

11661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES FES-CUAUTITLÁN PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

ELABORACIÓN DE UNA SONDA A PARTIR DE UN FRAGMENTO DEL
GEN *omp2* DE *Brucella melitensis*

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
ÁREA: MICROBIOLOGÍA

P R E S E N T A

OLGA LIDIA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

TUTOR DE LA MAESTRÍA: DR. J. FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ
DIRECTORA DE TESIS: DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO
ASESORES: DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO
DR. VÍCTOR R. TENORIO GUTIÉRREZ

México, D.F.

2005

m340624



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.

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

NOMBRE: Olga Lidia Martínez
Martínez

FECHA: 9 / Nov / 04

FIRMA: 

ELABORACIÓN DE UNA SONDA A PARTIR DE UN FRAGMENTO DEL GEN
omp2 DE *Brucella melitensis*

P O R

OLGA LIDIA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS ÁREA: MICROBIOLOGÍA

TUTOR DE LA MAESTRÍA: Dr. J. Francisco Morales Álvarez

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Beatriz Arellano Reynoso

ASESORES: DR. Efrén Díaz Aparicio

DR. Víctor R. Tenorio Gutiérrez

JURADO

Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma

Dra. Susana E. Mendoza Elvira

Dra. Cristina Escalante Ochoa

Dra. Beatriz Arellano Reynoso

Dr. Víctor R. Tenorio Gutiérrez



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES FES-CUAUTITLÁN
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

México, D.F.

2005

Realización del trabajo

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología y Biología Molecular del CENID- Microbiología, del INIFAP; ubicado en el Km 15.5 de la Carretera Méx.- Toluca . Colonia Palo Alto, Cuajimalpa, D. F.

Financiamiento

Este trabajo de tesis fue financiado parcialmente por:
Proyecto CONACYT-INIFAP K0029.

DEDICATORIAS

☛ A Dios:

Por permitirme el existir y por todas sus bendiciones.

☛ A mi Madre:

Sra. Adoración Martínez Tapia.

Gracias por ser la luz interna de obtener nuevos logros cada día en mi vida. Está meta alcanzada es el reflejo de tu esfuerzo. Con Gran Amor y Admiración.

☛ A mis hermanos:

Carlos, Marco Antonio, Fernando, Elizabeth, Héctor, Arturo y Dora Alicia.

El trabajo en equipo es el resultado del esfuerzo reflejado en esta meta. Gracias por ser gran parte de mi vida y formación.

☛ Al MVZ. Alfonso C. Terán Flores:

Gracias por brindarme su amistad, su tiempo y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio

Por brindarme nuevamente la oportunidad de trabajar con su grupo, por sus conocimientos, experiencias, por su gran paciencia y sobretodo por su valiosa amistad.

A la Dra. Beatriz Arellano Reynoso

Agradezco su gran apoyo y por ser una guía importante en la realización de este trabajo, sobretodo por su confianza y amistad.

Al Dr. Víctor R. Tenorio Gutiérrez

Expreso mi gratitud por compartir sus conocimientos, paciencia y por su apoyo.

Al Dr. J. Francisco Morales Álvarez

Expreso mi gratitud por todas las facilidades otorgadas para la elaboración de este trabajo.

Al Jurado que evaluó este documento y tan amablemente aportó valiosos comentarios que enriquecieron el trabajo:

Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma
Dra. Susana E. Mendoza Elvira
Dra. Cristina Escalante Ochoa
Dra. Beatriz Arellano Reynoso
Dr. Víctor R. Tenorio Gutiérrez

Al CENID-MICROBIOLOGIA:

En especial a todo el personal del laboratorio de Bacteriología por las facilidades prestadas para la elaboración de este trabajo.

Al MC. Marco Antonio Santillán Flores

Por su amistad y todas las facilidades otorgadas y por sus valiosos comentarios.

A mis Amigos

Por su amistad y afecto brindado así como no perder lo logrado.

La única verdad es que es necesario crearse, crear.

Y es entonces cuando nos encontramos de nuevo.

L. Pirandello.

ÍNDICE

	PAGINAS
I RESUMEN	i
II ABSTRACT	ii
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 GENERALIDADES	1
1.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA BRUCELOSIS	3
1.3 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>Brucella</i> spp	4
1.4 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL GÉNERO	5
1.5 BIOLOGÍA DEL ORGANISMO	6
1.6 FACTORES DE VIRULENCIA EN <i>Brucella</i> spp	7
1.7 PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME)	8
1.8 LIPOPROTEÍNAS	9
1.9 IMPORTANCIA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL ESTUDIO DE <i>Brucella</i> spp	9
1. 10 MÉTODOS DE DETECCIÓN PARA <i>Brucella</i> spp	10
2.JUSTIFICACIÓN	13
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVOS	14
4.1 OBJETIVO GENERAL	14
4.1.2 OBJETIVOS PARTICULARES	14

5. MATERIAL Y MÉTODOS	15
5.1 ELABORACIÓN DE LA SONDA	15
5.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	15
5.1.1.1. Purificación del producto de PCR	16
5.1.2 CUANTIFICACIÓN DE DNA	17
5.1.3. MARCAJE DE LA SONDA	17
5.1.3.1 Precipitación con etanol	18
5.1.4. CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO	18
5.1.5 TRANSFERENCIA A LA MEMBRANA DE NYLON	18
5.1.5.1 Tratamiento del gel de agarosa previo a la transferencia	18
5.1.5.2 Tratamiento para la transferencia	19
5.1.5.3 Tratamiento después de la transferencia a la membrana	19
5.1.6. HIBRIDACIÓN	19
5.1.6.1 Condiciones de hibridación	19
5.1.6.2 Unión del conjugado fosfatasa alcalina-estreptoavidina (SA-AP)	20
5.1.6.3 Reactivo de detección: aplicación-distribución	21
5.1.7. REVELADO	21
5.2.ESPECIFICIDAD DE LA SONDA	21
5.2.1. CEPAS BACTERIANAS	21
5.3.EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA SONDA	22
5.3.1. CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)	22
5.3.2. EXTRACCIÓN DE DNA	22
5.3.3 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	22

5.4. EVALUACION DE LA SONDA CON DNA DE TEJIDOS DE CAPRINOS	23
5.4.1 ESTUDIO SEROLÓGICO	23
5.4.2 COLECCIÓN DE MUESTRAS	24
5.4.3 ESTUDIO BACTERIOLÓGICO	24
5.4.3.1 IDENTIFICACIÓN DE <i>B. melitensis</i>	24
6. RESULTADOS	25
6.1 ELABORACION DE LA SONDA	25
6.1.1 Amplificación mediante PCR	25
6.1.2 Southern Blot	25
6.2 EVALUACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LA SONDA	26
6.2.1 Análisis de restricción con <i>BamH I</i>	26
6.2.2 Análisis de restricción con <i>EcoR V</i>	26
6.2.3 Análisis de restricción con <i>EcoR I</i>	26
6.2.4 Análisis de restricción con <i>Pst I</i>	27
6.3 SENSIBILIDAD DE LA SONDA	28
6.4 EVALUACION DE LA SONDA CON DNA DE TEJIDOS DE CAPRINOS	28
6.4.1 Estudio serológico	28
6.4.2 Estudio bacteriológico	28
6.4.3 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de las muestras de tejidos	29
7. DISCUSIÓN	30
8. CONCLUSIONES	36
9. CUADROS Y FIGURAS	37

10. LITERATURA CITADA

54

11. ANEXO

65

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	PAGINAS
CUADRO 1 Cuantificación de los productos de PCR a partir de <i>Brucella melitensis</i> 16 M y cepa de campo 133.	37
CUADRO 2 Cepas bacterianas antigénica y filogenéticamente relacionadas con <i>Brucella</i> y cuantificación de DNA.	37
CUADRO 3 Cepas de <i>Brucella</i> spp y su cuantificación de DNA	38
CUADRO 4 Grupos de cabras infectadas con la cepa <i>Brucella melitensis</i> de campo .	39
CUADRO 5 Muestras a la necropsia de los animales con los tres tratamientos del experimento.	39
CUADRO 6 Resultados del estudio bacteriológico de los tres grupos de experimentación.	40
FIGURA 1 Extracción de DNA de <i>Brucella melitensis</i> , obtenido por el Método Fenol-Agua.	41
FIGURA 2 Gel de agarosa al 1%, Corrimiento electroforético del DNA de <i>Brucella</i>	42
FIGURA 3 Gel de agarosa al 1%. Amplificación del fragmento de 940 pb del gen <i>omp2</i> de <i>Brucella melitensis</i> .	43
FIGURA 4 Gel de agarosa al 1%. Amplificación de productos de PCR de diferentes especies de <i>Brucella</i> .	44
FIGURA 5 Hibridación de la sonda de 940 pb de <i>B. melitensis</i> 133 y <i>B. melitensis</i> 16M con el fragmento de PCR homólogo.	45
FIGURA 6 RFLP del DNA de las cepas de <i>Brucella</i> spp digerido con <i>BamH I</i> hibridado con la sonda DNA de 940 pb.	46
FIGURA 7 RFLP del DNA de las cepas de <i>Brucella</i> spp digerido con <i>EcoR V</i> , hibridado con la sonda de 940 pb. <i>B. ovis</i> en el carril 6 se observa un patrón de hibridación distinto al resto de las cepas.	47

FIGURA 8 RFLP del DNA de las cepas de *Brucella* spp digeridos con *EcoR* I, hibridado con la sonda DNA de 940 pb. **48**

FIGURA 9 RFLP del DNA de las cepas de *Brucella* spp digerido con *Pst* I e hibridado con la sonda de 940 pb. **49**

FIGURA 10 RFLP del DNA de cepas bacterianas antigénica y filogenéticamente relacionadas con *Brucella* spp digeridas con *Pst* I. **50**

FIGURA 11 RFLP del DNA de las diluciones de *B. melitensis* 16M digeridas con *Pst* I e hibridadas con la sonda de 940 pb. **51**

FIGURA 12 RFLP de los tejidos del grupo III Control negativos digeridos con *Pst* I e hibridados con la sonda de 940 pb. **52**

FIGURA 13 Grupo I . RFLP de los tejidos de caprinos infectados con la cepa de campo de *B. melitensis*, digeridos con *Pst* I e hibridados con la sonda de 940 pb **53**

RESUMEN

Martínez Martínez Olga Lidia. Elaboración de una sonda a partir de un fragmento del gen *omp2* de *Brucella melitensis*. Bajo la dirección de la Dra. Beatriz Arellano Reynoso y asesorada por los Drs. Efrén Díaz Aparicio y Víctor R. Tenorio Gutiérrez.

Los objetivos del presente estudio fueron elaborar una sonda de DNA a partir de un fragmento del gen *omp2* de *Brucella melitensis* y evaluarla como marcador del polimorfismo genético en el DNA de *B. melitensis*, con el fin de establecer la diferencia con las demás especies de *Brucella*. Se utilizó la cepa de referencia de *B. melitensis* 16M para la obtención de la sonda por la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se analizaron por medio de la técnica del Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), 11 cepas de *Brucella spp* y 9 géneros bacterianos relacionadas filogenéticamente y que cruzan antigénicamente con *Brucella*. Se determinó la sensibilidad de la sonda y se evaluaron muestras de tejidos infectados con *B. melitensis*. El DNA fue digerido con las enzimas de restricción *BamH I*, *EcoR V*, *EcoR I* y *Pst I*. Se logró obtener una sonda de 940 pb que reconoce el sitio de amplificación del gen *omp2* de *B. melitensis*. Las diferencias más importantes en el patrón de reconocimiento se observaron con la enzima *Pst I*. *B. melitensis* puede diferenciarse de las demás especies de *Brucella* y todas las especies de brucelas reconocen la secuencia de 940 pb. Únicamente *B. ovis* se diferencia cuando es digerida por las enzimas *Pst I*, *EcoR I*, *EcoR V*. La secuencia de 940 pb no presentó reconocimiento de los otros géneros bacterianos. El análisis de restricción de la sonda mostró una baja sensibilidad de la prueba. En el análisis del RFLP de los tejidos de cabras infectadas, no se logró la detección de *B. melitensis*.

Palabras Claves: *Brucella melitensis*, *omp2*, PCR, RFLP.

ABSTRACT

Martínez Martínez Olga Lidia. Elaboration of a probe from *Brucella melitensis* *omp2* gene. Thesis supervisor: Beatriz Arellano Reynoso. Scientific direction: Efrén Díaz Aparicio and Víctor R. Tenorio Gutiérrez.

The objective of the present study was to develop and evaluate a DNA probe from the *B. melitensis omp2* gene as a marker of genetic polymorphism in *B. melitensis*, in order to differentiate *B. melitensis* from other *Brucella* species. The reference strain *B. melitensis* 16M was used to obtain the probe by the Polymerase Chain Reaction (PCR). 11 strains of *Brucella* species were examined by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis, as well as 9 other bacteria phylogenetically and serologically related with *Brucella*. Sensitivity of the probe was assayed with serial dilutions of bacterial DNA and evaluated in *B. melitensis* infected tissue samples. Important differences were obtained when DNA was digested with *Pst* I, as *B. melitensis* could be differentiated from other *Brucella* species. Only *B. ovis* could be differentiate from other *Brucella* species when digested with *Pst* I, *EcoR* I and *EcoR* V. The probe did not hybridized with bacteria other than *Brucella*. The restriction analysis of the probe showed a low sensitivity as it detected minimum of 2.8×10^6 cfu/ml. The RFLP analysis did not detect *B. melitensis* DNA from infected goat tissues. We conclude that RFLP analysis in combination with the enzyme *Pst* I and the *omp2* probe is a useful tool in *Brucella* strain characterization, but it is not good enough to use it as a diagnostic tool on tissue samples.

Key words: Brucella melitensis, omp2, PCR, RFLP.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

La brucelosis es una enfermedad de gran importancia en el mundo, especialmente en países en vías de desarrollo donde es una de las principales zoonosis, que cada vez adquiere mayor relevancia en la salud pública ¹. El agente etiológico fue descubierta en 1887 por David Bruce, sin embargo, tuvieron que transcurrir casi 20 años para que Zammit determinara que las cabras eran la fuente de infección para el humano y que ésta se lleva a cabo a través del consumo de productos lácteos ^{1, 2, 3}.

En México, en 1905 Valenzuela sospechaba de la presencia del *Micrococcus melitensis*, primer nombre que se le dio en humanos. Reséndiz en 1912, relacionó la importación de cabras de Murcia, España en 1910, con la aparición de una enfermedad extraña, caracterizada por fiebre recurrente ^{2, 3}. Los primeros informes de la infección en humanos aparecieron a finales de los años treinta y el primer aislamiento del agente lo realizó Pláceres en 1921 en el estado de Puebla con estudios bacteriológicos y serológicos ².

La brucelosis es causa de grandes pérdidas en la ganadería y es reconocida como una de las zoonosis bacterianas más importantes. Tiene una alta morbilidad en los animales, donde provoca abortos, mortandad de crías, disminución de la producción de leche e infertilidad. Principalmente afecta los animales domésticos y es capaz de transmitirse al humano, quien juega un papel mínimo en su propagación ^{4, 5, 6}.

Brucella melitensis, que comúnmente afecta a cabras, es la más invasiva y el agente responsable de la mayoría de los casos de brucelosis en humanos ^{1, 3, 6}.

El ganado caprino es un importante transmisor de esta enfermedad, la cual muchas veces pasa desapercibida en estos animales. A pesar de esto, en las campañas contra la brucelosis, la atención que se le da a este ganado es mucho menor en relación al ganado bovino ^{1, 2, 7}. *B. abortus* se ha relacionado hasta ahora con infecciones leves en humanos pero con un alto porcentaje de casos en bovinos ^{1, 6}. Comúnmente, las infecciones por *B. abortus* y *B. suis* suelen afectar preferentemente a grupos con ocupación similares tal es el caso de veterinarios y ordeñadores, mientras que la infección por *B. melitensis* se presentan con más frecuencia en la población en general. México, Perú y Argentina son de los países que presentan tasas más elevadas de brucelosis por *B. melitensis* en caprinos ⁸. En México, el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE), reporta que de casos en humanos, el 90% son ocasionados por *B. melitensis*, los cuales son frecuentemente asociados al consumo de productos lácteos de origen caprino. De igual manera, el Hospital General de México, en un estudio epidemiológico que se realizó de 1994 a 1995, se determinó que los pacientes seropositivos a brucelosis manifestaron en una encuesta el consumo de leche o sus derivados y los pacientes con manifestaciones clínicas de la enfermedad refirieron el consumo de leche de origen caprino sin pasteurizar o hervir ^{9, 10}.

La brucelosis animal es una enfermedad que se ha asociado a varias especies domésticas, sin embargo, las cepas de *Brucella* han sido aisladas de gran variedad de especies silvestres como son visón, alce, cerdos salvajes, jabalí, zorros, liebres, búfalo africano y renos ¹¹. Diversos investigadores han informado de la presencia de anticuerpos contra brucela en focas, delfines y lobos marinos ^{12, 13} y a la bacteria aislada se le dio el nombre de *Brucella maris*, la cual presenta diferencias biológicas y genéticas a la seis especies clásicas de brucela ^{11, 14, 15, 16}.

1.2 Epidemiología de la brucelosis

Al ser la brucelosis una zoonosis, la fuente de infección la constituyen los animales domésticos, que en su mayoría son aquellas especies productoras de alimento¹. El riesgo a enfermarse y la severidad del padecimiento están determinados por el tipo de brucela al cual el individuo se expone, sin dejar de considerar el estado nutricional e inmune del individuo, las vías de infección y la cantidad del inóculo⁹.

La infección por *B. abortus*, es el tipo más extendido en el mundo y probablemente en México ha sido una fuente importante de brucelosis humana en muchos lugares, debido a la gran concentración de ganado bovino que existe y a la costumbre de consumir leche cruda sin hervir o pasteurizar^{1,6}. Es probable que muchos de estos casos sean atribuidos a *B. melitensis*, sin embargo, una proporción alta de estas infecciones son leves o cursan en forma asintomática. En general es menos patógena para el hombre que *B. melitensis* o *B. suis*^{1,3,6}.

Brucella melitensis es la especie que más se reporta como causa de enfermedad, ya que se aísla con más frecuencia en humanos^{9,10,17}; además es el tipo de brucela asociada a casos severos. La bacteria afecta principalmente a cabras y borregos, y a otras especies.^{1,8} La presencia de *B. melitensis* en bovinos es un problema potencialmente grave por el gran volumen de leche infectada que se puede producir por animal y por la contaminación que se vierte al medio ambiente con un solo aborto (10^{10} bacterias/ml)¹. En el territorio nacional la biovariedad 1 es la más frecuente, con un 74%, aunque en algunos casos se ha aislado el biovar 3 en 1% y el 2 con 6%. La diferencia con *B. abortus* es demasiado amplia ya que los biovares 1, 4 y 5 de ésta, se han aislado en porcentajes bajos, al igual el biovar 1 de *B. suis*¹⁷.

También los perros juegan un papel importante en la epizootiología de la enfermedad. En México, se conoce la existencia de *B. canis* de los biovares 1, 4, 5 y 6 siendo el más frecuente el biovar 1 y el más virulento para el hombre el biovar 4. *B. suis* se presenta como una infección más restringida. En forma local, es una fuente importante de casos en humanos, que pueden ser tan severos como los producidos por *B. melitensis*. En México sólo se ha aislado el biovar 1, tanto de casos humanos como de cerdos¹⁷.

1.3 Características del género *Brucella* spp

Los miembros del género *Brucella*, se han agrupado en seis especies (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae*), cuatro de ellas son de forma lisa (S), mientras que sólo *B. canis*, y *B. ovis* se presentan en forma rugosa (R)^{18, 19}. El humano es susceptible a cualquiera de las cuatro primeras especies. En tanto *B. ovis* y *B. neotomae* poseen una baja virulencia que las restringe sólo a ciertos hospedadores¹⁷. El aislamiento de *Brucella* a partir de algunas especies de mamíferos marinos^{13, 14}, ha ampliado la clasificación de este género, ya que según los trabajos realizados, claramente forman un grupo separado al que han denominado *B. maris*^{11, 14, 15, 16, 17}.

Desde el punto de vista genético, el género *Brucella* es altamente homogéneo con base en estudios de hibridación y se considera que es un género monoespecífico con variantes de una especie, *B. melitensis*. Algunos autores sugieren que las diferentes especies o tipos deberían considerarse como biovares de *B. melitensis*; sin embargo, esta clasificación no ha sido plenamente aceptada, por lo que para propósitos epidemiológicos ha sido importante mantener la nomenclatura tradicional de las seis especies, ya que por otro lado sigue existiendo una preferencia marcada por el huésped animal^{20, 21, 22}. Así pues, *B. abortus* se asocia normalmente a ganado bovino y se subdivide en 7 biovares; *B. melitensis* es relacionada más con cabras y borregos y se subdivide en tres

biovares; *B. suis* con preferencia para cerdos, se subdivide en cinco biovares; *B. canis* infecta a perros y se subdivide en seis biovares; *B. ovis* causa infección específicamente a borregos y *B. neotomae* a roedores; en estos dos últimos no han sido reportados biovares ^{17, 21}. Como se ha mencionado *B. maris* afecta a focas y delfines, se ha propuesto una nueva clasificación de acuerdo al hospedador preferencial con dos nuevas especies: *Brucella pinnipediae* y *Brucella cetaceae*, que serían compatibles con los criterios clásicos del hospedador y del polimorfismo del locus *omp2* ^{11, 14, 15, 16}.

Brucella melitensis presenta dos cromosomas circulares similares a las demás especies de brucela, contiene 3,294,935 bp distribuidos en los dos cromosomas. *B. suis* biovar 3 tiene un sólo cromosoma y algunas hipótesis mencionan que esta especie es un ancestro común de las especies que contienen dos cromosomas ^{23, 24}.

1.4 Características microbiológicas del género

Las brucelas son bacilos cortos, Gram negativos, no esporulados, no presentan cápsula ni flagelos. Su característica de ligera ácido-alcohol resistente permite su tinción por el método de Stamp; son inmóviles y suelen presentarse en los frotis en forma aislada. Son bacterias aerobias catalasa, oxidasa y ureasa positiva, se desarrollan a 37°C y algunas especies requieren de CO₂. La variación en el comportamiento entre especie ha llevado a la necesidad de clasificarlas en biovariedades. Los criterios para la identificación de las especies y biovariedades del género *Brucella* resultan de la combinación de los resultados de producción de H₂S, necesidades de CO₂, producción de ureasa, desarrollo en presencia de colorantes como tionina y fucsina, producción de catalasa y oxidasa, aglutinación con sueros monoespecíficos y lisis con diferentes fagos (Tb, Wb, Iz y R/C) ^{2, 25, 26}. Son microorganismos intracelulares con la capacidad de invadir tejidos de

animales. Estas bacterias pueden ser aisladas de productos no pasteurizados de animales infectados y de muestras clínicas ^{1, 2, 25, 26}.

1.5 Biología del organismo

La virulencia de brucela se debe fundamentalmente a la capacidad para sobrevivir y multiplicarse en el interior de las células fagocíticas ^{27, 28, 29, 30}. Ésta constituye uno de los principales mecanismos de defensa para las brucelas. Una vez que el microorganismo penetra en el organismo, los fagocitos son estimulados, produciéndose su migración hacia el foco de infección mediante fenómenos quimiotácticos dependientes de productos microbianos o por activación de factores séricos que actúan como citocinas. La muerte del macrófago se produce como consecuencia de una sucesión de fenómenos para activar los mecanismos bactericidas oxígeno dependientes y oxígeno independientes de las células fagocíticas ^{31, 32, 33}.

Después de la internalización bacteriana, se inicia la fusión del fagosoma con los lisosomas para formar el complejo fagolisosomas. Los compartimentos donde se localizan la mayoría de las enzimas bactericidas. Paralelamente, debe resistir el efecto de potentes intermediarios del oxígeno (peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos), formados en los fagocitos durante la explosión respiratoria que acompaña a la fagocitosis para la destrucción de bacterias ingeridas. Sin embargo, *Brucella* puede permanecer en el fagosoma intacto y bloquear la fusión posterior con el lisosoma; esto le permite protegerse de la acción de los péptidos catiónicos y enzimas líticas presentes en los gránulos lisosómicos. Se cree que la cadena O y quizá lípidos de ornitina interactúan directamente con la membrana del fagosoma impidiendo la fusión ^{32, 33, 34, 35, 36, 37}. La superóxido dismutasa y la catalasa, enzimas presentes en brucela, se integran en el mecanismo de defensa que desarrollan algunos microorganismos frente a la toxicidad oxidativa ^{38, 39, 40, 41}. Esta habilidad de supervivencia de las brucelas les permite establecer la infección

crónica en el huésped y permanecer como un parásito intracelular facultativo^{27, 28, 29, 30}

1.6 Factores de virulencia en *Brucella* spp.

Se han descrito diversos factores de virulencia para *Brucella* spp., los clásicos como el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de membrana externa (PME) y otros no tan clásicos como los de regulación, metabolismo de los azúcares, metabolismo del DNA/RNA, mecanismos de estrés/chaperonas, óxido reducción, metabolismo del nitrógeno entre otros⁴². Pero los factores de virulencia más estudiados han sido los componentes de la membrana. Se han descrito dos componentes de la membrana externa, como factores de virulencia importantes: el LPS y PME^{43, 44, 45, 46, 47}

El LPS es el antígeno inmunodominante de la superficie de las brucelas lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae*), posee algunas propiedades que lo diferencian del LPS de las bacterias Gram negativas. El LPS está compuesto por un glicolípido (lípid A), una región central o núcleo glicosídico y una cadena polisacárida o antígeno "O". La cadena "O" contiene los determinantes antigénicos responsables de la especificidad serológica entre las especies y serovariedades. Los anticuerpos pueden ser detectados con suspensiones celulares (fase lisa) o con determinados extractos^{48, 49, 50, 51}

El carácter liso o rugoso radica en la presencia o ausencia, respectivamente de la cadena O (polisacárido homopolímero de N-formil-perosamina) del LPS. Es un componente exclusivo de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Lo que explica que sea el antígeno inmunodominante de las bacterias en fase lisa. El lípid A contiene glucosamina y diaminoglucosa, presenta en sus grupos amino e hidroxilo, sustituciones por ácidos grasos de longitud de cadena variable. El núcleo está cualitativamente formado por el ácido 2-ceto, 3-deoxioctulósico (KDO), manosa, glucosa y quinovosamina, por el cual se une la

cadena O. Las especies rugosas (*B. canis* y *B. ovis*) carecen de quinovosamina y por lo tanto de la cadena O. El LPS es una molécula que contiene los antígenos A y M clásicos de Wilson y Miles, así como determinantes que son los responsables de las reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas. Algunos estudios han evidenciado que solo un azúcar, la peroxamina, constituye exclusivamente la cadena O del LPS de *B. abortus* y *Yersinia enterocolitica* O:9, siendo responsable el antígeno A de la reacción cruzada ^{48, 49, 50, 51, 52}.

1.7 Proteínas de Membrana Externa (PME)

Las PME de brucela fueron inicialmente identificadas en la década de 1980. La caracterización de las proteínas de membrana externa de *B. abortus* fue realizada por Douglas *et al* ⁴⁶ al igual que Verstrete *et al* ⁴⁴, quienes identificaron tres grupos de proteínas con base en sus pesos moleculares. Sin embargo, Douglas en 1984 identificó el grupo II de las PME como el grupo de las porinas ^{45, 53}.

Las PME específicas de *Brucella* son de gran interés, porque las han relacionado con protección y algunas son reconocidas por el sistema inmune durante la infección y sólo se han reportado en *Brucella*, por lo que serían de gran utilidad en pruebas diagnósticas o para ser consideradas en las nuevas vacunas ^{54, 55}.

Brucella presenta tres grupos principales de PME, cuyo papel como antígenos son en gran parte desconocidos. Las principales proteínas citoplasmáticas intervienen en la hipersensibilidad retardada. La membrana externa de *Brucella* presenta varias proteínas cuantitativamente mayoritarias en las condiciones habituales de cultivo. Se han clasificado de acuerdo a su peso y actividad biológica ^{45, 46, 53}.

Grupo 1. De peso molecular de 88-94 kDa posiblemente relacionadas con ciertas funciones de la biosíntesis de la propia envoltura.

Grupo 2. De peso molecular 36-38 kDa, son equivalentes a las porinas de otros Gram-negativos, forman en estado nativo agrupaciones triméricas por las que penetran ciertos solutos. Dos genes, el *omp2a* y *omp2b*, codifican estas porinas, pero sólo el segundo parece expresarse *in vitro*.

Grupo 3. De peso molecular 25-31 kDa, codificadas en los genes *omp25* y *omp31*. Se han descrito interacciones muy fuertes con el LPS, pero su función es desconocida. Hay que señalar que *B. abortus* carece del gen *omp31*, por lo que sólo expresa Omp25^{33, 46}.

1.8 Lipoproteínas

Existen varias lipoproteínas de bajo peso molecular en la envoltura de *Brucella* y se conocen los genes de tres de ellas (*omp10*, *omp16* y *omp19*). También se ha descrito una lipoproteína de peso molecular bajo entre 8-9 kDa unida covalentemente al peptidoglicano. Aparentemente existen proteínas homólogas a las Omp10 y Omp19 en *Ochrobactrum anthropi* y otras bacterias relacionadas genéticamente a *Brucella*^{54, 55, 56}.

1.9 Importancia de la Biología Molecular en el estudio de *Brucella* spp.

Brucella está dentro de un grupo muy homogéneo de bacterias, por su relación antigénica y por estudios de hibridación DNA-DNA (> 90 % de homología para todas las especies). Con base en el análisis de las secuencias de RNA ribosomal 16S, se ubicó a *Brucella* en el grupo alfa, subgrupo 2 de las

Proteobacterias; dentro de la familia *Rhizobiaceae* ^{18, 19, 21, 57}. Algunos métodos han sido utilizados para una identificación más precisa de las especies de brucela con fines taxonómicos, principalmente pruebas de hibridación de DNA tipo Southern blot y de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de varios genes de brucela y posterior estudio del producto amplificado con enzimas de restricción ^{21, 54}.

Además, se han clonado los genes que codifican proteínas de la envoltura de *Brucella* ⁵⁸, estos incluyen proteínas periplásmicas y proteínas de membrana ^{59, 60, 61}. Halling *et al* ⁶², utilizaron los métodos de delección de genes y reemplazos que demuestran que la proteína periplásmica BCSP (31 kDa), no estaba involucrada en la invasión y el aumento de la replicación de *B. abortus* ⁶². Ficht *et al* ⁵⁹, reportaron la clonación de una región que codifica las porinas del grupo 2 de *B. abortus* (locus *omp2*) ⁵⁹. Estos autores demostraron también que este locus *omp2*, contiene dos genes estrechamente relacionados, *omp2a* y *omp2b*, los cuales están presentes en los genomas de todas las especies de *Brucella* ^{63, 64}. Sin embargo, aunque ambos genes contienen marcos de lectura abiertos codifican proteínas con 96 % de homología, la expresión de *omp2b* solo se ha demostrado en *B. abortus* cultivada en laboratorio ^{63, 64}. Esto no excluye la posibilidad de la expresión de *omp2a* en *B. abortus* bajo condiciones especializadas. Además, los genes *omp2a* y *omp2b* han sido expresados en *E. coli* y sus productos localizados fuera de la membrana celular, demostrando por ensayos de permeabilidad que el producto del gen *omp2a* tiene una actividad de porina ^{63, 64, 64}.

1. 10 Métodos de detección para *Brucella* spp.

La brucelosis en el humano y animales se diagnostica mediante métodos serológicos como lo son las pruebas de aglutinación en placa, rosa de bengala, fijación de complemento, ELISA y otras técnicas. Sin embargo, desde 1974 hasta la actualidad, se ha demostrado que las pruebas serológicas presentan un gran

número de reacciones cruzadas con otros microorganismos Gram negativos, en particular con especies de *Yersinia*, *Salmonella* y *Escherichia* que interfieren en el resultado del diagnóstico ^{28, 66, 67, 68, 69}.

La detección del agente tiene una ventaja decisiva sobre estos métodos serológicos. Sin embargo, debido a las propiedades biológicas de las brucelas, todos los cultivos requieren de cinco a diez días para su desarrollo y cuando el número de bacterias por muestra es baja, la probabilidad del aislamiento disminuye ^{26, 70}.

La técnica de PCR es un método altamente sensible, el cual hace posible detectar productos de amplificación específicos de ácidos nucleicos. Para la detección de especies de *Brucella* se han utilizado diversos iniciadores específicos del género, derivados de las secuencia de rRNA 16S de *B. abortus* ^{71, 72, 73, 74, 75}. El PCR es una herramienta que podría ser de utilidad en el diagnóstico ya que se puede utilizar para la detección de microorganismos, no sólo en animales infectados, sino también en alimentos ⁷⁶. Se ha demostrado la alta especificidad del PCR en todos los serotipos y especies de *Brucella* provenientes de aislamientos clínicos y de campo ⁷⁵.

La molécula más adecuada para estos propósitos es la subunidad pequeña del rRNA 16S. La cual está presente en bacterias con crecimiento activo en un gran número de copias ⁷⁷, alrededor de siete a diez copias de rRNA se repiten en diversos lugares del genoma ⁷⁸. La mitad de la masa de los ribosomas es RNA, el rRNA es el tipo más abundante de RNA celular, que constituye el 75% del RNA total y de 6 a 10 proteínas se enlazan al subunidad rRNA 16S en forma independiente y en sitios específicos ⁷⁹. Las comparaciones de las secuencias de los rRNA 16S, han mostrado que algunos segmentos de la molécula están altamente conservados, mientras que otros varían ⁸⁰. La variabilidad de las secuencias del rRNA es lo suficientemente estable como para permitir la

investigación de las relaciones filogenéticas, las cuales se pueden calcular por las diferencias de secuencias⁸¹. En muchos casos, no hay diferencias de secuencias suficientemente estables en las regiones variables para permitir el diseño de sondas de oligonucleótidos específicos de especies, las cuales podrían utilizarse para el diagnóstico^{82, 83}. Estudios recientes han mostrado que las sondas de oligonucleótidos específicos de especie se pueden utilizar para la hibridación, como solución para identificar diferentes géneros bacterianos, entre ellos, los géneros *Streptococcus* y *Pseudomonas*; además, estas sondas son útiles en el diagnóstico de diversas especies y permite un seguimiento epidemiológico^{84, 85}.

Por lo tanto, el desarrollo y la aplicación creciente de técnicas basadas en la detección y análisis de ácidos nucleicos, ha permitido una mejor identificación y clasificación taxonómica de géneros. Estos métodos evitan la subjetividad asociada con los resultados obtenidos con pruebas convencionales, donde es común el surgimiento de confusiones al existir reacciones cruzadas entre diferentes microorganismos^{84, 86, 87, 88}.

2.- JUSTIFICACION

El empleo de sondas o marcadores genéticos a partir de secuencias conservadas, para la detección de DNA de *Brucella melitensis* puede ser una alternativa en el diagnóstico de la brucelosis caprina. El uso de un fragmento de 940 pb específico de especie amplificado a partir del locus *omp2* de *B. melitensis*, por PCR, permitiría determinar diferencias con las demás especies de *Brucella*.

3.- HIPOTESIS

La secuencia conservada amplificada a partir del gen *omp2* utilizada como marcador genético permitirá detectar de manera específica el DNA de *Brucella melitensis*.

4.- OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Obtención de una sonda DNA a partir del gen *omp2* para la identificación y el de diagnóstico de *Brucella melitensis*.

4.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

- ❖ Obtener una sonda a partir del gen *omp2* de *Brucella melitensis*.
- ❖ Analizar la especificidad de la sonda con el DNA de diferentes géneros y especies bacterianas.
- ❖ Determinar la sensibilidad de la sonda.
- ❖ Evaluar la sonda con tejidos de caprinos infectados con *Brucella melitensis*.

5.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 ELABORACIÓN DE LA SONDA

Se trabajó con dos cepas de *Brucella melitensis* para la elaboración de la sonda.

- a) Cepa de referencia 16 M de *B. melitensis*.
- b) Cepa de campo de *B. melitensis*, aislada de una cabra procedente de Torreón, Coahuila, denominada 133.

Ambas cepas se inocularon en cinco placas de Agar *Brucella* por 72 h a temperatura de 37°C, posteriormente se cosechó la masa bacteriana de cada una de las cepas con solución salina fisiológica (SSF) y se inactivaron a 90°C por 15 min. Se realizó una extracción fenólica para la obtención de DNA utilizando lisozima 0.8 mg/ml combinada con la solución TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0 y EDTA 0.1mM pH 8.0) y se incubó a 37°C 1 h. Posteriormente se adicionó proteinasa K a una concentración final de 0.1 mg/ml combinada con solución de lisado (SDS 0.5%, Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA 0.5 M pH 8.0) e incubada a 60°C 1 h. Posteriormente se trató la muestra con fenol amortiguado y cloroformo para obtener la fase acuosa y así precipitar los ácidos nucleicos en una solución 1/10 de acetato de potasio 3 M y etanol absoluto frío. Se eliminó el RNA con RNAasa durante 1 h a temperatura ambiente, posterior a este paso se dió un tratamiento con acetato de potasio y etanol frío para precipitar el DNA, se amortiguó con solución TE la muestra se conservó a -20°C hasta su uso.

5.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la elaboración de la sonda se trabajó con DNA de *Brucella melitensis*. Se llevó a cabo la reacción de PCR con una solución amortiguadora de PCR (1.0

mM Tris-Cl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3), 100 μM de cada dNTP, 200 nM de cada iniciador, 2 U de Taq polimerasa (*Boheringer Mannheim*^R) y 1 μl o 200 ng de DNA, en un volumen final de 50 μl. La secuencia de los iniciadores fue: 5'-GTTATCTCGCCTTTACCG-3', 5'-CTCGGATCGTAAAGGCT-3', 5'-ATCGTGTAATCGTTGTCAAC-3^{89, 90}.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400^R) con el siguiente programa: 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 min.

5.1.1.1 Purificación del producto de PCR

El producto de PCR amplificado se purificó con el sistema CONCERT Rapid PCR/ (Life technologies^R). Brevemente: a la muestra se adicionaron 400 μl de la solución de unión H1 (Hidrocloreuro de guanidina, EDTA, Tris-HCl e isopropanol) a la reacción de amplificación. En el cartucho de separación se depositó la muestra y se centrifugó a 12,000 xg por 1 min, decantando el fluido a través de la membrana del tubo. El cartucho del centrifugado se colocó dentro de un tubo de lavado de 1.5 ml. Se agregaron 700 μl del amortiguador de lavado H2 (NaCl, EDTA y Tris-HCl). Se centrifugó a 12,000 xg por 1 min, los restos del fluido del tubo de 1.5 ml se eliminaron y para remover el amortiguador de lavado residual se centrifugó a 12 000 xg durante 1 min. Se depositó el cartucho de centrifugación dentro del tubo de recolección de 1.5 ml y se adicionaron 50 μl del amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0) caliente a una temperatura de 70°C, se incubó a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 xg durante 2 min. La muestra de DNA se conservó a -20 C hasta su uso.

5.1.2 CUANTIFICACIÓN DE DNA

El producto de la PCR purificado se cuantificó en ng/ μ l, utilizando 1 μ l de DNA de cada muestra diluida en 69 μ l de agua destilada estéril, tomando en cuenta la absorbancia (260 nm) y multiplicada por la constante de DNA (50) y por el factor de dilución (70). La lectura se realizó mediante un espectrofotómetro de DNA (Gene Quant II Pharmacia Biotech^R) (Cuadro 1).

5.1.3 MARCAJE DE LA SONDA

Para el marcaje del producto de PCR, se utilizó el sistema de DNA BIOPRIME (Life technologies^R). Se realizaron dos precipitaciones con etanol para la eliminación de nucleótidos no incorporados, usando 100 ng de DNA disueltos en 20 μ l de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0) diluido en tubos de 1.5 ml. Se adicionaron 20 μ l de la solución "Random prime 2.5 X" (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 12.5 mM MgCl₂, 25 mM 2-mercaptoetanol, 750 μ g/ml de iniciador octámetro aleatorio) en frío. Se incubó por 5 min en agua hirviendo, inmediatamente se enfrió en hielo. Posteriormente se realizó la mezcla en frío con 5 μ l de la mezcla 10 X de dNTPs (1 mM biotina-14dCTP, 1 mM dCTP, 2 mM dAtp, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP en 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM Na₂ EDTA) y 49 μ l agua destilada estéril en agitación. Se adicionó 1 μ l del "Fragmento Klenow" (40 unidades/ μ l Fragmento Klenow en 100 mM amortiguador de fosfato de potasio, pH 7.0, 10 mM 2-mercaptoetanol, 50 % (v/v) glicerol). Se centrifugó durante 30 segundos y se incubó durante 60 min. a 37°C. Para detener la reacción se adicionaron 5 μ l del amortiguador final (0.2 M Na₂ EDTA, pH 7.5).

5.1.3.1 Precipitación con Etanol

Después del marcaje con biotina se realizaron dos precipitaciones con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.0 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se congeló a -70°C durante 15 min. seguida de una centrifugación a 15,000 $\times g$ durante 10 min. La pastilla obtenida se resuspendió con 50 μl con TE (10 mM Tris-HCl; 0.1 mM EDTA pH 8.0) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.1.4 CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO

Las muestras de DNA se visualizaron en geles de agarosa al 1% en solución 0.5 X de TBE (Tris-Base 40mM, Ácido bórico 20 mM y EDTA 0.1mM pH 8.0) y 7 μl de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se utilizó el DNA del bacteriofago Lamda *Hind* III como marcador de referencia. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 70 V durante 40 min. y se visualizaron con luz ultravioleta de onda corta (UV).

5.1.5 TRANSFERENCIA A LA MEMBRANA DE NYLON

5.1.5.1 Tratamiento del gel de agarosa previo a la transferencia

Para realizar la transferencia a la membrana de nylon, se sumergió el gel de agarosa en una solución de ácido clorhídrico (HCl 0.15 M), durante 15 min. con agitación suave y se enjuagó con agua destilada estéril. Después se sumergió el gel en una solución de hidróxido de sodio y cloruro de sodio (NaOH 0.4 M, NaCl 0.6 M) durante 30 min. con agitación suave. La membrana se humedeció con agua destilada estéril durante 30 min. antes de la transferencia.

5.1.5.2 Tratamiento para la transferencia

Se agregaron 600 ml de la solución SSC 10 X (NaCl 3.0 M, Citrato de sodio dihidratado 0.3 M) al sistema de transferencia y se formó un puente entre la bandeja de polietileno y la solución de SSC 10 X con dos hojas de papel filtro previamente humedecidas en la misma solución. La cara inferior del gel quedó en contacto con el puente, la membrana se colocó sobre el gel. Dos hojas de papel filtro del tamaño del gel se colocaron sobre la membrana y se adicionaron toallas de papel secas y un peso 700 g. La transferencia se llevó a cabo durante toda la noche.

5.1.5.3 Tratamiento después de la transferencia a la membrana

Después de la transferencia la membrana se lavó con una solución de SSC 2X (anexo) y se fijó la membrana exponiendo a la luz ultravioleta del transiluminador durante 8 min. Para corroborar la transferencia se bañó el gel con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio durante 20 min y se observó en el transiluminador de UV.

5.1.6 HIBRIDACIÓN

Se usó el sistema de detección de ácidos nucleicos PHOTO GENE versión 2.0 (Life Technologies^R) que es útil para la detección quimioluminiscente no radioactiva de sondas biotiniladas hibridizadas a ácidos nucleicos e inmovilizadas en membranas de nylon.

5.1.6.1 Condiciones de hibridación

Se colocó la membrana en una bolsa de plástico sellada con 38.5 ml de la solución de prehibridación (anexo), utilizando 10 mg/ml de DNA de esperma de

salmón (anexo) por cada ml de la solución de prehibridación. Se incubó por 4 h a 42°C. Se eliminó la solución de prehibridación y se adicionaron 15.4 ml de la solución de hibridación (anexo), utilizando la misma concentración de esperma de salmón y 50 ng/ml de sonda biotinilada, previamente desnaturalizada en baño de agua hirviendo y enfriada en hielo. El paquete de hibridación se incubó a 42°C por toda la noche.

Se realizaron dos lavados a la membrana con SSC 5X (anexo) precalentado a 65°C y SDS al 0.5 % (P/V) por 5 min. por lavado y un tercer lavado con una solución precalentada a 50°C de SSC 0.1 X (NaCl 3.0 M, Citrato de sodio dihidratado 0.3 M), SDS al 1 % (P/V) por 30 min. Un último lavado se hizo con 2 ml / cm² de SSC 2 X (anexo) por 5 min. a temperatura ambiente.

5.1.6.2 Unión del conjugado fosfatasa alcalina-estreptoavidina (SA-AP)

Se enjuagó la membrana por 1 min. con TBS-TWEEN 20 (anexo). Se colocó la membrana en un paquete de hibridación y se agregaron 0.4 ml /cm² de la solución de bloqueo precalentada a 65°C (anexo), se incubó por 1 h a 65°C en agitación. La solución bloqueadora se eliminó y se adicionaron 7 µl del conjugado SA-AP por 100 cm² de membrana diluido 1:1000 en TBS-TWEEN 20. Se incubó por 10 min. a temperatura ambiente en agitación.

Se sacó la membrana del paquete de hibridación y se lavó dos veces con TBS-TWEEN 20, la primera durante 15 min. y la segunda por 1 h a temperatura ambiente con agitación. Finalizando con un tercer lavado con el amortiguador de lavado final (anexo) por 1 h a temperatura ambiente.

5.1.6.3 Reactivo de detección: aplicación-distribución

La membrana se depositó en un folder de revelado y se adicionaron 10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de membrana del reactivo de detección. Se colocó el fólter revelador PHOTO GENE 2.0 en un cassette cerrado con una pieza de la película de rayos X (KODAK XAR) arriba del fólter revelador en el cassette. Se incubó por 1 h a temperatura ambiente y se dio una exposición inicial a la placa por 5 min. a temperatura ambiente y se ajustaron subsecuentemente los tiempos de exposición.

5.1.7 Revelado

Se sacó la placa del cassette de exposición y se sumergió en la solución reveladora, posteriormente se lavó con agua corriente y por último se sumergió la placa en la solución fijadora por tres min. Nuevamente se lavó con agua y se dejó secar.

5.2 ESPECIFICIDAD DE LA SONDA

5.2.1 Cepas Bacterianas

Se incluyeron para el análisis, cepas bacterianas que cruzan serológicamente con *Brucella* y filogenéticamente relacionadas a este género (Cuadro 2). A estas cepas se les realizaron pruebas bacteriológicas para constatar que cumplieran con el patrón bioquímico establecido. Cada una de las cepas bacterianas fueron cosechada según sus requerimientos nutricionales. Se inocularon cinco placas de cada una de las cepas, se incubaron a 37°C por 24 h, excepto las cepas *B. abortus* S19, INDRE, 544, RB51 y RB51 aislada de leche, que se incubaron por 72 h a 37°C con 10% de CO₂ (Cuadro 3). Se recolectó cada

cepa con SSF y el paquete celular de las cepas de *Brucella* se inactivaron a 95°C durante 15 min. posteriormente se extrajo el DNA.

Se trabajó con el método de extracción fenólica ya descrito y se llevó el mismo procedimiento de cuantificación de DNA así como las técnicas de enzimas de restricción y Southern blot. Para el ensayo de enzimas de restricción se utilizaron las siguientes enzimas: *Pst* I (5'- CTGCA G-3'), *Bam*H I (5'-G GATCC-3') *Eco*R I (5'-G AATTC-3') y *Eco*R V (5'- GAT ATC-3') (Life technologies^R).

5.3 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA SONDA

5.3.1 Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)

La cepa de *Brucella melitensis* se inoculó en medio Agar *Brucella* por 72 h a temperatura de 37°C, se cosecharon con 50 ml de SSF, se realizaron diluciones décuples de 10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰ con el método de conteo de bacterias viables de Miles y Misra ²⁶. Se utilizaron dos placas de Agar *Brucella* por cada dilución, divididas en cuatro cuadrantes dobles, en cada cuadrante de la caja se depositaron 20 µl de la dilución, se incubaron a 37°C, revisándolas todos los días, posteriormente se realizó el conteo de UFC/ml. Tomando en cuenta el promedio de todos los cuadrantes de la última dilución en donde se realizó el conteo bacteriológico, resultado que fue dividido entre el número de cuadrantes y multiplicado por el factor de dilución 50.

5.3.2 Extracción de DNA

Cada una de las diluciones; se centrifugó a 8,000 xg durante 30 min. Posteriormente se decantó el sobrenadante, la pastilla se utilizó para la extracción de DNA usando el método de Verger ²¹. Para cada muestra se utilizaron 567 µl de

TE/NaCl (50mM Tris, 50mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0) y 30 μ l de SDS al 10 % con 3 μ l de proteinasa K (20mg/ml), incubando a 37° C por una h. Se adicionaron 300 μ l de fenol-cloroformo (v/v) y se centrifugó a 8000 xg durante 15 min. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo, y se adicionaron dos volúmenes de etanol frío, se decantó el etanol y se dejó secar, adicionando 100 μ l de la solución TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0).

5.3.3 Digestión con enzimas de restricción

Se adicionaron 2 μ g/ μ l de DNA por cada muestra, 2 μ l de amortiguador de restricción 10 X , cuanto baste para 18 μ l de agua destilada estéril y 2 μ l endonucleasa *Pst* I (1 a 5 U / μ g DNA), se incubaron toda la noche a 37°C, inactivando después a 65°C por 15 min ⁹¹.

5.4 EVALUACIÓN DE LA SONDA CON DNA DE TEJIDOS DE CAPRINOS

Se utilizaron muestras de tejidos obtenidas en un trabajo previo de animales desafiados con la cepa de campo de *Brucella melitensis* ⁹². En este trabajo se utilizaron tres grupos de animales cada uno con las características detallados en el Cuadro 4.

5.4.1 Estudio Serológico

Se colectaron muestras de sangre de la vena yugular de cada animal para la obtención de suero y se les realizó la prueba de tarjeta al 3% ⁹³. Posteriormente, a los 15 días se colectó nuevamente muestras a todos los animales para detectar anticuerpos contra *Brucella*.

5.4.2 Colección de Muestras

De todos los grupos de animales se tomaron en forma aséptica las muestras descritas en el Cuadro 5, para realizarles el análisis bacteriológico. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico estériles y fueron conservadas a -70°C hasta el momento de la siembra bacteriológica y la extracción de DNA.

5.4.3 Estudio Bacteriológico

Cada una de las muestras de tejidos antes mencionadas fue flameada con alcohol y colocadas en bolsas de plástico estériles. Se agregaron 20 ml de SSF estéril por órgano y se trituraron en una maceradora de tejidos (Laboratory Blender^R). Se tomó una muestra de la suspensión de tejido con un hisopo estéril y fue sembrado en medio sólido selectivo de Farell²⁵ e incubado a 37° C durante 7 días. El resto del tejido macerado se almacenó a -20 C para la extracción de DNA.

5.4.3.1 Identificación de *B. melitensis*

Se realizaron frotis de las colonias sospechosas a *Brucella* y se tiñeron por el método de Gram. Se realizó una resiembra en Agar *Brucella* de las colonias sospechosas, posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas de producción de ácido sulfhídrico, actividad de ureasa, utilización del citrato y actividad de la oxidasa²⁶.

6. RESULTADOS

6.1 ELABORACIÓN DE LA SONDA

El DNA extraído por el método fenol-agua (Figura 1) de las dos cepas de *B. melitensis* para la elaboración de la sonda, fueron visualizadas por medio de un corrimiento electroforético para corroborar la calidad del DNA (Figura 2).

6.1.1 Amplificación mediante PCR

Se amplificó un fragmento del gen *omp2* de las muestras de DNA de las dos cepas de *B. melitensis* por la técnica de PCR, encontrándose que amplificaron una misma banda de 940 pb (Figura 3). Ambos productos se utilizaron como sonda, para observar diferencias. Estos productos fueron purificados para eliminar los restos de dinucleótidos. Se amplificó el DNA de otras especies de *Brucella* (*Brucella melitensis* 16M, *B. melitensis* 133, *B. melitensis*. Rev1, *B. canis*, *B. abortus* 544, *B. ovis*, *B. abortus* INDRE, *B. abortus* S-19, *B. abortus* RB51 y *B. abortus* RB51 ais.), para observar las diferencias entre las especies. Se obtuvo una banda de 940 pb para *B. melitensis* y *B. abortus*, y una banda de 440 pb para *B. canis* y *B. ovis*⁸⁹ (Figura 4).

6.1.2 Southern Blot

Los dos productos de PCR de una cepa denominada 133 y otra de referencia 16 M *B. melitensis* fueron cuantificados y marcados con biotina para utilizarse con ensayos de hibridación de DNA (Southern Blot), ambas mostraron el mismo patrón de hibridación. Ninguna de las dos sondas mostró diferencias ni al PCR ni a la hibridación de DNA tipo Southern Blot. Por esta razón se decidió trabajar con la cepa de referencia 16M de *B. melitensis* (Figura 5).

6.2 EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LA SONDA

Para este estudio se trabajó con las siguientes cepas de brucela: *Brucella melitensis* 16M, *B. melitensis* 133, *B. melitensis*. Rev1, *B. melitensis*. Rev1 Francesa, *B. canis*, *B. abortus* 544, *B. ovis*, *B. abortus* INDRE, *B. abortus* S-19, *B. abortus* RB51 y *B. abortus* RB51 ais.

6.2.1 Análisis de restricción con *BamH* I

El polimorfismo que se presentó con *BamH* I con la sonda de 940 pb fue una banda de aproximadamente de 5,900 pb y fue detectada en todas las especies de *Brucella* (Figura 6).

6.2.2 Análisis de restricción con *EcoR* V

En la digestión con *EcoR* V, se observó un patrón polimórfico en el que se reconocieron tres bandas importantes de aproximadamente 4,800 pb, 3,000 pb y 2,800 pb. en todas las especies de *Brucella*. *B. ovis* comparte las mismas bandas, pero a diferencia de las demás especies muestra además una banda de 1,990 pb y otra de 1,000 pb (Figura 7).

6.2.3 Análisis de restricción con *EcoR* I

En el caso de *EcoR* I, la sonda DNA de 940 pb, mostró un patrón complejo polimórfico, en el que se reconocieron tres bandas importantes de aproximadamente 5,200 pb, 2,900 pb y de 1,600 pb. Todas las especies de *Brucella* comparten el mismo patrón. *B. ovis* presenta una banda adicional de 1,400 pb que la diferencia de todas las demás especies (Figura 8).

6.2.4 Análisis de restricción con *Pst* I

El patrón polimórfico de *Pst* I muestra diferencias en el DNA de las especies de *Brucella*, aunque todas las preparaciones de DNA comparten una banda de aproximadamente 940 pb, que es similar a la sonda utilizada, en el caso, de la cepa de *B. melitensis* (16M, 133 y Rev1) el marcador genético reconoce dos bandas, una de 940 pb que comparten todas las especies de *Brucella* y otra de aproximadamente 1,200 pb que sólo presenta *B. ovis*. En este caso, *B. melitensis* logra diferenciarse de *B. ovis* por que ésta última presenta una banda adicional de 300 pb. *B. canis* se diferencia de las demás especies de *Brucella* por una banda de aproximadamente 200 pb. Para el caso de las cepas de *B. abortus* (544, S-19, INDRE, RB51 y RB51 ais), presentan una banda de 940 pb, al igual que las demás especies de *Brucella* y dos bandas que nos dan la diferencia con *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. canis*, una de aproximadamente 590 pb y otra de 500 pb, pero no presentan ninguna diferencia entre las cepas de *B. abortus* (Figura 9).

Se incluyeron como control negativo cepas que cruzan antigénicamente y relacionadas filogenéticamente con brucela (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Yersinia enterocolitica* O:8, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Proteus vulgaris* OX 19 y *Rizobium* spp). El DNA de todas las cepas fue digerido con la enzima *Pst* I que fue la que nos mostró mayor polimorfismo entre las especies de brucela. Ninguna de las muestras de DNA mostró hibridación con la sonda de 940 pb (Figura 10).

6.3 SENSIBILIDAD DE LA SONDA

La cepa de referencia de *Brucella melitensis* 16M mostró un conteo inicial de 2.8×10^8 UFC/ml. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones décuples para determinar la sensibilidad de la sonda.

Las preparaciones de DNA de *B. melitensis* obtenidas de las diferentes diluciones se digirieron con la enzima *Pst* I y fueron hibridadas con la sonda de 940 pb. El análisis de restricción muestra que la sonda detectó un fragmento del gen *omp2* en la dilución 10^{-2} que es equivalente a una concentración celular de 2.8×10^6 UFC. A partir de la dilución 10^{-3} la sonda ya no mostró reconocimiento hacia el gen de *Brucella melitensis*. (Figura 11).

6.4 EVALUACION DE LA SONDA CON DNA DE TEJIDOS DE CAPRINOS

6.4.1 Estudio serológico

Las 15 muestras de sueros que se evaluaron mediante la prueba de tarjeta al 3 % fueron negativos, en los tres grupos experimentales. A partir de los 15 días del desafío, se tomaron nuevamente muestras de suero y se les realizó la prueba de tarjeta a los 15 caprinos, dando como resultado aglutinación positiva en todos ellos, excepto el grupo control.

6.4.2 Estudio Bacteriológico

El estudio bacteriológico fue realizado a los tres grupos experimentales. El grupo I y el grupo II de animales infectados con *B. melitensis* de campo, fueron los que presentaron aislamiento positivo a *B. melitensis*. En el caso del grupo I la mayoría de las muestras de tejidos se logró el aislamiento, especialmente en nódulo linfático submaxilar pero también de nódulo linfático supramamario, nódulo linfático prescapular, glándula mamaria y bazo. A diferencia del grupo II, sólo presentaron aislamiento a partir de nódulo linfático submaxilar, en menor frecuencia el bazo, glándula mamaria, nódulo linfático preescapular y nódulo

linfático supramamario. El grupo III de animales control negativo, no presentó aislamiento a *B. melitensis* (Cuadro 6).

6.4.3. RFLP de las muestras de tejidos

A todas la muestras de tejidos se les realizó extracción de DNA y fueron digeridas con la enzima *Pst* I y se hibridaron con la sonda de 940 pb. Los tres grupos fueron sometidos a los mismas pruebas, pero en ninguno de los casos la sonda detectó el fragmento del gen *omp2* de *B. melitensis* (Figuras 12 y 13).

7. DISCUSIÓN

La aplicación de técnicas basadas en la detección de análisis de ácidos nucleicos por medio de sondas, ha permitido una mejor identificación y clasificación taxonómica de diferentes géneros^{86, 87}.

Bentley *et.al.*⁸⁴ y Lew *et.al.*⁸⁵, mostraron que la utilización de sondas de oligonucleótidos específicos de especie son una alternativa para identificar diferentes géneros bacterianos como *Streptococcus* y *Pseudomonas*. Además, comprobaron que el uso de sondas pueden permitir un seguimiento epidemiológico. De igual forma, Huyen *et.al.*⁹⁴ reportan la utilización de sondas como importantes herramientas para la diferenciación de cepas de *Listeria monocytogenes*.

Husseinen⁸⁹ y Ficht *et.al.*⁹⁰ confirman que la utilización de sondas de diversos oligonucleótidos obtenidos a partir del gen *omp2* de *Brucella*, constituyen una herramienta para obtener diferencias entre las especies. Charachon *et.al.*⁹⁵, determinaron que la utilización de sondas son herramientas útiles para realizar estudios filogenéticos en *Brucella*.

El presente estudio confirma que una sonda obtenida del gen *omp2* de *B.melitensis*, el cual codifica para el grupo de proteínas denominadas porinas, manifiesta diferencias a nivel genético entre las especies de *Brucella*. La digestión del DNA con la enzima de restricción *Pst* I muestra un polimorfismo que permite la diferenciación de *B. melitensis* con las demás especies de *Brucella* y también permite discernir entre las especies de *B. abortus*, *B. ovis* y *B. canis*. Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por Ficht *et.al.*⁶⁴, quienes utilizando *Pst* I, obtuvieron patrones polimórficos que permiten diferenciar únicamente *B. abortus* de *B. melitensis*. En el caso de *B. suis*, *B.canis*, *B.ovis* y *B.neotomae*, estos investigadores detectaron un patrón similar que no permite

establecer alguna diferencia genética. En contraste con este trabajo, donde se logró diferenciar entre el DNA de *B. ovis*, *B. canis*, *B. abortus* y *B. melitensis* al ser digeridos con la enzima *Pst* I.

Es importante señalar que en nuestro estudio, el patrón similar que presentaron las cinco cepas de *Brucella abortus* evaluadas: 544, S19, INDRE, RB51 y RB51 aislada de leche de vaca, concuerda con los resultados de Ficht *et.al.* ⁶⁴.

Al realizar la digestión con la enzima *BamH* I, se obtuvieron patrones genéticos similares, entre los DNA de las cepas *B. melitensis*: 16M, 133 de campo, Rev1 mexicana y Rev1 francesa; con las cepas de, *B. canis*, *B. ovis* Reo 198, *B. abortus* 544, *B. abortus* S19, *B. abortus* INDRE, *B. abortus* RB51 y *B. abortus* RB51-ais, los cuales presentan una banda de 5.9 kb, resultados similares a los obtenidos por Ficht *et.al.* ⁶⁴, que trabajando con sondas derivadas del gen *omp2* encontraron reconocimiento de una sola banda de 6.5 kb en todas las especies de *Brucella* y por ello concluyen que en todas las especies de *Brucella* está presente el gen *omp2*, por lo que la digestión con esta enzima no es útil para demostrar diferencias en la secuencia del gen.

Cuando el DNA de las diferentes especies de *Brucella* fue digerido con las enzimas *EcoR* V y *EcoR* I, se observaron patrones polimórficos que no permiten determinar variaciones genéticas entre la mayoría de las especies de *Brucella*. La única diferencia importante se muestra con *B. ovis*, que al parecer presenta dos copias del gen *omp2a* y una del gen *omp2b* según Ficht *et.al.* ⁶⁴ y Cloeckert *et.al.* ⁹⁶.

El gen *omp2* está presente en todas las especies de *Brucella* y está compuesto de dos genes con una homología del 85%: el *omp2a* y *omp2b* que codifican dos proteínas de 33 y 36 kDa respectivamente ⁸⁹. El polimorfismo de ambos genes que codifican para las porinas ha sido evaluado mediante estudios

de RFLP identificándose once variantes del *omp2b* y ocho variantes del *omp2a*
64,97

Otros autores como Hussein⁸⁹ han trabajado en el género *Brucella* con la enzima *Pst* I por PCR-RFLP para distinguir a *B. abortus* de *B. melitensis*. De igual forma Bardentein *et.al.*⁹⁸ diferenciaron cepas de *B. melitensis* de campo de cepa vacunal *B. melitensis* Rev 1, al digerir los productos amplificados con la enzima *Pst* I.

Diversos investigadores, han realizados trabajos sobre el análisis de restricción con la enzima *EcoR* I y han demostrado una digestión total, pero no determinan diferencias entre las especies de *Brucella*^{99, 100, 101, 102, 103, 104}.

O'Hara *et.al.*⁹⁹, McGillivray *et.al.*¹⁰¹, Muzny *et.al.*¹⁰³, coinciden que la enzima *BamH* I realiza una digestión parcial en *Brucella*, sin presentar diferencias genéticas visibles. McGillivray *et.al.*¹⁰¹, en el mismo estudio, evaluaron la enzima *EcoR* V, obteniendo resultados similares a los de digestiones con *EcoR* I y *BamH*I.

En nuestro trabajo la sonda de 940 pb del gen *omp2* de *B. melitensis* fue hibridada con el DNA de las diferentes especies de *Brucella*, y digerido con las enzimas, *EcoR* V, *EcoR* I. Obteniendo la diferenciación solamente para *B. ovis*. De igual forma la enzima *EcoR* V, presentó una digestión total del DNA de *Brucella* y la enzima *EcoR* I mostró una digestión parcial como los resultados que observaron los autores antes mencionados.

El uso del marcador genético representa una herramienta de gran utilidad para diferenciar *B. ovis* de las demás especies de *Brucella*, considerando que gran parte de las diferencias se deben a las dos copias del gen *omp2a* que presenta en su genoma⁶⁴. Estos resultados sugieren nuevas alternativas para la identificación

y caracterización de *B. ovis* y posiblemente para una identificación rápida para el diagnóstico, en comparación a un perfil bioquímico.

Aunque O'Hara *et.al.*⁹⁹ y Servent *et.al.*¹⁰², reportaron que con el análisis de restricción de *EcoR I* *B. ovis* no presenta diferencias con otras especies de *Brucella*, resultados de nuestro trabajo demuestran que utilizando la sonda de 940 pb y la enzima *EcoR I* existe la posibilidad de diferenciar a *B. ovis*, considerando que en la mayoría de los patrones polimórficos presentados por *EcoR I*, *EcoR V* y *Pst I*, *B. ovis* siempre presentó un patrón genético diferente a las demás especies de *Brucella*.

El género *Brucella* está constituido de un grupo muy homogéneo de especies, por su relación antigénica y por estudios de hibridación. Con base en el análisis de secuencias del RNA ribosomal 16S, se ubicó a *Brucella* en el grupo alfa, subgrupo 2 de las *Proteobacterias* dentro de la familia *Rhizobiaceae* de acuerdo con los estudios realizados por Hoyer *et.al.*²⁰, Verger *et.al.*²¹, De Ley *et.al.*¹⁰⁵, Moreno *et.al.*¹⁰⁶ y Velasco *et.al.*¹⁰⁷. Adicionalmente *Brucella* mantiene una relación de epítopes del LPS, con el que se le asocia serológicamente en las reacciones cruzadas con *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Escherichia coli*, y *Salmonella typhi*^{67, 69, 108}.

En la evaluación de la especificidad de la sonda no se presentó reconocimiento de los otros géneros, lo que nos indica que la secuencia utilizada reconoce sitios conservados únicamente en *Brucella*, a pesar de que bacterias como *Rhizobium* está clasificada dentro del grupo de las *Brucella* y las PME están altamente relacionadas entre sí. Se puede entonces inferir que ambos géneros bacterianos no comparten una alta homología en estudios de secuenciación en relación a la secuencia del gen *omp2*. Con respecto a *Yersinia enterocolitica* 0:9 y *Escherichia coli* podemos mencionar que la reacción antigénica cruzada, se da por la relación que presenta en la cadena O del LPS^{66, 67, 69}.

La baja sensibilidad que mostró la prueba a partir de colonias bacterianas, que detectó a *B. melitensis* sólo hasta la dilución 10^{-2} que corresponde a 2.8×10^6 UFC/ml, con una señal de detección baja, nos demuestra que la técnica no es adecuada para utilizarse como prueba diagnóstica.

Los resultados obtenidos en este trabajo en relación a la sensibilidad y especificidad demuestran lo sugerido por Shibata ¹⁰⁹, que la técnica de Southern blot presenta una sensibilidad baja, pero una especificidad alta.

Los resultados bacteriológicos a partir de tejidos de caprinos infectados experimentalmente, muestran que de la mayoría de los órganos estudiados no fue posible el aislamiento bacteriológico, los nódulos linfáticos submaxilares fueron los que presentaron una mayor frecuencia de aislamientos siendo éstos nódulos los más cercanos al sitio de inoculación (vía conjuntival), por lo que coincide con lo señalado por Renoux *et.al.* ¹¹⁰, que en los nódulos más cercanos al sitio de la inoculación se tiene la mayor posibilidad de realizar aislamientos. Observaciones similares han sido reportadas por Villegas ¹¹¹ y por Mancera *et.al.* ¹¹², trabajando con cabras desafiadas con *B. melitensis*.

En el análisis del RFLP de tejidos de cabras infectadas, no se logró la detección de *Brucella melitensis*, posiblemente debido a que el DNA de *Brucella* se encuentra en cantidades mínimas, en relación al DNA del tejido. La sensibilidad nos confirma que la técnica de Southern Blot no es recomendada para el análisis de tejidos, debido a las cantidades de UFC detectadas por la sonda; también nos sugiere que el tejido infectado por *B. melitensis* debe presentar una carga bacteriana alta para poder detectar al microorganismo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, resaltan la importancia de la técnica de RFLP al digerir previamente el DNA con la enzima *Pst* I. Podemos

sugerir el uso de esta técnica en casos de caracterización de cepas, pero no es recomendable como prueba diagnóstica por su alto costo y por su baja sensibilidad.

Esta técnica, junto con los estudios recientes realizados sobre el genoma de *B. melitensis*²³ y el de las *omp2* de las demás especies de *Brucella*, nos presentan nuevas alternativas para mejorar la identificación y caracterización de las especies de *Brucella*. Tal es el caso de *B. maris*, que ha sido caracterizada por el gen conservado *omp2* que presentan las especies del género *Brucella*, el cual muestra importantes variaciones genéticas en relación a los genes *omp2a* y *omp2b*. El DNA de *B. maris*, presenta dos copias del gen *omp2b* en lugar de una copia del gen *omp2a* y del gen *omp2b* o bien, dos copia iguales del gen *omp2a* reportados comúnmente en *B. ovis*. De igual forma demuestran que el *omp2b* es un marcador específico que puede detectar y agrupar los aislamientos de *B. maris* de acuerdo al gen *omp2*. Considerando que los genes que codifican las proteínas de membrana han sido relacionados como importantes factores de virulencia¹¹³. Estos hallazgos nos podrían permitir obtener información sobre los aspectos epidemiológicos de la enfermedad dentro de una población.

8. CONCLUSIONES

- Se logró obtener una sonda de 940 pb que reconoce el sitio de amplificación del gen *omp2* de *Brucella melitensis*, la cual podría utilizarse como marcador genético.
- La sonda de 940 pb diferencia a *Brucella ovis* únicamente cuando es digerida por las enzimas *Pst* I, *EcoR* I, *EcoR* V.
- Mediante la utilización de la enzima *Pst* I, *B. melitensis* puede diferenciarse de las demás especies de *Brucella*, utilizando la sonda de 940 pb.
- La sonda de 940 pb no logró detectar a *Brucella melitensis* en los tejidos de cabras infectadas.
- Fue posible determinar diferencias genéticas entre las especies de *Brucella*. Esto podría indicar que a pesar de presentar una homología genética del 85 al 90% las especies de *Brucella* pueden diferenciarse con sondas o marcadores genéticos a partir de la amplificación de fragmentos del locus *omp2* de las proteínas de membrana externa.

9. CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1			
Cuantificación de los productos de PCR a partir de <i>Brucella melitensis</i> 16 M y cepa de campo 133			
IDENTIFICACION	A ₂₆₀ *	mg/ml de DNA**	Producto de PCR ng/ μ l de DNA
Cepa de referencia 16 M	0.344	1204	0.740
Cepa de campo 133	0.385	1347	0.795

*Absorbancia nm

** Lectura expresada en mg/ml. A(260nm)Constante DNA(50) por el factor de dilución (70).

Cuadro 2	
Cepas bacterianas antigénica y filogenéticamente relacionadas con <i>Brucella</i> y cuantificación del DNA	

IDENTIFICACION	LECTURA (A ₂₆₀)	mg/ml de DNA	Cantidad de DNA utilizado (μ l) [] de 2mg /ml de DNA
<i>Escherichia coli</i>	0.212	0.742	2.695
<i>Proteus vulgaris</i> OX 19	0.320	1.120	1.785
<i>Pasteurella. multocida</i>	0.142	0.497	4.024
<i>Manheimia. haemolytica</i>	0.324	1.134	1.763
<i>Rhizobium</i> spp.	0.222	0.777	2.574
<i>Salmonella typhi</i>	1.341	4.693	0.426
<i>Shigella boydii</i>	0.215	0.752	2.659
<i>Yersinia enterocolitica</i> serotipo 0:8	0.317	1.109	1.803
<i>Y. enterocolitica</i> serotipo 0:9	0.194	0.679	2.945

Cuadro 3
Cepas de *Brucella* spp y su cuantificación de DNA

IDENTIFICACION	LECTURA (A₂₆₀)	Concentración de DNA por muestra mg/ ml De DNA	Cantidad de DNA utilizado (μl) [] de 2mg /ml de DNA
<i>B. melitensis</i> (16M) Cepa de referencia	0.437	1.529	1.308
<i>B. melitensis</i> (133) Cepa aislada a partir de leche de cabra	0.589	2.061	0.970
<i>B. melitensis</i> (Rev 1) Cepa vacunal Nacional	0.412	1.442	1.386
<i>B. melitensis</i> (Rev 1) Francesa	0.317	1.109	1.803
<i>B. abortus</i> (S19) Cepa vacunal	0.512	1.792	1.116
<i>B. abortus</i> (544) Cepa de referencia	0.370	1.295	1.544
<i>B. abortus</i> (RB51) Cepa vacunal	0.259	0.906	2.207
<i>B. abortus</i> (RB51-AIS) Cepa aislada a partir de vacas vacunadas con RB51	0.370	1.792	1.116
<i>B. abortus</i> (INDRE)	0.437	1.529	1.308
<i>B. ovis</i> (Reo 198) Cepa de referencia	0.312	1.092	1.831
<i>B. canis</i> Cepa de campo	0.285	0.997	2.006

Cuadro 4		
Grupos de cabras infectadas con la cepa <i>B. melitensis</i> de campo		
Grupo I	Grupo II	Grupo III
Infectados con <i>B. melitensis</i> b.1	Infectados con <i>B. melitensis</i> b.1	Sin infectar
Con aislamiento positivo por lo menos en una de las muestras.	Sin aislamiento por lo menos en una de las muestras.	Sin aislamiento bacteriológico

Cuadro 5
Muestras a la necropsia de los animales con los tres tratamientos del experimento.

GRUPOS	LINFONODOS	ÓRGANOS
I, II, III	Preescapular, supramamario, submaxilar	Utero, Bazo, Glándula mamaria

Cuadro 6
Resultados del estudio bacteriológico de los tres grupos de experimentación

Grupo No.I	Tejidos	Aislamiento Bacteriológico					Grupo No.II	Aislamiento Bacteriológico				
		204*	214	709	507	850		07	077	14-A	324	17-A
Con aislamiento positivo por lo menos en una de las muestras.	Útero	-	-	+	+	-	Sin aislamiento por lo menos en una de las muestras.	-	-	-	-	-
	Bazo	+	+	+	+	-		+	+	-	-	-
	Glándula Mamaria	+	-	+	+	+		-	-	-	-	+
	Nódulo preescapular	+	+	-	+	+		-	-	-	-	+
	Nódulo Submaxilar	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
	Nódulo Supramamario	+	+	+	-	+		-	-	-	+	-
*Identificación de los caprinos												
Grupo No III	Tejidos	Aislamiento Bacteriológico										
		501	502	503	504	505						
	Sin aislamiento.	Útero	-	-	-	-	-					
		Bazo	-	-	-	-	-					
		Glándula Mamaria	-	-	-	-	-					
		N. preescapular	-	-	-	-	-					
		N. Submaxilar	-	-	-	-	-					
		N. Supramamario	-	-	-	-	-					

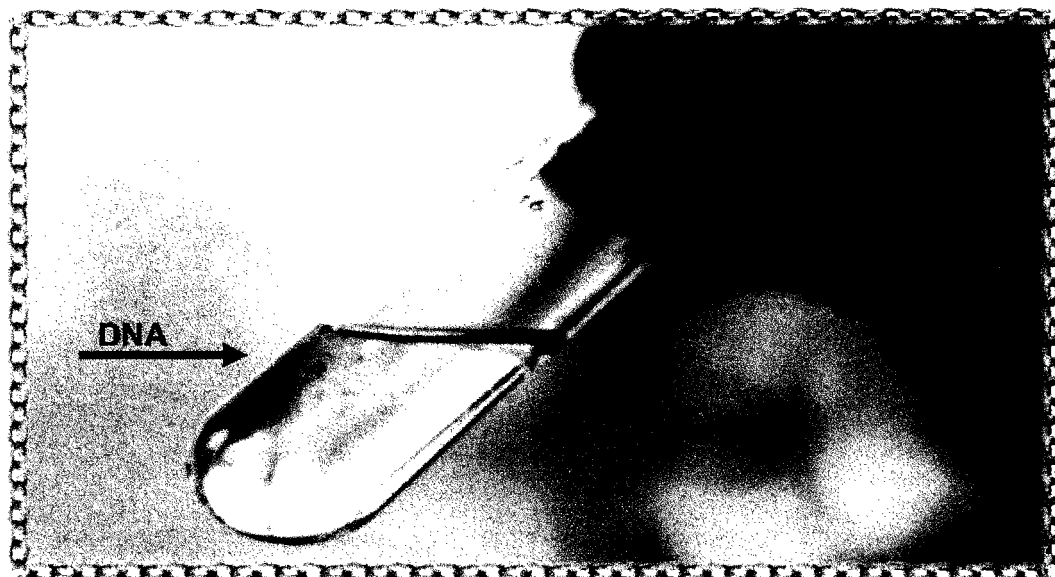


Figura 1. Extracción de DNA de *Brucella melitensis*, obtenido por el Método Fenol-Agua

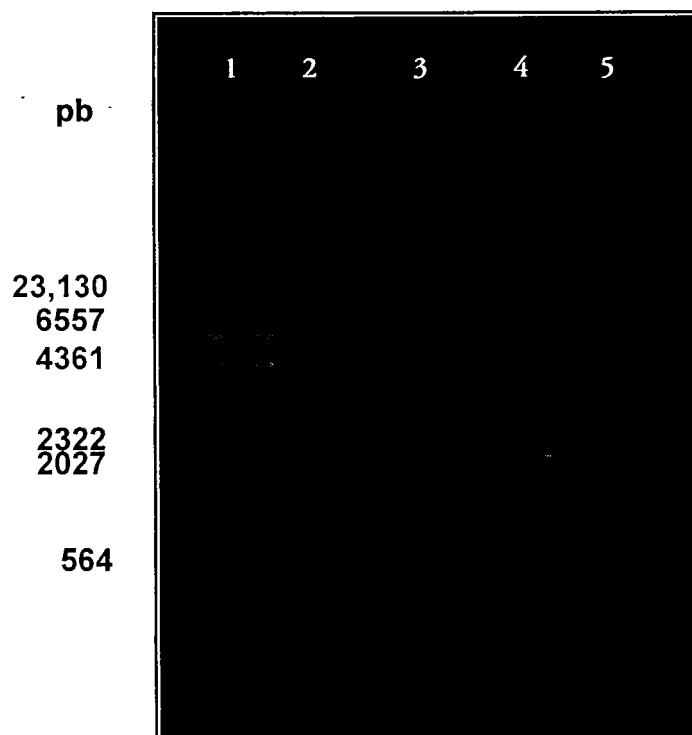


Figura 2. Gel de agarosa al 1%. Corrimiento electroforético del DNA de *Brucella*

Carril: 1) Marcador de peso molecular *Lamda Hind III*, 2 y 3) *Brucella melitensis* 16M, 4 y 5) *Brucella melitensis* 133

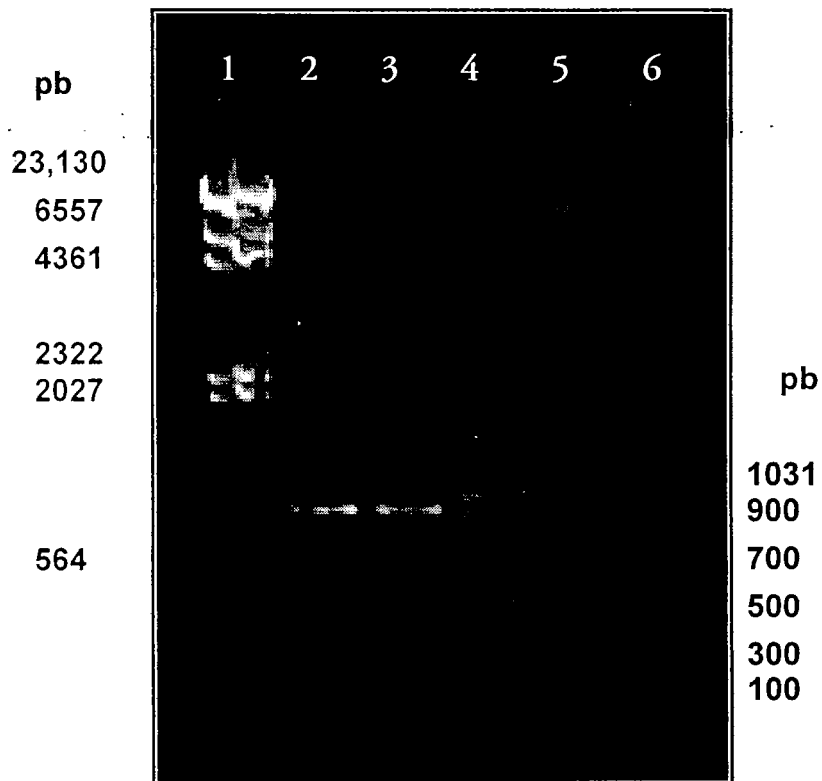


Figura 3. Gel de agarosa al 1%. Amplificación del fragmento de 940 pb del gen *Omp2* de *Brucella melitensis*

Carril 1) Lamda *Hind* III 2) y 3) Producto de 940 pb, 4) DNA ladder 5) y 6) DNA total de *Brucella melitensis*

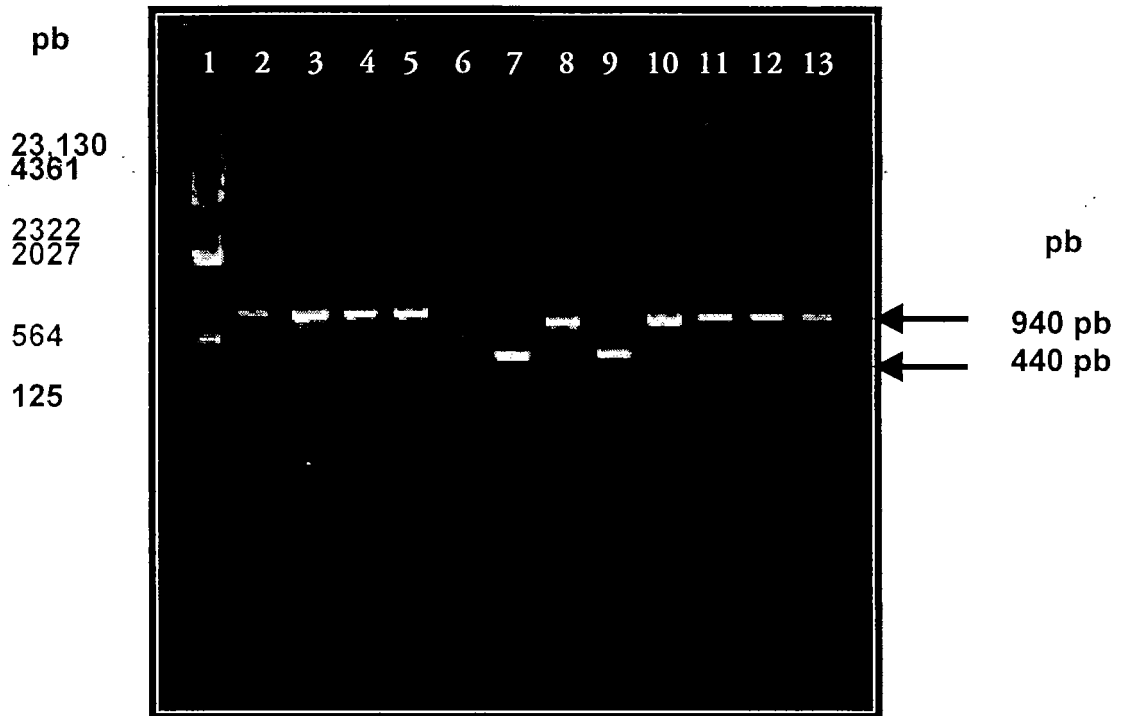


Figura 4. Gel de agarosa al 1%. Amplificación de productos de PCR de diferentes especies de *Brucella*.

Carril 1) *Lamda Hind III*; 2) Producto de PCR purificado del DNA de *B. melitensis* 16M; 3) *B. melitensis* 16M; 4) *B. melitensis* 133; 5) *B. melitensis*. Rev 1; 6) Agua estéril; 7) *B. canis*; 8) *B. abortus* 544; 9) *B. ovis*; 10) *B. abortus* INDRE; 11) *B. abortus* S-19; 12) *B. abortus* RB51; 13) *B. abortus* RB51 ais.

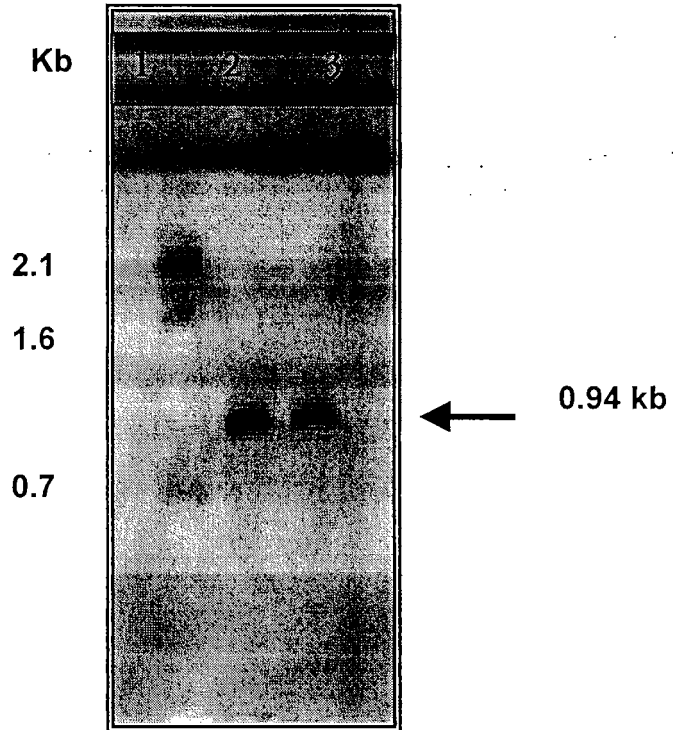


Figura 5. Hibridación de la sonda de 940 pb de *B. melitensis* 133 y *B. melitensis* 16M con el fragmento de PCR homólogo.

Carril 1) Marcador de tamaño del Kit de hibridación; 2) Producto de PCR de la Cepa de campo; 3) Producto de PCR de la cepa de referencia

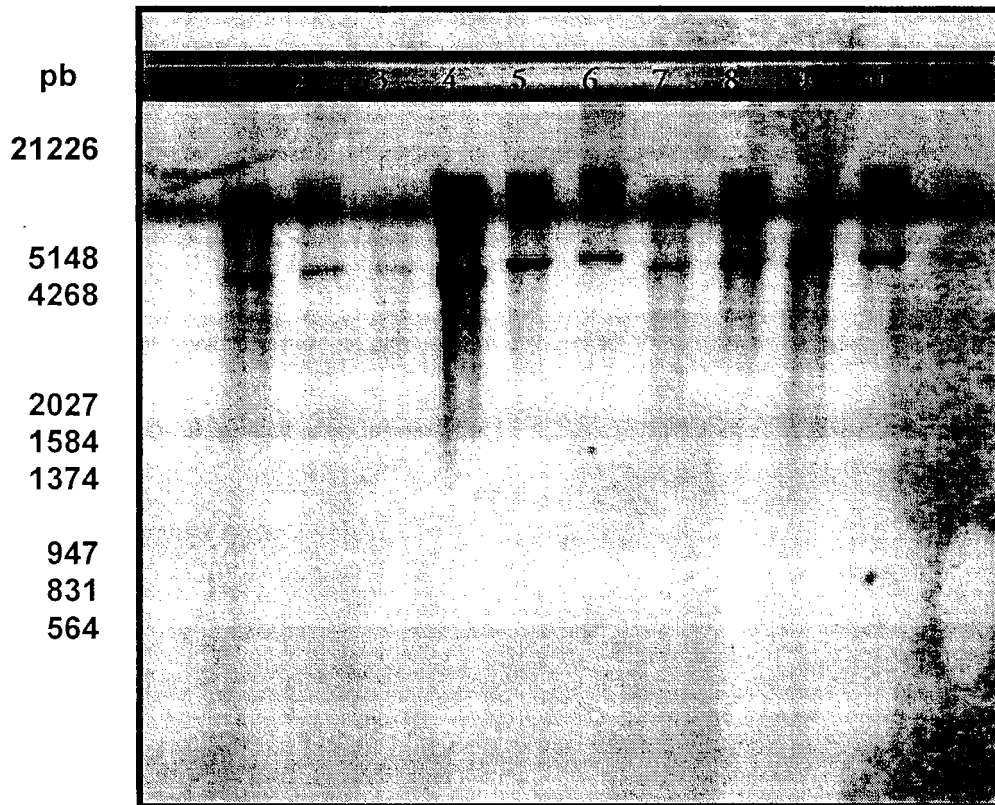


Figura 6. RFLP del DNA de las cepas de *Brucella spp* digerido con *BamH I* hibridado con la sonda DNA de 940 pb

Marcador: DNA Lamda / *EcoRI-Hind III*. Carril 1) *B. melitensis* 16 M; 2) *B. melitensis* 133; 3) *B. melitensis* Rev1; 4) *B. melitensis* Rev1 Francesa; 5) *B. canis*; 6) *B. ovis*; 7) *B. abortus* 544; 8) *B. abortus* INDRE; 9) *B. abortus* S-19; 10) *B. abortus* RB51; 11) *B. abortus* RB51 ais.

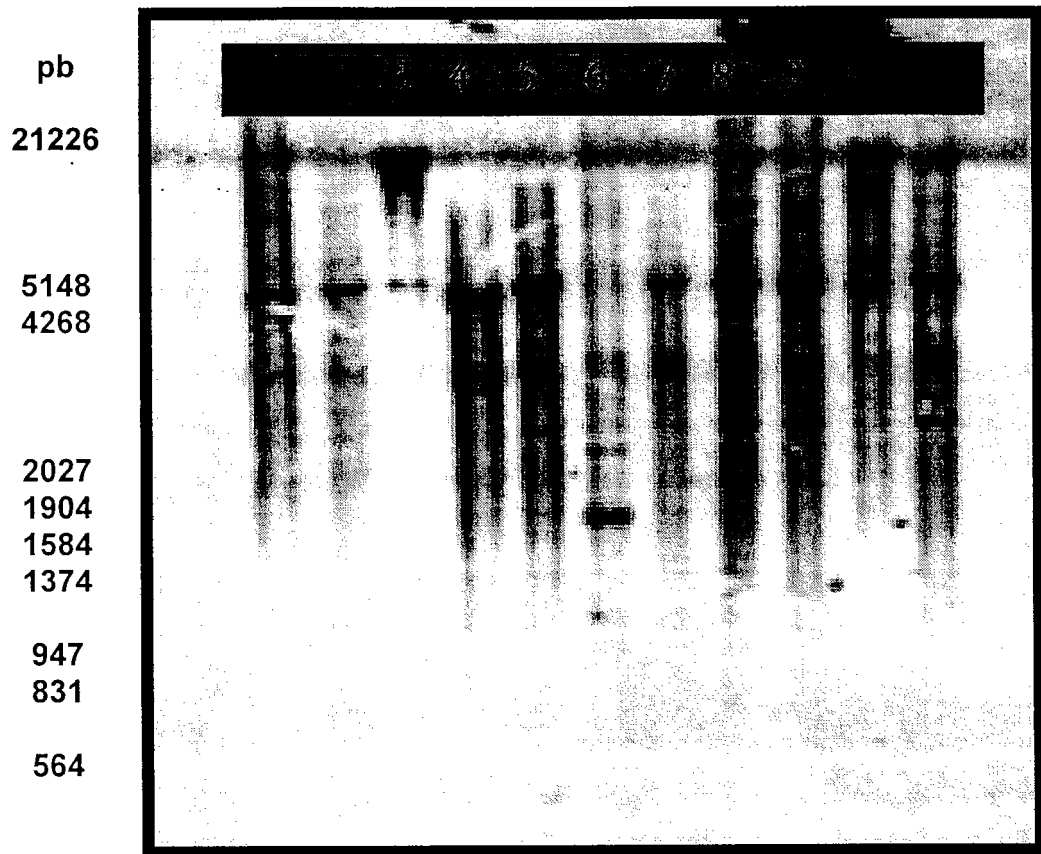


Figura 7. RFLP del DNA de las cepas de *Brucella spp* digerido con *EcoR* V hibridado con la sonda de 940 pb. *B. ovis* en el carril 6 muestra un patrón de hibridación distinto al resto de las cepas.

Marcador : DNA Lamda / *EcoRI-Hind* III. Carril 1) *B. melitensis* 16 M; 2) *B. melitensis* 133; 3) *B. melitensis* Rev1; 4) *B. melitensis* Rev1 Francesa; 5) *B. canis*; 6) *B. ovis*; 7) *B. abortus* 544; 8) *B. abortus* INDRE; 9) *B. abortus* S-19 10) *B. abortus* RB51; 11) *B. abortus* RB51 ais.

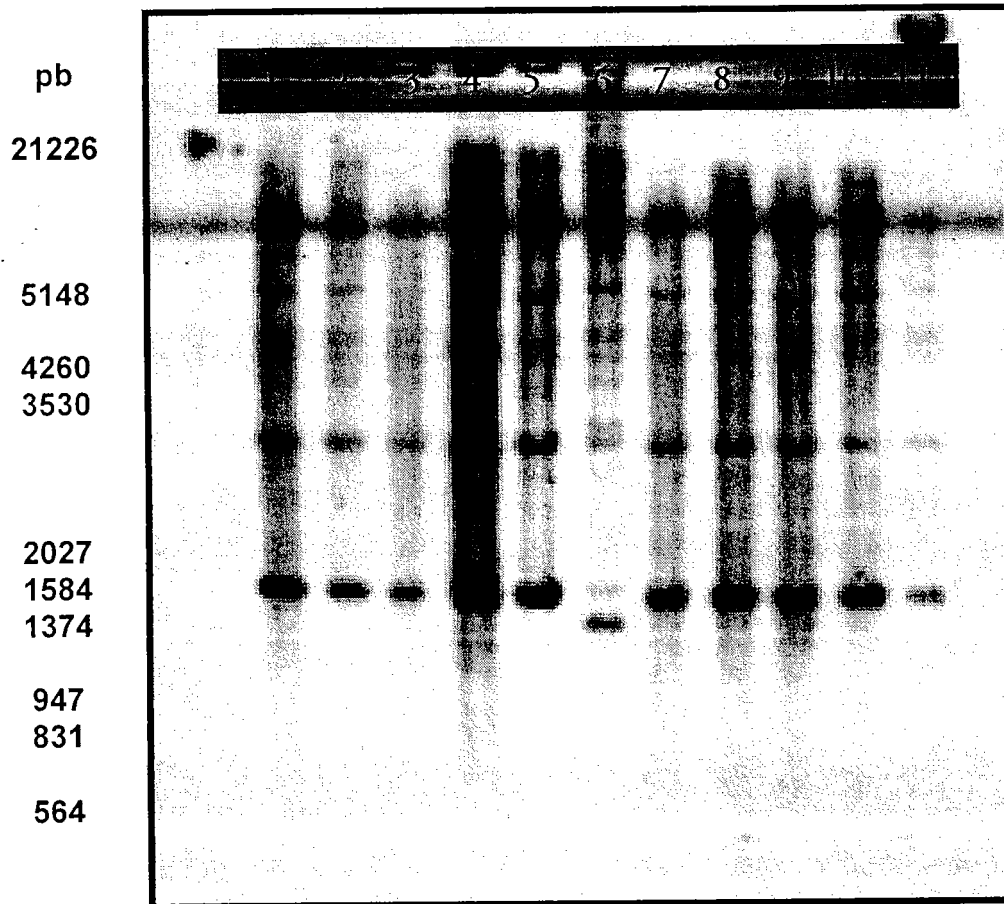


Figura 8. RFLP del DNA de las cepas de *Brucella spp* digerido con *EcoR I* hibridado con la sonda DNA de 940 pb.

Marcador: DNA Lamda / *EcoRI-Hind III*. Carril 1) *B. melitensis* 16 M; 2) *B. melitensis* 133; 3) *B. melitensis* Rev1; 4) *B. melitensis* Rev1 Francesa; 5) *B. canis*; 6) *B. ovis*; 7) *B. abortus* 544; 8) *B. abortus* INDRE; 9) *B. abortus* S-19; 10) *B. abortus* RB51; 11) *B. abortus* RB51 ais.

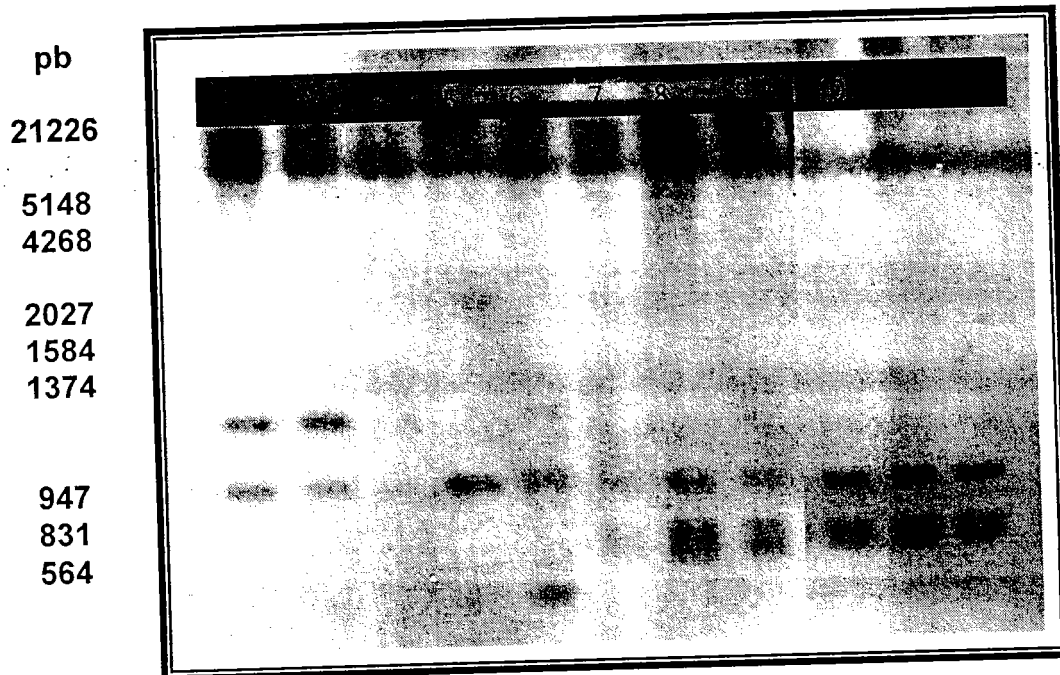


Figura 9. RFLP del ADN de las cepas de *Brucella* spp digerido con *Pst* I e hibridado con la sonda de 940 pb.

Marcador: DNA Lamda / *Eco*RI-*Hind* III. Carril 1) *B. melitensis* 16M; 2) *B. melitensis* 133; 3) *B. melitensis* Rev; 5) *B. canis*; 6) *B. ovis*; 7) *B. abortus* 544; 8) *B. abortus* INDRE; 9) *B. abortus* S-19; 10) *B. abortus* RB51; 11 y 12) *B. abortus* RB51 ais.

Nota: *B. melitensis* Rev1 Francesa, no fue incluida en este ensayo. Sin embargo, mostró un perfil idéntico en otro ensayo de hibridación con la misma sonda.

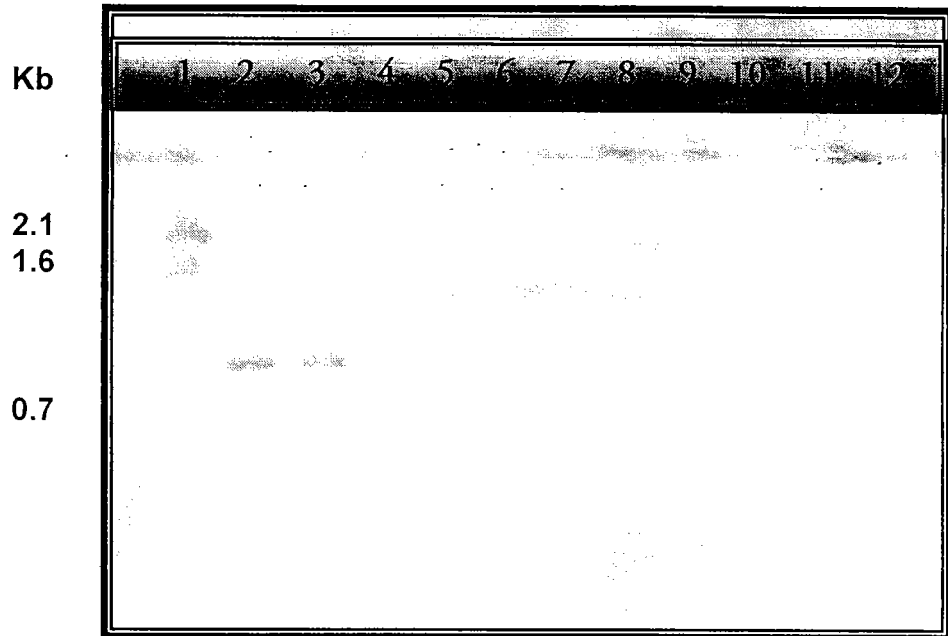


Figura 10. RFLP del DNA de cepas bacterianas antigénica y filogenéticamente relacionadas con *Brucella* spp digeridas con *Pst* I

Carril 1) Marcador de tamaño del Kit de hibridación. 2) y 3) Producto de PCR de *B. melitensis* 16M; 4) *Escherichia.coli*; 5) *Yersinia enterocolitica* O:9; 6) *Yersinia enterocolitica* O:8; 7) *Salmonella typhi*; 8) *Shigella boydii*; 9) *Pasteurella multocida*; 10) *Mannheimia haemolytica*; 11) *Proteus vulgaris* OX 19; 12) *Rhizobium* spp.

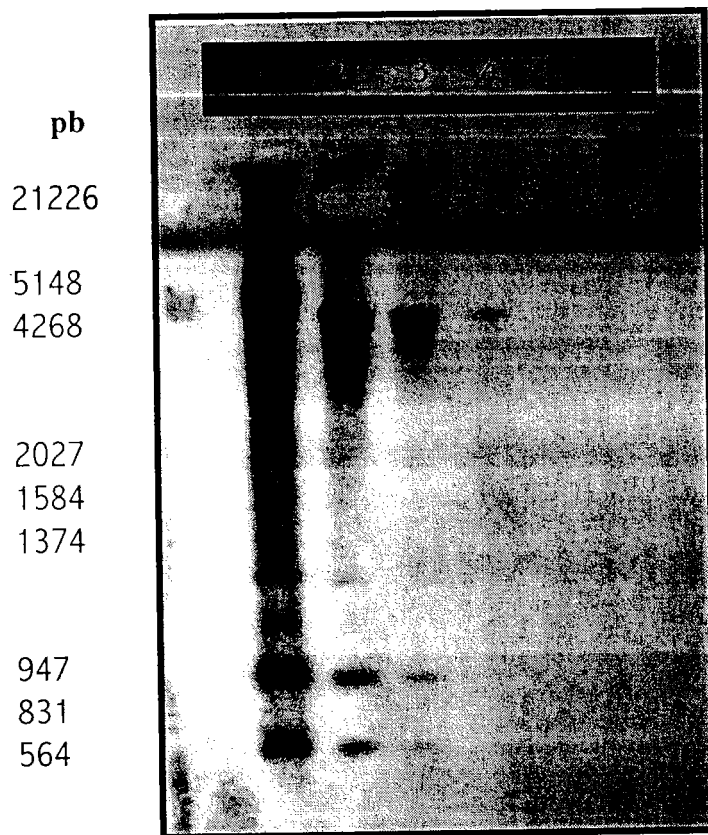


Figura 11. RFLP del DNA de las diluciones de *B. melitensis* 16M digeridas con *Pst* I e hibridadas con la sonda de 940 pb.

Marcador: DNA Lamda / *Eco*RI-*Hind* III. Carril 1) 2.8×10^8 *B. melitensis* 16 M; 2) 2.8×10^7 ; 3) 2.8×10^6 ; 4) 2.8×10^5 ; 5) 2.8×10^4 ; 6) 2.8×10^5

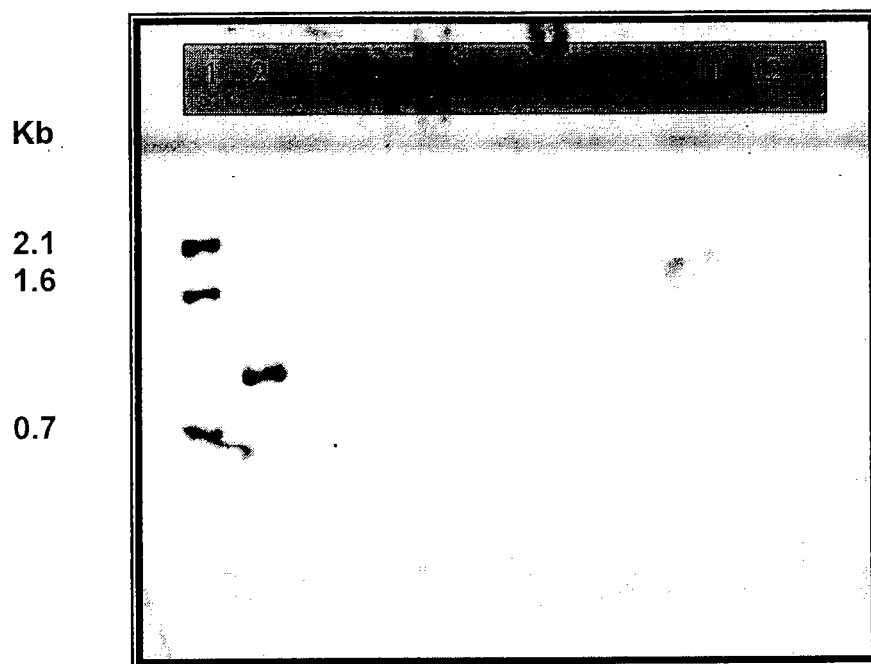


Figura 12. RFLP de los tejidos del grupo III Control negativos digeridos con *Pst* I e hibridados con la sonda de 940 pb.

Carril: 1) Marcador de tamaño del Kit; 2) Fragmento de 940 pb; 3) Bazo 501; 4) Bazo 502; 5) Bazo 503; 6) bazo 504; 7) Bazo 505; 8) G. Mamaria 501; 9) G. Mamaria 502; 10) G. Mamaria 503; 11) G. Mamaria 504; 12) G. Mamaria 505.

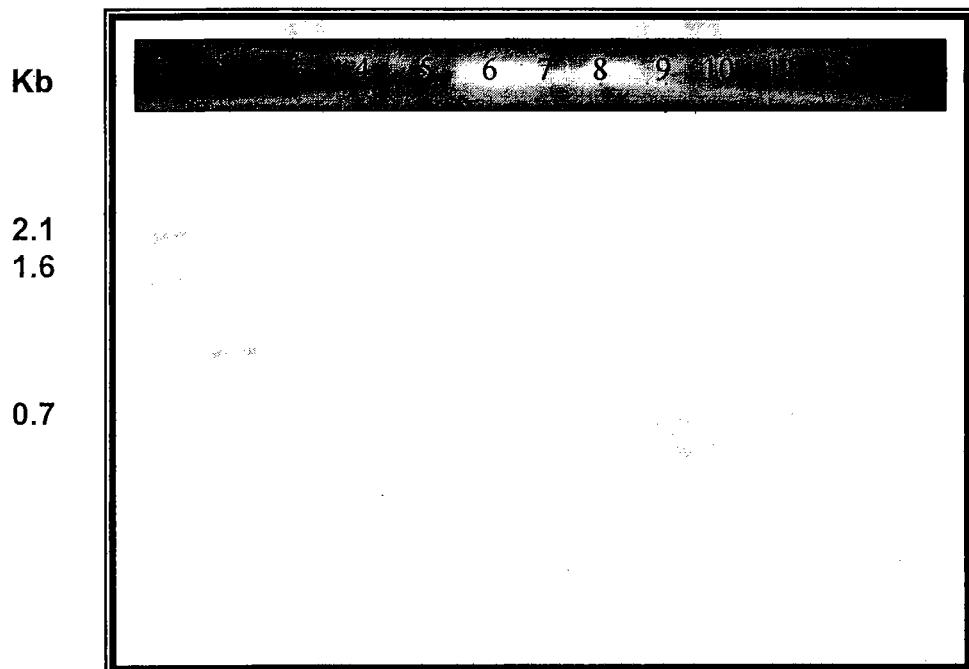


Figura 13. Grupo I . RFLP de los tejidos de caprinos infectados con la cepa de campo de *B. melitensis*, digeridos con *Pst* 1 e hibridados con la sonda de 940 pb

Carril: 1) Marcador de tamaño del kit; 2) Control. Fragmento de DNA de 940 pb; 3) y 4) DNA control de *B. melitensis* 16 M; 5) Bazo 204; 6) Bazo 214; 7) Bazo 709; 8) Bazo 507; 9) N. submaxilar 204; 10) N. submaxilar 214; 11) N. submaxilar 709; 12) N. submaxilar 507; 13) N. submaxilar 850

10. LITERATURA CITADA

- 1.- López MA. Brucelosis: Avances y perspectivas. Publicación técnica del INDRE. México, D.F. 1991, No.6, 1-23.
- 2.- Ruiz CM. Brucelosis. Tercera Edición, México. 1986, 296.
- 3.- Suárez GF, Brucelosis: Un viejo problema de actualidad. Memorias Magistrales. Congreso Internacional en la producción Caprina. Zacatecas, México. 1995, Octubre. 38-43.
- 4.-Gurría TFJ. Importancia de la erradicación de la brucelosis en México. Conferencia magistral: Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis. Acapulco, Gro. 1998, 5-11.
- 5.- Leal K, DS, V IO, Martínez RB, FA. Detección molecular del agente causal de la brucelosis caprina. Memorias del congreso internacional caprina. Zac. Mex. 1995, Octubre.158-160.
- 6.- Velásquez MO, Domínguez OJ, Lecuona OLA. La brucelosis como problema de la salud pública en México. Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis. 1998, Acapulco, Gro. 13-22.
- 7.- Olivares OJ, Aguilar OO, Sánchez CY. Prevalencia de la brucelosis en ovinos y caprinos en Mamith, Hidalgo. Memorias del congreso internacional caprino. Zac.Mex. 1995.
- 8.- Álvarez PE. Situación de la brucelosis en América: Panorama general. Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis. Acapulco, Gro. 1998, 23-31.
- 9.- Meljem MJ, Flores LJL. Control sanitario de productos lácteos como medida de prevención de brucelosis. Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis. Acapulco, Gro. 1998, 33-45
- 10.- Hernández BA, García RP, Cruz EA, Rojo J. Seroprevalencia de brucelosis en disponentes de sangre del Hospital General de México. Revista Medica del Hospital General de México. S. S.. 1999, Abril-Junio. Vol. 62. Núm. 2, 107- 112.
- 11.- Godfroid F. Brucellosis in Wildlife. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2002, 21:2 277-286.

- 12.- Tryland M, Kleivane L, Alfredsson A, Kljeld M, Arnason A, Stuen S, Godfroid F. Evidence of *Brucella* Infection in Marine Mammals in the North Atlantic Ocean. *Veterinary Record* 1999, 144 588-592.
- 13.- Retamal P, Blank O, Hablaos P, Torres D. Detection of anti- *Brucella* antibodies in pinnipeds from the Antarctic territory. *Veterinary Record* 2000, 146 166-167.
- 14.- Cloeckaert A, Grayon M, and Grepinet O. An IS711 Element Downstream of the *bp26* gene is specific marker of *Brucella* spp. Isolated from Marine Mammals. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2000, Sep 7:5, 835-839.
- 15.- Bricker JB, Ewalt RD, MacMillan PA, Foster G and Brew S. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000 Mar 38:3, 1258-1262.
- 16.-Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin BB, Foster G, Godfroid J. Classification of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes and Infection*. 2001, 3, 729-738.
- 17.- López MA. La brucelosis como zoonosis de interés en México. *Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis*. Acapulco, Gro. 1998, 53-62.
- 18.- Verger JM, Grimont F, Grimont PAD and Grayon M. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (Paris)* 1987, 138, 235-238.
- 19.- Moriyón I. Características estructurales y antigénicas de *Brucella*. *Jornadas Internacionales Sobre Brucelosis*. Madrid, España. 1994, 1-18.
- 20.-Hoyer BH and McCullough NB. Polynucleotide homologies of *Brucella* deoxyribonucleic acids. *J. Bacteriol.* 1968,95, 444-448.
- 21.- Verger JM, Grimont F, Grimont PAD and Grayon M. *Brucella* a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bact.* 1985, 35, 292-295.
- 22.- Grimont F, Verger JM, Cornelis P. Limet J, Lefevre M, Grayon M, Regnault B, Van Broeck J, Grimont PAD. Molecular typing of *Brucella* with cloned DNA probes. *Res. Microbiol.* 1992, 143:19, 55-65.

- 23.- DelVecchio GV, Kapatal V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer P, Hagijs S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkon R, Kyripides N and Overbeek R. The genome of facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Microbiology*. 2000, 99:1, 443-448.
- 24.- Tsoktouridis G, Merz CH, Manning SP, Giovagnoli-Kurtz R, Williams LE, Mujer C, Hagijs S, Elzer P, Redkar RJ, Patra G and DelVecchio GV, Molecular Characterization of *Brucella abortus* Chromosome II Recombination. *J. of Bacteriology*. 2003, 185:20, 6130-6136.
- 25.- Díaz AE. Libro de Diagnóstico de brucelosis. Animal. Impreso en México. INIFAP. 2001, 221.
- 26.- Alton GG, Jones LM, Angus RD & Verger JM. Techniques for brucellosis laboratory. INRA. Paris, 1988, 34-71.
- 27.- Frenchick PJ, Markham RJF, Cochrane AH. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 1984, 46, 332-335.
- 28.- Sangari FJ, Agüero J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. *Microbiología SEM*. 1996, 12, 207-218.
- 29.- Moreno E. Genoma evolution within the alpha *Proteobacteria*: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome. *FEMS Microbiology Reviews* 1998, 22, 255-275.
- 30.- Cetilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cell in vitro. *Infect. Immun.* 1990, 58, 2320-2328.
- 31.- Orduña A, Lortenzo B, Abad R, Rodríguez TA. Supervivencia intracelular de *Brucella* en las células fagocíticas. *Jornadas Internacionales Sobre Brucelosis*. Madrid- España. 1994, 2-8.
- 32.- Cheers C. Cell Mediated Immunity To Murine Brucellosis And The Role Of Cytokines. *50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference*. Chicago, 1997, November, 37-43.

- 33.- Moriyón I, López-Goñi I. Estructura genética y fisiología del género *Brucella*. Diagnóstico de brucelosis animal. INIFAP. E. Díaz and et. al. ISBN 970-92493-0-4. 2001,17-27
- 34.- Arenas NG, Staskevich AS, Aballay A, Mayorga S L. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infection and Immunity*. 2000, 68, 4255-4263.
- 35.- Aréstegui BM, Gualtieri SC, Domínguez J, Scharovsky OG. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. *Vet. Méx.*, 2001, 32, 131-139.
- 36.- Rittig GM, Alvarez-Martínez MT, Porte F, Liautard JP, Rouot. *Infection and immunity*. 2001, 69:6, 3995-4006.
- 37.- Iyankan L, Singh DK. The Effect of *Brucella abortus* on Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide Production by Bovine Polymorphonuclear Cells. *Veterinary Research Communications*. 2002, 26, 93-102.
- 38.- Pizarro CJ, Méresse S, Partón GR, Goot G, Sola LA, López GI, Moreno E, Pierre GJ. *Brucella abortus* Transists through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infection and Immunity*. 1998, 66, 5711-5724.
- 39.- Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig G and Misra H. Superoxide dismutases of virulent and avirulent strains of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology*. 1991, 26, 359-366.
- 40.- Stable TJ, Sha Z and Mayfiel EJ. Periplasmic location of the *Brucella abortus* Cu/Zn dismutasa. *Vet. Microbiol*. 1994, 38, 307-314.
- 41.- Sha Z, Stable TJ, and Mayfiel EJ. *Brucella abortus* catalasa is a periplasmic protein lacking a standard sequence. *J. Bacteriol*. 1994, 176, 7375-7377.
- 42.- Rose-May D, Lestrade P, Tibor A. Letesson JJ, De Bolle X. *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, 231, 1-12.

- 43.- Moriyón I and Berman DT. Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope. J. Bacteriol. 1982, 152, 822-828.
- 44.- Vestreat DR, Creasy MT, Caveney NT, Baldwin CL, Blab MW, Winter AJ. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. Infect. Immun. 1982, 35, 979-989.
- 45.- Santos JM, Verstrete DR, Perera VY and Winter AJ. Outer membrane proteins from rough strains of *Brucella* species. Infection and Immunity. 1984, 46, 188-194.
- 46.- Douglas T J, Rosenberg Y E, Nikaido H, Verstrete RD and Winter JA. Porins of *Brucella* species. Infection and Immunity. 1984, 44, 16-21.
- 47.- Moriyón I, and López-Goñi I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Internacional Microbiology. 1998, 1, 19-26.
- 48.- Jones LM, Berman DT, Moreno E, Deyoe BL, Gilsford MJ, Huber JD and Nicoletti P. Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. J. Clin. Microbiol. 1980, 12, 753-760.
- 49.- Moreno E, Brorowiak D and Mayer H. *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. Ann. Inst. Pasteur. Microbiol. 1987, 138, 10-105.
- 50.- Alonso-Urmenta B, Moriyón I, Díaz R and Blasco JM. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Brucella* native hapten polysaccharide and smooth lipopolysaccharide. J. Clin. Microbiol. 1988, 26, 2642-2646.
- 51.- Aragón V. Caracterización inmunoquímica de los polisacáridos hapténicos de *Brucella*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra España 1994.
- 52.- Moriyón I, Gamaso C. Estructura antigénica de *Brucella melitensis* y *Brucella ovis*. Manual Ovis. Ediciones Luzán5. Madrid, España. 1989, 35-49.
- 53.- Moriyón I. Structure of the cell envelope. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago, r 1997, November, 3-18.

- 54.-Cloeckert A, Vizcaíno N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Veterinary Microbiology*. 2002, 90, 229-247.
- 55.-López MA. *Brucella*. *Microbios*. Editores: Dra. Esperanza Martínez y et. Al. CIFN.ISBN 968-36-8879-9. [htt: //biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/](http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/).
- 56.- Cloeckert A, Tibor A, Zygmunt MS. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family *Rhizobiaceae*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1999, 6:4, 627-629.
- 57.- Gandara B, Merino LA, Rogel MMA and Martínez-Romero E. Limited Genetic Diversity of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2001, Jan. 39:1 235-240.
- 58.- Mayfield J, E.Bricker BJ, Godfrey H, Crosby RM, Knight DJ, Halling SM, Balinsky D, Tabatabai LB. The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene encoding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene*. 1988, 63, 1-9.
- 59.- Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, Adams LGA. 36 kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA. *Infect. Immun.* 1988, 56, 2036-2046.
- 60.- Tibor A, Weynants V, Denoel P, Lichtfouse B, De Bolle X, Saman E, Limet J, Letesson JJ. Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5 kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity PAL lipoproteins. *Infect. Immun.* 1994, 62, 3633-3639.
- 61.- Wergifosse P, Lintermans P, Limet JN, Cloeckert A. Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 2 kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.* 1995, 177, 1911-1914.
- 62.-Halling SM, Detilleux PG. Tatum FM, Judge B, Mayfield JE. Deletion of the BCSP31 gene of *Brucella abortus* by replacement. *Infect. Immun.* 1991, 59, 3863-3868.
- 63.- Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, Adams LG. DNA sequence and expression of 36 kilodalton outer protein gene of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 1989, 57, 3281-3291.

- 64.- Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, Marquis, H. Genetic variation at the *omp2* porin locus of the *Brucella*: species-specific markess. Mol Microbiol. 1990, 4, 1135-1142.
- 65.- Marquis H, Ficht TS. The *omp2* gene locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins whit properties characteristic of bacterial porines. Infect. Immun. 1993, 61, 3785-3790.
- 66.- Díaz, R. Estudio de las relaciones antigénicas entre *Yersinia enterocolitica* serotipo 9 y otras especies bacterianas gram - negativas. Microbiol. España. 1974, 27,1-14.
- 67.- Corbel MJ. Recent advanes in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. Vet. Bull. 1985, 55, 927-942.
- 68.- Limet JN, Kerkhofs P, Wijfels R and Dekeyser P. Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine par ELISA. Ann. Med. Vet. 1988, 132, 565-575.
- 69.- Weynants V, Tibor A, Denoel PA, Saegerman C, Godfroid J, Thiange P and Letesson JJ. Infection of catle with *Yersinia enterocolitica* O:9, a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic test. Vet. Microbiol. 1996, 48, 101-112.
- 70.- Corbel MJ. Manual of standars for diagnostic test and vaccines. 2nd 1992, 260.
- 71.- Fekete A, Bantle JA, Halling SM. and Sanborn MR. Preliminary development of diagnostic tes for *Brucella* using polymerase chain reaction. J. Appl. Bcteriol. 1990, 69, 216-227..
- 72.-Fekete A, Bantle JA. and Halling SM. Deteccion of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. J. Vet. Diagn. Invest. 1992, 4, 79-83.
- 73.- Baily GG, Kranhn BS, Drasar BS. and Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification J. of. Tropical Medicine and Hygiene. 1992, 95, 271-275.

- 74.- Herman I, De Ridder H. Identification of *Brucella spp.* by using the Polymerase Chain Reaction. Applied and Environmental Microbiology. 1992, 58, 2099-2101.
- 75.- Romero C, Gamazo C, Pardo, and López Goño I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J. of Clinical Microbiology. 1995, 33, 615-617.
- 76.-Gallin P, Dorn C, Alban G, Staak C, Protz D. Detection *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. The Veterinary Record. 1998; 142, 512-514.
- 77.-Watson R D, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, and Winer AM. Molecular Biology of the genes. Benjamin/Cummings Publishing Co., Neww York. 1987.
- 78.- Smith CA, Wood EJ. Biotecnología Molecular y Biotecnología. Capitulo 2 , 19. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. Prited in USA. 1998, 247.
- 79.- Snyder L and Champness W. Molecular Genetics of Bacteria. Chapter 2, 52. ASM press Washington, D.C. 1997, 504.
- 80.-Huysman E and DeWachte, R. Compilation of small subunit RNA sequences, Nucleic Acids. Res. 1986, 14, 73-118.
- 81.-Woese CR. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 1987, 51, 221-271.
- 82.-Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, and Pace NR. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for for identification of single microbial cell. J. Bacteriol. 1988, 170, 720-726.
- 83.- Bentley RW, Leigh J.A and Collins MD. Development and use of species-specific oligonucleotide probes for differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. J. Clin. Microbil. 1993, 31, 57-60.
- 84.- Bentley RW, Leigh JA and Collins MD. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 1991, 41, 487-494.
- 85.-Lew AE, Desmarchelier PM. Detection of *Pseudomonas pseudomallei* by PCR and hybridization. J. Clin. Microbiol. 1994, 32:5, 1326-1332.

- 86.-Collins M D, Ash C, Farrow JAE, Walbanks S, and Williams AM. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp.nov. J. Appl. Bacteriol. 1989, 67, 453-460.
- 87.-Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, and Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. J.Clin. Microbiol. 1994, 32, 335-351.
- 88.-Bentley RW, Leigh JA. Development of PCR-based hybridization protocol for identification of *Streptococcal* species. J.Clin. Microbiol. 1995, 33, 1296-1301.
- 89.- Hussein HS. Genetic variation among *Brucella* species at the *omp2* locus. Tesis Ph. D. Vet. Sci. Cairo University. Egypt. 1993.
- 90.- Ficht TA, Hussein JD, and Bearden SW. Species-Specific sequences at the *omp2* locus of *Brucella* type strains. International Journal of Systematic Bacteriology. 1996, 46:1, 329-331.
- 91.- Struhl K. Short Protocols in Molecular Biology. Third Edition. Unite. 3.1 Published by John Wiley and Sons, linc. 1995, 3-3.
- 92.- Arellano RB. Comparación de las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa y Bacteriología para el diagnóstico de *Brucella melitensis* en caprinos vacunados e infectados. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, División de estudios de Posgrado UNAM. 1998
- 93.- Díaz. AE, Blasco MJM, Suárez GF. Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina. Vet. Méx. 1999, 30:4, 307-311.
- 94.- Huyen LT, and Kathariou S. Restriction fragment length polymorphisms detectec with Novel DNA probes differentiate among diverse lineages of serogroup 4 *Listeria monocytogenes* and identify four distinct lineages in serotype 4b. Applied and Environmental Microbiology. 2002, 68:1 59-64.
- 95.- Charachon MS, Bourg G, Jumas-Bilak E, Guigue-Talet P, Allardet-Sevent A, O'Callaghan D, and Ramuz M. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. J. Bacteriol. 1997, 79:10, 3244-3249.

- 96.- Cloeckaert A, Verger JM, Grayo M, Grépinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 and 36 kDa outer membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*. 1995, 141, 2111-2121.
- 97.- Cloeckaert A, Verger MJ, Grayon M. and Vizcaíno N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiology Letters*. 1996, 145, 1-8.
- 98.- Bardenstein S, Mandelboim M, Ficht TA, Baum M, and Banai M. Identification of *Brucella melitensis* vaccines strain Rev 1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the *Pst*I site polymorphism of its *omp2* gene. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 1475-1480.
- 99.- O'Hara MJ, Collins DM, and De Lisle GW. Restriction endonuclease analysis of *Brucella ovis* and other *Brucella* species. *Veterinary Microbiology*. 1985, 10, 425-429.
- 100.- Bailey KM, and West DM. Restriction endonuclease (*Eco*R1) analysis of *Brucella ovis* DNA. *N.Z. Vet. J.* 1986, 35, 161-162.
- 101.- McGillivray J, Webber JJ, Edwards LD. Restriction endonuclease analysis of *Brucella abortus*. *Research in Veterinary Science*. 1988, 45, 251-252.
- 102.- Servent AA, Bourg G, Ramuz M, Pages M, Bellis M, and Roizes G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *Journal of Bacteriology*. 1988, 170:10 4603-4607.
- 103.- Muzny DM, Ficht TA, Templeton JW, Adams LG. DNA homology of *Brucella abortus* strains 19 and 2308, *Am J Vet Res.* 1989, 50:5, 655-661.
- 104.- Shrikrishna L, Suryanarayana WS, Satyanarayana RM, Rajasekhar M. Restriction endonuclease analysis of selected *Brucella* strains. *Online Journal of Veterinary Research*. 2001, 5, 233-238.
- 105.- De Ley J, Mannheim W, Segers P, Lievens A, Denjin M, Vanhoucke M, and Gillis M. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group VD. *Int. J. Syst Bacteriol.* 1987, 37, 35-42.

- 106.- Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Bruschi M, and Mayer H. *Brucella abortus* 16S RNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with member of the alfa 2 subdivision of the class Proteobacteria . J. Bacteriol. 1990, 172, 3569-3576.
- 107.- Velasco J, Romero C, López-Goñi I, Leiva J, Díaz R, and Moriyón, I. Evaluation of the relatedness of *Brucella spp.* And *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. Nov., a new species with a closer relationship to *Brucella spp.* International Journal of Systematic Bacteriology. 1998, 48, 759-768.
- 108.- Leong D, Diaz R, Milner J, Rudbach J, and Wilson J.B. Some structural and biological properties of *Brucella* Endotoxin. Infection and Immunity. 1970, 1:2 174-182.
- 109.- Shibata DK. The polymerase chain reaction and the molecular genetic analysis of tissue biopsies. Diagnostic Molecular Pathology. Vol II. Edited by Herrington, C.S and McGee, J.O.D. Published in the United States by Oxford University Press, New York . 1992, 85-111,
- 110.- Renoux G, Alton G, Amarasinghe A et Saquet E. Presence et repartition de *B. melitensis* dans les tissus et les organes des caprins artificiellement infectes. Ext. Arch. Inst. Pasteur. Tunis. 1956, 33, 397-402.
- 111.- Villegas AH. Estudio bacteriológico y fagotipificación de brucelas aisladas de caprinos y bovinos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. México. 1997.
- 112.- Mancera MA, Díaz AE, Vázquez NJ, Velásquez QF, Suárez GF y Flores C R. Vacunación de cabras con la cepa Rev1 de *Brucella melitensis* en diferentes dosis: Evaluación serológica y desafío. Veterinaria México. 1992, 23:2 117-123.
- 113.- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin BB, Foster G, and Godfroid J. Classification of *Brucella spp.* Isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2 locus*. Microbes and Infection. 2001, 3, 729-738.

11. ANEXO

FORMULACION DE SOLUCIONES PARA HIBRIDACION

SOLUCION DE PREHIBRIDACION (100 ml)		
COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	CANTIDAD (ml)
Formamida 100%	50 % (v/v)	50
SSPE 20 X	6 X	30
Solución de Denhard's 50 X	5 X	10
SDS 10 % (p/v)	1 %	10

Se mezcló la formamida, el SSPE y la solución de Denhard's. Adicionar la solución de SDS. Calentar a 42°C para incrementar el rango de disolución. La solución es estable a - 20°C por lo menos 3 meses o 4°C por algunas semanas.

SOLUCION DE HIBRIDACION (50 ml)		
COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	CANTIDAD
Dextrán sulfato	10 %	5g
Formamida 100 %	50	25ml
SSPE 20 X	6 X	15ml
Sol. de Denhardt's 50 X	5 X	5ml
SDS 10 % (p/v)	1 %	5ml

Disolver el dextrán sulfato en la formamida y en el SSPE. Adicionar a la solución de Denhardt's y el SDS. Calentar a 42°C para incrementar el rango de disolución.

La solución es estable a -20°C por lo menos 3 meses o 4°C por algunas semanas.

DNA DE ESPERMA DE SALMON (ssDNA 10mg/ml).

Disolver el ssDNA en agua destilada a una concentración de 10mg/ml. Agitar de 2 a 4 horas a temperatura ambiente. Purificar el DNA pasando la solución varias veces a través de una aguja hipodérmica del número 18. Hervir el DNA por 10 minutos. Almacenar a -20°C en pequeñas alícuotas. Antes de su uso calentar el DNA durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo. La solución es estable a -20°C al menos 12 meses.

SSC 20 X (1 lt)		
COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	CANTIDAD (g)
NaCl	3.0 M	175.3
Citrato de sodio dihidratado	0.3 M	88.2

Mezclar los siguientes componentes:

Disolver en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 con Hidróxido de sodio 4 N. Aforar a 1 litro con agua destilada. Filtrar utilizando una membrana estéril de $0.45\mu\text{m}$. Almacenar la solución estéril a 4°C .

TBS-TWEEN 20 (1 Litro)		
COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	CANTIDAD
NaCl	150mM	8.77g
Tween 20	0.05 % v/v	0.5 ml

Disolver en 800 ml de agua destilada. Ajuster a un pH 7.5 con HCl 4N. Aforar a un litro y filtrar con una membrana estéril de 0.45µm. Almacenar a 4°C.

SOLUCION BLOQUEADORA (100ml)

Disolver 3g de albúmina sérica bovina en 100 ml de TBS-TWEEN 20. (La disolución es más fácil que se acople espolvoreando la albúmina sérica bovina en la superficie del TBS-TWEEN 20 y permitiendo que por si sola baje durante 2 o 3 horas hasta que se disuelva). Filtrar utilizando una membrana estéril de 0.4µm. Almacenar la solución estéril a 4°C.

BUFFER DE LAVADO FINAL (1 Litro)		
COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	CANTIDAD (g)
NaCl	100mM	5.85
MgCl₂. 6 H₂O	50mM	10.2

Mezclar los siguientes componentes:

Disolver en 800 ml de agua destilada. Ajustar a un pH 9.5 con HCl 4N. Aforar a un litro y filtrar con una membrana estéril de 0.45µm. Almacenar a 4°C.

SSPE 20 X		
COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	CANTIDAD (g)
NaCl	3.0M	87.6
Fosfato de sodio monobásico	0.1 M	6.8
EDTA	20.0mM	3.7

Disuelva en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 con Hidróxido de sodio 4 N. Afore a 1 litro con agua destilada. Filtrar utilizando una membrana estéril de 0.45µm. Almacenar la solución estéril a 4°C.

2 X SSC a un volumen de 20X SSC agregar 9 volúmenes de agua.

5 X SSC a un volumen de 20X SSC agregar 3 volúmenes de agua.

Solución Denhardt's (100ml)		
COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	CANTIDAD (g)
Albúmina sérica bovina pH 7.5	1 %	1
Polivinil pirrolidona (PVP40)	1%	1
Ficoll 400	1%	1

Disuelva en 100 ml de agua destilada. Ajustar la albúmina a un pH de 7.5. Mezclar todos los componentes. Almacenar la solución estéril a 4°C.