



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMPARACION DE *Brucella melitensis* CEPA VACUNAL
REV1 Y CEPAS DE CAMPO MEDIANTE EL
POLIMORFISMO DEL GEN *RpsL* UTILIZANDO LA
REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

JIMENA BALLI GARZA

ASESORES: M. EN C. RIGOBERTO HERNANDEZ CASTRO
DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ



MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

El cinismo consiste en ver las cosas como realmente son, y no como se quiere que sean.

La tierra es un teatro, pero tiene un reparto deplorable.

Oscar Wild

No os espante el dolor; o tendrá fin o acabará con vosotros.

Séneca

Así como una jornada bien empleada produce un dulce sueño, así una vida bien usada causa una dulce muerte.

Leonardo Da Vinci

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Linaera Ball
Garza

FECHA: 15/11/01

FIRMA: [Firma]

Esta tesis fue realizada gracias al financiamiento del proyecto de investigación

PAPIIT- IN205701

DEDICATORIAS

A mi padre Federico Ballí Gonzalez

A mis hermanos Federico Ballí y Helena Ballí

A mis tíos Aurelio, Ma. Luisa, Raúl, Ma. Elena, Martín, Ma. Concepción y Rodolfo

A todos mis primos que siempre han estado conmigo

A mi abuela Herminia González

AGRADECIMIENTOS

A mi papá, por siempre apoyar y respetar mis decisiones, por buscar lo mejor para mí. A mi mamá por enseñarme lo difícil que puede ser la vida.

A mis hermanos por enseñarme a tener carácter y a mantenerme siempre de pie. Federico por su ejemplo de nobleza, por su terquedad que me han ayudado a aprender a defender mis creencias y Helena por sus pláticas de aliento y cariño incondicional.

A mis asesores:

Rigoberto Hernández por ayudarme a realizar este trabajo, por enseñarme lo que es y significa la paciencia y lo que es la desesperación y la neurosis, por enseñarme que hay que perseverar para alcanzar una meta, por el gusto de haber trabajado a su lado.

Antonio Verdugo por creer y confiar en mí, por todo el apoyo que me has dado durante todo este tiempo y por la oportunidad de estar aquí.

A mi jurado por sus críticas constructivas y por ayudarme a realizar este trabajo mejor.

A Francisco Basurto por ser amigo, compañero y confidente, gracias por toda la paciencia y por todo tu apoyo.

A mis grandes amigas: Laura (mi guía espiritual!!!!!!), por tus buenos consejos, por escucharme siempre que lo he necesitado y sobre todo, por enseñarme por donde caminar. A Ivonne (Yorkie), por todos esos momentos tristes y alegres que pasamos y disfrutamos juntas, gracias por tu sinceridad y tu apoyo incondicional.

A Karla, por estar ahí en el momento justo. A Juan José (Chaquillo) por todas las pláticas que hemos tenido y que me han ayudado tanto a no desesperar cuando todo parece perdido, por todas esas risas que compartimos.

A Ramón, por ayudarme a encontrar mi camino, a saber que quiero y luchar por ello, por enseñarme a no dejar que nada se interponga para conseguirlo. A Matias, por llegar justo

en el momento indicado, gracias por compartir el humor negro, el cinismo y el sarcasmo que sólo nosotros conocemos, solo alguien como tu podría entender y saber justo que es lo que pienso y siento.

A mis amigos Héctor, Carlos Macias, Mao, César, José C., Arlette, Alain, Carlos Mendieta, Ma. Emilia y Maricarmen Mora por estar presentes de una u otra forma durante las distintas etapas de mi vida, por formar parte de ella, por los buenos y malos momentos que vivimos, sin ustedes tal vez las cosas no serían como son.

A mi Soré, por todas esas noches de desvelo a mi lado, por ser un apoyo de cuatro patas verdaderamente incondicional y por estar ahí en los momentos de tristeza.

A mis compañeros del laboratorio de diagnostico, en especial a Raúl por la confianza que me has tenido y por todo lo que me has enseñado, a Lorena, por escucharme en los momentos difíciles, a Maritoña, por enseñarme a trabajar y a Cristina Rodríguez por todo el apoyo brindado durante todo este tiempo, por confiar en mi y por apoyarme en todo momento.

A Myrna Vicencio, por enseñarme como trabajar en un laboratorio, por ayudarme a ver que esto es lo que realmente quiero y por enseñarme a luchar por ello.

A todos mis compañeros del laboratorio de Tuberculosis por toda la ayuda brindada durante esta etapa.

A mis amigos del departamento de Microbiología e Inmunología que de una u otra manera ayudaron a completar este trabajo.

CONTENIDO

	<u>PÁGINA</u>
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Características generales.....	3
1.2 Características microscópicas, morfología y fisiología.....	3
1.3 Especies del género <i>Brucella</i>	4
1.4 Epidemiología.....	5
1.5 Historia y distribución.....	6
1.6 Patogenia.....	6
1.7 Transmisión.....	10
1.8 Signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas.....	11
1.9 Diagnóstico y prevención.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVO.....	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
5.1 Cepas bacterianas.....	21
5.2 Extracción de ADN	23
5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	23
5.4 Análisis de restricción del producto amplificado.....	26
6. RESULTADOS.....	27

	<u>PÁGINA</u>
6.1 Extracción de ADN.....	27
6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	30
6.3 Análisis de restricción del producto amplificado.....	33
7. DISCUSIÓN.....	37
8. CONCLUSIÓN.....	41
9. LITERATURA CITADA.....	42

RESUMEN

Ballí Garza Jimena. Comparación de *Brucella melitensis* cepa vacunal Rev1 y cepas de campo mediante el polimorfismo del gen *rpsL* utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Bajo la dirección del MVZ Rigoberto Hernández Castro y del MVZ Antonio Verdugo Rodríguez.

Brucella melitensis es el agente causal de la brucelosis en ovinos y caprinos, así mismo, es considerada una de las mayores zoonosis bacterianas del mundo.

En el presente trabajo se compararon cepas de campo de *Brucella melitensis* utilizando el polimorfismo del gen *rpsL*, se utilizaron 18 cepas aisladas a partir de casos clínicos, identificadas previamente como *B. melitensis*.

Mediante PCR, utilizando un par de oligonucleótidos que amplifican el gen *rpsL*, en todas las cepas de *Brucella* se amplificó un producto de aproximadamente 510 pb.

A partir de los productos de la PCR, se realizó un análisis de restricción del producto amplificado para poder diferenciar la cepa vacunal Rev1 de las cepas de campo de *B. melitensis*. En el caso de la cepa vacunal de *B. melitensis* Rev1 se obtuvieron dos fragmentos de 337 pb y 173 pb, mientras que para la cepa de referencia 16M se obtuvieron tres fragmentos de 337 pb, 114 pb y 59 pb.

En el caso de las cepas obtenidas a partir de casos clínicos se concluye que son cepas de campo, no encontrándose ninguna cepa vacunal.

Estos resultados indican que la técnica de PCR puede utilizarse como técnica diagnóstica, ya que es capaz de identificar a partir de muestras clínicas, la presencia de *Brucella* spp., así como diferenciar cepas de campo de *B. melitensis* de la cepa vacunal Rev1.

SUMMARY

Ballí Garza Jimena. Comparison of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev1 and field strains by means of the polymorphism of the *rpsL* gene using the Polymerase Chain Reaction (PCR). Under the direction of the MVZ Rigoberto Hernandez Castro and the MVZ Antonio Verdugo Rodriguez.

Brucella melitensis is considered the causal agent of ovine and caprine brucellosis, it is also considered one of the major worldwide bacterial zoonosis.

In the present work, the molecular differences between field strains of *Brucella melitensis* and the Rev1 vaccine strain were compared. Eighteen isolated strains from clinical cases previously identified as *B. melitensis*, were used. Then, two oligonucleotids which amplify the *rpsL* gen was used for the PCR. An approximately 510 bp product was amplified from all *Brucella* strains tested.

A restriction analysis was made from the products of the PCR to differentiate the vaccine strain Rev1 from the field strains of *B. melitensis*.

Two fragments were obtained in the case of the *B. melitensis* vaccine strain Rev1: 337 pb and 173 pb, whereas three fragments were obtained for the reference strain 16M: 337 pb, 114 pb and 59 pb.

In the case of the strains obtained from clinical cases, all of them showed a field strains pattern demonstrating that there is no vaccine strain.

These results indicate that the PCR can be used as a diagnosis technique, since is capable to identify from clinical samples the presence of *Brucella* spp., as well as to differentiate field strains of *B. melitensis* of the vaccine strain Rev1.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1 Características generales

La brucelosis es una de la zoonosis mas importantes del mundo, siendo los humanos susceptibles a tres especies de *Brucella* las cuales, en orden de importancia, son: *Brucella melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* ^{1, 2, 3, 4, 5, 6}. Debido a que ocasiona abortos y se secreta por medio de la leche de animales infectados, así como por placentas y fetos ^{1, 7}, las formas de contagio son mediante leche y derivados lácteos sin pasteurizar, así como por contacto directo con tejidos infectados o directamente con el microorganismo ^{7, 8}. A pesar de que *B. canis* no es considerada como patógena para el humano, se han reportado casos de infección por esta, sin embargo, estos han sido a nivel de laboratorio ^{5, 9}.

En México, la brucelosis fue reconocida a principios de 1900, desde entonces se han reportado un gran número de reportes en humanos y hasta la fecha sigue siendo una de las enfermedades bacterianas más importantes en este país. La brucelosis humana se caracteriza por ser una enfermedad multisistémica, la cual requiere un tratamiento periódico ⁹, algunos de los signos son: anorexia, cefalea, fatiga, fiebre y pérdida de peso entre otros. En México se reporta al año un promedio de 2000 casos nuevos de brucelosis, donde la especie con mayor frecuencia de aislamiento es *B. melitensis* con 93% ⁸.

1.2 Características microscópicas, morfología y fisiología

Los microorganismos que pertenecen al género *Brucella* son cocobacilos Gram negativos, con puntas redondeadas, miden 0.6 a 1.5 μm de largo y 0.5 a 0.7 μm de ancho, son aerobios, intracelulares facultativos que pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de células fagocíticas y trofoblastos, así como, sobrevivir a la acción bactericida del suero,

son inmóviles, no producen esporas ni cápsula, flagelos o pilus, no fermentan carbohidratos convencionales^{10, 11, 12}. Son poco exigentes, por lo que se pueden aislar en medios sólidos básicos como el agar tripticasa soya^{10, 12}.

La expresión del lipopolisacárido se asocia a la morfología colonial ya que es un componente de la membrana externa^{2, 5}; *Brucella* spp. llega a presentar una morfología lisa o rugosa y algunas cepas pueden ser de fenotipo mucoide. Llega a darse el caso de que colonias lisas se conviertan en rugosas de forma espontánea, así como, colonias rugosas reviertan a lisas, este cambio de cepas lisas a rugosas se asocia a una disminución en la virulencia. Algunas especies rugosas naturales como *B. ovis* o *B. canis* a pesar de ser completamente virulentas para sus hospedadores naturales, se ha demostrado que en comparación con las cepas lisas son menos virulentas en el resto de las especies, incluso en el humano⁴.

1.3 Especies del género *Brucella*

El género *Brucella* comprende 6 especies. Esta clasificación está hecha con base en su preferencia por un hospedador y con diferencias en patogenicidad: *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (caprinos), *B. canis* (perros), *B. ovis* (ovinos), *B. suis* (cerdos) y *B. neotomae* (rata de desierto)^{4, 6, 10, 12, 13}.

Con base en características fenotípicas, algunas de las especies de *Brucella* han sido dividida en biovariedades: *B. abortus* (7 biovariedades), *B. melitensis* (3 biovariedades) y *B. suis* (5 biovariedades)^{10, 12, 14}. Recientemente se han descrito dos especies que afectan mamíferos marinos: *B. pinnipediae* y *B. cetaceae*, ampliando así su espectro ecológico^{14, 15, 16, 17, 18} (**Cuadro 1**). A pesar de las diferencias fenotípicas que tienen entre sí las distintas especies de *Brucella*, todas comparten por lo menos un 90% de similitud en el ADN, por lo que se ha propuesto que este es un género monoespecífico, donde todos los

tipos deberán tomarse como biovariedades de *B. melitensis* ^{19, 20, 21}. Sin embargo, en el Congreso Internacional de Brucelosis del año 2003 se consideró conservar la nomenclatura clásica de *Brucella*.

Cuadro 1

Preferencias de hospedador de <i>Brucella</i> spp.	
Especie	Hospedador
<i>B. melitensis</i>	Borregos, cabras
<i>B. abortus</i>	Bovinos
<i>B. suis</i>	Biovariedad 1: cerdos
	Biovariedad 2: cerdos y liebres
	Biovariedad 3: cerdos
	Biovariedad 4: renos
	Biovariedad 5: roedores de vida silvestre
<i>B. neotomae</i>	Rata de desierto
<i>B. ovis</i>	Borregos
<i>B. canis</i>	Perros

1.4 Epidemiología

La brucelosis tiene un gran impacto económico en la industria agropecuaria debido a los problemas de baja fertilidad, disminución en la producción láctea, abortos en el último trimestre de la gestación y crías débiles, por lo que es importante llevar a cabo un plan de control de la enfermedad ^{10, 22}. Cabras y borregas preñadas infectadas con *B. melitensis*, suelen abortar en el último trimestre de preñez, cuando los hatos son grandes la enfermedad se puede esparcir con mucha facilidad después de un aborto ocasionando problemas severos de salud para los animales y manejadores ²².

En México existe una Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales la cual comprende bovinos, caprinos y ovinos (NOM-041-ZOO-1995). Dentro de la campaña que comprende a los caprinos y ovinos se utilizan dos pruebas oficiales de diagnóstico: prueba primaria, rosa de bengala y como prueba confirmatoria, se utiliza la fijación de complemento ^{8, 12}. Para el control de la enfermedad se utiliza la vacuna viva atenuada de *B. melitensis* cepa Rev1, la cual es considerada la mejor vacuna disponible para la

profilaxis de la brucelosis en pequeños rumiantes ^{3, 4, 6, 10}, sin embargo, la dosis estándar utilizadas en animales con una preñez tardía pueden ocasionar abortos y no necesariamente proteger contra la enfermedad, asimismo, se ha reportado que inyecciones accidentales pueden infectar al humano, ya que esta cepa es viva y virulenta ^{3, 4, 6, 12, 23, 30}.

1.5 Historia y distribución

En el año de 1883, Bruce aisló, a partir de bazos de soldados británicos muertos por cuadros febriles, un pequeño micrococo, la cuál era el causante de una enfermedad común en el personal militar que había ido a la isla de Malta. El nombre que se le dio a esta bacteria fue *Micrococcus melitensis*, la caracterización de la enfermedad en humanos se publicó en 1897 y se le denominó fiebre ondulante o fiebre de malta, debido a las fiebres recurrentes que sufren los pacientes ¹⁹.

Actualmente, la brucelosis es considerada una enfermedad de distribución mundial, países como Noruega, Suecia, Dinamarca, Finlandia y Australia han logrado su eliminación total. En cambio, se encuentra presente en México, países de Centroamérica y Sudamérica, así como, en países del Medio Oriente, Mongolia y Rusia ^{10, 22, 30}.

1.6 Patogenia

Brucella es un parásito intracelular facultativo que ha evolucionado para poder sobrevivir dentro de células fagocíticas profesionales y no profesionales ^{7, 24}, pudiendo permanecer sin ser detectada por el sistema inmune, es capaz de inhibir la actividad bactericida del suero ², así como, la fusión fagosoma-lisosoma, evita la degranulación primaria, y resiste la actividad de la mayoría de los antibióticos. El sistema inmune del hospedador también ha evolucionado para poder controlar la infección por este microorganismo, apoyando así

el sistema patógeno-hospedador ²⁴. Su resistencia a las acciones bactericidas parece radicar en una habilidad de manipular en cierto grado la respuesta del hospedador a su propio beneficio. La resistencia de *Brucella* en el organismo puede deberse en parte a una circulación intracelular alterada para evitar la fusión lisosomal contenida en vacuolas especializadas en el retículo endoplásmico ^{6, 24}.

Recientemente se ha descubierto que algunos de los genes involucrados en la supervivencia de *Brucella* dentro de macrófagos, son homólogos a los genes que participan en la simbiosis de bacterias patógenas para plantas (*Sinorhizobium meliloti*). Los genes rizobiales *bac*, los cuales participan en la diferenciación bacteriana son homólogos a los genes involucrados en la supervivencia de *Brucella* dentro de macrófagos. El sistema de regulación de dos componentes de *Brucella* BvrR y BvrS, son similares a los genes *exoS* de *S. meliloti*. Mutantes en los sistemas BvrR y BvrS tienen una reducida capacidad para invadir macrófagos y para replicarse intracelular ²⁰.

A diferencia de la mayoría de las bacterias, *Brucella* carece de los típicos factores de virulencia tales como: cápsula, fimbria, exotoxinas, exoenzimas, variaciones antigénicas y plásmidos entre otros.

Uno de los factores de virulencia mejor definido es el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) ²⁵, a diferencia de otros patógenos, los genes de *Brucella* que controlan la supervivencia e infección de esta dentro del hospedador es cerca del 8%, por el contrario, posee un gran número de genes que controlan una amplia variedad de actividades metabólicas que le permiten la supervivencia en distintos medios, esto contradice el dogma "los genes de virulencia adquiridos horizontalmente" son esenciales en la evolución de la patogénesis ^{24, 25}. *Brucella* puede penetrar mucosas introduciéndose en los linfonodos, los cuales se vuelven hemorrágicos resultando en una bacteremia, la cual facilita la diseminación en el hospedador ^{24, 26}.

Las especies patógenas para el humano son *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis*, las cuales son especies lisas ². El LPS ayuda a las bacterias a evitar la acción bactericida del suero, lo largo y la proporción de éste en la superficie bacteriana influye en la capacidad para evitar la respuesta mediada por el complemento, esto se debe a que el LPS de *Brucella* es menos inmunogénico que el LPS de las enterobacterias, de igual manera, no estimulan de forma significativa la vía alterna del complemento, así como, limita su deposición en la superficie bacteriana ².

Además, la cadena O es un antígeno inmunodominante capaz de inducir una respuesta inmune en animales que han sido expuestos a cepas de *Brucella* lisas, por lo que tiene un papel central en el diagnóstico serológico, ya que éste se basa en la detección de anticuerpos contra el antígeno O, para la síntesis de esta cadena se necesita del gen *wboA* ⁴, el cual se encuentra interrumpido en algunas especies rugosas; a pesar de ello, *B. ovis* y *B. canis* son especies rugosas de forma natural y son completamente virulentas para sus hospedadores primarios, sin embargo, son menos virulentas comparadas con especies lisas ^{2,4}.

Se ha descubierto que un gran número de microorganismos patógenos poseen sistemas especializados de secreción; un ejemplo es el sistema de secreción tipo IV, el cual también se ha descrito como un sistema de conjugación adaptada, ya que es homólogo con los sistemas de transferencia clásica de los plásmidos, debido a esto se ha propuesto que los microorganismos han adquirido y adaptado este sistema a partir de plásmidos, sin embargo, a pesar de la homología, en varios casos se ha demostrado que en realidad son aparatos para exportar proteínas y toxinas. Estos sistemas son considerados la clave para la supervivencia intracelular, asimismo, para su replicación, están formados por dos estructuras primarias; un pilus y un complejo exportador asociado a la membrana ^{27, 28}.

En el caso de *Brucella*, el sistema de secreción tipo IV es codificado por el operón *virB*, este operón está formado por una familia de doce proteínas. Los primeros miembros descritos de esta familia sirven principalmente para transferir ADN tumoral o complejos nucleoproteínicos durante la conjugación bacteriana de *Agrobacterium* a células de plantas^{28, 29}. La proteína VirB2, es el mayor componente del pili de virulencia del aparato de secreción tipo IV de *A. tumefaciens*, cuya función precisa aún se desconoce, aunque puede iniciar el contacto célula-célula y permitir la transferencia del sustrato a través de una estructura de canal²⁷.

El papel que desempeña el sistema VirB en *Brucella* en su virulencia aún no es claro, se han hecho estudios donde se han empleado cepas mutantes en la región *virB* de *B. abortus* y *B. melitensis* y se ha observado que éstas han perdido su capacidad para modular el tráfico intracelular^{27, 29}.

En el sistema de secreción tipo IV, VirB, es esencial para la multiplicación y supervivencia intracelular de *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis*, ya que este sistema parece necesario para la transmisión de señales para remodelar los autofagosomas a un compartimiento que permita la replicación intracelular^{27, 29}. Debido a que el género *Brucella* no contiene plásmidos, es probable que el sistema de secreción tipo IV, codificado por los genes *virB*, esté relacionado mas bien con secreción de proteínas que con conjugación, asimismo, parece formar parte del establecimiento de compartimentos en el retículo endoplásmico que permita su replicación. Los fagosomas que contienen a *Brucella* se acidifican rápidamente, esta acidificación es esencial para la replicación intracelular de estas bacterias, cuando la acidificación de fagosoma es bloqueada con cloruro de amonio durante las primeras horas de infección, la multiplicación de *Brucella* es inhibida, estos resultados han demostrado que la acidificación del fagosoma es un estímulo necesario para la multiplicación de *Brucella* mediado por la expresión del operón *virB*²⁹.

1.7 Transmisión

Brucella melitensis es causante de pérdidas económicas significativas debido a que ocasiona una baja en la producción animal, de igual manera, infecciones en humanos. *Brucella melitensis* es la especie del género *Brucella* mas virulenta y a la vez, la menos especie específica pudiendo infectar de esta forma a vacas, camellos y perros^{2, 3, 5, 8}, en borregos y cabras es una de las mayores causantes de abortos⁷.

La expresión de la enfermedad depende de la habilidad de *Brucella* de sobrevivir y persistir intracelularmente dentro de células fagocíticas profesionales. La localización intracelular de la bacteria depende de la célula que esté infectando cuando se encuentra en trofoblastos se localiza en la cisterna de retículo endoplásmico rugoso, en macrófagos se puede localizar en fagosomas y fagolisosomas, así como, en la cisterna del retículo endoplásmico rugoso y cuando está en células epiteliales se puede encontrar en membranas vesiculares²⁴.

Brucella utiliza las mucosas como vía de entrada principal, siendo las vías oral, conjuntival o respiratoria las más frecuentes. La vía primaria de diseminación y contagio hacia animales es por medio de la placenta, fluidos fetales y descargas vaginales expedidas por hembras infectadas después del aborto o del término de la gestación, es común encontrar *Brucella* en secreciones de la ubre y semen y se puede aislar de linfonodos de la cabeza y aquellos asociados al aparato reproductor y de lesiones artríticas^{7, 6, 10, 12, 19, 24}. La secreción de los microorganismos por leche de los animales infectados es considerada una causa secundaria de diseminación en la granja, sin embargo es considerada como la mayor ruta de infección en humanos al ser consumidos como productos lácteos sin pasteurizar^{7, 3, 6, 30}.

1.8 Signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas

Las lesiones patológicas en animales domésticos se ven influidas por la especie o cepa de *Brucella*, la inmunidad adquirida e innata del hospedador, la ruta de infección, madurez sexual, estado de preñez y la dosis de infección ²³.

Durante la infección temprana, los linfonodos que estén drenando en los sitios cercanos, tienen una marcada hiperplasia e hipertrofia acompañada de una linfadenitis neutrofílica y eosinofílica, mientras que en etapas tardías los linfonodos que irrigan la glándula mamaria, la cabeza y el tracto reproductivo desarrollan linfadenitis granulomatosa crónica ²³.

Los signos clínicos en animales son: abortos, nacimiento de crías débiles, retención placentaria, el útero generalmente presenta endometritis purulenta y erosionante, metritis fibrosa, vasculitis necrosante caruncular ^{10, 12, 24}. En fetos se puede observar bronconeumonía fibrinopurulenta necrosante, alveolitis neutrofílica monocítica, arteritis, linfangitis tromboembólica necrosante y pleuritis fibrinopurulenta; en hígado, bazo, riñones y linfonodos se pueden encontrar granulomas ²⁴.

El sistema reproductor o el sistema musculoesquelético se ven involucrados en cualquiera de los sexos, desarrollando en articulaciones afectadas sinovitis granulomatosa con proliferación de vellocidades, tendovaginitis proliferativa, artritis con erosiones articulares que se pueden asociar a bursitis granulomatosa supurativa ²⁴.

En el caso de los machos se puede manifestar de diversas formas, los testículos suelen tener adhesiones unilaterales o bilaterales de la túnica visceral a la parietal, se presenta orquitis con degeneración de los túbulos seminíferos, orquitis intratubular necrosante, epididimitis y periorquitis fibrinopurulenta ^{10, 12, 24}. En humanos *Brucella melitensis* es causante de una de las mas serias zoonosis bacterianas en el mundo. Entre los signos y síntomas que ocasiona son: fiebres ondulantes, pirexia, artritis, anorexia, cefalea, pérdida

de peso, fatiga, osteomielitis, espondilitis, demencia y en raros casos endocarditis y meningitis^{9, 10, 12, 22}.

1.9 Diagnóstico y prevención

El aislamiento de la bacteria a partir de muestras clínicas se considera como el estándar de oro, sin embargo, éste puede tardarse más de dos semanas y varios de los criterios de identificación son subjetivos, como la morfología de las colonias^{12, 14}.

Previo al cultivo se debe hacer una tinción para verificar que el microorganismo esté presente, aunque no es considerado ácido alcohol resistente se puede utilizar la tinción de Stamp, la cual es una modificación de la tinción de Ziehl-Neelsen y por lo general se utiliza para teñir fluidos biológicos que han sido previamente fijados con calor o etanol, por este método *Brucella* se tiñe rojo, mientras que, el fondo se tiñe azul. A pesar de la utilidad de la tinción de Stamp, las muestras también se deben teñir con Gram, esto se debe a que *Brucella* también es considerada como una bacteria Gram negativa¹².

Para la identificación de las distintas especies de *Brucella* y de sus biovariedades, se realizan cuatro pruebas: requerimientos de dióxido de carbono (CO₂), producción de ácido sulfhídrico (H₂S), sensibilidad a los colorantes tionina y fucsina y por último, aglutinación con antisueros específicos A y M^{10, 31} (**Cuadros 2 y 3**).

Cuadro 2

Características diferenciales entre especies del género <i>Brucella</i>				
Especie	Morfología colonial	Requerimiento de suero	Oxidasa	Ureasa
<i>B. melitensis</i>	Lisa	-	+	+
<i>B. abortus</i>	Lisa	-	+	+
<i>B. suis</i>	Lisa	-	+	+
<i>B. neotomae</i>	Lisa	-	-	+
<i>B. ovis</i>	Rugosa	+	-	-
<i>B. canis</i>	Rugosa	-	+	+

Cuadro 3

Diferenciación de biovariedades							
Especie	Biovariedad	Requerimiento de CO ₂	Producción de H ₂ S	Crecimiento en		Aglutinación con antisueros	
				Tionina	Fucsina básica	A	M
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+
	2	-	-	+	+	+	-
	3	-	-	+	+	+	+
<i>B. ovis</i>	1	+	-	+	-	-	-
<i>B. abortus</i>	1	+	+	-	+	+	-
	2	+	+	-	-	+	-
	3	+	+	+	+	+	-
	4	+	+	-	+	-	+
	5	-	-	+	+	-	+
	6	-	-	+	+	+	-
	9	+ ó -	+	+	+	-	+

Brucella melitensis no necesita CO₂ o suero para su crecimiento, puede ser aislada en condiciones de aerobiosis a una temperatura de 37°, en medios generales tales como el agar tripticasa soya puede llegar a crecer, sin embargo se recomienda utilizar medios selectivos para evitar el crecimiento de contaminantes y enriquecidos para el aislamiento, tales como, el medio Farell, sin embargo, las concentraciones de ácido nalidíxico y bacitracina en este medio pueden tener un efecto inhibitorio para el crecimiento de algunas cepas de *B. melitensis* y *B. ovis*, por lo que se recomienda utilizarlo conjuntamente con otros medios menos selectivos^{10, 12}. El medio bifásico de

Ruiz-Castañeda se utiliza para muestras clínicas de sangre o leche. Para el aislamiento bacteriológico a partir de tejidos, se prefiere utilizar órganos del sistema retículo endotelial, aunque se puede aislar a partir de fetos, membranas fetales, leche, semen, entre otros. El crecimiento generalmente es de dos a tres días, aunque no se puede declarar una muestra como negativa hasta después de diez días de incubación ¹².

Para tener un diagnóstico integral se deben utilizar en forma conjunta, pruebas serológicas y pruebas bacteriológicas, estas pruebas fueron establecidas en la Norma Oficial Mexicana para el Control y Erradicación de la Brucelosis Animal. Las pruebas son: aglutinación en placa con rosa de bengala o prueba de tarjeta al 3% en el caso de caprinos y ovinos y fijación de complemento, la cual es una prueba confirmatoria ^{8, 10, 12, 14, 32}. Estas dos pruebas deben ser utilizadas en conjunto para la detección de animales positivos dentro de un hato ¹⁰.

Los animales infectados generalmente son identificados por pruebas serológicas, aunque pueden quedar como portadores latentes sin ser positivos en estas pruebas, diseminando la brucelosis en el hato ocasionando problemas económicos y de salud pública, por lo que una prueba de diagnóstico complementario puede ser necesario, como en el caso de ELISA, inmunodifusión en agar o inmunoensayo ^{3, 12, 33, 34, 35}.

Actualmente se ha comenzado a utilizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como un método de diagnóstico altamente sensible, rápido y adaptable para procesar grandes volúmenes de muestras, este método ha permitido la identificación y diferenciación de especies y biovariedades de *Brucella* ^{12, 14, 32}.

Desde que la PCR fue utilizada por primera vez en 1987, se han propuesto diversas pruebas para *Brucella* basadas en secuencias específicas de su ADN. Los primeros ensayos fueron diseñados para localizar secuencias altamente conservadas, sirven cuando únicamente la identificación del género es importante.

El primer diagnóstico publicado, basado en la PCR, amplificaba una secuencia que codifica para una proteína de membrana de *B. abortus* S19, se demostró que este ensayo era altamente sensible y específico para *Brucella* ^{14, 36}, mientras mas secuencias genéticas de *Brucella* eran publicadas, los ensayos se fueron modificando para volverse mas sensibles y poder diferenciar especies; un ejemplo de esto, son los iniciadores creados para diferenciar las dos cepas vacunales utilizadas para *B. abortus*: S19 y RB51, esto fue un descubrimiento crítico, ya que la discriminación entre animales vacunados e infectados es muy importante en cualquier campaña de erradicación ^{14, 37}.

Varios laboratorios diseñaron diferentes PCR's donde la secuencia blanco es *omp2*; esta secuencia consta de dos genes: *omp2a* y *omp2b*, los dos genes poseen un 85% de homología ^{7, 14, 38} pero solo el gen *omp2b* es expresado ^{14, 38, 39}, utilizando la amplificación de este gen y una correcta combinación de enzimas de restricción (RFLP) se pueden diferenciar algunas especies y biovariedades de *Brucella* ^{14, 39}. Se hicieron estudios utilizando otros genes: *omp25* el cual puede diferenciar *B. melitensis* y *B. ovis* de otras especies de *Brucella*, se ha visto que este gen está involucrado en la virulencia de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. ovis* ya que se encuentra vinculado a la expresión de lipopolisacárido ^{14, 40}. Cepas mutantes en este gen confieren una inmunidad similar a la de la cepa vacunal contra *B. melitensis* Rev1, pudiéndose utilizar como futura cepa vacunal ⁴⁰. El gen *omp31* se ha utilizado para diferenciar *B. suis* de *B. canis*, y *B. abortus*. En esta última especie de *Brucella* existe una delección en el gen *omp31* ^{14, 40, 41}.

A pesar de existir diversos sitios genéticos utilizados para la diferenciación de especies y biovariedades de *Brucella*, la PCR-RFLP del sitio *omp2* ha sido adoptado por varios laboratorios para la identificación y diferenciación de cepas de *Brucella* y la caracterización de nuevas especies o cepas ^{7, 14, 42}.

La cepa vacunal Rev1 fue elaborada a mediados de la década de los 50 por Elberg y Herzberg a partir del pase 101, posteriormente congelaron la semilla madre ^{3, 4, 5, 7, 23, 30}, es una vacuna viva atenuada que derivó de una cepa virulenta de *B. melitensis* y que aún conserva virulencia residual, originalmente la cepa era dependiente de estreptomycin y a la vez resistente a ella; sin embargo, se observó que no protegía correctamente, por lo que se volvió a seleccionar una cepa que no fuera dependiente de estreptomycin, conservando la resistencia a esta.

La vacuna Rev1 es considerada la mejor cepa para el control y prevención de la brucelosis caprina y ovina ^{1, 3, 4, 10, 23}, ésta se ha usado junto con la cepa vacunal para *B. abortus* S19 por décadas, la dosis utilizada en animales jóvenes es de 1 a 2 x10⁹ Unidades Formadoras de Colonia (UFC) ^{10, 23}. El uso intensivo de estas vacunas ha demostrado que disminuyen la prevalencia de brucelosis en rumiantes ¹⁰, sin embargo, también ha revelado que existen efectos adversos: aunque la vacuna previene abortos no necesariamente protege contra la enfermedad, también se ha observado que la vacuna Rev1 persiste en los animales en los que se puede diseminar horizontalmente en el hato, además de que llega a infectar a los humanos, demostrando los riesgos biológicos que esta cepa puede ocasionar ^{3, 5, 6, 7, 30}. La vacunación de hembras preñadas en el último tercio de la gestación puede ocasionar abortos ^{6, 10, 22, 23, 30, 32}, hembras que están en lactación pueden secretar la cepa vacunal por leche, infectando a las crías ⁶.

Debido a que la vacuna tiene un fenotipo liso, los anticuerpos generados se pueden confundir en las pruebas serológicas de diagnóstico evitando la diferenciación de animales infectados de animales vacunados, esto dependerá de la ruta de vacunación ^{3, 4, 6, 10, 30}. Para evitar estos problemas, se ha sugerido aplicar una dosis reducida (5 a 10 x10⁴ UFC). Algunos países utilizan este método y lo han reportado eficiente para el control de *B. melitensis* pudiéndose utilizar en la vacunación intensiva,

sin embargo, se corre el riesgo de inducir una pobre respuesta inmune por lo que no se recomienda ampliamente ^{10, 23}, asimismo, se han propuesto distintas rutas de vacunación: la vacunación intradérmica se considera la ruta menos efectiva, la vacunación conjuntival es menos invasiva e igual de eficiente que la vacunación subcutánea en animales adultos pero tiene el mismo problema, no es lo suficientemente segura como para aplicarse sin saber la etapa de gestación, por lo que se ha aplicado por esta vía dosis reducidas de Rev1 pero no confiere la inmunidad adecuada aún después de la revacunación ^{3, 10, 23}. Los animales se deben de vacunar de tres y siete meses de edad, empleando la dosis estándar, solo en animales adultos se utiliza la dosis reducida ^{3, 12, 23}.

El uso de vacunas muertas se ha recomendado para animales jóvenes y adultos, pero estas vacunas confirieren una menor inmunidad que la cepa Rev1, de igual manera, han tenido inconvenientes prácticos tales como: reacciones locales intensivas, reacción serológica positiva prolongada y la necesidad de revacunación, se ha demostrado que las vacunas vivas estimulan de forma constante al sistema inmune, logrando una mejor protección ^{6, 23}.

Para sustituir la cepa vacunal Rev1, se han evaluado otras vacunas vivas como una alternativa, tales como: *B. suis* cepa 2, *B. abortus* RB51, *B. abortus* S19 o *B. melitensis* (H38) entre otras; sin embargo, estas no han sido útiles para la profilaxis de la brucelosis en pequeños rumiantes ya que inducen una pobre respuesta inmune, reacciones locales o reacciones serológicas falsas positivas, confirmando que la cepa Rev1 es la vacuna mas viable y efectiva para los pequeños rumiantes ^{4, 10, 23, 30}.

Utilizando el gen *wboA* se han construido mutantes de *B. melitensis* 16M y *B. suis*, generando cepas rugosas, VTRM1 y VTRS1 respectivamente, estas cepas se probaron en ratones para evaluar la virulencia residual, así como la protección conferida desafiando los animales vacunados. Se encontró que la virulencia de estas cepas es menor que la de

sus progenitoras pero su atenuación no es tan marcada como la de la cepa vacunal para *B. abortus* RB51, sugiriendo que hay mas genes que juegan un papel importante en la atenuación. Debido a que ninguna de estas cepas indujo la producción de anticuerpos contra la cadena "O" se continúan probando en cabras y cerdos ^{4, 10}.

Al ser la cepa vacunal Rev1 biotipo 1, resulta difícil diferenciarla de cepas de campo a partir de casos clínicos, para identificarla y diferenciarla se hace de forma fenotípica utilizando los métodos de diagnóstico convencionales, los cuales se basan en tres características: Rev1 crece muy lentamente, resistencia a estreptomicina y sensible a penicilina ¹. Con fines de obtener un diagnóstico mas certero y mas rápido se han empezado a utilizar técnicas moleculares ^{6, 10, 12}, una de ellas se basa en la identificación del gen *omp2* donde se identifica el sitio *Pst*II, este método permite la diferenciación de cepas atípicas de *B. melitensis* y la cepa vacunal Rev1 ^{7, 17, 30}. Otra técnica molecular es identificar una mutación el gen *rpsL*, este gen codifica una proteína ribosomal S12, la cual esta asociada a resistencia a estreptomicina. Esta consiste en identificar una mutación en el codón 91, donde en el caso de la cepa vacunal Rev1 existe una mutación (Pro-Leu), primero se realiza PCR de esta secuencia, posteriormente se hace un análisis de restricción del producto amplificado ¹.

Debido a la similitud fenotípica que existe entre las cepas de campo de *B. melitensis* biotipo 1 y la cepa vacunal de *B. melitensis* Rev1, resulta difícil diferenciarlas a partir de muestras clínicas, por lo que el uso de secuencias especie-específicas podría ser útil en estos casos. La secuenciación nucleotídica del gen *rpsL* ha demostrado que existe una mutación en el codón 91 (CCG a CTG), la cual provoca un cambio de aminoácidos (Pro por Leu) y a su vez bloquea el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Nci*I. Esta característica permite la diferenciación de la cepa vacunal Rev1 de las cepas de campo de *B. melitensis* de forma rápida y específica ¹.

2. JUSTIFICACIÓN

La ausencia de marcadores específicos para diferenciar cepas vacunales de cepas de campo, no permite conocer el origen de las cepas aisladas a partir de casos clínicos. Sin embargo, la reciente publicación del genoma de *B. melitensis* y *B. suis* permitió la identificación de secuencias especie-específicas que podrían ser utilizadas como marcadores genéticos ^{1, 12, 14}.

Actualmente, la identificación de la cepa vacunal Rev1 a partir de muestras clínicas se realiza con base en tres características fenotípicas: crecimiento lento en agar y colonias pequeñas, resistencia a estreptomycin así como susceptibilidad a penicilina. Utilizando estas características, el diagnóstico podría ser erróneo, ya que estas se fundamentan en la observación del personal del laboratorio ^{1, 6, 12}.

3. HIPÓTESIS

La utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el análisis de restricción del gen *rpsL*, permitirá la diferenciación de cepas vacunales y cepas de campo de *Brucella melitensis*.

4. OBJETIVO

Identificación de la cepa vacunal Rev1 y cepas de campo de *B. melitensis*, mediante el polimorfismo del gen *rpsL*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Cepas

Se utilizaron 18 cepas aisladas de casos clínicos procedentes de diversos estados de la República Mexicana. Las cepas fueron previamente identificadas como *B. melitensis*, utilizando pruebas microbiológicas estándar ^{10, 12}.

De igual manera, se utilizaron como controles cepas de *B. melitensis* Rev1, *B. melitensis* 16M, *B. abortus* 2308, *B. abortus* 544, *B. abortus* RB51, *B. abortus* S19, *B. canis* y *B. ovis* Reo198 (**Cuadro 4**).

Las cepas fueron sembradas en agar brucella en aerobiosis. Cuando fue necesario, al medio se le agregó ácido nalidíxico a una concentración final de 15 µg/ml *. En el caso de *B. ovis* y *B. canis*, las cepas se sembraron en agar sangre, el tiempo de incubación fue de 24-48 horas.

* Sigma, St Louis. USA

Cuadro 4

Cepas utilizadas

Número de cepa	Especie	Procedencia	Origen de la cepa	Biotipo
550	<i>B. melitensis</i>	Tlax	Humano	3
234	<i>B. melitensis</i>	Jal	Animal	N.C.
508	<i>B. melitensis</i>	Coah	Humano	3
657	<i>B. melitensis</i>	Coah	Humano	N.C.
564	<i>B. melitensis</i>	N.C. [†]	N.C.	N.C.
399	<i>B. melitensis</i>	N.C.	N.C.	N.C.
226	<i>B. melitensis</i>	N.C.	N.C.	N.C.
551	<i>B. melitensis</i>	BCN	Animal	1
291	<i>B. melitensis</i>	Pue	Animal	3
600	<i>B. melitensis</i>	N.C.	N.C.	N.C.
659	<i>B. melitensis</i>	Gto	Humano	1
168	<i>B. melitensis</i>	N.C.	N.C.	N.C.
565	<i>B. melitensis</i>	Pue	Humano	1
402	<i>B. melitensis</i>	Zac	Humano	3
694	<i>B. melitensis</i>	Son	Animal	N.C.
624	<i>B. melitensis</i>	Son	Humano	N.C.
658	<i>B. melitensis</i>	D.F.	Animal	1
276	<i>B. melitensis</i>	Méx	Animal	3
1	<i>B. melitensis</i>	México	Rev1	1
2	<i>B. melitensis</i>	Francia	Rev1	1
3	<i>B. melitensis</i>	Francia	16M	1
4	<i>B. abortus</i>	Shering Plough	RB51	1
5	<i>B. abortus</i>	Brovel	S19	1
6	<i>B. abortus</i>	España	2308	1
7	<i>B. abortus</i>	España	544	1
8	<i>B. canis</i>	D.F.	N.C.	
9	<i>B. ovis</i>	Francia	Reo198	

[†] N.C. No se conoce

5.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante un método estandarizado para *Brucella* ⁴³. Brevemente, las cepas bacterianas fueron cultivadas en caldo *Brucella* a 37°C en una atmósfera de aerobiosis de 24 a 48 horas. Los cultivos fueron centrifugados a 3 000 x g durante 10 minutos. La pastilla bacteriana fue colocada en solución de lisis (Tiocianato de Guanidina [‡] 5 M, EDTA [§] 0.1 M y sarcosyl [‡] 0.5% p/v) por 10 minutos.

Posteriormente se adicionó 0.5 volumen de acetato de amonio ^{**} 7.4 M y se colocó en hielo por 5 minutos. Después se agregó cloroformo alcohol isoamílico [‡] (24:1 v/v) y se agitó por 5 minutos, esta mezcla se centrifugó a 7 700 x g por 5 minutos, el sobrenadante se colectó en un tubo limpio y se agregó nuevamente alcohol isoamílico [‡] (24:1 v/v) mezclándose por 5 minutos.

Posteriormente se colectó el sobrenadante y se precipitó con 0.5 volumen de isopropanol [‡]. Por último, el ADN fue extraído y lavado 3 veces con etanol al 70%. El ADN se resuspendido en agua y almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

La concentración de ADN fue determinada mediante un espectrofotómetro ^{††} de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

5. 3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir de la secuencia de nucleótidos que flanquean al gen *rpsL*, el cual codifica para una proteína ribosomal S12, se diseñaron un juego de oligonucleótidos que amplifican un producto de 510 pb (**Figura 1**), la secuencia de los oligonucleótidos fue descrita previamente por Cloeckert *et al* (2002). La PCR se realizó de la siguiente manera, brevemente, la reacción fue realizada en un volumen final de 50 µl el cual contenía 5 µl

[‡] Sigma, St Louis. USA

[§] Invitrogen. California. USA

^{**} Merk, Darmstadt. Alemania

^{††} Pharmacia Biotech, USA.

buffer para PCR 1X, cada nucleótido trifosfatado a una concentración final de 1 mM, cada oligonucleótido a una concentración final de 0.2 mM, 100 ng de DNA genómico, sulfato de magnesio a una concentración final de 1 mM y 2.5 unidades de TAQ polimerasa.

La PCR fue realizada en un termociclador (PCRexpress ^{††}), donde los ciclos de la reacción fueron los siguientes: un ciclo a 94° por 5 min. (desnaturalización inicial), 30 ciclos a 55° por 45 seg. (alineamiento), 70° por 45 seg. (extensión) y 94° por 45 seg. (desnaturalización) y el último ciclo fue de 70° por 10 min.

La visualización de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio en un transiluminador de luz UV ^{§§}.

^{††} ThermoHybaid. USA.

^{§§} UVP, USA.

```

1                                     50
B. melitensis 16M GAGGGCTGACTCCGAATTTGCGCATGAGCATGCCGGTGAAACGGCCCTTT
B. melitensis Rev1 GAGGGCTGACTCCGAATTTGCGCATGAGCATGCCGGTGAAACGGCCCTTT

51                                     100
B. melitensis 16M GGGGCGTGGATACGAGATTTTAAAGAGGAAGGTTCAATGCCTACCGTA
B. melitensis Rev1 GGGGCGTGGATACGAGATTTTAAAGAGGAAGGTTCAATGCCTACCGTA

101                                    150
B. melitensis 16M AACCAGCTTATCCGCAAGCCGCGCACTGCGCCGGTGAAGCGCAATAAGGT
B. melitensis Rev1 AACCAGCTTATCCGCAAGCCGCGCACTGCGCCGGTGAAGCGCAATAAGGT

151                                    200
B. melitensis 16M TCCTGCACTGCAGGCAAACCCTCAGAAGCGGGCGTTTGACCCGCGTTT
B. melitensis Rev1 TCCTGCACTGCAGGCAAACCCTCAGAAGCGGGCGTTTGACCCGCGTTT

201                                    250
B. melitensis 16M ACACGACGACCCCGAAGAAGCCGAACCTCGGCTCTGCGTAAGGTTGCCAAG
B. melitensis Rev1 ACACGACGACCCCGAAGAAGCCGAACCTCGGCTCTGCGTAAGGTTGCCAAG

251                                    300
B. melitensis 16M GTTCGTCTGACGAACGGCTTTGAAGTCATTGGTTATATCCCTGGTGAAGG
B. melitensis Rev1 GTTCGTCTGACGAACGGCTTTGAAGTCATTGGTTATATCCCTGGTGAAGG

301                                    350
B. melitensis 16M GCATAACCTGCAGGAGCACTCCGTCGTGATGATCCGTGGCGGTTCGTGTGA
B. melitensis Rev1 GCATAACCTGCAGGAGCACTCCGTCGTGATGATCCGTGGCGGTTCGTGTGA

351                                    400
B. melitensis 16M AGGACTT C TGTGCGTTACCACATCATCCGTGGCGTTCTCGATACC
B. melitensis Rev1 AGGACTT T TGTGCGTTACCACATCATCCGTGGCGTTCTCGATACC

401                                    450
B. melitensis 16M CAGGGTGTCAAGAACC GCAAGCAGCGCCGTTCCAAGTACGGTGCAAAGCG
B. melitensis Rev1 CAGGGTGTCAAGAACC GCAAGCAGCGCCGTTCCAAGTACGGTGCAAAGCG

451                                    500
B. melitensis 16M TCCGAAGTAAGATTTT ATACCGGCCGCCGGAAGGCGAGTTGAGC
B. melitensis Rev1 TCCGAAGTAAGATTTT ATACCGGCCGCCGGAAGGCGAGTTGAGC

501                                    550
B. melitensis 16M CCGATGTAATTGAAAGAAGAGACGAAATGTCCAGACGCCATAAGGCAGAG
B. melitensis Rev1 CCGATGTAATTGAAAGAAGAGACGAAATGTCCAGACGCCATAAGGCAGAG

551
B. melitensis 16M AAGCGT
B. melitensis Rev1 AAGCGT

```

Figura 1. Secuencia nucleotídica del gen *rpsL*. Las letras en rojo indican la secuencia de los oligonucleótidos. Las letras en amarillo indican el sitio de corte de la enzima *NciI*. Las letras en negro indican el cambio de nucleótido de la cepa vacunal Rev1.

5. 4 Análisis de restricción del producto amplificado

Los productos de la PCR fueron purificados utilizando un sistema de columnas Qiagen[®] de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Posteriormente, el producto amplificado fue digerido con la enzima de restricción *NciI*, el cual posee una mutación en el codón 91 del gen *rpsL* (Cloeckaert *et al* 2002) (**Figura 2**), 8 µl de la reacción de PCR fueron digeridos con 18 unidades de la enzima *NciI* y el producto de restricción fue visualizado en un gel de agarosa al 2%.

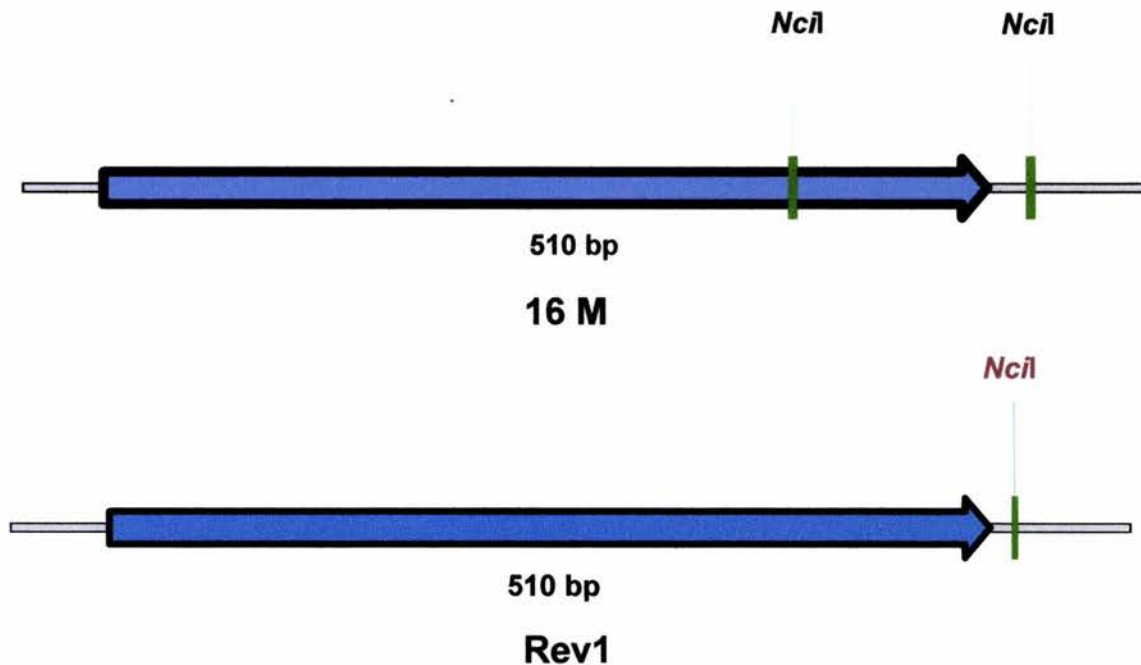


Figura 2. Mapas genéticos del gen *rpsL* de *B. melitensis* 16M y de la cepa vacunal Rev1.

[®] QIAquick PCR purification kit,

6. RESULTADOS

6.1 Extracción de ADN

A 20 cepas de campo aisladas a partir de casos clínicos, identificadas previamente como *B. melitensis* y 9 cepas de referencia de distintas especies de *Brucella*, se les realizó la extracción de ADN mediante el método de Tiocianato de Guanidina ⁴³. Las muestras se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (Figuras 3, 4, 5 y 6). Asimismo, se cuantificó la concentración de ADN utilizando un espectrofotómetro dando como promedio de 4.690 µg/ml.

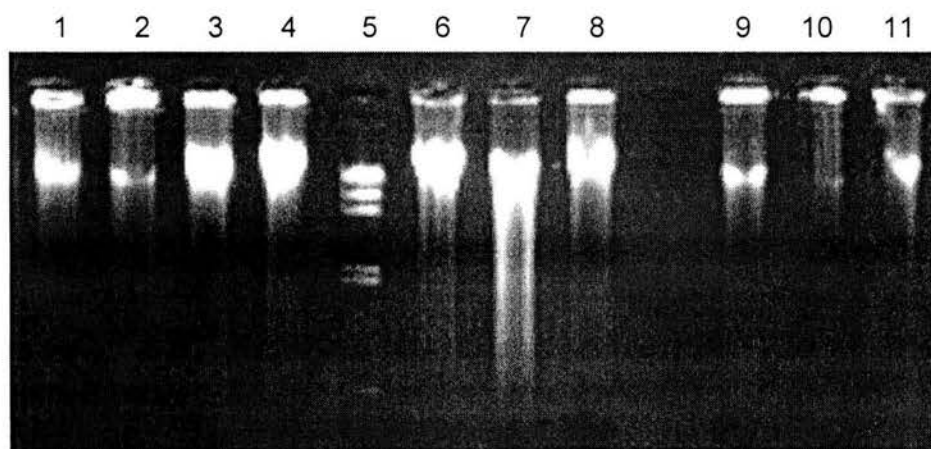


Figura 3. Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se separan por electroforesis diferentes cepas control de *Brucella*. Carriles 1-4: cepas control de *B. abortus* S19 y RB51; carril 5: marcador de peso molecular de λ HindIII; carriles 6-8: cepas control de *B. melitensis* Rev1 de México, Rev1 de Francia y 16M; carril 9: *B. ovis*; carril 10 y 11: cepas de *B. canis*.

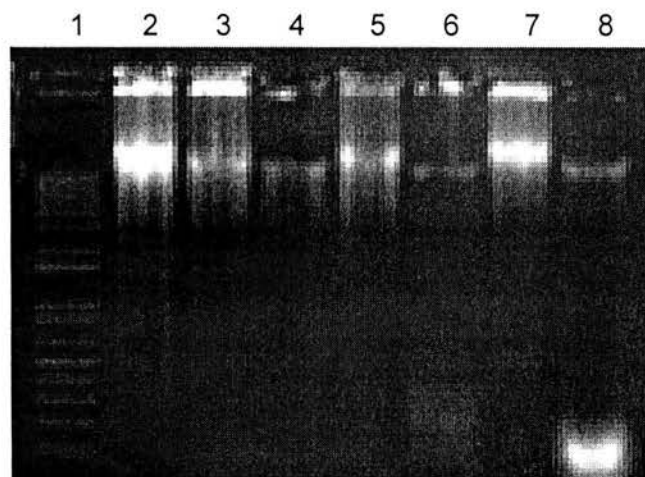


Figura 4. Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se separan por electroforesis diferentes cepas de *Brucella*. Carril 1: marcador de 1 Kb plus DNA ladder; carriles 2-8: ADN de cepas de campo de *B. melitensis*.

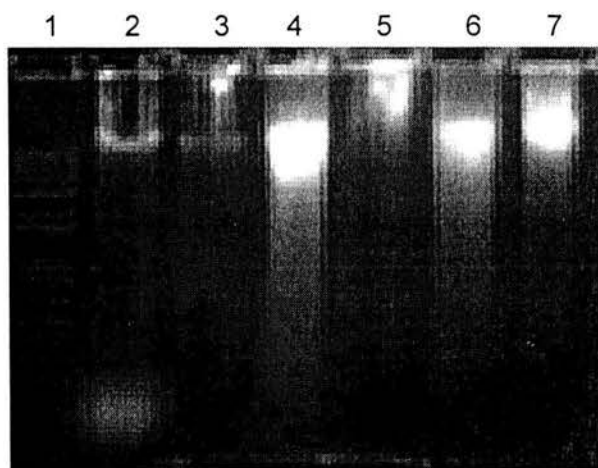


Figura 5. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, donde se separan por electroforesis diferentes cepas de *Brucella*. Carril 1: marcador de 1 Kb plus DNA ladder; carriles 2-7: ADN de cepas de campo de *B. melitensis*.

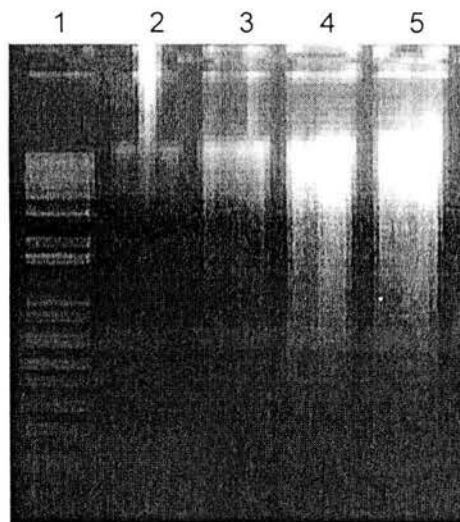


Figura 6. Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se separan por electroforesis diferentes cepas de *Brucella*. Carril 1: marcador de 1 Kb plus DNA ladder; carriles 2-5: ADN de cepas de campo de *B. melitensis*.

6. 2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la PCR se utilizaron el par de oligonucleótidos previamente descritos por Cloeckaert ¹ que amplifican el gen *rpsL* y secuencias flanqueantes. Una vez que se obtuvieron las reacciones de PCR, estas se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. El producto de amplificación observado en las 18 cepas de campo, así como, en las cepas de referencia fue de 510 pb (Figuras 7, 8, 9, 10 y 11).

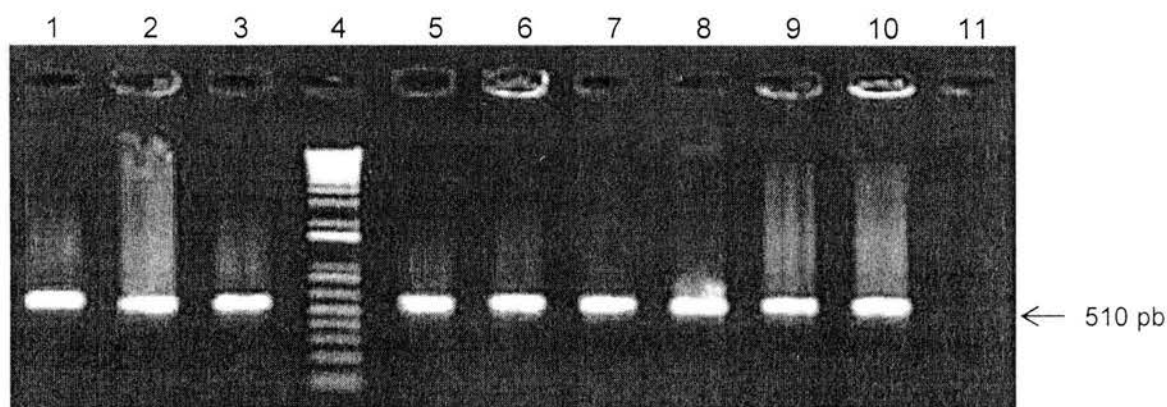


Figura 7. Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se observa la PCR del gen *rpsL* de diferentes cepas control de *Brucella*. Carril 1: cepa de referencia de *B. melitensis* 16M; carril 2 y 3: cepa de referencia de *B. melitensis* Rev1; carril 4: marcador de peso molecular de 1 Kb plus DNA ladder; carril 5: cepa de referencia de *B. abortus* S19; carril 6: cepa de referencia de *B. abortus* 544; carril 7: cepa de referencia de *B. abortus* 2308; carril 8: cepa de referencia de *B. abortus* RB51; carril 9: cepa de referencia de *B. ovis*; carril 10: cepa de referencia de *B. canis*; carril 11: control negativo.

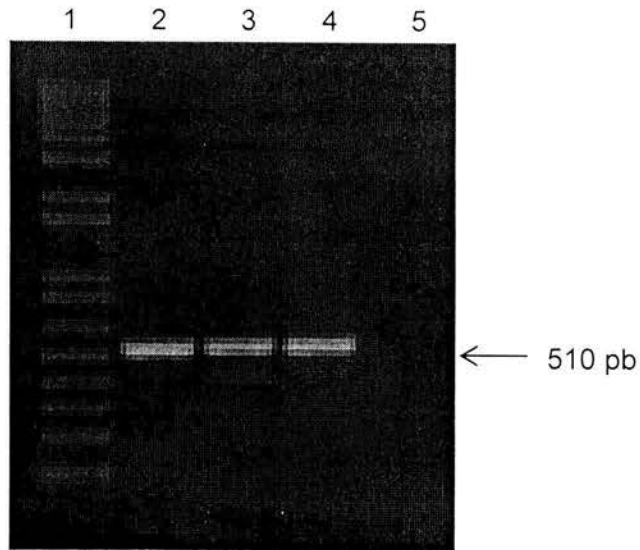


Figura 8. Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se observa la PCR del gen *rpsL* de diferentes cepas control de *Brucella*. Carril 1: marcador de 1 Kb plus DNA ladder; carril 2: *B. ovis*; carril 3: *B. canis*; carril 4: *B. canis*; carril 5: control negativo.

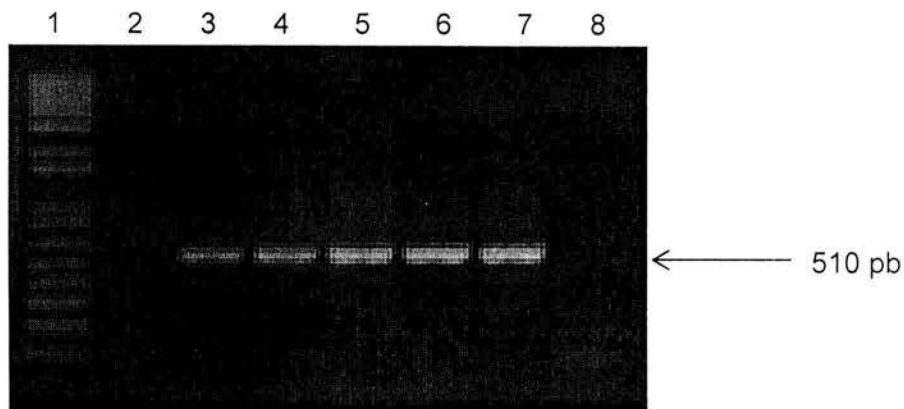


Figura 9. Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se observa la PCR del gen *rpsL* de diferentes cepas de *Brucella*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb plus DNA ladder; carril 3-7: Producto de PCR de las cepas de campo de *Brucella melitensis*; carril 8: control negativo.

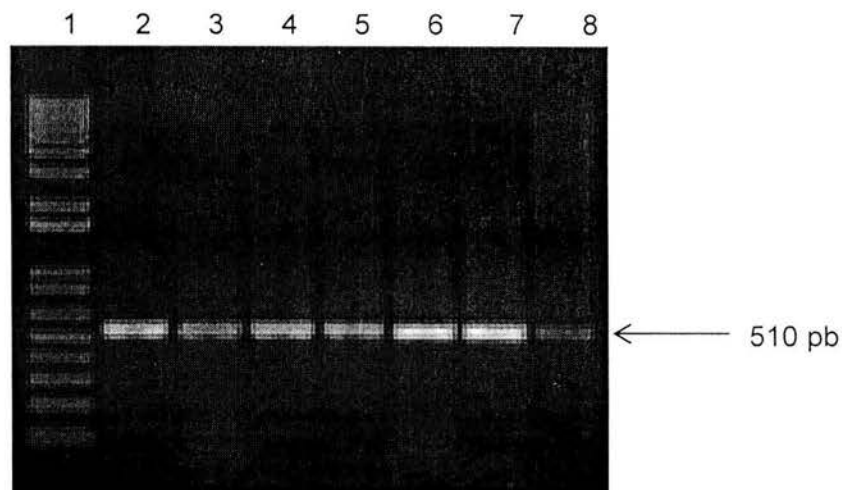


Figura 10. Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se observa la PCR del gen *rpsL* de diferentes cepas de *Brucella*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb plus DNA ladder; carriles 2-8: producto de PCR de las cepas de campo de *Brucella melitensis*.

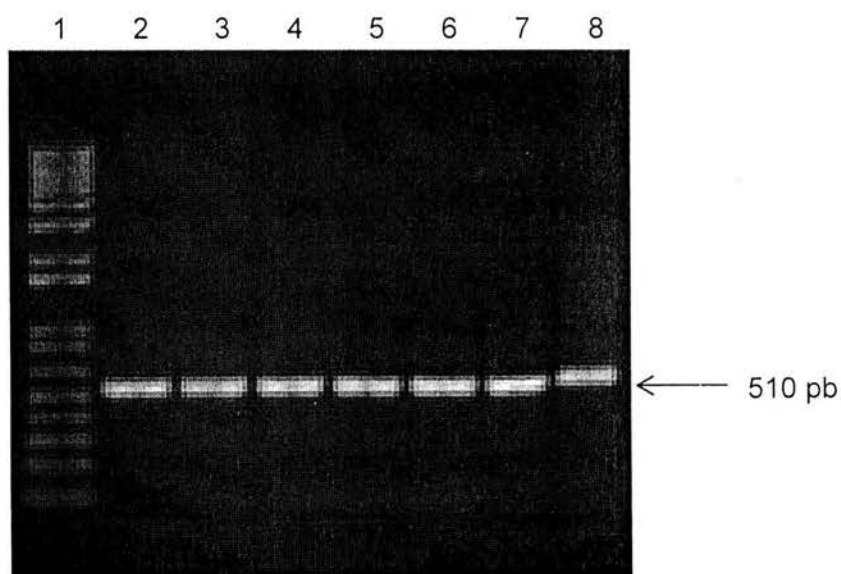


Figura 11. Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se observa la PCR del gen *rpsL* de diferentes cepas de *Brucella*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder; carril 2-8: producto de PCR de las cepas de campo de *Brucella melitensis*.

6.3 Análisis de restricción del producto amplificado

Los productos de PCR se digirieron con la enzima de restricción *NciI*, la cual permitió distinguir la cepa vacunal Rev1 de cepas de campo de *B. melitensis* mediante el polimorfismo del gen *rpsL*.

Después de permitir la digestión de los productos, esta reacción se visualizó en un gel de agarosa al 2%, para poder observar los fragmentos de la digestión.

Las cepas de *B. abortus*, *B. ovis*, y *B. canis*, utilizadas como controles amplificaron un producto igual al de las cepas de campo de *B. melitensis*, observándose 3 fragmentos, de 337 pb, 114 pb y 59 pb (**Figura 13**) en contraste, en la cepa de referencia de *B. melitensis* Rev1 se observaron 2 fragmentos: 451 pb y 59 pb, lo que evidencia la ausencia del sitio de corte de la enzima *NciI* en el codón 91 (CloECKaert *et al* 2002) (**Figuras 1 y 12**).

Al realizarse el análisis de restricción descrito, del producto amplificado, a las 18 cepas provenientes de casos clínicos, se observaron 3 bandas, las cuales corresponden a los sitios de corte de la enzima *NciI* (**Figuras 14, 15 y 16**).

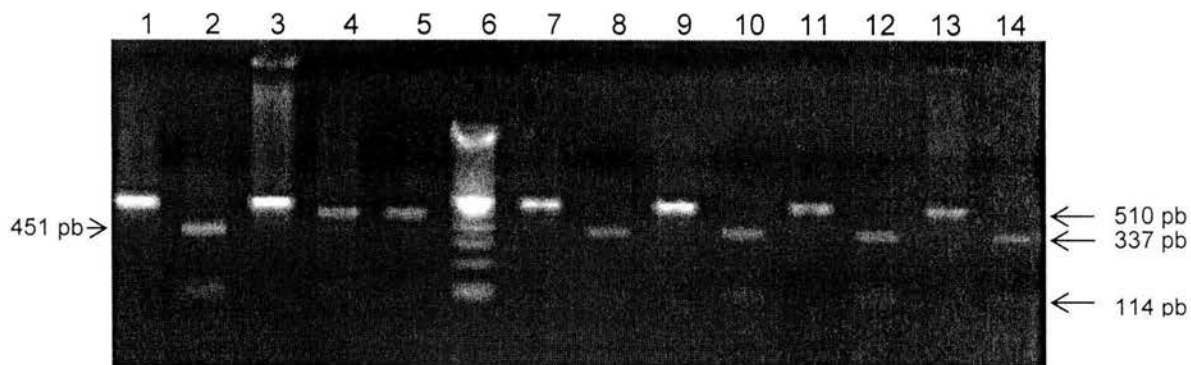


Figura 12. Gel de agarosa al 2% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se separan por electroforesis las digestiones del gen *rpsL* con la enzima *NciI*. Carril 1: cepa de *B. melitensis* 16M sin digerir; carril 2: cepa de *B. melitensis* 16M digerida; carril 3: cepa de *B. melitensis* Rev1 sin digerir; carriles 4 y 5: cepas de *B. melitensis* Rev1 digeridas; carril 6: marcador de peso molecular de 1 Kb plus DNA ladder; carril 7: cepa de *B. abortus* S19 sin digerir; carril 8: cepa de *B. abortus* S19 digerida; carril 9: cepa de *B. abortus* 544 sin digerir; carril 10: cepa de *B. abortus* 544 digerida; carril 11: cepa de *B. abortus* 2308 sin digerir; carril 12: cepa de *B. abortus* 2308 digerida; carril 13: cepa de *B. abortus* RB51 sin digerir; carril 14: cepa de *B. abortus* RB51 digerida.

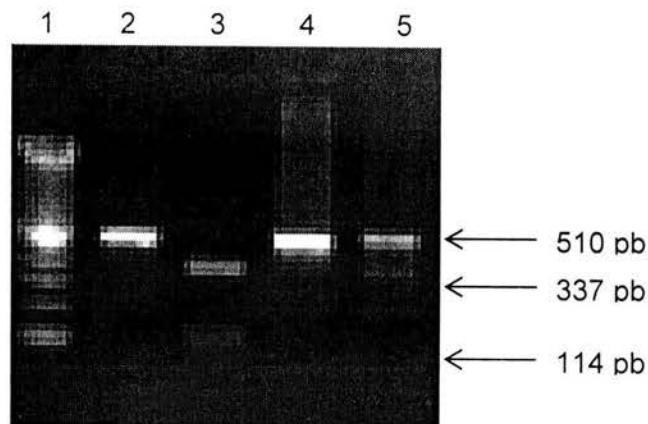


Figura 13. Gel de agarosa al 2% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se separan por electroforesis las digestiones del gen *rpsL* con la enzima *NciI*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb plus DNA ladder; carril 2: cepa de *B. ovis* sin digerir; carril 3: cepa de *B. ovis* digerida; carril 4: cepa de *B. canis* sin digerir; carril 5: cepa de *B. canis* digerida.

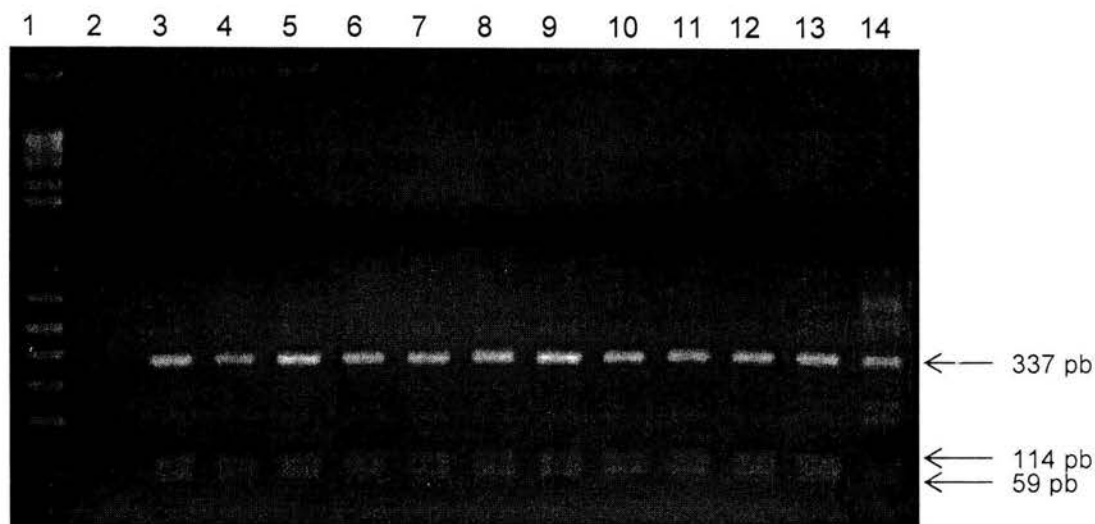


Figura 14. Gel de agarosa al 2% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se separan por electroforesis las digestiones del gen *rpsL* con la enzima *NciI*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb plus DNA ladder; carril 3-14: digestiones de cepas de campo de *Brucella melitensis*.

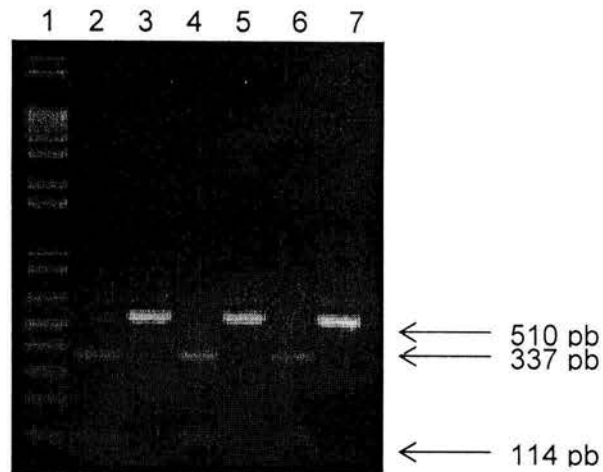


Figura 15. Gel de agarosa al 2% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se separan por electroforesis las digestiones del gen *rpsL* con la enzima *NciI*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb plus DNA ladder; carriles 2, 4 y 6: cepas de campo de *Brucella melitensis* digeridas; carriles 3, 5 y 7: cepas de campo de *Brucella melitensis* sin digerir.

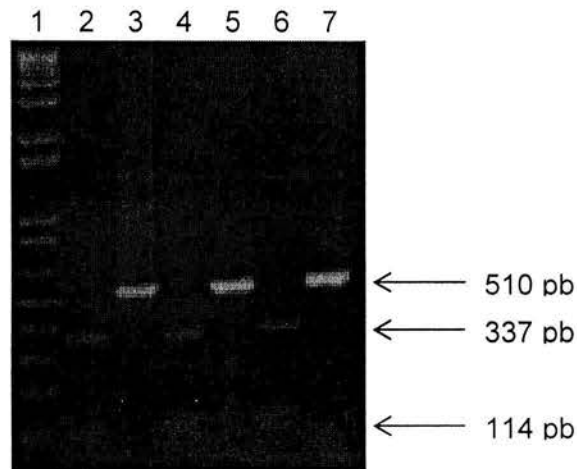


Figura 16. Gel de agarosa al 2% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se separan por electroforesis las digestiones del gen *rpsL* con la enzima *NciI*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb plus DNA ladder; carriles 2, 4 y 6: cepas de campo de *Brucella melitensis* digeridas; carriles 3, 5 y 7: cepas de campo de *Brucella melitensis* sin digerir.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se identificaron, utilizando el polimorfismo del gen *rpsL*, amplificado mediante PCR, 20 cepas de campo de *B. melitensis* previamente identificadas mediante técnicas bacteriológicas convencionales.

Al realizar la PCR se observó en todas las cepas de campo, así como en las cepas patógenas utilizadas como control, una banda de aproximadamente 510 pb, lo que demostró que con este ensayo de PCR se identificó a microorganismos del género *Brucella*.

Al realizar análisis de restricción del gen *rpsL*, se observó un patrón de bandas idéntico al de la cepa de referencia *B. melitensis* 16M, mostrando que los aislamientos correspondían a cepas de campo con lo anterior, se descartó así la presencia de la cepa vacunal de *B. melitensis* Rev1¹.

Los procesos previamente aceptados para la identificación y diferenciación bacteriana tienen como base los estándares de oro, que consisten en el aislamiento bacteriológico a partir de muestras clínicas como: tejidos infectados, leche o descargas vaginales. En el caso de *Brucella*, los organismos se pueden caracterizar en género, especie o biotipo y en algunos casos, cepas vacunales¹⁴.

Sin embargo, este procedimiento tiene varios inconvenientes, primero, el proceso de aislamiento e identificación bacteriana puede durar hasta dos semanas. Segundo, éstas son pruebas complejas, el laboratorio donde se realizan debe estar autorizado, de la misma forma, el personal que las realiza debe estar capacitado. Tercero, algunas de las características son subjetivas, tales como la morfología colonial, el tiempo de crecimiento, entre otras, por lo que se requiere de personal con experiencia y entrenamiento para poder diferenciarlas. La sensibilidad de esta técnica puede variar de 15% a 70%^{12, 14, 32}.

A pesar del alto grado de homología en el ADN que comparte el género *Brucella*, la tecnificación de la PCR ha permitido la identificación y en algunos casos, la diferenciación de las especies de forma más rápida y precisa. Esta técnica es altamente sensible, específica, poco costosa y se puede realizar en un alto número y variedad de muestras clínicas como: leche, queso, sangre, suero, fluidos, entre otras ^{12, 14, 21}.

Se han reportado diferentes ensayos con PCR para identificar el género *Brucella*, se puede utilizar como secuencia blanco del gen que codifica para la proteína de la membrana externa BCSP-31, este es un antígeno membranal característico en *Brucella* spp., también se utiliza la subunidad 16S del RNAr como secuencia flanqueante ya que ésta permite la diferenciación de géneros bacterianos debido a que son únicas entre géneros. Una tercera opción es utilizar como secuencia blanco un gen que codifica para la proteína de membrana externa *omp2* ^{32, 44, 45}.

Existen ensayos con PCR que son capaces de diferenciar especies de *Brucella*, un ejemplo es la amplificación de la secuencia IS711, debido a que este elemento posee varias copias insertadas en sitios específicos en el cromosoma según la especie, permitiendo la diferenciación de *B. abortus* biovariedad 1, 2 y 4, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis* biovariedad 1 ⁴⁶. Anteriormente se utilizaba una PCR que amplificaba un producto de 607 pb, el cual corresponde a una proteína putativa membranal de la cepa vacunal para *B. abortus* S19 ⁴⁷ lo que permitía la diferenciación de esta cepa vacunal con cepas de campo de *B. abortus*, sin embargo ha dejado de utilizarse debido a que existen otros PCR's más específicos. En el caso de la identificación de especies, existen PCR's que son capaces de diferenciarlas, como en el caso de la PCR AMOS (A: *abortus*, M: *melitensis*, O: *ovis*, S: *suis*) la cual utiliza tres oligonucleótidos que permiten la diferenciación entre *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis* utilizando la secuencia

IS711, esta PCR se ha utilizado para detectar *Brucella* en leche de distintas especies animales como en el caso de bovinos, caprinos, ovinos y en camellos ^{48, 49}.

Para el caso de *B. canis* se ha reportado una PCR que es capaz de identificarla a partir de muestras clínicas, en este caso se amplifica una secuencia intergénica entre las subunidades 16S y 23S del RNAr, sin embargo, en este caso *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* amplifican el mismo patrón de bandas que *B. canis*, por lo que para poder identificar *B. canis* se realizó un estudio de cromatografía de gases, con el fin de detectar un constituyente de la cadena O del LPS llamado quinovosamina, ya que *B. canis* es la única especie que carece de este aminoazúcar, permitiendo así su identificación y diferenciación del resto de las especies de *Brucella*. Se demostró que estos productos de PCR son únicos para *Brucella*, asimismo, se observó que permiten diferenciar a *Brucella* de otras bacterias Gram negativas ⁵⁰.

Debido a que la cepa vacunal Rev1 es fenotípicamente muy parecida a las cepas de campo de *B. melitensis* biotipo 1, es difícil diferenciarla a partir de muestras clínicas y cultivos ^{7, 1, 3, 12}. La secuenciación nucleotídica del gen *rpsL* indica que en la cepa vacunal Rev1 existe una mutación en el codón 91 (CCG a CTG), provocando un cambio de aminoácidos: prolina por leucina, la cual a su vez bloquea el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *NciI* (Figura 1). Esta característica permite poder utilizar el gen *rpsL* como marcador genético, debido a que permite la diferenciación de la cepa vacunal de cepas de campo de *B. melitensis* de manera más rápida y específica ^{1, 51, 52}.

Por otro lado, en México se reportan un promedio de 3 000 casos de brucelosis por año en el humano ⁸, donde un 97% son a causa de *B. melitensis*, asimismo debido a que la cepa vacunal Rev1 es considerada patógena para el humano y puede llegar a causar aborto en las cabras y ovejas en el tercer tercio de la gestación, así como ser excretada en leche, principal vía de entrada en el humano, es importante llegar a tener una

caracterización completa del microorganismo, ya que esto nos permitirá conocer el origen de la infección, aportando gran ayuda en los análisis epidemiológicos y en los cuadros de tratamiento.

8. CONCLUSIÓN

La técnica de PCR y análisis de restricción utilizados con el gen *rpsL* en este trabajo permitió la identificación de 20 cepas de campo de *B. melitensis*.

De igual manera, este marcador genético puede ser utilizado como una técnica de control de calidad para antígenos y biológicos utilizados en la Campaña Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis.

9. LITERATURA CITADA

- ¹ Cloeckaert A, Grayon M, Grépinet. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev. 1 by PCR- RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. *Vaccine*. 20 (2002): 2546-2550
- ² Fernandez- Prada C M, Nikolich M, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Boyle S M, Schuring G G, Hadfield T L, Hoover D L. Deletion of *wobA* Enhances Activation of the Lecitin Pathway of Complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun*. 69 (2001): 4407-4416
- ³ Alavi- Shoushtari S M, Zeinali A. Responses of female lambs to Rev- 1 (brucellosis) vaccination. *Prev Vet Med*. 21 (1995): 289- 297
- ⁴ Schuring G G, Sriranganathan N, Corbel M J. Brucellosis vaccines: present, past and future. *Vet Microbiol*. 90 (2002): 479- 496
- ⁵ Eschenberenner M, Wagner M, Horn T, Kraycer J, Mujer C, Hagius S, Elzer P, DeVicchio V. Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev. 1 and a virulent strain, 16M. *J Bacteriol*. 184 (2002): 4962- 4970
- ⁶ Banai M, Adams L G, Dangott L J, Frey M, Ficht T A. *Brucella* attenuation and relevance to vaccine properties. *Small Rumin Res*. 45 (2002): 129- 137
- ⁷ Bardenstein S, Mandelboim M, Ficht T, Baum M, Banai M. Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev. 1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the *PstI* site polymorphism of its *omp2* gene. *J Clin Microbiol*. 40 (2002): 1475- 1480
- ⁸ Luna- Martínez J E, Mejía- Terán C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet Microbiol*. 90 (2002): 19- 30
- ⁹ Sauret J, Vilissova N. Human Brucellosis. *J Am Board Fam Pract*. 15 (2002): 401- 406
- ¹⁰ Garin- Bastuji B, Blasco J M, Grayon M, Verger J M. *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Vet Res*. 29 (1998): 255- 274
- ¹¹ Liautard J P, Gross A, Dornand J, Köhler S. Interactions between profesional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiology*. 12 (1996) :197- 206
- ¹² Manual de procedimientos de la OIE, Brucelosis caprina 4ª ed. 2000
- ¹³ Corbel M J. Brucellosis: An overview. *Emerg Infect Dis*. 3 (1997): 213- 221
- ¹⁴ Bricker B J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol*. 2402 (2002):1- 12
- ¹⁵ Jahans K L, Foster G, Broughton E S. The characterization of *Brucella* strains insolated from marine mammals. *Vet Microbiol*. 57 (1997): 373- 382

-
- ¹⁶ Clavareau C, Wellemans V, Walravens K, Tryland M, Verger J M, Grayon M, Cloeckaert A, Letesson J J, Godfroid J. Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Microbiology*. 144 (1998): 3267- 3273
- ¹⁷ Cloeckaert A, Verger J M, Grayon M, Paquet J Y, Garin-Bastuji B, Foster G, Godfroid J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect*. 3 (2001): 729- 738
- ¹⁸ Cloeckaert A, Grayon M, Grépinet O, Sidi Boumedine K. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes Infect*. 5 (2003): 593- 602
- ¹⁹ Boschioli M, Foulonge V, O'Callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol*. 4 (2001):58-64
- ²⁰ Gándara B, López Merino A, Rogel M A, Martínez- Romero E. Limited Genetic Diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*. 39 (2001): 235- 240
- ²¹ Verger J M, Grimont F, Grimont P A , Grayon M. *Brucella*, a monoespecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol*. 1985: 292- 295
- ²² Elzer P H, Hagius S D, Davis D S, DelVicchio V G, Enright F M. Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis. *Vet Microbiol*. 2400 (2002): 1- 7
- ²³ Blasco J M. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med*. 31 (1997): 275- 283
- ²⁴ Adams G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet Microbiol*. 2409 (2002): 1- 9.
- ²⁵ Fitch T. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet Microbiol*. 92 (2003): 213- 223
- ²⁶ DelVecchio V, Kapatral V, Redkar R, *et al*. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol*. 99 (2002): 443- 448
- ²⁷ Delrue R M, Martinez- Lorenzo M, Lestrade P, Danese I, Bielarz V, Mertens P, De Bolle X, Tibor A, Grovel J P, Letesson J J. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol*. 7 (2001): 487- 497
- ²⁸ Sexton J, Vogel J. Type IV secretion by intracellular pathogens. *Traffic*. 3 (2002): 178- 185

-
- ²⁹ Boschirolì M L, Ouahrani- Bettache S, Foulongne V, Michaux- Charachon S, Bourg G, Allardet- Servent A, Cazevielle C, Lavigne J P, Liautard J P, Ramuz M, O'Callaghan D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol.* 2393 (2002): 1- 8
- ³⁰ Banai M. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet Microbiol.* 90 (2002): 497- 519
- ³¹ Cloeckaert A, Grayon M, Verger J M, Letesson J J, Godfroid F. Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolisaccharide O side chain in *Brucella* spp. *Res Microbiol.* 151 (2000): 209- 216
- ³² Navarro E, Escribano J, Fernández J., Solera J. Comparación of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1435 (2002): 1- 5
- ³³ Jacques I, Oliver-Bernardin V, Dubray G. Efficacy of ELISA compared to conventional tests (RBPT and CFT) for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Vet Microbiol.* 64 (1998): 61-73.
- ³⁴ Zygmunt M, Baucheron S, Vizcaíno N, Bowden R, Cloeckaert A. Single-step purification and evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet Microbiol.* 87 (2002): 213- 220
- ³⁵ Kittelberger R, Diack D, Vizcaíno N, Zygmunt M, Cloeckaert A. Characterization of an immuno-dominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol.* 59 (1998): 213-227.
- ³⁶ Fekete A, Bantle J A, Halling S M, Sanborn M R. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol.* 1990: 216- 27
- ³⁷ Bricker B J, Halling S M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol.* 33 (1995):1640-1642
- ³⁸ Paquet J Y, Diaz M, Genevrois S, Grayon M, Verger J M, De Bolle X, Lakey J H, Letesson J J, Cloeckaert A. Molecular, antigenic and functional analyses of Ompb porin size variants of *Brucella* spp. *J Bacteriol.* 183 (2001): 4839- 4847
- ³⁹ Leal-Klevezas D S, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano J P. Molecular detection of *Brucella* spp.: rapid identification of *B. abortus* biovar I using PCR. *Arch Med Res.* 1995: 263- 267

-
- ⁴⁰ Salhi I, Boigengrain R A, Machold J, Weise C, Cloeckeaert A, Rouot B. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. Infect Immun. 71 (2003): 4326- 4332
- ⁴¹ Vizcaino N, Verger J M, Grayon M, Zygmunt M S, Cloeckeaert A. DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. Microbiology. 143 (1997): 2913- 2921
- ⁴² Sifuentes-Rincon A M, Revol A, Barrera-Saldana H A. Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. Mol Med. 1997: 734- 139
- ⁴³ Pitcher D G, Saunders N A, Owen R J. Rapid extraction of genomic DNA with guanidinium thiocyanate. Lett Appl Microbiol. 8 (1989): 151- 156
- ⁴⁴ Guarino A, Serpe L, Fusco G, Scaramuzza A, Gallo P. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. Vet Rec. 147 (2000): 634- 636
- ⁴⁵ Leyla G, Kadri G, Üрман O. Comparasion of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. Vet Microbiol. 93 (2003): 53- 61
- ⁴⁶ Bricker B, Halling S. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol. 32 (1994): 2660- 2666
- ⁴⁷ Fekete A, Bantle J, Halling S. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. J Vet Diagn Invest. 4 (1992): 79- 83
- ⁴⁸ Hamdy M E, Amin A S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. Vet J. 163 (2002): 299- 305
- ⁴⁹ Briker B, Halling S. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. J Clin Microbiol. 33 (1995): 1640- 1642
- ⁵⁰ Fox K, Fox A, Nagpal M, Steinberg P, Heroux K. Identification of *Brucella* by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation pf *Brucella canis* form other *Brucella* spp. Pathogenic for humans by carbohydrate profiles. J Clin Microbiol. 36 (1998): 3217- 3222
- ⁵¹ Wittmann, H G, Apirion D. Analysis of ribosomal proteins in streptomycin resistant and dependent mutants isolated from streptomycin independent *Escherichia coli* strains. Mol Gen Genet. 141 (1975): 331– 341
- ⁵² Springer B, Kidan Y G, Prammanant T, Ellrott K, Böttger E C, Sander P. Mechanisms of Streptomycin resistance: Selection of Mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. Antimicrob Agents Chemother. 45 (2001): 2877– 2884