el ADN del fragmento 193 pb. De las 24 muestras clínicas de tejidos, se observó que 6 testículos y 6 bazos de los animales de estudio, mostraron claramente la amplificación del PCR anidado del fragmento 193 pb del ADN de *Brucella canis*. Se trabajó con muestras de tres perros testigos positivos con *Brucella canis* y dos cuyes, que fueron inoculados con 1×10^8 UFC/ml, que sirvieron como testigos positivos, en donde se observa la amplificación al PCR anidado del ADN del fragmento 193, de 5 bazos y de 4 testículos, no amplificando el testículo del cuye 2.

En lo referente a la especificidad en los resultados obtenidos se observó que *Pasteurella haemolytica* y *Brucella melitensis*, amplificaron el ADN del fragmento 193 pb, al igual que la *Brucella canis*. Siendo negativas las bacterias *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Yersinia enterocolitica* 0:8, *Shigella boydii*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Rhizobium leguminosarum* y *Pasteurella multocida*. Respecto al estudio bacteriológico, los resultados obtenidos fueron negativos, lo mismo sucedió para los tejidos de los testigos serológicamente positivos. Por lo que la sensibilidad obtenida para PCR fue de 50% y la especificidad de 50%, sin embargo estos resultados no fueron satisfactorios, tomando en consideración que lo aceptable para una prueba diagnóstica debe ser mayor al 80%. No hay un comparativo para analizar concordancia de la técnica de PCR, debido a que la bacteriología fue negativa. Estos resultados indican que la sensibilidad del PCR anidado propuesto para *Brucella canis*, es el adecuado; sin embargo, se deben de realizar más investigaciones en este campo, para hacer las modificaciones pertinentes para mejorar la sensibilidad y la especificidad de la técnica de PCR, en las muestras clínicas de perros enfermos y de esta forma implementar al PCR como una técnica diagnóstica para *Brucella canis*.

Summary

Roberto Reséndiz Martínez IDENTIFICACION OF *Brucella canis* THROUGH THE POLIMERASA CHAIN REACTION IN CLINICAL DOG SAMPLES.

Under the direction of Efrén Díaz Aparicio and Beatriz Arellano Reynoso.

The objective of the present project was to identify the DNA of *Brucella canis* through the polimerasa chain reaction from tissues. In this study 170 dogs were used in the sample, in which 12 were found to be serologically positive for brucellosis and straight afterwards the testicles and spleen from these animals were collected. The Fenol-CTAB method of DNA extraction was used and then two PCR methodologies were implemented with two sets of initiators, which were designed beginning with the Omp2 gene from *Brucella abortus*. These methods were: PCR 1, with a set of initiators which amplify a fragment of 193 pb. The standardization of the amplification of PCR took place beginning with dilutions of a *Brucella canis* suspension, in which the minimum quantity of bacteria amplified was up to 10×10^8 UFC/ml amplifying the DNA of the fragment 193 pb.

Of the 24 clinical tissues samples, it was observed that 6 testicles and 6 spleens from the animals under study, clearly showed the amplification of the PCR of the fragment 193 pb of the *Brucella canis* ADN.

Two samples from three dogs who tested positive for *Brucella canis* and two cuyes, who were inoculated with 1×10^8 UFC/ml to serve as positive examples, were used, in which the amplification to the fragment 193 pb ADN was observed. Of five spleens and 4 testicles, the testicle of the second cuye was not amplified.

With reference to the specific results obtained, it was observed that *Pasteurella haemolytica* and *Brucella melitensis* amplified the ADN of the fragment 193 pb, as with *Brucella canis*. The bacterias *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Yersinia enterocolitica* 0:8, *Shigella boydi*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Rhizobium leguminosarum* and *Pasteurella multocida* were negative. With reference to the bacteriological study, the results obtained were negative, the same thing occurring for the tissues of the serologically positive samples. The sensitivity and specificity obtained for PCR was 50%, however these results were not satisfactory, taking into consideration that the acceptable level for a diagnostic test should be greater than 80%. There is no comparison to analyze the concordance of the PCR technique, owing to the fact that the bacteriology was negative.

These results indicate that the sensitivity of the PCR proposed for *Brucella canis*, is the adequate one; however, more research must be carried out in this field in order to make the necessary modifications to improve the sensitivity and specificity of the PCR technique, as used in the samples from sick dogs and in this way implement PCR as a diagnostic technique for *Brucella canis*.

Tabla de contenido

Realización del trabajo _____	I
Agradecimientos _____	II
Dedicatoria _____	III
Resumen _____	IV
Summary _____	V
Tabla de contenido _____	VI
Lista de abreviaturas y siglas utilizadas _____	IX
I.- Introducción _____	1
Biología del organismo _____	3
Genética molecular _____	4
Relación entre la virulencia in vivo y crecimiento dentro de los macrófagos _____	6
Diagnóstico de la Brucelosis _____	7
Utilización de la Técnica de PCR para el diagnóstico de Brucella _____	8
Técnica de Reacción en Cadena de la polimerasa _____	9
Justificación _____	12
Hipótesis _____	12
Objetivo General _____	13
Objetivos específicos _____	13
II.- Material y Métodos _____	14

Grupo de Animales	14
Grupo testigo	14
Estudio Bacteriológico	14
Estudio Serológico	16
Método de ruptura y extracción de ADN	16
Cuantificación de ADN	18
Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	19
a) Reacción 1 (PCR 1)	19
b) Reacción 2 (PCR 2)	20
Evaluación del producto amplificado	21
Preparación del gel de agarosa	21
Análisis Estadístico	22
VARIABLES DE ESTUDIO	23
III.- Resultados	24
Estudio Serológico	24
Estudio Bacteriológico	24
Conteo de UFC/ml	24
Resultados de los ensayos de PCR realizados con ADN de tejidos de cuye y perro	25
Análisis estadístico	26
Prueba estadística	26
IV.- Discusión	36
Conclusiones	41
V.- Apéndices	43

Lista de abreviaturas y siglas utilizadas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
LPS	Lipopolisacarido
mpb	mega pares de bases
PARP	Prueba de aglutinación rápida en placa
PAT	Prueba de aglutinación en tubo
dNTP's	desoxinucleótidos
pb	pares de bases
UFC	Unidades formadoras de colonias
2-ME	2-mercaptoetanol
SSF	solución salina fisiológica
μl	microlitro
ng	nanogramos
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetil amonio
TBE	Tris-Borato-EDTA
cbp	Cuanto baste para
SDS	Dodecil sulfato de sodio
μM	micromoles

I.- INTRODUCCION

La brucelosis es una enfermedad infecciosa, de curso agudo o crónico, producida por bacterias del género *Brucella*, que afecta a varias especies de animales domésticos, silvestres y al hombre. Esta enfermedad es importante no solamente desde el punto de vista médico, sino por las graves pérdidas económicas que causa a la industria ganadera. Esta infección constituye un problema de carácter mundial, cuya importancia ha ido imponiéndose a pesar del lamentable descuido que se le ha tenido en muchos países (Acha y cols, 1977; Ruiz, 1986). La enfermedad en México continúa siendo uno de los problemas zoonosarios que mayormente impactan a la economía nacional y a la salud pública. Los primeros estudios que reportan la infección por *Brucella canis* fueron publicados por Flores en 1975, en donde reporta de un total de 500 muestras de perros callejeros el 28% de seropositividad, el aislamiento de *Brucella canis* en 8 casos y encontró de un total de 203 sueros humanos, 27 (13.3%) seropositivos a *Brucella canis* (Flores y Segura, 1975).

Considerada una de las principales zoonosis, que se puede transmitir directa o indirectamente. *Brucella canis* es el agente etiológico del aborto contagioso en los perros y fue aislada por primera vez por Carmichael en 1968 en perros de la raza Beagle en Estados Unidos. La bacteria se ha reportado mundialmente; sin embargo, las tasas de prevalencia son muy variables. La enfermedad causa grandes problemas en criaderos. En países donde se permite el deambular de perros callejeros la incidencia puede ser alta.

El perro es la única especie animal conocida que puede ser infectada naturalmente por *B. canis*.

Existen dos clasificaciones dentro del género de las brucelas: Tipo liso que comprende a *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* y de tipo rugoso como son *B. ovis* y *B. canis*. (Gillespie y Timoney, 1983).

La brucelosis canina es producida por *B. canis* la cual se caracteriza por producir epididimitis en los machos y abortos en las hembras en el último tercio de la gestación (Carmichael, 1991).

La transmisión de la bacteria puede ser de tipo vertical (trasplacentaria o lactancial) y horizontal por medio de secreciones vaginales, seminales, orina y fomites. (Gillespie y Timoney, 1983).

Los perros son los principales huéspedes de *B. canis*. En un principio se creyó que solo afectaba a la raza Beagle, pero actualmente se ha reconocido que afecta a la todas las razas, de cualquier edad y sexo (Ghoneim y Woods, 1984). La infección se adquiere a través de la mucosa conjuntival, oral, faríngea, tracto genital y en forma congénita (Swenson y cols, 1972).

Por otro lado se menciona que las infecciones por vía oral son del 90% (Carmichael, 1991). El hombre adquiere la enfermedad a partir de perros infectados o en accidentes de laboratorio, siendo las vías de infección similares a las del perro (Swenson y cols, 1972).

Una vez que *B. canis* entra al cuerpo, se localiza y se multiplica dentro de los neutrófilos y macrófagos. Esta localización intracelular del organismo resulta en una incapacidad del sistema inmune para eliminar a la bacteria y ofrecer resistencia a la terapia convencional con antibióticos. Una bacteremia ocurre de 1 a 4 semanas después de la infección con el organismo y puede persistir por un período largo de 3 años. Durante este estado de la enfermedad el organismo se disemina por todo el cuerpo, alojándose en los ganglios linfáticos, bazo, útero, glándula mamaria, hígado, testículo, próstata, vesículas seminales y médula ósea (Johnson y cols, 1983; Carmichael y Kenney, 1970)

Los signos clínicos de la enfermedad son poco comunes, a veces son inaparentes. Cuando se hacen presentes, en el macho hay orquitis, epididimitis y atrofia testicular en infecciones crónicas infectados raramente, los machos pueden mostrar signos de incomodidad durante la eyaculación (Carmichael y Kenney, 1970; Alonso y Flores, 1995; Gillespie y Timoney, 1983). En ambos sexos hay lesiones en articulaciones, inflamación de nódulos linfáticos, retrofaríngeos y inguinales, pudiendo llegar a producir infertilidad en etapas reproductivas. Un perro ocasionalmente puede desarrollar fiebre y linfadenopatía. Algunos dueños han reportado cambios en la cubierta del pelo, una disminución del vigor, o una disminución de la tolerancia al ejercicio. Los signos clínicos obvios usualmente tienen que ver con desordenes reproductivos en animales sexualmente maduros. En la hembra se presenta aborto de los 40 a 45 días de gestación, no habiendo respuesta febril. Frecuentemente los fetos no son detectados porque las perras han ingerido a los fetos muertos, por lo que pueden ser sospechosas cuando una perra falla en la concepción después de una sucesiva época de celo y obvia gestación. Otra alteración poco común asociada con la infección de *B. canis* incluye la discoespondilitis, la cual ocurre cuando la bacteria se localiza en la circulación arterial del espacio intervertebral. La discoespondilitis puede resultar en dolor espinal y ataxia (Ghoneim y Woods, 1984).

Uveitis anterior, glomerulonefritis, y meningoencefalitis puede resultar de la deposición o filtración de la bacteria en los tejidos afectados. Uveitis anterior puede causar dolor, fotofobia, blefarospasmo, inyección esclerótica, miosis y destellos acuosos (Greene y George, 1984)

Además se pueden presentar lesiones articulares, inflamación de ganglios linfáticos retrofaríngeos, inguinales e infertilidad en etapa reproductiva, esto es en ambos sexos. No hay respuesta febril (Carmichael y Kenney, 1970). La bacteria se elimina durante el aborto, pudiéndose encontrar una gran cantidad de microorganismos en el feto, así como en subsecuentes descargas vaginales, persistiendo de 4 a 6 semanas post-parto. En los machos infectados, la orina y el semen son fuente de infección, alojándose el agente en las vías genitales y excretándose en forma intermitente (Flores, 1975; Carmichael y Kenney, 1970; Johnson, 1990)

Biología del organismo

Brucella es una bacteria cocobacilar gram negativa, aerobia, catalasa, oxidasa y ureasa positiva, algunas especies requieren de CO₂ para su desarrollo, especialmente en aislamiento primario. *B. canis* no requiere de CO₂ para su crecimiento y no produce H₂S. Su crecimiento es inhibido por fucsina básica pero no por tionina en concentraciones estándar. Es conveniente que los medios de cultivo tengan un pH de 7.4 para disminuir el desarrollo de colonias mucoides, sobre todo si se quiere utilizar las bacterias en la preparación de antígenos. *Brucella canis* se desarrolla bien tanto en medios líquidos como sólidos entre 48 y 72 hrs en condiciones de aerobiosis, sin embargo es importante considerar que después de 48 hrs de incubación las colonias se pueden convertir en mucoides, sobre todo si el pH está por debajo de 6.8 aunque *B. canis* es una bacteria rugosa, morfológicamente no muestra diferencias con las brucelas lisas. Se desarrolla entre 20-40°C, pero su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C (Corbel y cols, 1984; Moyer y Hausler, 1991; Carmichael & Bruner, 1968).

Brucella canis se clasifica como rugosa por carecer de una cadena "O" similar a la presentada por las brucelas lisas, la cual forma parte del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa (Carmichael & Bruner, 1968).

Numerosos componentes antigénicos de *Brucella* han sido caracterizados. Sin embargo, el antígeno que domina la respuesta humoral es el lipopolisacárido (LPS). En cepas de fase lisa (S), el S-LPS está constituido del lípido A (conteniendo dos tipos de aminoglucosas); distintos ácidos grasos (excluyendo al ácido B-hidroximirístico); la región del núcleo contiene glucosa, manosa, y quinovosamina; y una cadena O formada de un homopolímero de 4-formamido-4,6-didesoximano (unidas predominantemente [alfa]-1,2 en cepas epitope A dominante, el quinto residuo ligadura [alfa]-1,3 en cepas dominantes M) (Perry y Bundle, 1990).

La estructura más característica de las bacterias gram negativas es su envoltura celular, formada por una membrana citoplasmática, una membrana externa y un espacio periplasmático intermedio. Este último contiene enzimas, entre ellos muchos que detoxifican agentes nocivos procedentes del medio, proteínas relacionadas con el transporte de nutrientes, varias de las enzimas sobre las que actúan los antibióticos β-lactámicos y, como componente estructuralmente más importante, un gel glucopeptídico (mureína o peptidoglicano) responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. La membrana externa contiene, distribuidos asimétricamente, fosfolípidos y un lipopolisacárido (LPS), actuando como una barrera de permeabilidad frente a muchos solutos hidrofílicos e hidrofóbicos (Moriyón y López-Goñi, 1998). La membrana externa de *Brucella* es diferente de la de los Gram negativos típicos (*Enterobacterias* y *Pseudomonas*). En primer lugar, es relativamente permeable a agentes hidrófobos como los colorantes, detergentes y sales biliares, con diferencias entre especies y biotipos que se reflejan en las técnicas bacteriológicas de tipificación. En segundo lugar, es resistente a los péptidos catiónicos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales (lisozoma, lactoferrina, defensinas) y a otros policationes bactericidas como la polimixina B.

El LPS es una molécula que se encuentra expuesta hacia el exterior de la membrana externa, orientación que facilita la inducción de anticuerpos dirigidos contra el antígeno "O" y el oligosacárido central, que son de gran valor diagnóstico de la brucelosis y en la identificación serológica de las especies de *Brucella* (Moriyón y López-Goñi, 1998; López y cols, 1991).

Bacterias Gram negativas dan reacciones cruzadas con las brucelas lisas al nivel de la cadena O, siendo la más notable *Yersinia enterocolitica* 0:9, que posee una cadena O químicamente idéntica a la de tipo A (*abortus*). Otras bacterias Gram negativas que dan reacción cruzada con el LPS-S de *Brucella* al nivel de la cadena O son *Salmonella* grupo N (0:30), *Vibrio cholerae*, *Escherichia hermannii*, *E. Coli* 0157, un Gram negativo clasificado como *Xanthomonas maltophilia* y *Francisella tularensis*. Para la mayoría se ha demostrado que la reacción cruzada con el LPS-S de *Brucella* es debida a la presencia de derivados de la perosamina en la cadena O (Riezu-Boj y cols, 1990).

El análisis del ácido nucleico de 16S del ribosoma (16S rRNA), la composición lipídica y ciertos aspectos de su fisiología y biología general sitúan a *Brucella* dentro de la subdivisión $\alpha 2$ de la Clase *Proteobacteria*, en la que están también otros patógenos intracelulares animales (*Rickettsia*), así como destacados patógenos y endosimbiontes de vegetales (*Agrobacterium* y *Rhizobium*), las propias mitocondrias y ciertas bacterias de la tierra. Por lo tanto, parece que la asociación intracelular con eucariotas es una tendencia compartida con otros miembros de la subdivisión $\alpha 2$. Esto es coherente con ciertas hipótesis sobre la patogenicidad y explica las reacciones cruzadas con proteínas de otros miembros de la subdivisión $\alpha 2$ en pruebas serológicas y moleculares (Cieslak y cols, 1992; Rielman y cols, 1992; Moriyón y López-Goñi, 1998).

Las cepas que se encuentran en la fase rugosa en general son menos virulentas para el hombre por lo que su tratamiento es menos problemático. El control de la infección recae fundamentalmente sobre los linfocitos T que de forma secuencial activan a los macrófagos y desencadenan una hipersensibilidad retardada frente a los antígenos proteicos. Este fenómeno puede ser el responsable de la formación de granulomas en un intento de evitar la diseminación de la infección. (Gazapo y cols, 1989)

Genética Molecular

Algunos aspectos de la genética molecular de *Brucella*, se han estudiado durante los últimos 10 años. El ADN de *Brucella* contiene un 58-59% de moléculas Guanina + Citocina y el tamaño del genoma se ha estimado en aproximadamente 3.2×10^6 pares de bases. Ese tamaño es menor que el de *Escherichia coli* (4.7×10^6 pares de bases).

Dos características genéticas de *Brucella* de especial importancia son primeramente la existencia de dos cromosomas circulares en la mayoría de las especies y biotipos (con un tamaño, en *B. melitensis*, de 2,100 kpb y 1,500 kpb).

En segundo lugar, la ausencia de plásmidos. La presencia de dos cromosomas posiblemente sea reflejo del origen evolutivo de *Brucella*, pues varios de sus parientes próximos poseen megaplásmidos que, por adquisición de genes esenciales generarían cromosomas auténticos. (De Ley y cols, 1987; Moriyón y López-Gofí, 1998)

Las distintas especies del género *Brucella* muestran más de un 95% de homología en el ADN, por la que se clasifica a la *Brucella* como un género monoespecífico (Verger y cols, 1985). Sin embargo, la nomenclatura propuesta por Verger y colegas, en la cual todas las especies deben ser consideradas como biovariedades de *B. melitensis*, no ha sido adoptada generalmente en la práctica.

Por esta razón se sigue usando la vieja nomenclatura siendo retenidas las antiguas especies llamadas *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *Brucella neotomae*, *B. ovis*, y *B. canis*. (Alton y cols, 1975; Corbel, 1997).

Aunado a esto, se reconocen 7 biovariedades para *B. abortus* (Amato, 1995; Ross y cols, 1994; Verger y cols, 1985; Corbel y Morgan, 1984; Corbel, 1991), tres para *B. melitensis* (Amato, 1995; Ross y cols, 1994; Ewalt y cols, 1994), y cinco para *B. suis* (Amato, 1995; Ross y cols, 1994; Verger y cols, 1985; Corbel y Morgan, 1984). Las otras especies no han sido diferenciadas en biovariedades, sin embargo las variantes existen. (Corbel y Thomas, 1985).

Los patrones de los fragmentos de restricción producidos por corte infrecuente de algunas endonucleasas proporcionan soporte para la diferenciación corriente de las especies de la nomenclatura (Allardet-Servent y cols, 1988).

El análisis de los fragmentos de restricción han sido generalmente un fracaso para tipificar cuando se aplica a todo un genoma (O'Hara y cols, 1985). Aunque la reacción en cadena de la polimerasa amplifica secuencias, seguida por el análisis de restricción que ha proporcionado evidencia de polimorfismo en un número de genes incluyendo al *omp 2*, *dnak*, *htr*, y *ery* (el gene erythrusolosa-1-fosfato dehidrogenasa) (Ficht y cols, 1989; Sangari y cols, 1994).

El gene *omp2* es taxonómicamente importante porque este determina la sensibilidad a los colorantes, uno de los métodos tradicionales de tipificación para la diferenciación de las biovariedades (Douglas y cols, 1984). Este polimorfismo y capacidad para la modificación postranslacional de su producto puede explicar la tendencia para la variación de los patrones de sensibilidad a los colorantes y poder ser usados como la base para la clasificación genética de *Brucella* (Ficht y cols, 1996; Cloeckaert y cols, 1995; Cloeckaert y cols, 1996).

El gene *dnak* de *B. melitensis* esta enclavado dentro de dos fragmentos cortados por endonucleasa Eco RV, donde los genes de todas las otras especies están produciendo un fragmento simple (Cloeckaert y cols, 1996).

El gene *ery* esta reportado que tiene una eliminación agotada de 7.2 kbp en la cepa 19 de *B. abortus* (Sangari y cols, 1994).

Por otro lado dos características genéticas de *Brucella* llaman especialmente la atención. En primer lugar, la existencia de dos cromosomas circulares en la mayoría de las especies y biotipos (con un tamaño en *Brucella melitensis*, de 2100 kpb y 1,150 kpb). En segundo lugar, la ausencia de plásmidos (Michaux y cols, 1993; Jumas-Bitlak y cols, 1995).

Los plásmidos naturales no han sido detectados en *Brucella*, sin embargo la transformación ha sido eficiente por el rango extenso del plásmido huésped después de transferir la conjugación o la electroporación (Rigby y Fraser, 1989).

Relación entre la virulencia *in vivo* y crecimiento dentro de los Macrófagos.

Los patógenos que han adquirido la capacidad de multiplicarse en el interior de los macrófagos deberían sintetizar productos que interactúen específicamente con el sistema de defensa de la célula hospedadora. La supervivencia de la *Brucella*, está estrechamente relacionada con los mecanismos de evasión de las defensas celulares. La brucelas pueden encontrarse en vacuolas limitadas por membranas llamadas fagosomas, pero aún no se comprende bien la naturaleza exacta y el mecanismo de formación de este compartimento.

Los macrófagos desempeñan un papel esencial en el desarrollo de la brucelosis; hay diferencias naturales entre las especies de *Brucella* en cuanto a la respuesta de los macrófagos a estas bacterias.

Brucella spp. Puede desarrollarse dentro de macrófagos o líneas celulares de macrófagos semejantes. Macrófagos de cuye son usados en estudios primarios para demostrar una correlación entre la virulencia de las cepas de *B. abortus* y su habilidad para sobrevivir en los macrófagos (Braun y cols, 1958).

Se ha establecido que las cepas rugosas de *B. abortus* son ingeridas por macrófagos de cuye más rápidamente que las cepas lisas, pero crecen más lentamente una vez que entran a la célula. Recientemente se ha mostrado que las especies de *Brucella* como *B. suis* y *B. melitensis*, son capaces de inducir infecciones crónicas en humanos, multiplicándose dentro de los macrófagos de humanos (Caron y cols, 1994).

Todo lo contrario, con las especies rugosas de *B. canis* y *B. ovis*, muy raramente producen una brucelosis humana, y no son capaces de multiplicarse dentro de las células humanas (Caron y cols, 1996). Los macrófagos peritoneales de ratón BALB/c eliminan intracelularmente a la cepa 19 de *B. abortus* mucho más efectivamente que la cepa 2308 de *Brucella abortus*. Similarmente, se ha demostrado con los macrófagos de bovino que las cepas virulentas de *B. abortus* han incrementado su supervivencia y los grados de crecimiento en macrófagos, se comparan con las cepas no-virulentas de mutantes rugosas (Harmon y cols, 1988).

Estudios sobre las interacciones entre macrófagos de la glándula mamaria y cepas rugosas y lisas de *B. abortus* sugieren que ambas cepas son rápidamente ingeridas solamente si ellas son opsonizadas con el complemento o anticuerpos específicos (Harmon y cols, 1988). Estudios realizados usando líneas celulares U937 de humano diferenciadas dentro de las líneas celulares de macrófagos revelan un muy bajo grado de ingestión (Caron y cols, 1994), incrementando después la opsonización con la IgG (Caron y cols, 1994). Aunque los fagocitos profesionales han ingerido *B. suis* muy pobremente opsonizado, recientemente se ha establecido que la citocalasina inhibe esta función, sugiriendo la participación de la polimerización de la actina en este proceso (Caron y cols, 1996).

DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS

El diagnóstico de la brucelosis en animales se basa en los signos clínicos de la enfermedad, pero los signos clínicos no son comúnmente adecuados, para el diagnóstico de la brucelosis canina. El diagnóstico es insidioso y puede excluir a muchas manifestaciones clínicas. Lo que se puede considerar para un diagnóstico diferencial es la historia del aborto en las hembras y una baja en la fertilidad. El único método que permite establecer un diagnóstico definitivo es el aislamiento y la identificación de las brucelas en cultivos o bien estudiando los anticuerpos específicos a *Brucella canis*.

El diagnóstico de *Brucella canis* se realiza también por métodos bacteriológicos, aislando el microorganismo a partir de sangre, secreciones vaginales, de útero, fetos abortados (pulmón, hígado y líquido estomacal), bazo, semen y testículos. (Vázquez, 1991).

Aunque el aislamiento de la bacteria puede resultar concluyente en la infección aguda, en los casos crónicos la persistencia en sangre es muy discreta y la investigación de portadores puede resultar infructuosa mediante estas técnicas. Por el contrario la seropositividad perdura durante varios meses después del cese de la bacteremia y pueden mantenerse títulos altos hasta por dos años en algunos casos, sobre la base de una fuerte estimulación linfocitaria y a la elevada producción de beta y gama globulinas (Alton y cols, 1988; Carmichael and Joubert, 1988; Carmichael, 1989)

El diagnóstico serológico basado en la respuesta humoral, goza de una mayor importancia por su sensibilidad, especificidad y rápida realización.

Las pruebas serológicas más comunes para el diagnóstico de la brucelosis canina son: la prueba rápida de aglutinación en placa (PRAP), aglutinación en tubo y la prueba modificada de aglutinación en placa con 2- β -mercaptoetanol (2- β -M) e inmunodifusión en agarosa, usando como antígenos bacterias completas teñidas con rosa de bengala y extractos de proteínas citoplasmáticas de *B. canis*. También en el serodiagnóstico se pueden usar otros métodos como fijación del complemento, contra inmunoelectroforesis, inmunofluorescencia indirecta e inmunoensayos enzimáticos (ELISA).

La adición de 2-mercaptoetanol a la PRAP puede eliminar algunos de los resultados falsos-positivos. Este procedimiento es recomendado para conocer los títulos de anticuerpos, considerando que títulos superiores a 1:200 son presuntivos de infección. Estas pruebas también son utilizadas en el diagnóstico de la brucelosis causada por cepas rugosas del género *Brucella* que afectan al humano y que no pueden ser diagnosticadas con antígenos lisos convencionales (Vázquez-Navarrete y cols, 1996; Carmichael, 1991)

Recientemente se han sugerido métodos moleculares rápidos como herramientas de diagnóstico que utilizan, el ácido desoxirribonucleico (ADN), de análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (FRLP) y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Herman, 1992; Leal y cols, 1992; O'Hara y cols, 1985; Romero y cols, 1995).

El ADN es un polímero circular, no ramificado, que puede contener muchos millones de nucleótidos dispuestos en una secuencia irregular, pero no aleatoria y la información genética esta contenida en el orden exacto de los nucleótidos, por esta razón es que el análisis de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) permite la identificación precisa de diferentes bacterias, aún tratándose de bacterias de la misma especie (Lehninger y cols, 1993).

Utilización de la Técnica de PCR para el diagnóstico de *Brucella*

La Microbiología molecular también ha entrado en el diagnóstico de esta infección. La literatura referente al PCR y *Brucella* de los dos últimos años presenta abundantes trabajos y ensayos. El PCR permite la detección específica de secuencias de ADN del microorganismo a partir de muy pequeñas cantidades del mismo.

La característica común de todos ellos es la sensibilidad que muestran para la detección de *Brucella* en diferentes muestras (sangre, médula, leche, orina, etc.). Igualmente los protocolos de extracción y las regiones dianas a amplificar son tan variadas que es difícil decir cual de ellas será la más adecuada. El PCR es empleado también para la determinación de la especie infectante y estudios epidemiológicos (Romero y cols, 1995; Leal-Klevezas y cols, 1995).

Se ha diseñado y perfeccionado un método basado en el PCR, que permite detectar la presencia conocida de *Brucella spp.* en muestras clínicas (Martínez-Soriano y cols, 1993).

En el caso del género *Brucella*, existen diferencias específicas de especie en la secuencia de ADN del gen *omp2* (Fitch y cols, 1996; Husseinen, 1993).

El locus *omp2* está compuesto de dos genes muy relacionados entre sí: *omp2a* y *omp2b*, que codifican para proteínas del tipo de porinas de 33 y 36 Kda, respectivamente. Los dos genes *omp2a* y *omp2b* comparten aproximadamente el 85% de homología de ADN. De esta forma, se han empleado estas diferencias para generar sondas específicas e iniciadores para PCR que se pueden utilizar para distinguir entre las diferentes especies de *Brucella* por medio de la hibridación con una región común en el gen *omp2a* seguido de su amplificación por medio de la técnica de PCR. Esta se basa en la variación del locus *omp2a* entre las especies y permite que el género *Brucella* se divida en dos grupos:

1. - El grupo de *B. abortus b5* y *B. melitensis*
2. - El grupo *B. canis*, *B. ovis*, *B. suis* y *B. neotomae*.

En una primera reacción de PCR con 3 diferentes iniciadores, *B. abortus* b5 y *B. melitensis* amplifican un producto de 940 pb, pero el grupo de *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. suis* producen un fragmento de 440 pb. Cada *Brucella* del grupo de *B. canis* y *B. suis* (amplifican un fragmento de 670 pb), *B. ovis* y *B. neotomae* se puede diferenciar en forma independiente por medio de una segunda reacción de PCR. *B. melitensis* y *B. abortus* requieren de un análisis por enzimas de restricción con Pst1 para diferenciarla entre sí. (Husseinen, 1993).

La reacción en cadena de la polimerasa permite la detección de secuencias de muestras de tejidos específicas del patógeno y debido a esto, es altamente efectiva para detectar directamente la presencia de la bacteria. Esta técnica es relativamente rápida y permite prescindir del uso de radioisótopos a diferencia de la detección por medio de sondas marcadas con radioactividad (Saiki y cols, 1988).

Técnica de Reacción en Cadena de la polimerasa

La técnica es un proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por el ADN polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 30 y 50) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso.

La técnica de PCR es un método específico para la amplificación enzimática de secuencias de ADN a partir de dos iniciadores que son complementarios a los extremos del segmento de ADN que se desea amplificar. La enzima Taq polimerasa, en presencia de iones de Mg^{++} extiende los iniciadores agregando nucleótidos, utilizando el ADN blanco como molde.

En general, los componentes, requeridos para un PCR son: ADN, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación; mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's); solución amortiguadora de la reacción; y Taq polimerasa que es un ADN polimerasa (Barrera y cols, 1993; Gibbs, 1991).

La técnica puede resumirse en tres importantes pasos:

Desnaturalización del ADN, alineamiento y extensión. La desnaturalización consiste en la separación de las cadenas del ADN, para formar cadenas sencillas, por medio de una temperatura de 94 C por 20 segundos, en donde la doble cadena se abre para que posteriormente se unan los iniciadores a una temperatura de 55 C por 20 segundos.

La alineación es el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco, en presencia de un par de oligonucleótidos sintéticos que tienen afinidad específica por la región del ADN en cuestión, siendo uno de ellos complementario al extremo 5' del gen o fragmento del ADN que se desea amplificar y el otro se aparea con el extremo 3' del mismo, pero en la cadena opuesta. La extensión es lograda por la polimerización del ADN a partir del extremo 3' de los iniciadores a una temperatura de 72 C por 30 segundos llevada a cabo por una enzima termoestable a partir de los oligonucleótidos apareados en el paso anterior (Taq polimerasa).

Estas temperaturas se repiten un total de 30 ciclos o más, según las características del ADN blanco como la cantidad de G+C en el fragmento a amplificar.

Este ciclo se repite de 30 a 50 veces, lográndose multiplicar la secuencia original en una progresión geométrica de tal forma que al final del proceso, la cantidad del ADN amplificado es de 10^6 y 10^7 veces la cantidad original (Martínez-Soriano y cols, 1993).

El producto de extensión sintetizada en un ciclo puede servir como molde del siguiente, el número de copias de ADN se duplica en un ciclo. Así, 20 ciclos de PCR resulta en una amplificación de un millón de veces (Erlich, 1989; Innis y cols, 1990).

La técnica de PCR es muy específica, ya que solamente se amplifican los fragmentos de ADN delimitados por los iniciadores, no importando si hay otro tipo de ADN presente.

El producto de amplificación del PCR se pone de manifiesto posteriormente en un gel de agarosa que hace evidente el segmento específico de un determinado tamaño en pares de bases (pb) de ADN. El PCR es muy sensible, partiendo de la teoría que puede detectar desde una sola molécula de ADN, sin embargo, se han encontrado obstáculos para amplificar pequeñas cantidades de ADN en muestras clínicas, por lo que se han hecho diversas modificaciones con el fin de obtener los resultados deseados, una de estas modificaciones es el PCR anidado, el cual consiste en llevar a cabo dos reacciones de PCR, la segunda a partir del producto de amplificación de la primera, ya sea con los mismos iniciadores, o con otros diferentes que amplifican un producto interno y más pequeño que el primero (Leal y cols, 1992; Matar y cols, 1996; Gilbert y cols, 1997).

Para que la reacción se lleve a cabo en forma adecuada, primero se deberá estandarizar la técnica según la aplicación que se le vaya a dar. Se deberán alicuotar los reactivos en cantidades pequeñas, usar pipetas limpias y puntas nuevas, separar físicamente las reacciones ya realizadas de las que todavía no se hacen para evitar contaminaciones con ADN de otras muestras e incluir siempre un testigo negativo y uno positivo.

Aunque el PCR tiene alta sensibilidad y especificidad, es bien sabido de muestras clínicas y de tejidos pueden verse alteradas si la eficiencia de recuperación del ADN blanco por el procedimiento de extracción es bajo, además existen sustancias propias de las muestras que inhiben la reacción de amplificación si la extracción del ADN no es del todo pura, o inclusive reactivos utilizados en el proceso de extracción de ADN actúan como bloqueadores de la polimerasa (Persing, 1993), por lo que es importante determinar el método de extracción de ADN más adecuado de acuerdo a la muestra a usarse y el fin diagnóstico que se le quiera dar.

JUSTIFICACION

Las técnicas actuales para la identificación de *Brucella canis* tienen como base los métodos serológicos y bacteriológicos. Sin embargo la bacteriología puede resultar en falsos negativos ya que se requiere que los microorganismos estén en número viables y accesibles para poder ser cultivados; además es una técnica laboriosa, cara y el personal de laboratorio se puede contagiar accidentalmente. Mientras que las pruebas serológicas son poco sensibles durante las primeras cuatro semanas de la infección, después los perros mantienen una respuesta alta de anticuerpos contra los antígenos proteicos y el LPS.

Por lo que en esta investigación se plantea la evaluación de la técnica de PCR para sugerirla como un método de diagnóstico de *B. canis*, debido a que puede ser más sensible y rápida que el diagnóstico bacteriológico y serológico.

HIPOTESIS

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica diagnóstica de alta sensibilidad y especificidad para la identificación de *Brucella canis* en muestras clínicas de perros.

OBJETIVO GENERAL

Identificación de *Brucella canis* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa a partir de tejidos de perros seropositivos a *Brucella*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. – Determinar la sensibilidad y especificidad del PCR a partir de cultivos de *Brucella canis*.
2. -Implementar la técnica de PCR como una herramienta diagnóstica para *Brucella canis* en muestras clínicas de testículo y bazo.
3. - Comparar la sensibilidad de PCR con el diagnóstico bacteriológico.
4. – Comparar la sensibilidad de PCR con el diagnóstico serológico.

II.- MATERIAL Y METODOS

Grupo de animales

Se trabajaron 170 perros machos del Centro Antirrábico del Municipio de Puebla. A los cuales se les realizó un examen clínico de los testículos, con palpación y observación, considerando la simetría testicular y consistencia, así como tamaño del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola). Se tomaron las muestras de sangre de todos los animales de estudio, para la obtención de suero y su posterior conservación en congelación. Posteriormente se realizó el sacrificio de los animales y seguidamente se recolectó el testículo y bazo de todos los animales de estudio y se procedió a guardarlos en bolsas estériles de plástico etiquetados y manteniéndose en una hielera, para transportarlos al laboratorio y mantenerlos a -20°C hasta su procesamiento.

Grupo Testigo

Se utilizaron el testículo y el bazo de tres perros como controles positivos, los cuales presentaron problemas clínicos y de los cuales se aisló *Brucella canis*, la procedencia de estos animales fue de un criadero, en donde enfermaron de brucelosis y sirvieron como controles positivos, para este estudio.

También se trabajó con los testículos y bazo de tres perros testigos negativos, los cuales estuvieron en vigilancia constante, en jaulas acondicionadas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (INIFAP-SAGAR)

Estudio Bacteriológico

Las muestras de tejido de los órganos de estudio fueron flameadas en alcohol y colocadas en bolsas de plástico estéril agregándose 20 ml de solución salina fisiológica estéril. Se sembraron en medio de agar *Brucella* así como en el medio Thayer - Martín, incubados a 37°C durante 7 días. El medio Thayer-Martin se preparó mezclando volúmenes iguales de medio GC base a doble concentración y una solución de hemoglobina al 2%, y se añadió por litro de medio: 3mg de vancomicina, 7.5 mg de colistina, 100.000 U.I. de nistatina y 10 mg de nitrofurantoina (Alton, 1988; Carmichael y cols, 1989)

Las muestras del testículo y bazo también se sembraron en medios de agar sangre y MacConkey, para observar el crecimiento de bacterias Gram negativas, diferentes a la *Brucella canis*

Para la identificación de las colonias de *Brucella canis* se procedió a la realización de la tinción de Gram y posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas primarias y secundarias: Urea, H₂S, oxidasa, catalasa y triple azúcar hierro.

- a) Producción de H₂ S. Para esta prueba, los cultivos se inocularon en un tubo inclinado de medio tripticosa soya agar y se colocaron en la boca del tubo una tira de papel impregnada con una solución de acetato de plomo al 10% sin hacer contacto con el medio y se incubó bajo condiciones apropiadas durante tres días: El oscurecimiento del papel indica la producción de H₂ S.

- b) Actividad de la ureasa, se inocularon las cepas aisladas por estría se inocularon en tubos inclinados de agar con urea, se examinaron después de 15min, 1 hora (h), 2 h y 24 h de haber sido inoculados e incubados a 37 C, *B. canis* produciría una reacción positiva en 15 min.

- c) Actividad de la oxidasa. Se colocaron 2 a 3 gotas de una solución de Diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1% en un pedazo de papel filtro, sin dejar que el reactivo se seque, se separó el microorganismo de prueba con una varilla de vidrio del medio para extenderse en el papel impregnado. Una reacción positiva indicaría el desarrollo (un color púrpura oscura) dentro de 10 seg.

- d) Reducción del nitrato. Se evaluó inoculando la bacteria en el medio de caldo de nitrato que contiene peptonas y 0.1% de nitrato de potasio y la reducción del nitrato en nitrito estaría indicada por la aparición de color rojo cuando el nitrito reacciona con los reactivos: ácido sulfanílico y alfa-naftilamina(odimetil.alfa-naftilamina). La reacción coloreada resultante se debe a la formación de un compuesto diazoico-sulfobenceno-a 20-alfa-naftilamina. (Mac Faddin, 1990).

Estudio serológico

Se obtuvieron muestras sanguíneas en tubos vacutainer sin anticoagulante, de los perros de estudio, se dejaron reposar las muestras por 12 h para que se formara el coágulo; después se centrifugaron los tubos a 1500 xg por 10 min, se recolectó en forma estéril el suero obtenido y se conservó en congelación hasta su uso. Se realizó la prueba rápida de aglutinación en placa convencional para el diagnóstico presuntivo y la prueba en placa con adición de 2-mercaptoetanol (2-ME) (0,2 mol/l) en el suero sin diluir antes de que se le agregara el antígeno; este procedimiento no redujo la sensibilidad y aumentó la especificidad. La prueba se realizó sobre una placa de vidrio cuadrada, depositando en cada cuadro 30 µl de los sueros problema y enseguida se le agregó el mismo volumen del antígeno de *Brucella canis* al 8 %, pH 8.9, teñido con Rosa de Bengala (INIFAP-SAGAR), se homogeneizó la mezcla perfectamente con una manija de acero inoxidable, manteniendo la placa en movimiento giratorio durante cuatro minutos. La lectura se realizó en un transiluminador¹, considerándose reacción positiva cuando hubo presencia de aglutinación. También se realizaron diluciones de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600 para cuantificar los títulos de anticuerpos, se consideró que un título de 1:200 en aglutinación en placa es una prueba presuntiva de infección.

Método de ruptura celular y extracción de ADN

1. - Sonicado de las muestras

A los tejidos en estudio (bazo y testículo), tanto de los perros positivos, como negativos y de los cuyes, se les sometió a sonicación² a 30 micrones; 1 minuto de sonicado con un 1 minuto de descanso, con ocho repeticiones, esto con el fin de romper las células, y así facilitar la extracción del ADN, trayendo consigo un aumento en la sensibilidad en el PCR.

¹ White/Ultraviolet, Transilluminator. Ultra-Violet Products.

² Ultrasonic Homogenizer. Freq: 20 kHz. Cole Power Instruments.

2. – Suspensiones de *Brucella canis* y de las muestras clínicas de estudio

Se hicieron nueve diluciones decuples de una suspensión de *B. canis* en solución salina fisiológica (SSF) estéril, en un volumen final de 40 ml. A estas suspensiones se les efectuó un conteo celular por el método de Miles y Misra para llegar a establecer el número de UFC/ml. (Alton, 1988).

Se inactivaron todas las muestras a 90⁰ C por 15 min. en baño maría. Se procedió a realizar la extracción de ADN a partir de cada una de las diluciones y de las muestras clínicas. Se tomaron 40 ml de cada dilución de *B. canis* para cada extracción, se centrifugo a x 13800/g, se tiro el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de TE (10:1) (10 ml M Tris-Cl pH 7.5 a 8 y 1 mM EDTA pH), Para continuar la extracción (apéndice 2).

Se tomaron 2 ml de tejido previamente macerado, se colocaron en un tubo de polipropileno de 50 ml, en el caso de las diluciones de bacterias se tomaron 40 ml de cada una, Para posteriormente utilizar la técnica de extracción fenólica-CTAB para las 24 muestras de testículo y bazo, de perros que serológicamente fueron positivos a *Brucella canis* (ver apéndice 1) (Técnica descrita por Ausbel y cols, 1995).

3. - Desafío de cuyes con *Brucella canis*.

Se inocularon dos cuyes clínicamente sanos con 1×10^8 UFC/ ml con una cepa de campo *B. canis* de Bacteriología-INIFAP, por vía intraperitoneal y sacrificándose a los 45 días postinoculación; no sin antes obtener una muestra de sangre de cada cuye para realizar la serología, posteriormente se extrajo el testículo y el bazo en forma aséptica, se flameó y se maceró en 10 ml de SSF. De este macerado se realizaron nueve diluciones decuples, con un volumen final de 15 ml y se llevó a cabo el aislamiento y el conteo bacteriológico por el método de Miles y Misra (Alton y cols, 1988).

Se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para corroborar que la cepa que se aisló fuera la misma del desafío. Las diluciones de las muestras se hicieron en tubos de polipropileno³ y se inactivaron en baño maría a 90⁰ C por 15 minutos. A las diluciones de los tejidos de los cuyes se les agregó un volumen de solución de tripsina versene y se incubó por 1 ó 2 horas a temperatura ambiente y en agitación suave.

Se usaron 2 ml de cada una de las muestras de testículo y bazo de los cuyes inoculados con *B. canis*, para aplicar el protocolo de extracción Fenólica-CTAB (Ausbel y cols, 1995).

4. - De otros géneros bacterianos y tejidos negativos

Se realizó la extracción de ADN con el método Fenol-CTAB, a partir de cultivos puros de las bacterias *Yersinia enterocolitica* 0:9 (cepa de campo), *Salmonella typhi* (cepa de campo), *Escherichia coli* (cepa de campo), *Yersinia enterocolitica* 0:8 (cepa de campo), *Pasteurella haemolytica* (serotipo A2, cepa de campo), *Pasteurella multocida* (tipo A, cepa de campo), *Shigella boydii* (cepa de campo), *Brucella melitensis* (cepa de campo), *Proteus vulgaris* (0x19 cepa de campo), y *Rhizobium leguminosum* (cepa de campo donadas por el laboratorio de Bacteriología (INIFAP-SAGAR) que sirvieron como control negativo en la amplificación por la técnica de PCR.

Al mismo tiempo se realizó la extracción del ADN como se describió anteriormente, de 3 testículos y 3 bazos, correspondientes a los tres perros controles negativos, los cuales sirvieron como controles negativos para la amplificación por medio de PCR.

Cuantificación del ADN

Posterior a la extracción de ADN se cuantificó la cantidad obtenida en ng/ μ l de cada muestra: ADN de *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Yersinia enterocolitica* 0:8, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Brucella melitensis*, *Proteus vulgaris* y *Rhizobium spp.* La cuantificación se realizó en un fluorómetro⁴ siguiendo las instrucciones del fabricante con 2 repeticiones por muestra y obteniendo el promedio. Posteriormente se realizaron diluciones de estos ADNs bacterianos, para su estandarización final a 1 μ g/ml.

³Falcon

⁴Gene Quant II, Biotech

Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Las técnicas de PCR descritas se basaron en la utilización de iniciadores que forman parte del gen *omp2* de *Brucella abortus*, con dos juegos de iniciadores. El primer protocolo incluye una reacción de PCR con un juego de tres iniciadores (PCR 1), desarrollados por el Dr. Thomas Ficht, de la Universidad de Texas A & M; estos permiten la amplificación de un fragmento de 440 pares de bases en el caso de *Brucella canis* (Ficht y cols, 1996).

El PCR anidado se realizó con dos iniciadores, desarrollados por el Dr. Juan Pablo Martínez Soriano del INIFAP y que amplifican un fragmento de 193 pares de bases (Leal y cols, 1995). Se tomó 1 µl a partir de la reacción de PCR 1, como fuente de ADN blanco, para agregarlo a una segunda reacción basada en los iniciadores del PCR 2.

La combinación de estas dos técnicas resultó en lo que se denomina PCR anidado, el cual permitió aumentar la sensibilidad de la prueba detectando ADN de *Brucella* a partir de muestras clínicas con una limitada cantidad de bacterias (Matar y cols, 1996).

Las mezclas para las reacciones de PCR se realizaron en una campana de seguridad clase II, en un sitio diferente de donde se realizaron las extracciones para evitar la contaminación con ADN extraño a la muestra.

Las muestras de ADN de las diluciones de *B. canis*, de los tejidos positivos y de los tejidos de los cuyes obtenidos de la extracción descrita anteriormente, se trabajaron en volumen de 1 µl de ADN por muestra de estudio.

Para la metodología del PCR se evaluó el ADN de las bacterias de los perros testigo positivo, de los animales serológicamente positivos, así como de los cuyes que fueron inoculados.

a) Reacción 1 (PCR 1)

Se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl con los siguientes reactivos:

Solución amortiguadora de PCR (1.0 mM Tris-Cl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3).

100 µM de cada dNTP⁵

200 µM de cada iniciador.

2 U de Taq polimerasa⁶

⁵Bohering mannheim

⁶ Biotecnologías Universitarias, UNAM, México.

La cantidad necesaria del ADN que se empleó fue de 1 μ l para el caso del ADN a partir de los tejidos de los cánidos.

Se realizó una premezcla, incrementando la concentración de reactivos de acuerdo al número de muestras que se trabajaron. La premezcla contenía solución amortiguadora, dNTPs, iniciadores y Taq polimerasa; posteriormente se agregó a un microtubo de 200 μ l la cantidad necesaria para cada muestra, más agua mili Q estéril cbp 50 μ l. El ADN se agregó al final. Se centrifugó brevemente.

El programa en el termociclador⁷ fue el siguiente:

Una desnaturalización inicial a 94 C por 5 min, seguido de 32 ciclos a 94 C por 30 seg. 58 C por 30 seg. 72 C por 30 seg.; y una extensión final a 72 C por 15 minutos.

Secuencia de los iniciadores de esta reacción:

Iniciadores

- F 1. - 5'-GTTATCTCGCCTTACCG -3'
- F 2. - 5'-CTCGGATCGTAAAGGCT -3'
- F 3. - 5'-ATCGTGTAATCGTTGTCAAC -3'

b) Reacción 2 (PCR)

Se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l con los siguientes reactivos:
Solución amortiguadora de PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 9.0, 0.1% Tritón X-100).

1.5 mM MgCl₂

200 μ M de cada dNTP

150 nM de cada iniciador.

2.0 U de Taq polimerasa.

1 μ l de la reacción PCR 1.

⁷ Gene Amp. PCR system 2400. Perkin Elmer.

Se centrifugó brevemente.

El programa en el termociclador fue como sigue:

Una desnaturalización inicial a 94 C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 C por 60 segundos, 60 C por 60 seg. y 72 C por 60 seg. y una extensión final a 72 C por 3 min.

Secuencia de los iniciadores de esta reacción:

Iniciadores

JPA. - 5' -GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA-3'

JPB. - 5' -ACCAGCCATTGCGGTTCGGTA-3'

Evaluación del producto amplificado

Se evaluó la calidad del producto amplificado por medio de electroforesis en un gel de agarosa 1.0% (peso/vol. en TBE 0.5 x).

Preparación del gel de agarosa

Se disolvió la agarosa⁸ de gel al 1% en una solución de TBE 0.5 x y se calentó hasta ebullición. Cuando la solución estuvo a una temperatura aproximada de 40⁰ C se le agregó bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se vació en el molde de la cámara de electroforesis horizontal⁹. Una vez que gelificó se agregó la solución TBE 0.5 x hasta cubrir ligeramente el gel.

Se mezclaron 5 µl de la muestra con 1 µl de solución de carga y se colocó en el pozo (Erlich, 1989). Se utilizó además el marcador de peso molecular en alguno de los pozos de gel: 1Kb DNA Ladder¹⁰.

Una vez concluida la electroforesis a 50-70 volts, el gel se observó sobre un transiluminador de luz ultravioleta. Se tomaron fotos del gel con una cámara para fotografías instantáneas¹¹.

⁸ GIBCO BRL.

⁹ Horizon 58, Life Technologies, GIBCO BRL.

¹⁰ GIBCO BRL.

¹¹ Polaroid Mp4+. Fotodyne.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados con una prueba de concordancia de Kappa usando una tabla de contingencia de 2 x 2, para conocer si existía concordancia significativa entre las técnicas de diagnóstico (Thompson y cols, 1988).

Al mismo tiempo se determinó la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas de estudio, utilizando las siguientes fórmulas: (Riegelman y cols, 1992).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos} \times 100}{\text{Verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdadero negativo} \times 100}{\text{Verdadero negativo} + \text{falsos positivos}}$$

El estudio de la sensibilidad y especificidad se realizó:

1. - Analizando al PCR tomando como referencia los cultivos positivos
2. - Analizando los cultivos positivos, el PCR y tomando la serología positiva como animales positivos.

III. – Resultados

Estudio Serológico

Los resultados obtenidos indican que 12 de 170 perros presentaron clínicamente epididimitis y anticuerpos contra *B. canis*, en la prueba de aglutinación rápida en placa, y con la prueba de 2- ME, se obtuvo un porcentaje del 7%. De las cuales 6 muestras fueron positivas a una dilución 1:800 (tabla 1).

Este mismo estudio serológico se les practicó a los cuyes que se inocularon con *B. canis*, siendo serológicamente positivos a la prueba de aglutinación rápida en placa y con 2-ME fueron positivos a una dilución de 1:800 (tabla 2).

Los perros del grupo testigo positivo también resultaron positivos tanto a la prueba rápida en placa como a la prueba 2-ME en una dilución de 1:800 (tabla 2).

Los 3 perros correspondientes a los testigos negativos fueron serológicamente negativos.

Estudio Bacteriológico

En este estudio no se logro el aislamiento bacteriológico de *Brucella canis* del bazo y del testículo de los animales serológicamente positivos, de los cuyes y de los tejidos de los perros que se utilizaron como testigos negativos, salvo en las muestras de referencia que se utilizaron como testigos positivos en donde la Identificación de la *Brucella canis* se realizó con las pruebas bioquímicas primarias y secundarias anteriormente mencionadas.

En los medios de agar sangre y MacConkey, se observo el crecimiento de colonias bacterianas gram negativas las cuales presentaban la misma morfología y cápsula. Al desarrollar las pruebas bioquímicas, los resultados fueron los siguientes; oxidación-fermentación (-), catalasa (+), oxidasa (+), TSI R=5, urea (+), SIM (-), Reducción de nitratos (+), gelatina (-), fenilalanina y glucosa(-), identificándose la bacteria como *Moraxella phenylpyruvica*.

Conteo de UFC/ml.

Se observó una concentración de bacterias de 10×10^8 UFC/ml en el tubo más concentrado y de 1×10^1 UFC/ml en el tubo más diluido de la cepa de campo.

Resultados de los ensayos de PCR realizados con ADN de tejidos de cuyes y cánidos

La estandarización de la amplificación del PCR anidado se realizó a partir de las diluciones de una suspensión de *Brucella canis*, en donde la cantidad de bacteria mínima que se amplificó fue hasta de 10×10^8 , amplificando el ADN del fragmento 193 pb, como lo muestra la figura No.1.

Se determinó la amplificación del fragmento específico de *Brucella canis*, en el protocolo de PCR anidado, observándose un fragmento de 193 pb correspondiente a 3 tejidos de cuyes positivos, como se ilustra en la figura No. 2.

En el ensayo de PCR anidado realizado en las muestras de tejidos de los perros testigos negativos, no se observó amplificación del fragmento de ADN de *Brucella canis*.

Al realizar el ensayo de PCR anidado del ADN de las muestras de tejidos de los testigos positivos, los resultados permitieron determinar que de los seis tejidos de estudio, se observó que solamente 4 tejidos amplificaron un fragmento 193 pb. Esto permitió inferir la presencia de *Brucella canis*, como se aprecia en la figura No. 3.

Posteriormente en el PCR anidado de las muestras de tejidos serológicamente positivas a *Brucella canis*, se observaron que 12 tejidos fueron positivos, pero se observa claramente solo en 10 tejidos la amplificación del fragmento 193 pb del ADN de *Brucella canis*, como se ilustra en las figuras No. 3, 4 y 5.

En los resultados obtenidos en el PCR anidado con el ADN de cultivos puros de las bacterias *Rhizobium spp*, *Yersinia enterocolítica* O:8, *Yersinia enterocolítica* O:9, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Shigella boydii*, *Salmonella typhi*, *Brucella melitensis*, los testigos positivos que correspondieron a *Brucella canis* y el testigo negativo que ocupó el último carril, en donde se observó amplificación del fragmento 193 pb correspondiente a la *Pasteurella haemolytica* y a la *Brucella melitensis*. Como se observa en la figura No.6.

La figura No.7 muestra el PCR anidado que se realizó a las muestras bacteriológicas de *Moraxella phenylpyruvica*, en donde solamente se observa la amplificación del fragmento 193 pb del testigo positivo de *Brucella canis*. El cual se localiza en el último carril.

Análisis estadístico

Prueba estadística

Los resultados de la prueba de concordancia de Kappa muestran que entre el diagnóstico con PCR y el estudio bacteriológico no existió concordancia ya que el estudio bacteriológico fue negativo, por lo que no se pudo hacer la relación estadística. Por lo que al tomarse los resultados negativos y positivos de la amplificación del ADN de los tejidos de las muestras clínicas serológicamente positivas a *Brucella canis*, se obtuvo una sensibilidad del 50% y una especificidad del 50% para la técnica del PCR anidado. Mientras que para la serología se obtuvo una sensibilidad del 100%

Tabla 1

Resultados de las pruebas de aglutinación rápida en placa, aglutinación rápida en placa con 2-mercaptoetanol, bacteriología, protocolo PCR 1 y PCR 2. Y de los perros serológicamente positivos a *Brucella canis*.

Identificación No.	Agglutinación Rápida en placa	Agglutinación rápida en placa con 2 mercaptoetanol	Aislamiento Bacteriológico	PCR 1	PCR 2
113	+	Positiva 1 : 400	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)
84	+	Positiva 1 : 800	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(+)
68	+	Positiva 1 . 800	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (+) Testículo(+)
66	+	Positiva 1 : 400	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)
46	+	Positiva 1 : 200	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)
15	+	Positiva 1 . 800	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (+) Testículo(+)
204	+	Positiva 1 : 400	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (+) Testículo(-)
255	+	Positiva 1 400	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)
221	+	Positiva 1 : 400	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (+) Testículo(-)
201	+	Positiva 1 : 800	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(+)
215	+	Positiva 1 800	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (+) Testículo(+)
244	+	Positiva 1 : 800	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (+) Testículo(+)

Tabla 2

Resultados de las pruebas de Aglutinación rápida en placa, 2-mercaptoetanol, bacteriología, protocolo de PCR 1 y PCR 2, de los cuyes y de los perros controles positivos con *Brucella canis*.

Identificación	Aglutinación rápida en placa	Prueba de 2mercaptoetanol	Aislamiento Bacteriológico	PCR 1	PCR 2
Perro No 1	+	Positiva 1 : 800	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (+) Testículo(-)
Perro No. 2	+	Positiva 1 : 800	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (+) Testículo(+)
Perro No. 3	+	Positiva 1 : 800	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (+) Testículo(+)
Cuye No. 1	+	Positiva 1 : 400	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (+) Testículo(+)
Cuye No. 2	+	Positiva 1 : 400	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (-) Testículo(-)	Bazo (+) Testículo(-)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

193

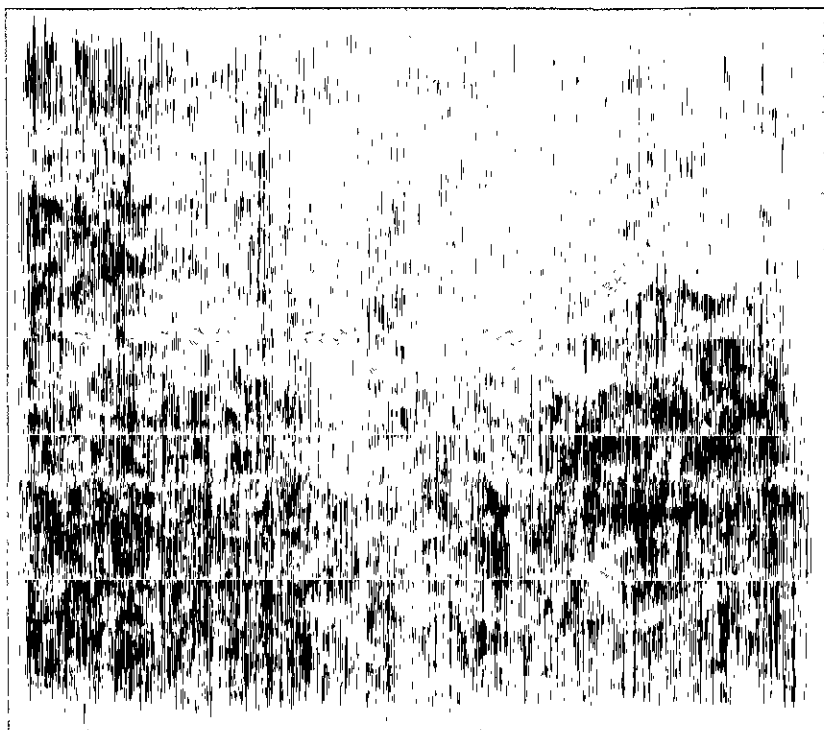


Figura 1. Amplificación del PCR anidado a partir de las diluciones de una suspensión de *B. canis* rotas por sonicación.

Carril 1. - Marcador de peso molecular 1 Kb DNA (pBR 322)

Carril 2. - 10×10^4 ufc/ml positiva

Carril 3. - 10×10^5 ufc/ml positiva

Carril 4. - 10×10^6 ufc/ml positiva

Carril 5. - 10×10^7 ufc/ml negativa

Carril 6. - 10×10^8 ufc/ml positiva

Carril 7. - 10×10^9 ufc/ml negativa

Carril 8. - 10×10^{10} ufc/ml negativa

Carril 9. - Fragmento del primer PCR

Carril 10. - Testigo negativo

Carril 11. - Testigo negativo

Carril 12. - Testigo negativo.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

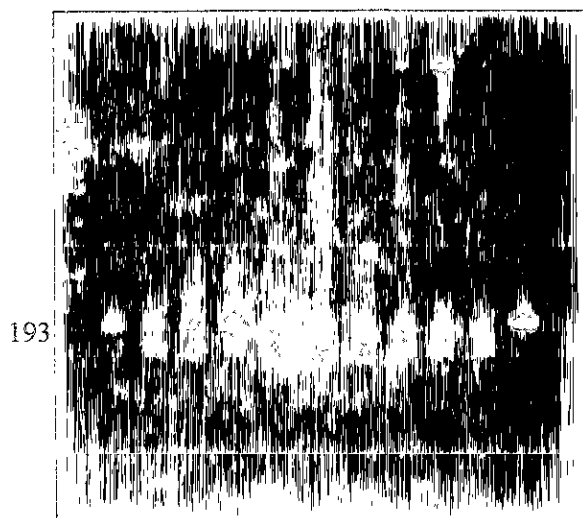


Figura 3. – Amplificación del PCR anidado de
Los tejidos de los Perros de estudio y de los Perros testigos
Positivos con *Brucella canis*
Carril 1. – Marcador 1 Kb ADN (pBR 322)
Carril 2. – No. 15 Bazo positivo
Carril 3. – No. 15 Testículo positivo
Carril 4. – No. 244 Bazo positivo
Carril 5. – No. 244 Testículo positivo.
Carril 6. – Perro 1 Bazo positivo
Carril 7. – Perro 1 Testículo positivo.
Carril 8. – Perro 2 Bazo positivo.
Carril 9. – Perro 2 Testículo positivo.
Carril 10. – Perro 3 Bazo positivo
Carril 11. – Perro 3 Testículo positivo.
Carril 12. – Testigo positivo del PCR 2.
Carril 13. – Testigo negativo.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

193

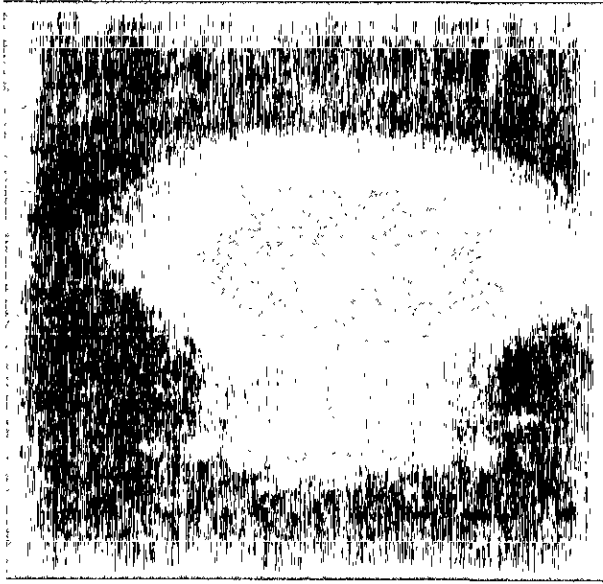


Figura 4. – Amplificación del PCR anidado de los tejidos de los Perros de estudio.

- Carril 1. – Marcador 1 Kb ADN (pBR 322)
- Carril 2. – Perro No. 68 Bazo, positivo.
- Carril 3. – Perro No. 68 Testículo, positivo.
- Carril 4. – Perro No. 201 Bazo, negativo.
- Carril 5. – Perro No. 201 Testículo, positiva.
- Carril 6. – Perro No. 204 Bazo, negativo.
- Carril 7. – Perro No. 204 Testículo, negativo.
- Carril 8. – Perro No. 215 Testículo, positiva.
- Carril 9. – Perro No. 215 Bazo, negativo.
- Carril 10. – Perro No. 84 Testículo, positivo
- Carril 11. – Perro No. 84 Bazo, negativo.
- Carril 12. – Testigo positivo de *Brucella canis*
- Carril 13. – Testigo negativo

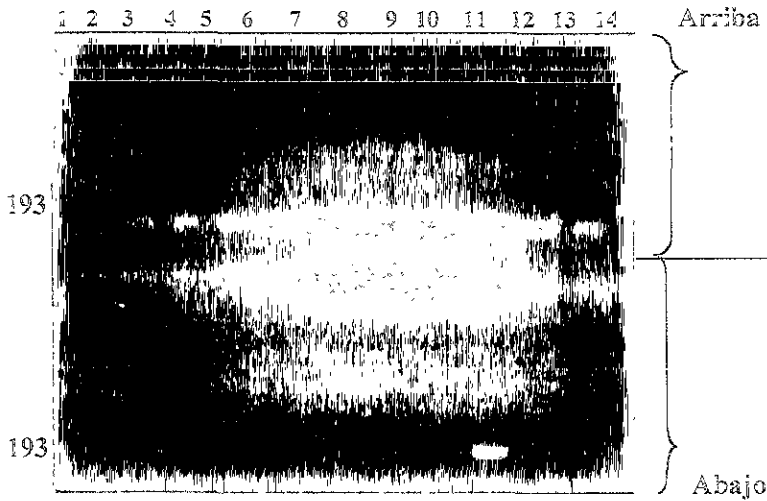


Figura 5. – Amplificación del PCR anidado de los tejidos De los Perros de estudio.

Arriba

- Carril 1. – Marcador 1 Kb ADN (pBR 322)
- Carril 2. – Perro No. 204 Bazo, positivo.
- Carril 3. – Perro No. 204 Testículo, negativo.
- Carril 4. – Perro No. 113 Testículo, negativo.
- Carril 5. – Perro No. 113 Bazo, negativo
- Carril 6. – Perro No. 15 Bazo, negativo.
- Carril 7. – Perro No. 15 Testículo, negativo.
- Carril 8. – Perro No. 66 Testículo, negativo
- Carril 9. – Perro No. 66 Bazo, negativo
- Carril 10. – Perro No. 66* Bazo, negativo.
- Carril 11. – Perro No. 201 Bazo, negativo.
- Carril 12. – Perro No. 201* Bazo, negativo.
- Carril 13. – Perro No. 201 Testículo, negativo
- Carril 14. – Perro No. 221 Bazo, positivo.

Abajo

- Carril 1. – Marcador 1 Kb ADN.
- Carril 2. – Perro No. 221 Testículo, negativo.
- Carril 3. – Perro No. 255 Testículo
- Carril 4. – Perro No. 255 Bazo, negativo.
- Carril 5. – Perro No. 46 Bazo, negativo.
- Carril 6. – Perro No. 46* Bazo, negativo.
- Carril 7. – Perro No. 46 Testículo, negativo.
- Carril 8. – Perro No. 215 Bazo, negativo.
- Carril 9. – Perro No. 46* Testículo, negativo.
- Carril 10. – Perro No. 84 Bazo, negativo.
- Carril 11. – Testigo positivo de *Brucella canis*, PCR 2.
- Carril 12. – Testigo negativo.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

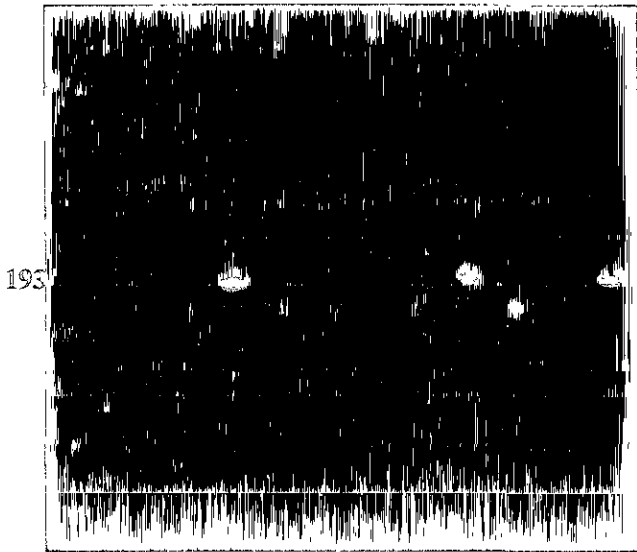


Figura 6. - Amplificación de PCR realizados con ADN de diferentes bacterias.

Carril 1. - Marcador 1 Kb ADN (pBR 322)

Carril 2. - *Rhizobium spp.* 1 μ g, negativa.

Carril 3. - *Yersinia enterocolitica* 5:8, 1 μ g, negativa.

Carril 4. - *Yersinia enterocolitica* 0:9, 1 μ g, negativa.

Carril 5. - *Pasteurella haemolytica* 1 μ g, positiva.

Carril 6. - *Pasteurella multocida* 1 μ g, negativa.

Carril 7. - *Escherichia coli* 1 μ g, negativa.

Carril 8. - *Shigella boydii* 1 μ g, negativa.

Carril 9. - *Salmonella typhi* 1 μ g, negativa.

Carril 10. - *Brucella melitensis* 1 μ g, positiva.

Carril 11. - Testigo negativo.

Carril 12. - *Brucella canis*, PCR protocolo 1

Carril 13. - *Brucella canis*, PCR protocolo 2

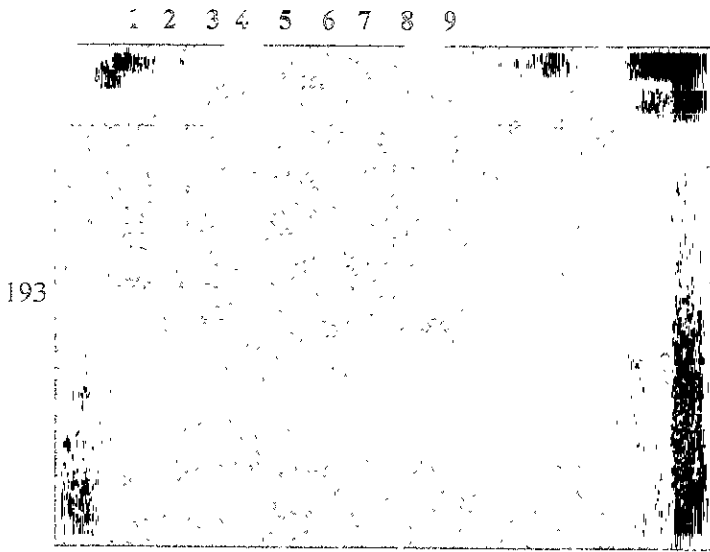


Figura 7.- Amplificación de PCR anidado de las muestras bacteriológicas de *Moraxella phenylpyruvica*.
Carril 1.- Marcador 1 Kb ADN (pBR 322).
Carril 2.- Testículo No. 204 Negativa.
Carril 3.- Testículo No. 293 Negativo
Carril 4.- Testículo No. 15 Negativo
Carril 5.- Bazo No. 221 Negativo
Carril 6.- Testículo No. 84 Negativo
Carril 7.- Bazo No. 255 Negativo.
Carril 8.- Testigo Negativo.
Carril 9.- Testigo Positivo *Brucella canis*.

I V. - DISCUSION

El aislamiento de *Brucella canis* es de importancia para el diagnóstico de la brucelosis en los perros, sin embargo esto no siempre es posible, sobre todo en esta investigación en donde las muestras clínicas de perros serológicamente positivos a brucelosis y que no tenían antecedentes de una historia clínica, presentaron un aislamiento negativo.

En las muestras clínicas de animales, el porcentaje de aislamiento depende de varios factores; como los medios de cultivo, el tiempo de obtención de la muestra, el método de transporte y el manejo de la misma en el laboratorio. También hay que mencionar que las brucelas podrían estar en muy poca cantidad en las muestras clínicas (Hernández y cols, 1996).

Renoux y cols, en 1956, trabajaron con muestras de tejidos de caprinos infectados con *B. melitensis*, y observaron un aislamiento negativo, en el 100% de los casos. Una observación a considerar con la investigación de Renoux y cols, es el aislamiento negativo que se obtuvo para *Brucella canis* en esta investigación.

Arellano, en 1998 reporta resultados bacteriológicos a partir de grupos de caprinos infectados experimentalmente, en donde se muestra que en ninguno de los tejidos estudiados se obtuvo un 100% de aislamientos, mientras que en nuestro estudio bacteriológico se obtuvo un aislamiento negativo de la *Brucella canis*.

En perros, la bacteremia persiste por largos períodos de tiempo, generalmente por 1 o 2 años, pero existen intervalos intermitentes de abacteremia de variable duración durante la fase inicial de la enfermedad. *Brucella canis* puede ser localizada en diversos tejidos como la próstata, y médula ósea durante meses o años después de que ha cesado la bacteremia. Cultivos de sangre negativos, no pueden ser usados como criterio para excluir un diagnóstico de brucelosis canina (Carmichael, 1991)

Alton y cols (1988); Angus & Barton (1984) hacen mención de lo difícil que es el aislamiento de *Brucella canis* a partir de muestras clínicas, por el lento crecimiento de la bacteria, por lo tanto estas afirmaciones apoyan el porqué no hubo aislamiento bacteriano de los tejidos de estudio pertenecientes a perros serológicamente positivos a *Brucella canis*.

Los primeros estudios que reportan la infección por *Brucella canis* en México fueron publicados por Flores en 1975, reportando que de un total de 500 muestras de perros callejeros el 28 % presentaron seropositividad y el aislamiento de la bacteria solamente se logró en 8 cánidos. En nuestra investigación de 170 perros que se muestrearon solamente 12 animales presentaron anticuerpos contra *Brucella canis*, y el aislamiento bacteriano fue negativo. Flores en su investigación solamente obtuvo el 5.7% de aislamiento bacteriano, esto de 140 perros seropositivos. Por lo tanto se confirma que el aislamiento bacteriano en los demás estudios siempre ha sido menor al 100%, salvo en nuestro estudio en donde fue negativo el aislamiento bacteriano.

López en 1991, menciona que para la identificación de *Brucella* se han usado técnicas de detección inmunológica y bacteriológica. Estas técnicas son tardadas y con frecuencia dan resultados falsos negativos. En relación con esta investigación y con referencia a los resultados negativos obtenidos en el aislamiento, se puede decir que es algo normal el no haber obtenido los resultados esperados, ya que puede haber brucelas viables, pero no cultivables para identificar a la *Brucella canis*.

El aislamiento de *Brucella canis* en un medio de cultivo es la única prueba de diagnóstica incontestable que demuestra la existencia de brucelosis. Sin embargo, la sensibilidad del cultivo bacteriológico convencional depende de gran medida de la viabilidad y concentración de *Brucella* en la muestra clínica, del tipo de muestra elegida y del número de muestras sembradas de cada animal (Hornitzki y Searson, 1986). El aislamiento bacteriano negativo obtenido en este trabajo, se debió a la obtención de muestras contaminadas por otras bacterias y por un bajo número de brucelas, o bien en muestras conteniendo sólo brucelas muertas por un deficiente proceso de conservación por lo que la detección de ADN específico de *Brucella canis* mediante la técnica de PCR solamente se observó la amplificación en 12 muestras clínicas de testículo y bazo de los perros serológicamente positivos.

De hecho, varios autores han citado que esta técnica posee una buena sensibilidad para la detección de ADN específico obtenido de cultivos puros de *Brucella* (Fekete y cols, 1992^a; Baily y cols, 1992; Herman y De Ridder, 1992; Romero y cols, 1995; Da Costa y cols, 1996)

Aunque se ha desarrollado la técnica de PCR para poner de manifiesto a *Brucella spp.* Pocos han sido los investigadores que han intentado adecuarla como método diagnóstico a partir de muestras clínicas (Matar y cols, 1996; Leal y cols, 1995) y menos aún los que han intentado identificar un fragmento de la bacteria a partir de los tejidos (Arellano, 1998; Fekete y cols, 1992). En esos trabajos los resultados han sido satisfactorios cuando se trabajó con un juego de iniciadores para detectar a *B. abortus* a partir de tejidos maternos y fetales y han obtenido una alta sensibilidad (5 UFC/100 mg de tejido); sin embargo, también afirman que se deben hacer más ensayos y adecuaciones a la técnica antes de proponerla como técnica diagnóstica ya que a menudo también se presenta amplificación inespecífica, mostrando bandas del mismo tamaño que el esperado para una reacción positiva.

Se trabajó con 1µl de ADN de los tejidos anteriormente estudiados los cuales fueron amplificados por medio de PCR utilizando los iniciadores específicos, previamente descritos. Amplificando el fragmento 193 pb del ADN de *Brucella canis*.

Las bacterias del género *Brucella* son intracelulares, lo que hacen difícil el acceso al ADN de éstas bacterias a partir de órganos o muestras clínicas (Fekete y cols, 1992; Leal y cols, 1995).

Además hay que tomar en cuenta que la cantidad de copias de ADN de *Brucella canis* que se encuentra en la muestra y se desean reproducir por medio de la técnica de PCR son mínimas en comparación a la cantidad total de ADN del tejido o muestra.

Por estos motivos se recurrió a la metodología de digerir los tejidos por medio de la tripsina que incide sobre los enlaces peptídicos de las proteínas de la matriz extracelular (Lehninger, 1991) y romper el mayor número de células posibles (sonicado), antes de someterla a la extracción de ADN.

El hecho de que se observara amplificación en el 50% de las muestras de tejidos sin aislamiento bacteriológico probablemente se debió a que en la muestra pueden encontrarse también microorganismos muertos o que son viables pero no cultivables ya que cuando se somete una muestra a un cultivo, las bacterias tienen que adaptarse a crecer en un ambiente que aunque es rico en nutrientes no tiene las características exactas de su hospedero natural (Akkermans y cols, 1995, Stevenson, 1978).

La técnica de PCR podría ser capaz de amplificar el ADN del microorganismo sin necesidad de que sea viable. Basándose en los resultados obtenidos en este estudio, se demostró que la detección de *Brucella canis*, por medio de PCR tuvo una sensibilidad del 50% y una especificidad del 50%.

Relacionado con los resultados obtenidos en esta investigación, Tcherneva y cols en 1996, estudiaron una colección de 40 cepas de *Brucella*, incluyendo 19 de *Brucella canis* de muestras clínicas y fueron analizadas usando la amplificación del PCR. También aislaron una cepa aberrante de un perro importado de un criadero en el norte de Bulgaria y que poseía un fragmento de 750 pb, que también estuvo presente en la cepa de referencia de *Brucella canis* RM/66. Y concluyeron que la PCR es un promisorio método de diagnóstico para la evaluación de un brote de enfermedad.

La relación de esta investigación con el estudio que se realizó, se basa principalmente en las muestras clínicas de bazo y testículo de perros serológicamente positivos a *Brucella canis*, con la única salvedad de que en este estudio se obtuvieron fragmentos que amplificaron a 193 pb, con iniciadores específicos.

Este trabajo confirma que los ensayos y adecuaciones que se han venido realizando en torno a la técnica de PCR, con relación a la detección de *Brucella* a partir de muestras clínicas, demuestra ser efectiva para poner de manifiesto la presencia del ADN bacteriano sin necesidad de que existan bacterias viables en la muestra clínica analizada, por lo que puede resultar más sensible que la prueba bacteriológica.

Romero y cols, en 1995 estudiaron la prueba de PCR con iniciadores derivados de la secuencia de *Brucella abortus* 16S rRNA, los cuales amplificaron un fragmento de 905 pb. en 23 diferentes brucelas aisladas, estos investigadores concluyen que la alta especificidad y sensibilidad de la prueba de PCR puede proporcionar una herramienta confirmatoria para el diagnóstico de la brucelosis. Este estudio se relaciona con el de nuestra investigación por el hecho, de utilizar al PCR como prueba diagnóstica, y en donde se obtuvo la amplificación del fragmento 193 pb, de *Brucella canis*, correspondiente a las muestras de estudio de los perros serológicamente positivos.

Bricker y Halling en 1995 trabajaron diversas pruebas de PCR para identificar al género *Brucella*. La prueba comprendió cinco iniciadores de oligonucleótidos los cuales identificaron biovariedades de cuatro especies de *Brucella*. Las cepas de campo de *Brucella abortus* que amplificaron el fragmento de DNA a 498-pb. Solamente tres de las ocho biovariedades de *B. abortus* fueron amplificadas por la prueba de PCR.

Tres biovariedades de *B. melitensis* fueron identificadas por amplificación de un fragmento de 731-pb. Y una sola biovariedad *B. suis*, bv 1, por amplificación de un fragmento de 285-pb y *B. ovis* fue identificada sobre la base de amplificación de un fragmento de 976-pb.

En esta investigación, se demostró la amplificación del PCR, en 12 muestras clínicas de testículo y bazo, que presentaban alteraciones anatomopatológicas como son la orquitis y epididimitis y la presencia en bazo de formaciones granulomatosas focales, de perros serológicamente positivos, de cuyes inoculados con *Brucella canis*, así como en los controles positivos en donde se obtuvo la amplificación del fragmento 193 pb. detectándose la presencia de *Brucella canis*. Es de suma importancia, la estandarización de una técnica confirmatoria, específica, sensible y rápida, desarrollada para las muestras clínicas de testículo y bazo de perro. En este estudio la técnica de PCR permitió la amplificación del fragmento 193 pb del ADN de *Brucella canis*, una secuencia de un gen conocido (*omp2*) presente en el genoma.

Se obtuvieron resultados no muy satisfactorios al hacer una primera reacción de PCR con un juego de iniciadores que permitieron la amplificación de un fragmento de 940 pb, a partir de esta primera reacción se tomó 1 µl, como fuente de ADN blanco, para agregar a una segunda reacción basada en un juego diferente de iniciadores que permitieron la amplificación de un fragmento de 193 pb. La combinación de estas dos técnicas en este estudio resultó en lo que se denomina PCR anidado, el cual dio una sensibilidad del 50% y una especificidad del 50%, detectando ADN de *Brucella canis* a partir de 12 muestras clínicas de perros que serológicamente fueron positivos. Se han logrado Amplificar hasta 10 ufc/ml con este procedimiento (Arellano y cols, 1996; Ficht y cols, 1996; Leal- Kleveland y cols, 1995).

Aún cuando la secuencia del gen *omp2* mencionada se encuentra en muy bajas concentraciones, el fragmento 193 pb de ADN, de los perros que serológicamente fueron positivos a *Brucella canis* y que no presentaron historia clínica y que el aislamiento fue negativo debido a que no se encontró viabilidad de los organismos de *Brucella canis*, y por lo tanto no se pudo comprobar la sensibilidad y especificidad, para el estudio bacteriológico, obteniendo para la técnica de PCR, una especificidad del 50 % y una sensibilidad del 50 %.

En la investigación realizada para establecer la técnica de PCR para el diagnóstico de *Brucella melitensis*, Barrera en 1993, trabajó con un grupo de 13 cabras, y se recolectaron muestras sanguíneas en tubos con EDTA para la extracción del ADN, el cual fue utilizado para el PCR, pudiéndose confirmar la positividad de dos de los animales a la enfermedad. Estos hallazgos demuestran que la sensibilidad y la especificidad de la PCR frente a las pruebas son mayores, como ha sido observado en otras investigaciones por Martínez-Soriano y cols, en 1993.

Esta investigación se relaciona con el estudio, por el hecho de que la serología y el PCR fueron positivos, lo que no sucedió con el aislamiento bacteriano en donde los resultados fueron negativos. Al realizar la técnica de PCR, se detectó el fragmento 193 pb de *Brucella canis* en el 50 % de los tejidos (bazo y testículo) y Barrera obtuvo con la técnica de PCR solamente el 15 % de las muestras de sangre estudiadas.

Las características moleculares y químicas frecuentemente proporcionan información en la diferenciación de microorganismos estrechamente relacionados. La identificación de cuatro especies patógenas en humanos (*Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* y *Brucella canis*) es problemática para muchos laboratorios de diagnóstico clínico al depender principalmente de las características serológicas y fenotípicas para diferenciar las especies.

En 1998, Fox y cols, estudiaron el PCR por medio de la amplificación del interespcio 16S-23S ribosomal ADN, región que fue evaluada para el polimorfismo específico-especies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, y *B. canis* produciendo idénticos perfiles de interespcios a PCR.

En esta investigación se determinó, la posibilidad de utilizar una de las técnicas desarrolladas en el área de la biología molecular, como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa como un método a estandarizar y perfeccionar en el estudio de las muestras clínicas de animales, y su uso en el diagnóstico de la brucelosis, pudiendo facilitar la detección del patógeno, complementándolo con estudios bacteriológicos, infectológicos, inmunológicos y epidemiológicos.

Pocos estudios se han llevado a cabo con muestras clínicas para determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR para el diagnóstico directo de la brucelosis en los animales. Hasta ahora, ninguna de las técnicas de PCR empleadas ha demostrado poseer una sensibilidad suficiente como para reemplazar con garantías al cultivo bacteriológico convencional en el diagnóstico directo de la enfermedad (Fekete y cols, 1992^a, 1992b; Leal-Klevezas y cols, 1995; Romero y cols, 1995b; Matar y cols, 1996; Rijpens y cols, 1996).

Es importante señalar que no existen estudios de la utilización de la técnica de PCR para detectar a *Brucella canis* a partir de tejidos como son bazo y testículo de perros, serológicamente positivos y en donde el aislamiento fue negativo. En la presente investigación, los resultados obtenidos de los perros de estudio, de los testigos positivos a *Brucella canis*, así como de los cuyes que también sirvieron como testigos positivos, se observó que el PCR anidado, utilizado fue el adecuado para obtener el fragmento amplificado de 193 pb, en las muestras clínicas de los perros, así como de los cuyes.

En 1990 Perry y Bundle, estudiaron la estructura del LPS de las cepas rugosas (R-LPS), en donde mencionan, que es básicamente similar al de las cepas lisas (S-LPS), excepto que la cadena O esta ausente. En esta investigación se fundamenta la relación que poseen algunas bacterias para que se de una reacción cruzada, esta reacción se lleva a cabo por determinantes antigénicos que poseen en común las bacterias, lo que sucedió con *Pasteurella haemolytica* la cual amplifica el ADN del fragmento 193 pb, al igual que la *Brucella canis*. Otro aspecto importante que fundamenta la reacción cruzada es la relación que guardan en su genoma, ya que algunas bacterias gram negativas tienen genes similares (*Omp2*) y a la similitud que muestran estos microorganismos en su estructura y por lo tanto en su composición química de la membrana externa (Michaux y cols, 1993).

La presencia de la bacteria *Moraxella phenylpyruvica*, en las muestras clínicas de los perros serológicamente positivos y negativos, probablemente se manifiesta por el contacto de las secreciones respiratorias de mamíferos o humanos enfermos y que diseminaron las bacterias en el momento de la recolección de las muestras clínicas de los perros de estudio. La *Moraxella phenylpyruvica* es un patógeno de las membranas mucosas de los mamíferos (<http://intranet.on.ca/msds/mchem/mxella.htm>, 1999)

Conclusiones

El aislamiento negativo obtenido en este estudio posiblemente se debió a la falta de viabilidad y baja concentración de *Brucella canis* en las muestras clínicas (bazo y testículo) utilizadas en esta investigación.

La técnica de PCR anidada estudiada en muestras clínicas de perros serológicamente positivos a *Brucella canis*, dio resultados no muy satisfactorios. Los resultados obtenidos en este estudio representan un aporte en la detección del patógeno *Brucella canis* a partir de muestras clínicas de perros serológicamente positivos y que no presentaron antecedentes de una historia clínica, establecen las bases para la implementación de la PCR como técnica de diagnóstico.

En este trabajo se diseñó y se estableció un método de detección para *Brucella canis* basado en la técnica de PCR. La técnica se desarrolló con muestras clínicas de animales serológicamente positivos, pero que no presentaron historia clínica alguna ya que los perros pertenecían al Centro antirrábico del Municipio de Puebla. Detectándose la presencia del ADN amplificado del fragmento 193 pb de *Brucella canis*, en 12 tejidos (6 testículos y 6 bazos), de un total de 24 tejidos. La técnica de PCR anidada evaluada y practicada a los tejidos de perros, no obtuvo resultados satisfactorios, como en los tejidos de los perros testigos positivos a *Brucella canis*, en donde los tejidos amplificaron el ADN del fragmento 193 pb de *Brucella canis*, lo que no ocurrió con las muestras de estudio.

Sin embargo, no se puede afirmar que no sea útil en el diagnóstico de la brucelosis canina, ya que estos estudios establecen futuras investigaciones en donde se obtenga un éxito cercano al 100% con la técnica de PCR para la detección de *Brucella canis* de muestras clínicas de perros enfermos, es posible que la metodología aquí propuesta pueda modificarse en cuanto a las concentraciones de reactivos utilizados, al programa en el termociclador y los dos iniciadores utilizados, para hacerlo útil como prueba diagnóstica y que además presente una sensibilidad y especificidad aceptable.

Se propone seguir investigando al respecto, ya que esta técnica es una buena herramienta diagnóstica que se puede implementar en un laboratorio como prueba confirmatoria; además tiene la ventaja de poder inactivar las muestras desde un principio, evitando que puedan llegar a infectar a la persona que trabaja en el laboratorio. Es posible obtener un resultado en dos o tres días, lo cual no sucede con el estudio bacteriológico, ya que un resultado confirmatorio puede tardar hasta 15 días.

Estos resultados, vislumbran un camino promisorio para una posible implementación de esta técnica en el diagnóstico de la brucelosis canina causada por *Brucella canis*. El uso de PCR en el diagnóstico de brucelosis facilitará la detección del patógeno y complementará estudios infectológicos, inmunológicos y epidemiológicos.

En este trabajo se pudo comprobar que es posible que la técnica de PCR detecte muestras positivas, que en el diagnóstico bacteriológico fueron negativas.

Algunos de los inconvenientes de esta técnica son la facilidad con la que se pueden contaminar las muestras de ADN externo, que aunado a su alta sensibilidad, puede resultar en falsos positivos.

Es importante que la persona que vaya a trabajar con esta técnica esté capacitada en la metodología del trabajo molecular. Además el laboratorio donde se implemente la técnica debe contar con el equipo especializado.

V. – Apéndices

Apéndice 1. Método de extracción de ADN

El material utilizado para las extracciones fue nuevo y estéril para evitar acarrear ADN ajeno que contaminara las muestras.

Extracción Fenólica-CTAB

Del tejido previamente macerado se tomaron 2 ml, se colocaron en un tubo de polipropileno de 50 ml, de las diluciones de bacterias se tomaron 40 ml de cada una, se inactivaron todas las muestras a 90 C por 15 minutos en baño maría. Las diluciones de bacteria se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 13800 xg por 10 minutos, se tiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2 ml de TE 10:1. Se llevaron a cabo los siguientes pasos: (Técnica descrita por Ausubel y cols, 1995, con modificaciones)

1. – A los tejidos se les agregó un volumen de solución de Tripsina-Versene (apéndice 2).
2. – Se sonicó la muestra a 30 micrones; 1 minuto de sonicado con 1 minuto de descanso, con ocho repeticiones. Se evitó que la punta del sonicador tocara las paredes del tubo. El tubo se colocó en un recipiente con hielo para evitar que se calentaran las muestras.
3. – Se agregaron 5 volúmenes de solución de lisis, y se añadió lisozima (20 mg/ml) a una concentración final de 0.8 mg/ml. Se incubó 1 hora a 37 C.
4. – Se agregó SDS al 10%, a una concentración final de 0.5%
5. – Se añadió proteinasa K (20 mg/ml), a una concentración final de 0.1 mg/ml; incubando 1 hora a 37^o C en baño maría
6. – Se agregó NaCl 5 M a una concentración final de 0.7 M

7. – Se puso CTAB-NaCl, a una concentración final del 1%; mezclándose e incubándose a 65 C, 10 minutos.
- 8 –Se agregó 1 volumen de Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se mezcló 10 min y se centrifugó por 5 min a 3500 xg
9. – Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo, resistente al fenol, sin tomar la interfase.
10. – Se añadió un volumen de Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 (Fenol equilibrado con Tris-HCl, pH 8.0). Se mezclaron 10 minutos y se centrifugaron 5 min/3500 xg.
11. – Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.
12. – Se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló suavemente hasta que el ADN precipitó (aproximadamente 15 minutos).
13. – Se centrifugó 15 min a 13800 xg, y posteriormente se tiró el sobrenadante cuidando de no tirar la pastilla y se agregó 1 ml de etanol al 70%. Se cambió a un microtubo nuevo y estéril.
14. – Se microcentrifugó 5 min a 20000 xg y se tiró el sobrenadante. Se dejó secar.
15. – Se resuspendió en solución amortiguadora TE 10 1, se agregó de 200 a 100µl de solución, según el tamaño de la pastilla de ADN. Se guardó a 4 C.

Apéndice 2. Soluciones y reactivos utilizado

□ Solución de Tripsina-Versene

8.0 g NaCl

4 g KCl

0.58 g NaHCO₃

1.0 g Dextrosa

0.5 g Tripsina

0.2 g Versene (EDTA)

cbp 1 L agua mili-Q. Esterilizar por filtración.

□ Solución TE 10:1

10 mM Tris-Cl pH 7.5 a 8.0

1 mM EDTA pH 8.0

□ TBE 5x

54 g Tris base

27.5 g ácido bórico

20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

cbp 1 l Esterilizar en autoclave.

Apéndice 3. Tabla

Tabla 2. Cuantificación del ADN de diferentes bacterias.

Bacteria	ADN, ng/ μ l
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:8	121
<i>Proteus vulgaris</i>	150
<i>Pasteurella haemolytica</i>	3.5
<i>Brucella melitensis</i>	101
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:9	3.3
<i>Salmonella typhi</i>	150
<i>Shigella boydii</i>	127
<i>Escherichia coli</i>	100
<i>Pasteurella multocida</i>	149
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	60

BIBLIOGRAFIA

Stamp: FEB 1995, LIBRARY, BIOLOGIA

Acta, N.P, Szyfres, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y animales. *Organización Panamericana de la Salud* 1977 Publicación científica No. 354. Washington, D.C. E.U.A. 6-22.

Akkermans A D L, Mirza M J, Harmsen H J M, Blok H J, Herron P R, Sessitsch A, Akkermans W M. Molecular ecology of microbes: A review of promises, pitfalls and true progress: *FEMS Microbiology Reviews* 1995; 15:185-194.

Alonso, M.L. y Flores, C.R: Presencia de *Brucella canis* en perros de Monterrey. *Memorias de la Reunión de Investigaciones Pecuarias en México, 1995.*

Alton, G.G., Jones, L.M. and Pietz, D.E., Laboratory Techniques in Brucellosis. 2nd ed. W.H.O., Geneva, pp. 149-154. 1975.

Alton GG, Jones LM, Angus, R.D. and Verger, J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

Allardet-Servent, A., G. Bourg, M. Ramuz, M. Pages, M. Bellis, and Roizes. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella* J. Bacteriol. 170:4603-4607. 1988.

Amato Gauci AJ. The return of brucellosis. *Maltese Medical Journal* 1995. 7:7-8.

Angus, R. D.. & Barton, C.E. The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. *Dev. Biol. Stand.* 1984. 56, 349-356.

Arellano, R B. Comparación de las Técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa y Bacteriología para el Diagnóstico de *Brucella melitensis* en Caprinos Vacunados e Infeccións. Tesis de Grado FMVZ. UNAM. 1998.

Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore DD, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. Short protocols in Molecular Biology 3rd edition. U S A: Willey, pp 2 11-2. 12, 1995.

Baily, G.C Krahn J.B, Drasar B.S, Stoker N.G. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *B. abortus* by DNA amplification. *J Trop. Med Hyg.* 95. 271-275.

Barrera, S.E. Ortiz. L.R. Rojas, M.A. Reséndiz. P.D. 1993 Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo.* pp 50-60

Braun, W., Pomales-Lebron, A., Stinebring, W. R. Interactions between mononuclear phagocytes and *Brucella* strains of different virulence. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1958. 97, 393-397.

Bricker B.J. and Halling S M. Identifying closely related organisms containing common insertion sequence. 1995. *Derwent Biotechnology Abstracts* An: 95-13864.

Carmichael, L.E. and D. W. Bruner. Characteristics of a newly recognized *brucella* species responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet.* 58:579-592 1968.

Carmichael, L.E. Canine brucellosis: Isolation, diagnosis, Transmission *Proc. U.S. Livestock Sanitary Assoc.* 71. 517-527 1968.

Carmichael L, Kenney R. Canina brucellosis the clinical disease pathogenesis and immune response. *J. Am Vet Med. Assoc.* 1970; 156:1726-1734

Carmichael, L.E. Joubert, J. C And Jones, L. 1989. Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs. *Vet. Microbiol.* 19: 373-387.

Carmichael L.E. Brucellosis canina Curso sobre enfermedades infecciosas de los perros. *Vet. Mex.*, XXII: 2, 120-128, 1991.

Carmichael, L.E. and Joubert, J.C.: Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell Vet* 78:63-73. 1988.

Caron, E., Peyrard, T., Köhler, S., Cabane, S., Liautard, J. P., Dornand, J. Live *Brucella spp* Fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes 1994. *Infect. Immun.* 62, 5267-5274.

Caron, E., Liautard, J.P., Köler, S. Differentiated U937 cells exhibit increased bactericidal activity upon LPS activation and discriminate between virulent and avirulent *Listeria* and *Brucella* species. 1994. *J. Leuk Biol* 56, 174-181.

Caron, E., Gross, A., Liautard, P., Dornand, J. *Brucella* species release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF- α expression, active on human macrophage-like cells. 1996. *J. Immunol.* 156, 2885-2893

Cieslak TJ, Robb ML, Drabick CJ, Fisher GW. Catheter-associated sepsis caused by *Ochrobactrum anthropi*: report of a case and review of related non-fermentative bacteria. *Clin Infect Dis* 1992; 14:902-7.

Cioeckaert A, Verger J-M, Grayon M, Crepinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25kDa and 36kDa outer membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology* 1995; 141:2111-21

Cioeckaert A, Salth-Alj Debarrh H, Zygmunt MS, Dubray G. Polymorphism at the *dnk* locus of *Brucella* species and identification of a *Brucella melitensis* species-specific marker. *J Med Microbiol* 1996; 45:200-13.

Corbel M J. Brinley-Morgan W J. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173, En N.R. Krieg y J. G. Holt, editores. *Bergey's manual of systematic Bacteriology*. vol. 1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. 1984 377-387.

Corbel M J. Recent advances in Brucellosis. *J Med Microbiol* 1997, 46:101-103.

Corbel MJ Identification of dye-sensitive strains of *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol* 1991; 29:1066-8.

Corbel MJ, Thomas E L. Use of phage for the identification of *Brucella canis* and *Brucella ovis* cultures. *Res Vet Sci* 1985; 35 35-40.

Da Costa M, Guillou J-P, Garin-Bastuji B, ThiJbaud M, Dubray G. Specificity of six gene sequences for the detection of the Genus *Brucella* by DNA Amplification. *J Appl Bacteriol* 1996; 81:267-75.

De Ley J, Mannheim W, Segers P, Lievens A. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighbourhood of *Brucella* and CDC Group Vd. *Int J Syst Bacteriol* 1987; 37:35-42.

Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaïdo H, Verstrete DR, Winter AJ. Porins of *Brucella* species. *Infect Immun* 1984; 44:16-21.

Erlich, H.A (editor). PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. USA: Stockton press, 1989.

Ewalt DR, Payeur JB, Martin BM, Cummins DR, Miller WG. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest* 1994; 6:448-52.

Fekete A, Bantle J.A, Halling SM. 1992^a. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 79-83.

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

Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, Adams LG. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 1989; 57:3281-91.

Fitch, T.A; Husseinen. H.S; Derr, J. And Bearden, S.W. species-specific sequences at the Omp2 locus of *Brucella* type strains. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 46.1. 329-331. 1996.

Flores, C.R. y Segura, L.R: Estudio sobre *B. canis* en México. *Técnica Pecuaria en México.* 29:54-58, 1975

Flores C.R.: Estudio sobre la Presencia de *B. canis* en México. Resúmenes de la XII Reunión Anual. Inst. Nal. De Investigaciones Pecuarias, S.A.G, México, 1975.

Fox KF, Fox A, Nagpal M, Steinberg P, Heroux K. Identification of *Brucella* by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation of *Brucella canis* from other *Brucella* spp. pathogenic for humans by carbohydrate profiles. *J. Clin. Microbiol.* 36(11):3217-22. 1998.

Gazapo E, Lahoz J G, Subiza J L, Baquero M, Gil J. Changes in IgM and IgG Antibody Concentrations in Brucellosis. Over Time: Importance for Diagnosis and Follow-up. *J Inf Dis* 159:2, pp 219-225. February. 1989.

Gaoneim, N.H, Woods, G.T: Serological epidemiology of *Brucella canis* in a hospitalized and referral population of dogs and cats in Illinois. *Canine Pract.* 11:17-27, 1984.

Gibbs, R. 1991. "Polymerase Chain Reaction Techniques". *Current Opinion in Biotechnology.* Vol. 2. Pp. 69-75.

Gilbert S A, Timoney P J, Mc Collum W H, Dereg T D. Detection of Equine arteritis virus in the semen of carrier stallions by using a sensitive nested PCR assay. *J. Of Clin. Microbiol* 1997; 35:8, 2181-2183.

Gillespie, J. E. y Timoney J.F. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. La Prensa Médica Mexicana, 4ª. Edic. México, D.F. 1983.

Greene, C.E, George, L.W: Canine brucellosis, in *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat.* Philadelphia, WB Saunders Co. 1984, pp 646662

Herman, L, De Rider Z. 1992. Identification of *Brucella* spp by using the polymerase chain reaction. *Appl. Env. Microbiol* 58, 2099-2101.

Harmon, B. G., Adams, L. G., Frey, M. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. 1988 *Am J. Vet. Res.* 49, 1092-1097.

Hernández M, I. Peña, F. G. Betancourt M X. Brucelosis. Manual de Procedimientos de Laboratorio INDRE/SAGAR. Editor Alejandro Escobar Gutiérrez 1996. Pag. 26 - 30.

Herman, L; De Ridder, H. Identification of *Brucella spp.* By using the Polymerase Chain Reaction. Applied and Environmental Microbiology. 58:6. 2099-2101. 1992.

Hornitzki, M, Searson J. 1986. The relationship between the isolation of *Brucella abortus* and serological status of infected, non-vaccinated cattle. *Aust. Vet. J.* 63, 172-174.

Husseinien, H.S. Genetic variation among *Brucella* at the Omp2 locus. Tesis Ph. D. Vet. Sci. Cairo University. Egypt. 1993.

Innis, M.A; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J and White, T.J (editors) PCR Protocols, a guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc. U.S.A., 1990.

Johnson, C.H: Desordenes de la gestación. *Rev Vet. AMMVEPE.* 3:9, 1990.

Johnson CA, Bull RW, Schirmer RG: Peripheral lymphocyte function in dogs with *Brucella canis* infection. *Vet Immunopathol.* 14:425-431, 1983.

Jumas-Bitlak E, Maugard C, Michaux-Charachon S, Allardet-Servent A, Perrin A, O'Callaghan D. Study of the organization of the genomes of *Escherichia coli*, *Brucella melitensis* and *Agrobacterium tumefaciens* by insertion of a unique Restriction site". *Microbiology* 1995; 141:2425-32.

Leal-Kievezas, Martínez-Vazquez I.O. 1995. Single-step PCR for detection of *Brucella spp.* From blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol.* 33:12. 3087-90.

Leal, K.D.S.; López, M.A. y Martínez, S.J.P. Molecular Detection of *Brucella spp.* Rapid identification of *B abortus* biovar iusing PCR *Archives of Medical Research.* 26. 3. 263-267 1992.

Lehninger A., L.D. Neison, M.M. Cox. Principles of Biochemistry, 2ª ed Wort Publishers, N.Y. 1993.

López M A, López R, Ocampo D A, Hernández Y, González F. Brucelosis: Avances y perspectivas, Publicación técnica del INDRE. México 1991: No. 6. 2-22.

Mac Fadden. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana pp. 183-189. 1990.

Martínez-Soriano, J.P.E.L. Cab-Barrera, R. Tamez-Gonzalez and D.S., Leal-Kievezas. Detección de *Brucella abortus* por medio de la Reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica* 18(4): 10-16. 1993.

Matar G M, Khneisser I A, Abdelnoor A M. Rapid laboratory confirmation of human Brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-Kilodalton *Brucella* antigen DNA, *J of Clin Microbiol* 1996; 34 2, 477-478.

Michaux, S, J. Paillison, M.J. Carles, Nurit. G. Bout, A. Allardet-Servet y M. Ramuz. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J. Bacteriol.* 1993. 175. 701-705.

Material safety data sheet-101 Health Protection Branch-Laboratory Centre for Disease Control. <http://intranet.michener.on.ca/msds/mchem/mxelia.htm> , 1999.

Minnick MF, Stiegler G L. Nucleotide sequence and comparison of the 5S ribosomal genes of *Rochalimaea henselae*, *R. quintana* and *Brucella abortus*. *Nucleic Acids Res* 1993, 21:2518.

Moriyón. I. y I. López-Goñi. 1998 Structure and properties of the outer membrane proteins of *Brucella* *FEMS Microbiology Letters* 145:1-8

Moyer P N, Hausler W Jr. The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology Isolation Identification Applications, 1991

O'Hara. M.J; Collins, D.M. and Delisle, G.W. Restriction endonuclease analysis of *Brucella ovis* and other *Brucella* species. *Vet. Microbiol* 10. 425-429. 1985.

Perry M B, Bundle D R. Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of *Brucella* In: Adams LG, editor. *Advances in Brucellosis Research* Austin (TX): Texas A & M University, 1990, 6 1801-7.

Persing, D. H. In vitro Amplification Techniques. In Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications. Edited by David H. Persing, Thomas F. Smith, Fred C. Tenover and Thomas J. White. American Society for Microbiology. USA, pp 76, 122-125. 1993.

Rencux G, Alton G, Amaransinghe A, Saquet E. Presence et repartition de *Brucella melitensis* dans les tissus et les organes des caprins artificiellement infectés. Ext. Arch. Inst. Pasteur. Tunis. 33:397-402 1956.

Rielman DA, Lepp PW, Sadler KN, Schmidt TM. Phylogenetic relationships among the agent of bacillary angiomatosis, *Bartonella bacilliformis*, and other alpha-proteobacteria. Mol. Microbiol 1992; 6:1801-7.

Rigby CE, Fraser ADE. Plasmid transfer and plasmid-mediated Genetic Exchange in *Brucella abortus*. Can J Vet Res 1989; 53:326-30.

Riegelman R K, Hirsch R P. Como estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica. Organización Panamericana de la Salud. 2ª edición. E.U.A., 29-36, 1992.

Riezu-Boj, J.I., I.Moriyón, J.M. Blasco, C. Gamazo, R. Díaz, y A.J. Winter. 1990. Analysis by immunoblot of the antibody response of sheep infected by smooth and rough *Brucellae* to outer membrane proteins extracted with hot saline. *Infect Immun* 58: 489-494.

Rijpens NP, Jannes G, Van Asbroeck M, Rossau R, Herman LMF (1996). Direct detection of *Brucella spp.* in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes *Appl Env. Microbio* 62, 1683-1688.

Romero, C.; Gamazo, C.; Pardo, M. And López Goffi, J. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J. Of Clinical Microbiology. 33.3. 615-617. 1995

Ross HM, Foster G, Reid RJ, Jabans KL, MacMillan AP. *Brucella* species infection in sea mammals. Vet Rec 1994, 132 359

Ruiz, C.M. Brucelosis. 3ª. Edición. México: *La Prensa Médica Mexicana*, 1-13, 1986

Saiki, R. K, D.H. Gelfand, S. Staffer, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.R. Hora. K.B. Mullis, and H.A. Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491 1988.

Sangari FJ, García-Lobo JM, Agüero J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. FEMS Microbiol Lett 1994; 121:337-42.

Stevenson L H. A case for bacterial dormancy in aquatic systems. Microbial Ecology. 4:127-133. 1978.

Swenson, R.M., Carmichael, L.E. and Cundy K.P.: Human infection with *Brucella canis*. Annals. Int. Med. , 76: 435-438. 1972.

Tcherneva. E, Rijpens, N, Naydensky, C. Herman, L. Repetitive Element sequence based polymerase chain reaction for Typing of *Brucella* strains Veterinary Microbiology 51; 169-178. 1996.

Thompson D W, Walter D S. A reappraisal of the kappa coefficient. J. Clin. Epidemiol. 41(19):949.958. 1988.

Vázquez N. J. Utilización de un antígeno de *Brucella canis* teñido con rosa de bengala, para diagnosticar la brucelosis canina. XXII Con. Nac. De Microb. 21-24, Mayo en Acapulco, México, 1991.

Vergier JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M. *Brucella* A monoespecific Genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization Int J Syst Bacteriol 1985;35: 292-5.