

11661



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**DIFERENCIACIÓN DE CEPAS VACUNALES E INFECTANTES
DE *Brucella melitensis* MEDIANTE EL POLIMORFISMO
DE LONGITUD EN FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN
E HIBRIDACIÓN CON SONDAS**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AREA: MICROBIOLOGÍA

PRESENTA:

ELBA DOLORES NÚÑEZ TORRES

ASESORES:

PhD. ALFREDO SAHAGÚN RUÍZ
DR. VÍCTOR TENORIO GUTIÉRREZ

CUAUTITLÁN, IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2005

17346427



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.

DEDICATORIAS

⌘ A mis Padres:

Lino Núñez y Martha Torres, que siempre han estado conmigo brindándome su apoyo y cariño.

⌘ A mis hijos:

Pablo Nava Núñez e Isaac Nava Núñez que son la luz de mis días.

⌘ A mi esposo:

Eduardo Nava, por el tiempo, paciencia y dedicación a este proyecto, pero por sobre todo, por creer en mí.

⌘ A mi abuela:

Dolores que me brindo su cariño y apoyo, mientras trabaje en este proyecto.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Alfredo Sahagun. Cuyo apoyo fue muy importante para concluir este trabajo.

Al Dr. Víctor Tenorio De quien recibí todo su apoyo y comprensión, en la realización de este trabajo.

A los integrantes del laboratorio de Bacteriología del CENID-MICROBIOLOGÍA

Dr. Francisco Morales
Dra. Lourdes Ontiveros
MC Arturo Mancera
Dr. Francisco Aguilar
Dra. Laura Jaramillo

A los integrantes del Jurado que invirtieron tiempo valioso en la evaluación de este documento y cuyas aportaciones enriquecieron este trabajo.

DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA
DR. FRANCISCO SUÁREZ GUEMES
DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO
DR. ALFREDO SAHAGUN RUÍZ
DR. VÍCTOR TENORIO GUTIERREZ

ÍNDICE

TEMA	PAGINAS
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Epidemiología	2
1.3 Características Microbiológicas del género	3
1.4 Taxonomía	4
1.5 Componentes estructurales	5
1.6 Genética de <i>Brucella sp</i>	7
1.7 Prevención y control	8
1.6 Diagnóstico	10
1.9 Análisis de restricción y sondas genéticas	11
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo General	14
4.2 Objetivos Particulares	14
5. MATERIAL Y MÉTODOS	15
5.1 Cepas utilizadas en el estudio preliminar	15
5.2 Extracción de ADN genómico	15
5.3 Cuantificación	16
5.4 Cualificación	16
5.5 Restricción del ADN genómico	17
5.6 Preparación del gel de agarosa	18
5.7 Inspección o Escrutinio de la biblioteca genómica y escisión "in vivo" del plásmido pBK-CMV	18
5.8 Extracción del plásmido	20
5.9 Digestión del plásmido pBK-CMV	21
5.10 Marcaje de la sonda de ADN de <i>Brucella melitensis</i>	21

5.11 Hibridación tipo Southern blot	22
5.12 Astringencia y detección de la señal de hibridación	24
5.13 Animales de experimentación	25
5.14 Colección de muestras	26
5.15 Estudio Bacteriológico	26
5.16 Identificación del género <i>Brucella</i>	27
5.17 Crecimiento en presencia de colorantes	28
5.18 Serotipificación de <i>Brucella</i>	29
5.19 Resistencia a colorantes y antibióticos	29
5.20 Fagotipificación de cepas	30
5.21 Cepas de aislamiento de campo donadas por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE)	31
6. RESULTADOS	32
6.1 Extracción de ADN	32
6.2 Sondas de <i>B. melitensis</i>	33
6.3 Bacteriología	36
6.4 Análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción	37
7. DISCUSION Y CONCLUSIONES	51
7.1 Extracción de ADN	51
7.2 Bacteriología	51
7.3 Análisis de restricción e hibridación	52
8. BIBLIOGRAFIA	59

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Tabla 1. Grupos de animales y tratamientos	26
Tabla 2. Número de aislamientos de los distintos órganos por grupo	36
Tabla 3. Análisis de hibridación con la sonda 21.1	41
Tabla 4. Análisis de hibridación con la sonda 21.2	43
Tabla 5. Análisis de hibridación con la sonda 22.1	45
Tabla 6. Análisis de hibridación con la sonda 22.2	48
Figura 4 RFLP del ADN de las cepas de <i>Brucella</i> , digerido con las enzimas <i>Sau3A1</i> y <i>EcoRI</i> hibridado con la sonda 21.1.	38
Figura 5 Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de las cepas de <i>Brucella melitensis</i> , 133 y Rev1 INRA digerido con las enzimas, <i>Sau3AI</i> y <i>EcoRI</i> e hibridado con la sonda 22 (combinando los fragmentos 22.1 y 22.2)	40
Figura 6 Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de diferentes cepas de <i>Brucella melitensis</i> , tanto de aislamiento de campo como de cepas vacunales digerido con la enzima, <i>EcoRI</i> e hibridado con la sonda 21.1	42
Figura 7 Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de diferentes cepas de <i>Brucella melitensis</i> , tanto de aislamiento de campo como cepas vacunales digerido con la enzima, <i>EcoRI</i> e hibridado con la sonda 21.2	44

Figura 8 Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de diferentes cepas de *Brucella melitensis*; tanto de aislamiento de campo como cepas vacunales digerido con la enzima *EcoRI* e hibridado con la sonda 22.1 46

Figura 8a Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de diferentes cepas de *Brucella melitensis*, tanto de aislamiento de campo como cepas vacunales digerido con la enzima, *EcoRI* e hibridado con la sonda 22.1 47

Figura 9 Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de diferentes cepas de *Brucella melitensis*, tanto de aislamiento de campo como cepas vacunales digerido con la enzima, *EcoRI* e hibridado con la sonda 22.2 49

Figura 9a Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de diferentes cepas de *Brucella melitensis*, tanto de aislamiento de campo como cepas vacunales digerido con la enzima, *EcoRI* e hibridado con la sonda 22.2 50

RESUMEN

Núñez Torres Elba Dolores. Diferenciación de cepas vacunales e infectantes de *Brucella melitensis* mediante el polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción e hibridación con sondas. Bajo la asesoría de PhD. Alfredo Sahagún Ruíz y del Dr. Víctor Tenorio Gutiérrez

Brucelosis es una zoonosis de importancia en México, por las pérdidas económicas que genera es causada principalmente por *Brucella melitensis*. El aislamiento de la bacteria y su identificación constituye el principal método de diagnóstico, implicando un riesgo para el técnico, además de los tiempos prolongados dentro del laboratorio; por lo que el objetivo del presente trabajo fue encontrar diferencias entre cepas de aislamiento de campo y cepas vacunales Rev1 de *B. melitensis* biotipo 1 con base a la presencia de polimorfismos en su secuencia de ADN, utilizando cuatro sondas genéticas marcadas con biotina y obtenidas a partir de dos clonas de una biblioteca genómica de *B. melitensis* 133, construida en el vector de expresión λ ZAP Express. Se seleccionaron cuatro clonas, subclonándose directamente mediante escisión *in vivo* en el plásmido pBK-CMV. Los plásmidos recombinantes fueron identificados como 21 y 22 de los que se tomaron dos fragmentos después de haber sido digeridos con la enzima *EcoRI*, los cuatro fragmentos se marcaron para ser utilizados como sondas y probaron con las diferentes cepas, tanto de aislamiento de campo como con dos cepas vacunales.

Se obtuvieron diversos resultados, sin embargo la mejor sonda fue la nombrada 21.1 ya que con esta sonda se lograron obtener diferencias

significativas entre la cepa vacunal Rev1 PRONAVIBE y las cepas de aislamiento de campo exceptuando a las cepas de campo 551 y “feto de Puebla” que presentaron el mismo perfil que la cepa vacunal antes mencionado.

SUMMARY

Núñez Torres Elba Dolores. Differentiation of *Brucella melitensis* infective vaccinal strains by length polymorphism on restriction and hybridization fragments with probes. Under the guidance of PhD. Alfredo Sahagún Ruiz and Dr. Víctor Tenorio Gutiérrez.

Brucellosis represents an important zoonosis in Mexico as great economic loss is caused mainly by *Brucella melitensis*. The isolation and identification of this bacteria is currently the principal method of diagnosis, which implies high risk to the technicians involved as well as long periods of time spent at the laboratory. Due to this, the objective of the present work was to find the differences existing between field isolation strains and *B melitensis* Rev1 vaccinal strains biotype1 based on the presence of polymorphisms on their DNA sequence, using four genetic probes marked with biotine and which were obtained from two clones of a *B melitensis* 133 genomic library, constructed on the expression vector ZAP Express. Four clones were selected, being subcloned directly by an *in vivo* excision on the pBK-CMV plasmid. The recombining plasmids were identified as 21 and 22 from which two fragments were taken after having been digested by *EcoRI* enzyme. The four fragments were then marked in order to be used as probes and were tried with the different strains, namely, the field isolation ones and two vaccinal strains.

Various results were obtained; however, probe 21.1 proved to be the best, since significant differences were achieved between vaccinal strain Rev 1 PRONAVIBE and the field isolation strains except for field strains 551 and "fetus of Puebla", which presented the same profile as the already mentioned vaccinal strain.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

La brucelosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Brucella*, el primer aislamiento del agente fue realizado por Bruce en 1884 (Niccoletti, 2002), se trata de una bacteria intracelular que se multiplica dentro de los fagocitos del sistema inmune, siendo capaz de evadir la acción de los mecanismos bactericidas del fagocito (Fernandez-Prada C.M., *et al.*, 2001; Jiménez de Bagues M.P., *et al.*, 2003). De forma natural, *Brucella spp.* infecta a varias especies animales: rumiantes, camélidos, suinos, cánidos, roedores y algunos mamíferos marinos, mostrando una cierta especificidad de especie. La enfermedad es una zoonosis que causa graves pérdidas en la ganadería nacional debido a la alta incidencia con que se presenta por lo que además tiene un gran impacto en la salud pública (CONASA, 1994). La infección en humanos generalmente resulta de una transmisión gastrointestinal, debido al consumo de leche sin pasteurizar así como de sus derivados, además la carne también se ha considerado como una fuente de contaminación y de la transmisión por aerosoles al estar en contacto con abortos así como a la exposición directa con animales infectados u objetos contaminados (Fosgate. *et al.*, 2002; Kaufman. *et al.*, 1980; Miller. *et al.*, 1987) por lo que también se le ha considerado una enfermedad de tipo profesional (El-Begawey-MB *et al.*, 1994), donde *B. melitensis* es la especie más comúnmente involucrada (FAO/OMS, 1986). En México se ha reportado que en humanos el 93% de casos son infecciones por *B. melitensis* de origen caprino,

5% con *B. melitensis* de origen bovino, 1.5% con *B. abortus* de origen bovino y 0.5% con *B. suis* de origen bovino (Pacheco *et. al.*, 1999).

1.2 Epidemiología

La brucelosis es una infección que se trasmite al hombre de forma accidental de animales domésticos que en su mayoría son aquellas especies productoras de alimento. El riesgo de 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, las vías de infección y la cantidad del inóculo (Meljem *et. al.*, 1998).

Se trata de una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo, especialmente en los países en vías de desarrollo, México también la posee, considerándose una de las enfermedades bacterianas más serias e importantes (Gurría, 1998). En nuestro país *B. abortus* se ha considerado como una fuente importante de brucelosis humana en muchos lugares debido a la gran concentración de ganado bovino que existe (Velásquez, 1998). Sin embargo en el estudio realizado por Hernández *et. al.* (1999) sobre la seroprevalencia de brucelosis en disponentes de sangre, se encontró con que el 90% de los casos tienen su origen en el ganado caprino, que existe en todo el territorio nacional, predominando en un área triangular cuya base es la frontera norte y el vértice es el centro del país. En esta última región afecta predominantemente al estado de Guanajuato. El 90% de los casos son producidos por *B. melitensis*, y en todos se

ha encontrado un reservorio animal.

El ganado caprino se infecta principalmente de *B. melitensis* y se encuentra distribuido en todo el territorio nacional en tres sistemas de explotación: a) ranchos controlados; b) en rebaños nómadas que se mueven en áreas extensas en busca de alimento y c) como parte integral de actividades de traspato, como un recurso de ingresos que pueda mejorar la economía familiar; lo que contribuye a infectar un número considerable de individuos. Por lo anterior es necesario el control epidemiológico de *B. melitensis* para lo que se requiere mejorar las técnicas de diagnóstico y prevención de la enfermedad para su erradicación (Mikolon *et. al.*, 1998; Alvarez, 1998; Luna-Martínez and Mejía-Terán , 2002).

1.3 Características Microbiológicas del género.

Las brucelas son pequeños bacilos cortos de 0.6 a 1.5 μm por 0.5 a 0.8 μm , Gram negativas, aerobias, catalasa, oxidasa y ureasa positivas y algunas especies requieren de CO_2 para su desarrollo, especialmente en aislamiento primario. Se desarrolla entre 20-40°C, siendo su temperatura óptima de crecimiento 37°C. Por lo general aparecen aislados o en pares, pero a veces se ven cadenas cortas o grupos. Sus requerimientos nutricionales son complejos, requiriéndose medios de cultivo enriquecidos con triptosa y algunas veces suplementos como infusión de hígado, suero de bovino o hidrolizado de levadura. Aún cuando se desarrolla en medios de cultivo que contienen sangre, su crecimiento es lento sin producir hemólisis ni pigmento, por lo que los medios deben conservarse hasta tres

semanas antes de ser descartados como negativos (Hitchcock *et. al.*, 1986; Manual del II Taller monográfico de Biología Molecular Básica aplicada al laboratorio clínico. 1995).

1.4 Taxonomía

El análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S, la composición lipídica y ciertos aspectos de su fisiología y biología general sitúan a *Brucella* dentro de la subdivisión general $\alpha 2$ de la Clase Proteobacteria (Jumas-Bilak, 1998), en la que están también otros patógenos intracelulares animales como las Rickettsias, así como destacados patógenos y endosimbiontes de vegetales (*Agrobacterium* y *Rhizobium*), las propias mitocondrias y ciertas bacterias telúricas. Por tanto, parece que la asociación intracelular con eucariontes es una tendencia evolutiva compartida con otros miembros de la subdivisión $\alpha 2$. Esto es coherente con ciertas hipótesis sobre la patogenicidad y explica las reacciones cruzadas con proteínas de otros miembros de la subdivisión $\alpha 2$ en pruebas serológicas y moleculares (Moreno *et. al.*, 2002).

Clásicamente, las brucelas se han agrupado en varias especies; *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis* siguiendo, entre otros, el criterio del animal hospedero preferente. En estudios recientes se han logrado aislar bacterias, de diferentes mamíferos marinos (delfines y focas entre otros), que han sido identificadas como brucelas por su morfología, desarrollo, aglutinación por antisueros monoespecíficos susceptibilidad a la lisis, así como por

sus características metabólicas, lo cual ha sugerido la existencia de una nueva especie llamada "*B. maris*" (Cloeckaert *et. al.* 2001). Además dentro de algunas de estas especies se pueden distinguir biotipos o biovariedades siguiendo criterios como la sensibilidad a colorantes, tipo serológico y otros (Marin and Hancock, 1990).

1.5 Componentes estructurales

El género *Brucella* revela ciertas peculiaridades con respecto a otros gérmenes Gram negativos a nivel genómico, como lo es la presencia de dos replicones independientes (López *et. al.*, 1991), así como la envoltura celular que es resistente a la acción de detergentes, al ácido etilendiamino tetracético (EDTA), a la acción de la polimixina B, a la proteólisis de enzimas y a la digestión con lisozima (Marin and Hancock, 1990; Corbel and Brinley-Morgan, 1984; Jiménez de Bagues, 1991; Koneman, 1984).

La resistencia a la desintegración física del género *Brucella* se debe en parte a las diferencias cuantitativas y cualitativas en la estructura del peptidoglicano (PG) pero también por tamaño y forma celular. Se ha observado que la inactivación por calor de *Brucella abortus* causa colapso en la membrana citoplasmática, mientras que la membrana externa conserva su apariencia morfológica a pesar de liberar grandes cantidades del LPS y otros materiales de membrana externa. Esto sugiere que la interacción membrana externa-

peptidoglicano puede resultar en una gran rigidez en *Brucella*, más que en otras Gram negativas.

La molécula más abundante en la membrana externa es el lipopolisacárido el cual está constituido por el antígeno "O" específico, un polisacárido central y el lípido A. El antígeno "O" es una molécula que se encuentra expuesta hacia el exterior de la membrana externa, orientación que facilita la inducción de anticuerpos contra dicho antígeno y el oligosacárido central, por lo que son de gran valor en el diagnóstico de la brucelosis y en la identificación serológica de las especies de *Brucella*. El antígeno "O" polisacárido de *B. abortus* 1119-3 está constituido de un homopolímero lineal de unidades de D-manopiranosil, 4-6 dideoxi, formamido ligadas por unión α 1-2. La estructura del polisacárido "O" de *B. melitensis* es también un homopolímero de D-manopiranosil, 4-6 dideoxi, 4-formamido (o perosamina) en apariencia similar al de *B. abortus*. Con base en esta similitud estructural explicaría la reacción cruzada de estos organismos. La cadena "O" del lipopolisacárido (LPS) ha sido implicada en la supervivencia intracelular en células fagocíticas, además de conferirle a este agente etiológico mayor resistencia a la acción de sustancias bactericidas lisosomales por lo que sigue siendo de gran interés para la investigación de la enfermedad (Jahans *et al.*, 1997).

1.6 Genética de *Brucella sp*

El genoma de completo de *B. melitensis* contiene 3,294,931 pares de bases (pb) del cual aproximadamente 58% es de Guanina-Citosina, este se puede observar como una sola banda en una electroforesis de tipo convencional y dos en la electroforesis de pulso poniendo de manifiesto la existencia de dos cromosomas; el cromosoma I de 2, 117,144 pb y el cromosoma II de 1,177,787 pb (Michaux *et. al.* 1993). Los orígenes de replicación de ambos cromosomas son muy parecidos a los de otras α - proteobacterias. Los genes de: replicación del ADN, transcripción, metabolismo, así como genes de biosíntesis de la pared celular se encuentran distribuidos en ambos cromosomas. Los llamados sistemas de adhesinas, invasinas y hemolisinas han sido identificados dentro del genoma de *B. melitensis*. Varias características del genoma de *B. melitensis* son similares a las del simbiote *Sinorhizobium meliloti* (DelVecchio *et. al.*, 2002). Gracias a la secuenciación total del genoma de *B. melitensis* se han realizado estudios para su aplicación directa en el diagnóstico tales como los genes genes *groEL* y *groES* cuyos productos entre otros son altamente inmunogénicos.

De los primeros estudios moleculares aplicados al género *Brucella* fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos basado en secuencias de inserción (IS) que permiten distinguir entre las diferentes especies de *Brucella*, seguido por el de hibridación tipo Southern blot.

Los estudios moleculares también han servido para la construcción de bibliotecas en transposones los cuales han permitido la obtención de mutantes para conocer sobre la sobrevivencia de *Brucella* en los macrófagos y utilizando los

cambios alélicos para explorar la contribución de genes en la patogenicidad de *Brucella spp.* Estudios de complementación han servido para el aislamiento de genes que participan en la biosíntesis y metabolismo. Similarmente, se ha demostrado que el LPS es un factor de virulencia. Hasta el momento no se ha logrado establecer la existencia de plásmidos relacionados con patogenicidad o resistencia a antibióticos.

Estos estudios también han permitido reconocer polimorfismos en el ADN del género *Brucella* en las diferentes especies, el desarrollo de ensayos moleculares para distinguirlas entre ellas (Jahans *et. al.*, 1997; Verger *et. al.*, 1985).

1.7 Prevención y control

Los programas de control de la brucelosis comprenden la eliminación de la infección a través de pruebas diagnósticas con el subsecuente sacrificio de animales infectados y la prevención de la reinfección del rebaño (Brown *et. al.*, 1988). Se han utilizado contra la brucelosis una amplia variedad de vacunas, sin embargo, la generalidad de los programas se basan en el uso de vacunas vivas atenuadas. Actualmente la única vacuna utilizada para el ganado ovino y caprino es la cepa atenuada *B. melitensis* Rev1 que es de baja virulencia, altamente antigénica y estable, ya que no revierte a patógena e induce una respuesta inmune semejante a la de la infección natural (FAO/OMS, 1986; Jiménez de Bagues, *et. al.*, 1991), por lo que existe una multiplicación de dicha cepa en los

animales. La vacunación sólo disminuye el riesgo de contagio, sin eliminarlo por completo, por lo que debe estar integrada a un programa de control que incluya el diagnóstico y medidas sanitarias (Blasco, 1990). La persistencia de anticuerpos es variable en el suero después de la vacunación y constituye la mayor desventaja del uso de la vacuna ya que puede existir interferencia en la identificación de animales infectados. La persistencia de anticuerpos posteriores a la vacunación convencional (vía subcutánea, dosis completa) en cabritas podría oscilar entre cuatro y veinte meses (FAO/OMS. 1986; Mancera, 1990). En la persistencia de anticuerpos intervienen diversos factores tales como la edad, dosis, vía de administración, tiempo posvacunal, así como el tipo de prueba utilizada y la interpretación de resultados es importante (Frank, 1991; El-Begawey-MB *et. al.*, 1994). Al usar la vacunación con dosis reducida (1×10^5 - 5×10^4 UFC) en cabras adultas, estas resultan negativas a las diversas pruebas serológicas entre los 3 y 7 meses después de la vacunación (Alton *et. al.* 1988; Alton, 1972; Díaz, 1984). Es importante mencionar que la vacuna protege alrededor del 80% de los animales, sin embargo la cepa vacunal en algunos casos llega a provocar brucelosis (Díaz, 1993). Existen pocos datos actualizados sobre la situación de la enfermedad en esta especie. Sin embargo Luna-Martínez and Mejía-Terán (2002) reportan que cada año el Programa Nacional de Brucelosis logra colocar vacunas de Rev1 a aproximadamente 800 000 cabezas de ganado caprino.

1.6 Diagnóstico

Existen diferentes métodos para el diagnóstico de *B. melitensis*, los convencionales se basan en detectar en suero sanguíneo anticuerpos contra este microorganismo. Los mejores resultados se han obtenido con la prueba de fijación de complemento (FC) y la prueba de ELISA indirecta. La prueba de rosa de bengala, a una concentración del 3%, es utilizada como tamiz, ya que tiene una sensibilidad del 98% y tiene la ventaja de poder ser utilizada tanto en el laboratorio como en campo, además de ser una prueba económica (CONASA. 1994), y el método confirmatorio es el aislamiento de la bacteria de los animales que padecen la infección (Flores, 1990). Actualmente los métodos moleculares ofrecen ventajas como la rapidez, especificidad y menor riesgo para el técnico; por lo que uso de sondas genéticas, el polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ficht *et. al.*, 1996; Hermant and De Ridder, 1992), facilitan el diagnóstico de la infección por *Brucella spp.*, ya que pueden detectar una cantidad mínima de bacterias y encontrar diferencias muy pequeñas de cepas estrechamente relacionadas, lo cual es de gran utilidad en estudios filogenéticos y epidemiológicos, y es así que la utilización de herramientas como las sondas genéticas, son de gran importancia en el laboratorio de diagnóstico actual.

1.9 Análisis de restricción y sondas genéticas

El ADN es un polímero lineal, no ramificado, que puede contener muchos millones de nucleótidos dispuestos en una secuencia irregular, pero no aleatoria y la información genética esta contenida en el orden exacto de los nucleótidos, por esta razón es que el análisis de ADN permite la identificación precisa de diferentes bacterias, aún tratándose de bacterias de la misma especie (O'Hara *et.al.*,1985). La utilización de sondas de ADN, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP); han sido utilizados como herramientas epidemiológicas en brotes de distintas enfermedades bacterianas y virales, así como para establecer diferencias entre Taxas, o el establecimiento de las distintas líneas filogenéticas dentro del mismo género.

Un método por el cual se generan fragmentos de ADN es la digestión con enzimas de restricción. El sitio de reconocimiento de una enzima de restricción comúnmente consiste de una secuencia específica de 4 a 6 pares de bases. Estos están distribuidos a lo largo del DNA con diferente frecuencia. La identificación por polimorfismo es la base de los mapas genéticos, y puede ayudar a la selección de marcadores moleculares de interés diagnóstico. Por medio de esta técnica se puede conocer de manera rápida y específica la etiología de algunas enfermedades bacterianas y además es posible determinar si existe diversidad genética en la población bacteriana. Los fragmentos digeridos son separados en geles de agarosa por electroforesis. Posteriormente son transferidos a membranas de nylon e hibridados a una sonda de ADN del microorganismo estudiado

marcada con biotina. Se puede observar la presencia de bandas adicionando el conjugado de Streptoavidina-fosfatasa alcalina y un sustrato que produce luz. Esta señal puede ser captada en películas radiográficas (Kapperud *et. al.*, 1989).

2. JUSTIFICACIÓN

Para establecer esquemas de control de la brucelosis en un rebaño caprino es necesario reconocer al agente causal. El aislamiento primario e identificación de *Brucella melitensis* es tardado, debido a que incluye pruebas metabólicas con diferentes sustratos, serotipificación y fagotipificación, lo que implica tiempo, costos elevados y riesgos para el técnico. La utilización de las herramientas moleculares, para la diferenciación de cepas bacterianas, además de poder realizarse en un tiempo corto, puede ser utilizado como un recurso epidemiológico, ya que incluso es posible determinar la transmisión de un rebaño a otro y de esta manera poder fortalecer los esquemas de control de la brucelosis dentro de un rebaño caprino.

3. HIPÓTESIS

Los marcadores moleculares permitirán diferenciar el ADN de *Brucella melitensis* de cepas aislamiento de campo del ADN de la cepa vacunal de *Brucella melitensis* Rev1 biotipo 1.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Diferenciar cepas vacunales de cepas infectantes de *Brucella melitensis* mediante análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN cromosómico hibridado a sondas genéticas.

4.2 Objetivos Particulares

Determinar si existe polimorfismo entre cepas de *Brucella melitensis* de campo utilizando sondas genéticas marcadas con biotina.

Determinar que enzima proporciona un patrón de restricción que permita la diferenciación entre cepas vacunales e infectantes de *Brucella melitensis*, utilizando sondas genéticas marcadas con biotina.

Caracterización de aislamientos de *B. melitensis* a partir de la infección experimental de cabras y aislamientos de campo mediante el uso de sondas genéticas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Cepas utilizadas en el estudio preliminar.

Para el estudio preliminar fueron utilizadas tres cepas de *B. melitensis*: Cepa vacunal Rev1 INRA, cepa 16M de referencia (cepario del CENID-Microbiología) y cepa de aislamiento de campo 133, todas estas cepas del biotipo 1.

Las cepas se cultivaron en placas de agar *Brucella* durante 48 h a 37°C, colectadas y conservadas en alícuotas 1 ml de solución de leche descremada al 10% y congeladas a -70 °C.

5.2 Extracción de ADN genómico

Cada una de las cepas de *Brucella melitensis* después de ser descongelada y sembrada en cajas petri de agar *Brucella*, fue crecida en botellas Roux con agar *Brucella*, en estufa bacteriológica a 37°C durante 48 h. La masa bacteriana se cosechó con solución salina fisiológica, colectándose en tubos Corex e inactivándose a 65°C por 1 h. Enseguida se centrifugó a 1 000 xg/10 minutos. Las células obtenidas fueron resuspendidas en 10 ml de solución TE (10 mM TRIS-HCl pH 8, 50 mM EDTA 0.5 pH 8.0), adicionando proteinasa K, 100 µg/ml, y 200 µl de SDS al 20% para obtener una concentración final 1%. Se mezcló y se incubó a 65 °C 1h. Se extrajo con un volumen igual de fenol saturado con Tris-HCl pH 8.0 y cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1, esto se mezcló por 15 minutos y se centrifugó a 4 000 xg/10 minutos y se separó

la fase acuosa en tubos de teflón limpios. Se repitió nuevamente el procedimiento para separar la fase acuosa en tubos limpios a la que se agregó RNAsa a 50 µg/ml de concentración final, incubándose a temperatura ambiente por 10 minutos, para después extraer nuevamente el ADN con fenol, a la fase acuosa se adiciono un décimo de volumen de acetato de amonio 3 M, pH 5 y 2 volúmenes de etanol puro frío, para precipitar el ADN, se agitó levemente y se centrifugó a 10 000 xg/15 minutos, se decantó el etanol y se lavó el botón con etanol al 70%, seguido de una centrifugación a 10 000 xg durante 15 minutos. Una vez precipitado el ADN se eliminó el etanol residual y se resuspendió en solución TE, posteriormente se observó en gel de agarosa al 1% (Davis *et. al.*, 1986).

6.3 Cuantificación

La concentración aproximada del ADN fue determinada por fluorimetría. Se utilizó como blanco 2 ml de la solución para lectura de bajo rango, enseguida se calibró con ADN de esperma de salmón a una concentración de 120 ng/µl patrón. Para la lectura se tomaron 2 µl de ADN diluyéndose en 2 ml de la solución de bajo rango, la lectura obtenida corresponde a la concentración de la muestra.

6.4 Cualificación

Las extracciones fueron evaluadas por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Estos geles fueron preparados fundiendo agarosa en TAE (Tris base 40 mM, ácido

acético 20 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) vertiendo 30 ml en una minicámara horizontal. Una vez gelificada la agarosa, se depositó la muestra previamente mezclada con colorante de carga tipo III (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30% en agua bidestilada estéril). Posteriormente se aplicó una diferencia de potencial de 10 volts por cm (80 V para un minigel) y se permitió que migrara durante aproximadamente 1 hora. Una vez terminada la corrida, el gel fue teñido por inmersión en una solución de 5 µg/ml de bromuro de etidio en agua, por 5-8 minutos se lavó con agua corriente. Finalmente se observó con la ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta y posteriormente fueron fotografiados (Sambrook *et. al.*, 1989).

5.5 Restricción del ADN genómico

El ADN de las cepas Rev1 INRA y de aislamiento de campo 133 fueron digeridos con las enzimas *EcoRI* y *Sau3AI*, según la técnica descrita por Davis *et. al.* (1986). Los fragmentos obtenidos se utilizaron para realizar diferentes ensayos con diferentes sondas con el fin de encontrar la enzima que permitiera la diferenciación entre cepas. Para dicho ensayo se utilizaron 1.25 µg de ADN genómico se adicionaron 2 U de la enzima en presencia de la solución amortiguadora apropiada incubándose a 45°C. La actividad de la enzima se detuvo mediante la incubación a 65°C durante 5 minutos de cada una de las muestras (Sambrook *et.al.*, 1989).

5.6 Preparación del gel de agarosa.

Los fragmentos de restricción obtenidos con cada una de las enzimas fueron separados y observados por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% en amortiguador TBE 0.5 x (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 1mM) en una minicámara de electroforesis.

5.7 Inspección o Escrutinio de la biblioteca genómica y escisión “in vivo” del plásmido pBK-CMV

Se trabajó a partir de una biblioteca genómica construida en lambda Zap II a partir de la cepa 133 (Hernández-Castro *et. al.*, 2000).

Se inoculó caldo LB (Luria-Bertrani NaCl, Triptona, Extracto de levadura, pH 7.0) adicionado con 0.2% de maltosa y 10 mM de MgSO₄ con una colonia de la cepa *E. coli* XL1-Blue MRF, incubándose toda la noche a 30°C. Posteriormente se utilizó el cultivo para preparar una dilución 1:100 en el mismo medio, se dejó en incubación durante 4 h a 37°C, hasta una DO₆₀₀ 1.0, por otra parte se hicieron diluciones del fago lambda ZAP II de la biblioteca genómica de 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³ en solución amortiguada SM (1.45 g de NaCl, 0.5 g de MgSO₄, 0.1M Tris-HCl y 1.25 g de gelatina pH final 7.5). Se tomaron 600 µl de la suspensión bacteriana más 1µl de cada una de las diluciones del fago, para ser incubadas a 37°C durante 30 minutos, de esta manera se llevó a cabo la adsorción. De las diluciones antes descritas se tomaron 600 µl para ser inoculados en tubos que contenían Top-agar (NZY agar, NaCl 0.1M, MgSO₄.7H₂O 0.1M, 5g de extracto de levadura, 10g de NZ

amina y 7g de agar, en 1lt agua), adicionado con maltosa al 20%, MgSO₄ y MgCl₂, con esta mezcla se cubrió la superficie de agar y una vez frío se incubaron a 40°C por 4h; después a 37°C hasta la observación de placas líticas que aparecieron después de 12 h de incubación. Una vez que las placas fueron visibles, fueron colectadas en microtubos estériles a los que se les agregó 100 µl de amortiguador SM y 50 µl de cloroformo concentrado, para después conservarse en refrigeración hasta realizar la escisión *in vivo*.

El fagémido pBK-CMV fue escindido *in vivo* del vector lambda ZAP Express mediante coinfección de *E. coli* XL1 Blue con el lambda ZAP Express recombinante seleccionado y el bacteriófago cooperador R-408. El plásmido obtenido contiene el ADN clonado.

Se creció *E. coli* XL1MRF Blue en caldo LB suplementado con 0.2% de maltosa y 10 ml de MgSO₄ y *E. coli* XL0LR en caldo NZY (NZ amina caseína hidrolizada) toda la noche a 30°C. Ambos cultivos fueron centrifugados separadamente a 1 000 xg/10 minutos y fueron resuspendidos en la mitad del volumen inicial con una solución MgSO₄ 10 mM. Se colocaron 200 µl del fago cooperador R-408 y se incubaron a 37°C, 15 minutos. Después de esta incubación, se adicionaron 3 ml de caldo NZY y se continuó la incubación por 16 h a 37°C en agitación a 180 xg. Las células aún viables fueron inactivadas por calor a 69°C por 20 minutos y centrifugadas a 1000 xg por 15 minutos. El sobrenadante conteniendo el pBK-CMV escindido fue transferido a otro tubo. En un tubo nuevo conteniendo 200 µl de bacterias *E. coli* XL0LR en MgSO₄ 10 mM, fueron

agregados 100 μ l pBK-CMV escindido y se incubó a 37°C por 15 minutos. Enseguida se adicionaron 3 ml de caldo NZY y se continuó la incubación a 37°C por 45 minutos. Finalmente la bacteria fue sembrada en cajas de agar LB conteniendo 0.05 mg/ml de monosulfato de Kanamicina, únicamente las bacterias transformadas se desarrollaron.

5.8 Extracción del plásmido

Las bacterias transformadas fueron cultivadas en caldo LB con 0.05 mg/ml de kanamicina a 37°C toda la noche con agitación a 185xg. El cultivo en 1.5 ml fue centrifugado a 12000 xg por 5 minutos, se decantó el sobrenadante para sacar la pastilla y esta fue resuspendida en 100 μ l de solución de lisis fría (25 mM de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM de EDTA, 50 mM de glucosa) e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, a esto se le adicionaron 200 μ l de una solución recién elaborada con 0.2M de NaOH y 1% de SDS (dodecil sulfato de sodio), se mezcló e incubó en hielo por 5 minutos, transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 150 μ l de acetato de potasio 3M pH 5, continuándose la incubación por 5 minutos más. Posteriormente se centrifugó a 12000 x g por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio, a este se adicionó RNAsa a una concentración final de 20 μ l/ml. El ADN contenido en el sobrenadante se precipitó con etanol a temperatura ambiente, enseguida se lavó con etanol frío al 70% tres veces y finalmente fue disuelto en TE.

5.9 Digestión del plásmido pBK-CMV

La digestión de los plásmidos recuperados, se sometió a una digestión total con 5 U de la enzima *EcoRI* por una hora a 37°C, para determinar la presencia y tamaño del inserto clonado de *Brucella melitensis*, los fragmentos obtenidos de la digestión fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% con amortiguador TBE. Una vez identificados los insertos se cortaron del gel y se sometieron a electroforesis en un gel nuevo, se verificó que los insertos corrieran libremente y enseguida se hizo una incisión en el gel frente a cada uno de los fragmentos. En esta ranura se colocó una membrana de diálisis para recuperar el ADN con una pipeta de 20 μ l y se almacenó en un microtubo de 1.5 ml a -20°C. Posteriormente se precipitó el ADN de los insertos clonados con un décimo de volumen de acetato de sodio 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló invirtiendo el tubo, se incubó a -70°C por 15 minutos, se centrifugó el tubo a 15000 xg por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, la pastilla se dejó secar y finalmente se disolvió el ADN en solución TE, y se almacenó a -20°C, hasta realizar el marcaje de la sonda.

5.10 Marcaje de la sonda de ADN de *Brucella melitensis*

El ADN cortado del plásmido pBK-CMV se utilizó como sonda a una concentración de 250 ng/ μ l contenido en 20 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM pH 8.0). Este fue desnaturalizado por calentamiento a 100°C por 10 minutos,

transcurrido el tiempo se colocó en hielo, adicionando 5 μ l de dNTP (Mezcla 10x dNTP, 1 mM biotín-14-dCTP, 1 mM dCTP, 2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP en 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM Na₂EDTA) 20 μ l de iniciadores al azar 2.5X (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 12.5 mM MgCl₂, 25 mM 2-mercaptoetanol y 750 μ l/ml oligodeoxirribonucleótido), 3 μ l de agua destilada y finalmente 2 μ l del fragmento Klenow de la polimerasa I (40 unidades/ml de fragmento Klenow en 100 mM de solución de fosfato de potasio pH 7.0, 10 mM 2-mercaptoethanol, 50% de glicerol. La reacción fue incubada a 37°C por 4 h y se detuvo con 5 μ l de solución Na₂EDTA 80.2 mM, pH 7.5 (sistema Bioprime).

El ADN marcado fue adicionado a 10 ml de solución de hibridación (10x SSC NaCl 1.5 M, Citrato de sodio 150 mM, SDS 0.5%, 20 μ l de ADN de espermatozoos de Salmón (10 mg/ml) y 50% de formamida) y almacenado a -20°C hasta su uso.

5.11 Hibridación tipo Southern blot

Los fragmentos del ADN genómico, fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% realizando el corrimiento a 70 V por 2 h (geles de 12 cm) en amortiguador TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 2 mM) (Sambrook, *et. al.*, 1989). El gel se sumergió en 20 volúmenes de HCl 0.25 N por 10 minutos, posteriormente fue enjuagado con agua desionizada para ser sumergido en 20 volúmenes de solución de desnaturalización (1.5 M de NaCl, 0.5 M de NaOH) por 20 minutos a temperatura ambiente, enseguida se sumergió en 20 volúmenes de

solución neutralizante (1 M de Tris pH 7.5, NaCl 1.5 M) por 20 min. El ADN del gel fue transferido a una membrana de nylon cargada positivamente (Gibco BRL) por capilaridad usando 500 ml de solución SSC 10x y toallas de papel, durante 12 h. Una vez completa la transferencia la membrana fue lavada con solución SSC 2X, para posteriormente fijar el ADN de la membrana con una fuente de luz ultravioleta Crosslinker (Stratalinker 1800/Statagene) a 254 nm con 120,000 microjoules. Las membranas fueron prehibridadas colocándose en una bolsa de hibridación durante 8 h en baño maría a 42°C, con agitación (1xg) con solución de prehibridación (SSPE 6X NaCl 3 M, NaH₂PO₄ H₂O 0.2 M, Na₂EDTA 0.02 M; pH 7.4, reactivo de Denhardt's Ficoll 0.1%, polivinilpirrolidona 0.1%, albúmina sérica bovina 0.1%, SDS 0.5%, esperma de salmón 100 µg/ml, formamida 50%).

La hibridación de la membrana se efectuó removiendo la solución de prehibridación de la bolsa de hibridación y colocando 100µl/cm² solución de hibridación 1X (Formamida 100%, SSPE 6X, solución de Denhardt's 5X, SDS 1%). Esta solución contenía el ADN de *Brucella melitensis* marcado (sonda génica a una concentración final de 50 ng/ml). La sonda fue desnaturalizada por ebullición durante 10 minutos, inmediatamente se enfrió en agua con hielo antes de ser colocada en la bolsa de hibridación y posteriormente fue incubada en baño María con agitación (1xg) a 42°C durante 16 h.

5.12 Astringencia y detección de la señal de hibridación

Las membranas una vez hibridadas fueron lavadas dos veces por 5 minutos con 5X SSC y 0.5% de SDS a 65°C, posteriormente se lavaron por 30 minutos en 0.1X SSC y 1% de SDS a 50°C, enseguida se lavaron con 2X SSC a temperatura ambiente. Las membranas fueron enjuagadas con TBS-T20 pH 7.5 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, Tween20 0.5%) y bloqueadas con albúmina sérica bovina al 3% en TBS-T20. pH 7.5 durante 1 h a 65°C con agitación. Transcurrido el bloqueo, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente con el reactivo de detección SA-AP (conjugado de Streptoabidina-fosfatasa-alcalina) (Photogene) diluído (1:1000) en TBS-T20. Después las membranas se lavaron en dos ocasiones en TBS-T20 pH 7.5, por 10 minutos la primera ocasión y por 1 h la segunda, por último se realizó un lavado con solución de lavado final (100 mM Tris base, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ 6H₂O pH 7.5) durante 1 h. Se adicionó el reactivo de detección sobre la membrana dentro de un folder de revelado, incubándolas a 37°C por 1h en completa oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo se permitió la exposición frente a una película radiográfica por 15 minutos y se fueron ajustando los tiempos de exposición según la intensidad de la señal en cada una de las películas radiográficas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se extrajo la placa radiográfica y se procedió a su revelado colocando la placa primero en la solución de revelado (Kodak) durante 5 minutos, después la placa fue sumergida en un tanque con ácido acético al 3% durante 1 minuto, enseguida la placa fue colocada en un tercer tanque conteniendo solución fijadora (Kodak) durante 5 minutos, terminado el proceso de revelado se procedió a eliminar los restos de solución

lavando con agua corriente durante 15 minutos.

5.13 Animales de experimentación

Se utilizaron 45 cabras, previamente evaluadas por serología con la prueba de rosa de Bengala al 3% e intradermorreacción contra *Brucella*. Se trabajo con tres grupos de 15 animales cada uno, el grupo identificado como I negativo serologicamente a *Brucella*, al inicio del trabajo fue vacunado con la cepa vacunal Rev1 de *B. melitensis* (1×10^5 UFC) por vía subcutánea y alojados en las unidades de aislamiento del CENID-Microbiología, a los 120 días de realizada la vacunación se llevó a cabo el desafío con la cepa referencia 16M biotipo 1 de *B. melitensis* (4×10^5 UFC) por vía conjuntival. El grupo II también negativo a las pruebas serológicas iniciales fue aislado en las unidades de aislamiento del CENID-Microbiología y a los 120 días de alojamiento fue desafiado con la cepa de referencia 16M biotipo 1 de *B. melitensis* (4×10^5 UFC) por vía conjuntival. El grupo III; positivo a las pruebas serológicas aplicadas al inicio del trabajo fue sacrificado, inmediatamente. Los animales del grupo I y II fueron sacrificados a los 60 días posteriores al desafío de manera humanitaria (UFAW, 1967)

Tabla 1. Grupos de animales y tratamientos

GRUPOS	TRATAMIENTO PREVIO AL DESAFIO	TRATAMIENTO POSTERIOR A LOS 120 DÍAS DE LA VACUNACIÓN
I	Vacunación con Rev 1 (1×10^5 UFC), por vía subcutánea	Desafío con cepa 16 M de <i>B. melitensis</i> (4×10^5 UFC), vía conjuntival
II	NINGUNO	Desafío experimental con cepa 16 M de <i>B. melitensis</i> (4×10^5 UFC), vía conjuntival
III	Este grupo fue	sacrificado

5.14 Colección de muestras

Se colectaron en bolsas de plástico estériles y en forma aséptica los nódulos linfáticos preescapulares, submaxilares y supramamarios, así como el útero, bazo y glándula mamaria; las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su estudio bacteriológico y molecular.

5.15 Estudio Bacteriológico

Las muestras de nódulos linfáticos y tejidos, fueron fraccionadas, flameadas con alcohol etílico y colocadas en bolsas de plástico estériles, a las que se les adicionaron 20 ml de solución salina fisiológica estéril para facilitar la maceración en un triturador de tejidos (Stomacher 400). De las suspensiones finales se

embebido un hisopo estéril y se sembró en placas de medio sólido selectivo de Farrell con antimicrobianos y suero (Blasco 1990; Farrell, 1974), las placas fueron incubadas a 37°C con 5-10% de CO₂ (Alton *et. al.*, 1988). El sobrante de tejido macerado se conservó en las bolsas selladas a -20 °C.

Las placas fueron revisadas durante tres semanas antes de ser descartadas como negativas, las colonias convexas y de un color blanco azulado fueron consideradas sospechosas.

5.16 Identificación del género *Brucella*

Se realizaron frotis de los cultivos sospechosos tiñéndose por el método de Gram, se observó la morfología cocobacilar o bacilos cortos Gram negativos, posteriormente se realizó la resiembra en placas de agar *Brucella* en estría para verificar la pureza y posteriormente poder practicar las siguientes pruebas bioquímicas (Alton, 1988).

- ◆ Actividad de Ureasa. Los medios con urea fueron preparados en tubos inclinados, inoculados e incubados a 37°C y fueron examinados después de 15 minutos. Las cepas *B. melitensis* dieron reacciones positivas en 1 h.
- ◆ Utilización del citrato. Se preparó una suspensión de la bacteria en agua estéril, inoculando el medio de citrato con una asa recta e incubándose a 37°C, y fue examinada diariamente por 7 días para confirmar crecimiento y cambio de color del medio.

- ◆ **Actividad de la oxidasa.** Se colocaron de 2 a 3 gotas de una solución de dihidrocloruro de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% en papel filtro, sin dejar que el reactivo se secase. Se separó el microorganismo de prueba con una varilla de vidrio del medio para extenderse en el papel impregnado. Una reacción positiva se observó por el desarrollo dentro de 10 segundos de un color púrpura oscuro.
- ◆ **Producción de ácido sulfhídrico (H₂S).** Los cultivos se inocularon en medio inclinado de agar soya tripticasa y colocándose una tira de papel impregnada con una solución de acetato de plomo al 10%, en la boca del tubo, cuidando de no entrar en contacto con el medio e incubándose a 37°C durante tres días. El oscurecimiento del papel indicó producción de H₂S. Un ligero ennegrecimiento de la tira durante los primeros días no fue considerado positivo.

5.17 Crecimiento en presencia de colorantes

Se usó agar tripticasa soya que contenía colorantes fucsina básica al 0.1% y teniendo una concentración final entre 10 µg/ml de medio (la concentración exacta requerida para obtener resultados satisfactorios fue determinada para cada lote del medio usando cepas de referencia de *Brucella*).

Las placas fueron divididas en cuatro cuadrantes y una gota de cultivo fue aplicada en cada cuadrante y estriada cinco veces. Las placas fueron incubadas a 37°C durante cuatro días. Solo el crecimiento en tres o más estrías fue

considerado resistencia al colorante (Payeur *et. al.*, 1993).

5.18 Serotipificación de *Brucella*

Las bacterias fueron aglutinadas por antisueros monoespecíficos de *B. abortus* y *B. melitensis*. En un portaobjetos se colocó una gota de la dilución del suero a cada una de ellas se adicionó una gota de la suspensión bacteriana mezclándose con el asa bacteriológica. Se observó si había aglutinación en un lapso de un minuto utilizando testigos de *B. melitensis* biotipo 1. Para lograr diferenciar entre los distintos biotipos se ocuparon los anti-sueros A, M y R (donde A es un suero monoespecífico contra *B. abortus*, M es un suero monoespecífico contra *B. melitensis*, R es un suero anti-brucelas rugosas).

5.19 Resistencia a colorantes y antibióticos

En general las colonias de la cepa Rev1 de *B. melitensis* alcanzan un diámetro máximo de 1-2 mm a los cuatro días de cultivo a 37°C, es decir son más pequeñas que las de otras cepas de *B. melitensis* cultivadas en las mismas condiciones. La tironina al 1:50 000 y la fucsina básica al 1:50 000 inhiben el desarrollo de la cepa Rev1 en atmósfera ordinaria. La presencia de colorantes en el medio tiende a inhibir la proliferación de la cepa *B. melitensis* cepa Rev1 más que la de las demás cepas de *B. melitensis*, pero esta diferencia resulta menos aparente si las placas se incuban en una atmósfera enriquecida con un 10% de

bióxido de carbono (Alton *et. al.*, 1988; Payeur *et.al.*, 1993).

La cepa Rev1 de *B. melitensis* no crece si se le añade al agar 5 UI de penicilina por ml, sin embargo esta concentración no inhibe desarrollo de otras cepas de *B. melitensis*; similarmente, la Rev1 prolifera en agar con 2.5 µg/ml de estreptomycin, pero esta concentración inhibe otras cepas de *B. melitensis* (Alton *et. al.*, 1988; Payeur *et.al.*, 1993).

5.20 Fagotipificación de cepas

Para el género *Brucella* se han descrito varios bacteriófagos (fagos) activos los cuales no lisan a otros géneros de bacterias por lo que son de valor taxonómico para la identificación del género y especie. Pero además el uso simultaneo de fagos como Tb, Wb, 12 y R/C, sirven para diferenciar cepas de *B. melitensis* de campo de las cepas vacunales (Alton *et. al.*, 1988; Morris *et. al.*, 1973). Por lo que se realizaron las pruebas empleando dos concentraciones: la dilución habitual de la prueba (DHP) y una más concentrada (10000 x DHP). Se utilizo el agar soya tripticasa para esta prueba. Se ocupo la cepa de referencia *B. abortus* cepa 19, como cepa huésped para el cultivo de fagos (Alton *et. al.*, 1988).

5.21 Cepas de aislamiento de campo donadas por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE)

Las cepas *B. melitensis* biotipo 1, aisladas (Feto de Puebla y Feto de Querétaro) y las cepas donadas por el INDRE (234, 244, 551, 553, 562, 565, 647, 658, 659, 660 y 696), fueron conservadas y manejadas de igual forma que las cepas con las que se realizó el estudio preliminar, de igual manera estas cepas fueron sometidas tanto al estudio bacteriológico como a la identificación bioquímica con la finalidad de comprobar el biotipo de dichas cepas.

6. RESULTADOS

6.1 Extracción de ADN

El ADN fue extraído a partir de las cepas originales (Rev1 PRONABIVE, Rev1 INRA y 16M); posteriormente se trabajaron las cepas aisladas (Feto de Puebla, feto de Querétaro y 133) y las cepas donadas por el INDRE (234, 244, 551, 553, 562, 565, 647, 658, 659, 660 y 696).

El ADN de todas las cepas extraído por el método de fenol/cloroformo fue evaluado en gel de agarosa al 0.7%, observando una sola banda superior a los 23.13 Kb comparado con el marcador λ *Hind*III verificando su integridad como ADN total (Figura 1) libre de proteínas.

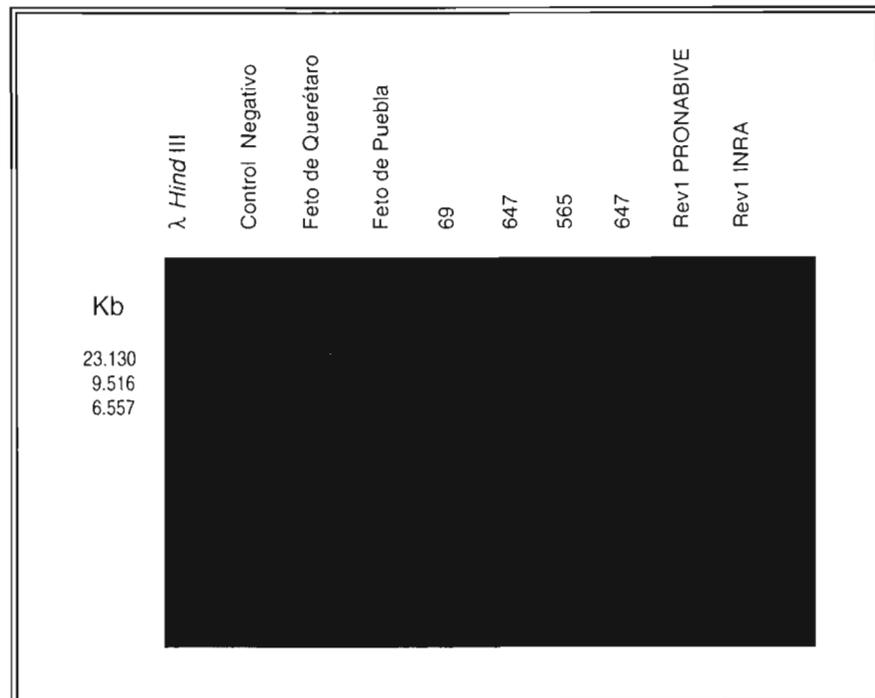


FIGURA 1. Gel de agarosa al 0.7% en el que se muestra el ADN total de algunas de las cepas de *B. melitensis*.

En el primer carril se observa el marcador de peso molecular, en el segundo carril control negativo agua, del tercer carril al sexto cepas de campo y en los carriles séptimo y octavo se encuentran las cepas

6.2 Sondas de *B. melitensis*

Quince clonas conteniendo un fragmento de ADN recombinante de *Brucella melitensis* fueron seleccionadas a partir de la biblioteca genómica construida en lambda ZAP II a partir de la cepa de aislamiento de campo 133. Se realizó la escisión *in vivo* para obtener el plásmido pBK-CMV, posteriormente el fragmento recombinante fue liberado con la enzima de restricción *EcoRI* y evaluado en gel de agarosa al 1%. Se obtuvieron cuatro sondas de ADN de 3.75, 2.10, 4.42 y 4.38 kb a partir de dos clones que contenían dos fragmentos cada uno después de la digestión con *EcoRI*. Estos fragmentos fueron purificados y marcados por separado con biotina para utilizarlos como sondas (Figuras 2 y 3).

Los fragmentos marcados fueron probados directamente en Dot blot para comprobar que se encontraban biotinilados y tenían la capacidad de reconocer a ADN de *Brucella*. Las cuatro sondas a partir de las clonas fueron capaces de identificar ADN de *Brucella*.

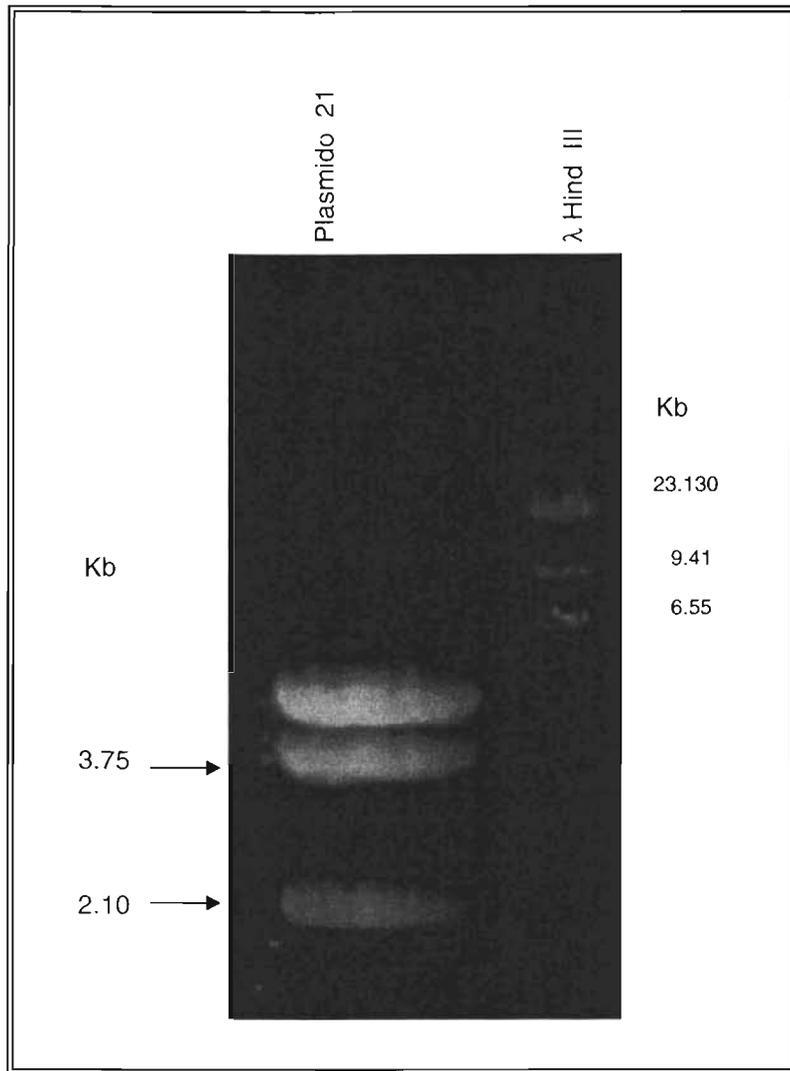


FIGURA 2 Análisis de restricción del plásmido Pbk-CMV 21 digerido con la enzima *EcoR* I
 Segmentos del plásmido Pbk-CMV 21 de 4.36 Kb (21.1) y 2.32 Kb (21.2) que se utilizaron como sondas

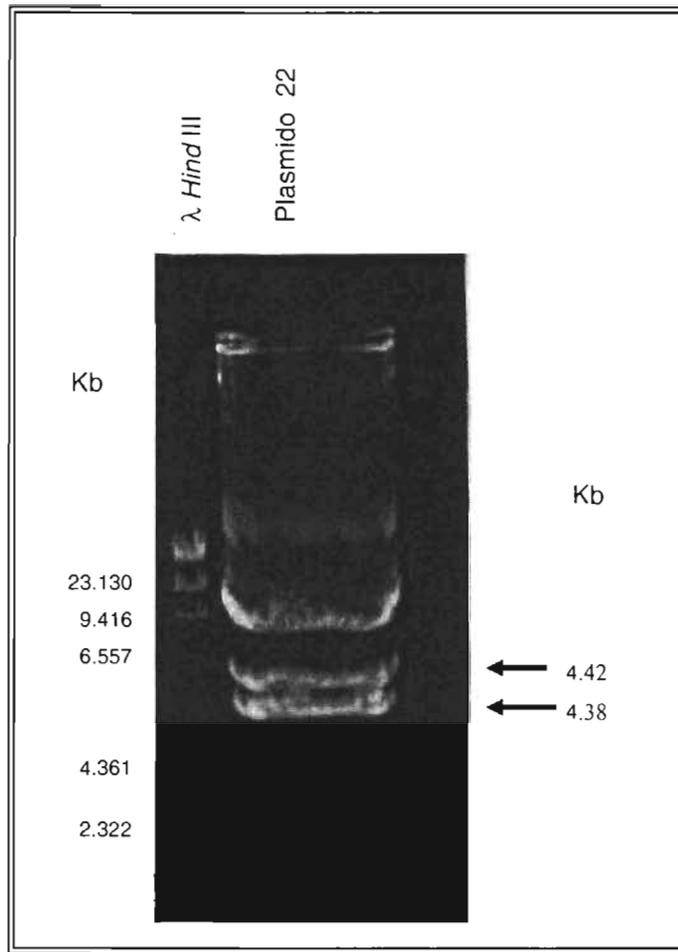


FIGURA 3. Análisis de restricción del plásmido Pbk-CMV 22 digerido con la enzima *EcoR* I
 Segmentos del plásmido Pbk-CMV de 4.42 Kb (22.1) y 4.38 Kb (22.2) que se utilizaron como sondas

6.3 Bacteriología

Se realizó la siembra de las muestras, marcándose las colonias circulares y convexas, estas se evaluaron por tinción de Gram, resultando ser bacterias cocobacilares, Gram negativas. Posterior a su aislamiento el cultivo puro fue sometido a las técnicas de identificación y tipificación antes descritas. Se logró aislar *Brucella melitensis* de por menos uno de los órganos de cada animal de experimentación de los grupos II y III, sin embargo en el grupo I no fue posible recuperar a la bacteria, los resultados se resumen en la tabla 1. Del grupo III se aisló la cepa identificada como *B. melitensis* biotipo 1, 133 con la que se trabajó desde el inicio de este trabajo ya que este grupo una vez que fue reconocido como positivo a las pruebas de intradermo reacción fue sacrificado. En tanto que el grupo II se logró el aislamiento de la cepa de desafío *B. melitensis* 16M biotipo 1.

Tabla 2. Número de aislamientos de los distintos órganos por grupo.

GRUPOS	PRESCAPULAR	SUBMAXILAR	SUPRAMAMARIO	ÚTERO	BAZO	GLANDULA MAMÁRIA
I Negativo a <i>Brucella</i> <i>sp.</i> , vacunado y desafiado	0	0	0	0	0	0
II Negativo a <i>Brucella</i> <i>sp.</i> , y desafiado	3	12	3	0	6	3
III Positivo a <i>Brucella</i> <i>sp.</i>	13	15	13	8	13	10

6.4 Análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción

Se utilizó la sonda 21.1 para hibridar el ADN de las cepas 133 y Rev1 INRA digeridas con *Sau3AI* y *EcoRI* por 45 minutos. La sonda 21.1 hibridó con fragmentos de 23.13 kb, 10 kb, 4.30 kb y 2.28 kb de ADN de la cepa 133 digerida con *EcoRI*; en contraste, la sonda 21.1 sólo hibridó a una banda de ADN de 23.13 kb de la cepa Rev1 INRA digerida con *EcoRI*. Por otra parte, la sonda 21.1 hibridó el ADN de la 133 digerida con *Sau3AI*, presentó un fragmento de 0.56 kb, mientras que la cepa Rev1 INRA digerida con *Sau3AI* hibridó a dos fragmentos: uno de 23.13 kb y de 0.56 kb (Figura 4).

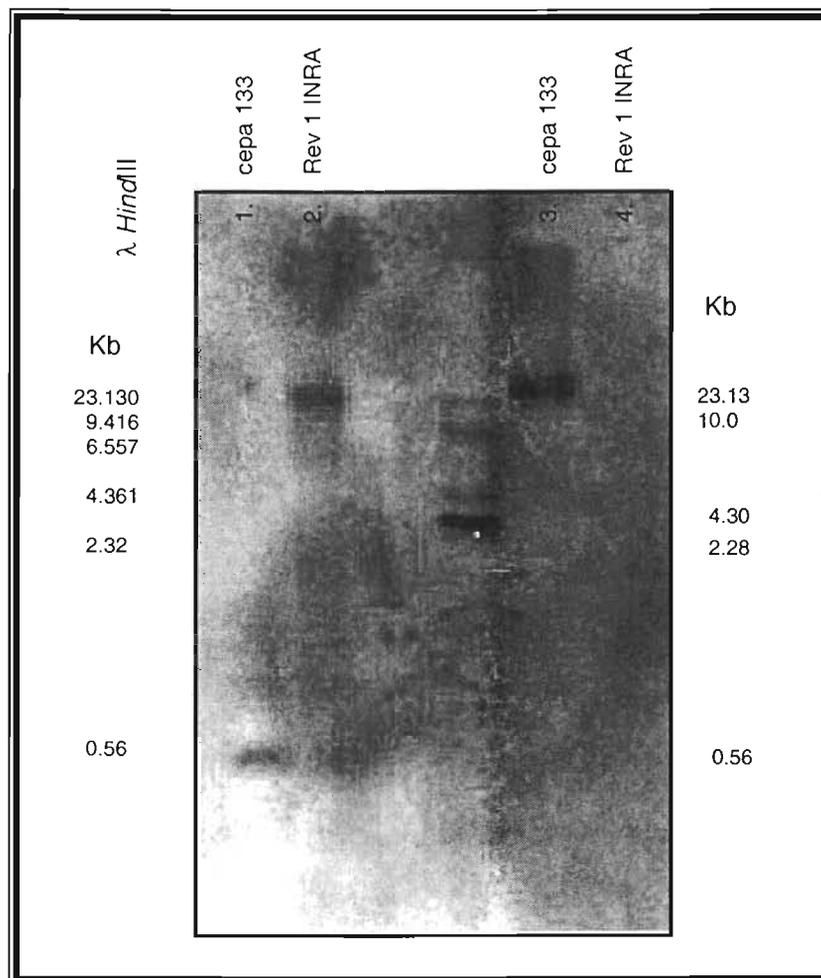


Figura 4 RFLP del ADN de las cepas de *Brucella*, digerido con las enzimas *Sau3A1* y *EcoRI* hibridado con la sonda 21.1.

En esta figura se logra observar las diferencias que existen entre la cepa vacunal de campo 133 y la cepa vacunal Rev1 INRA de *B. melitensis* al ser digeridas con la enzima *Sau3A1* (carril 1 y2), en tanto que en los carriles 3 y 4 se observan las diferencias de la cepa de campo 133 con respecto a la cepa vacunal Rev1 INRA *B. melitensis*, al ser digeridas con la enzima *EcoRI*.

Se utilizó la sonda 22 en un experimento preliminar, consistente de los fragmentos 22.1 y 22.2, para hibridar el ADN de las cepas 133 y Rev1 INRA digeridas con *Sau3AI* y *EcoRI* por 45 minutos. La sonda 22 hibridó el ADN de la cepa de campo 133 digerida con *EcoRI* con los fragmentos 23.13 kb, 9.41 kb, 2.72 y 2.66 kb, mientras que la cepa Rev1 INRA digerida con *EcoRI* la sonda 22 hibridó con una banda de 2.66 kb. La sonda 22 hibridó con una banda de 23.13 kb del ADN sin digerir de ambas cepas y la misma sonda hibridó el ADN con las cepas 133 y Rev1 INRA digeridas con la enzima *Sau3AI* con un fragmento de 0.50 kb (Figura 5).

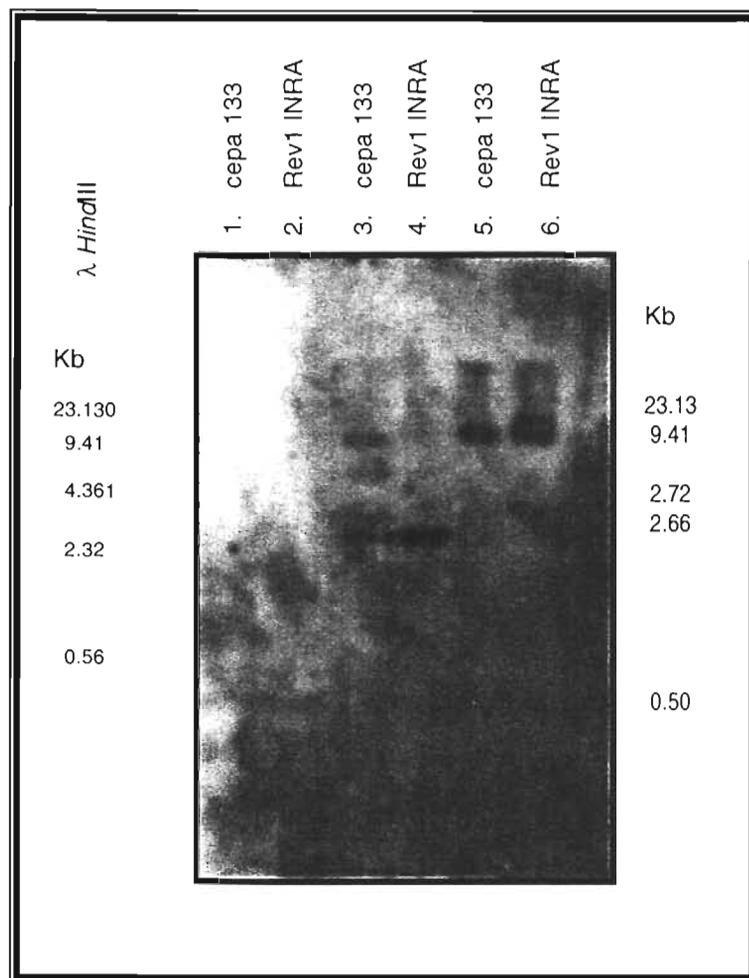


Figura 5 Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de las cepas de *Brucella melitensis*, 133 y Rev1 INRA digerido con las enzimas, *Sau3AI* y *EcoRI* e hibridado con la sonda 22 (combinando los fragmentos 22.1 y 22.2).

Se observan en los carriles 1 y 2 un fragmento para el ADN digerido con la enzima *Sau3AI*, mientras que en los carriles 3 y 4 se observan las diferencias entre la cepa de campo 133 y la cepa vacunal Rev1 INRA al ser digeridas con *EcoRI*. Al colocar el ADN sin digerir (carriles 5 y 6) hibridan a una sola banda de 23.13 Kb.

Se realizó la hibridación de las sondas 21.1, 21.2, 22.1 y 22.2 por separado al ADN de todas las cepas después de digerir con *EcoRI* por 12 horas a 37°C.

La sonda 21.1 permite la diferenciación la cepa vacunal Rev1 PRONABIVE de las cepas de campo, excepto la cepa551 y la obtenida a partir del feto de Puebla, que presentan en mismo patrón que dicha cepa vacunal (Tabla 3, Figura 6).

Tabla 3. ANALISIS DE HIBRIDACION CON LA SONDA 21.1

CEPAS DIGERIDAS CON <i>EcoRI</i>	Kilo bases
Rev1 PRONABIVE	2.7, 1.4
Rev1 INRA	1.4
16M	1.4
133	1.4
244	1.4
551	2.7, 1.4
553	1.4
562	1.4
658	1.4
Feto de Puebla	2.7, 1.4

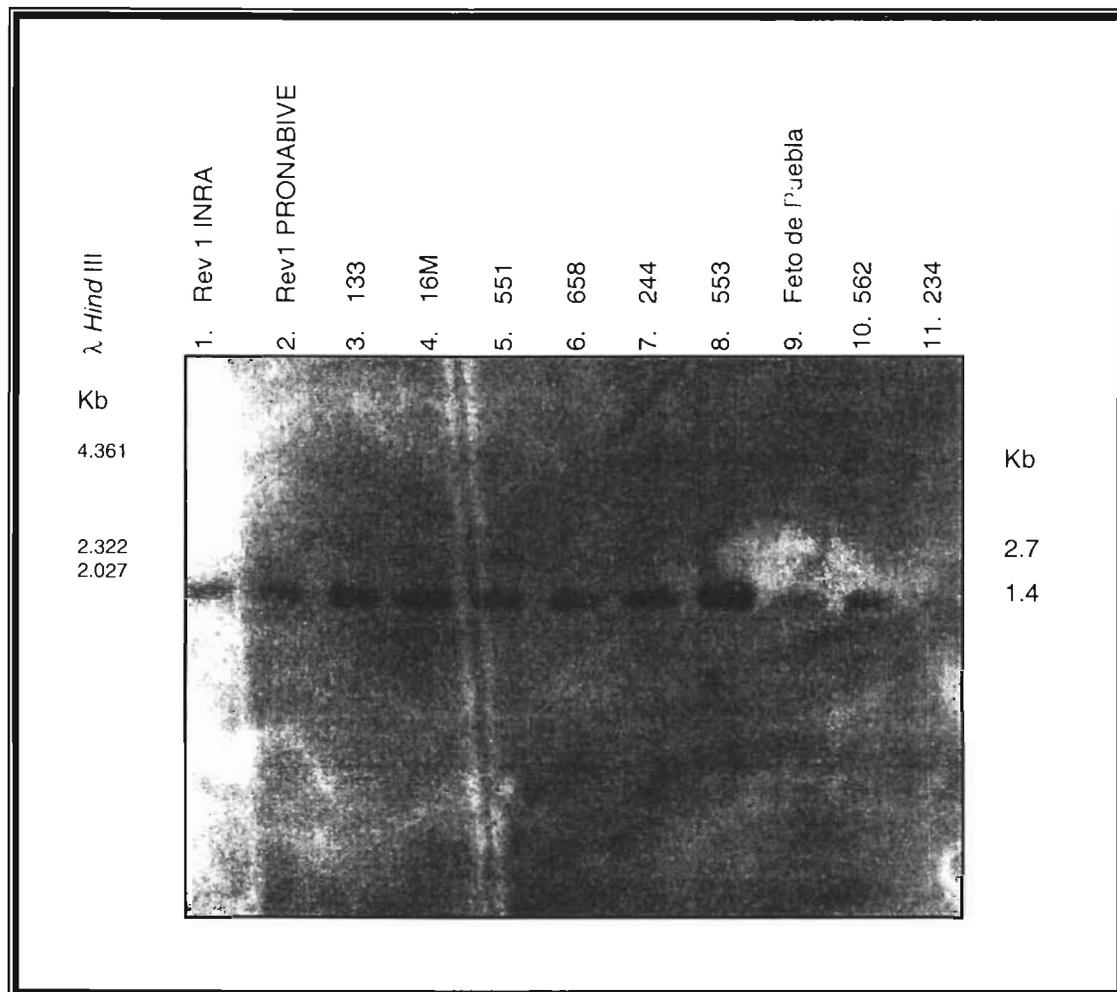


Figura 6 Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de diferentes cepas de *Brucella melitensis*, tanto de aislamiento de campo como de cepas vacunales digerido con la enzima, *EcoRI* e hibridado con la sonda 21.1.

Se observan las diferencias de la cepa vacunal Rev1 PRONABIVE (carril 2) con respecto a las cepas de campo y la cepa vacunal Rev1 INRA, a excepción de las cepas 551 (carril 5) y la obtenida a partir del feto de Puebla (carril 9); las cuales presentan un patrón similar entre ellas, al de la cepa vacunal Rev1 PRONABIVE.

La sonda 21.2 no permite la diferenciación de cepas vacunales de la mayoría de las cepas de campo, sin embargo dos cepas de campo: la 696 y la obtenida a partir del feto de Querétaro, sí mostraron un perfil diferente (Tabla 4; Figura 7).

Tabla 4. ANALISIS DE HIBRIDACION CON LA SONDA 21.2

CEPAS DIGERIDAS CON EcoRI	Kilo bases
Rev1 PRONABIVE	1.87
Rev1 INRA	1.87
16M	1.87
133	1.87
565	No hibridó
647	1.87
658	1.87
659	1.87
660	1.87
696	2.32, 1.87
Feto de Querétaro	5.5, 3.47,2.32,1.87

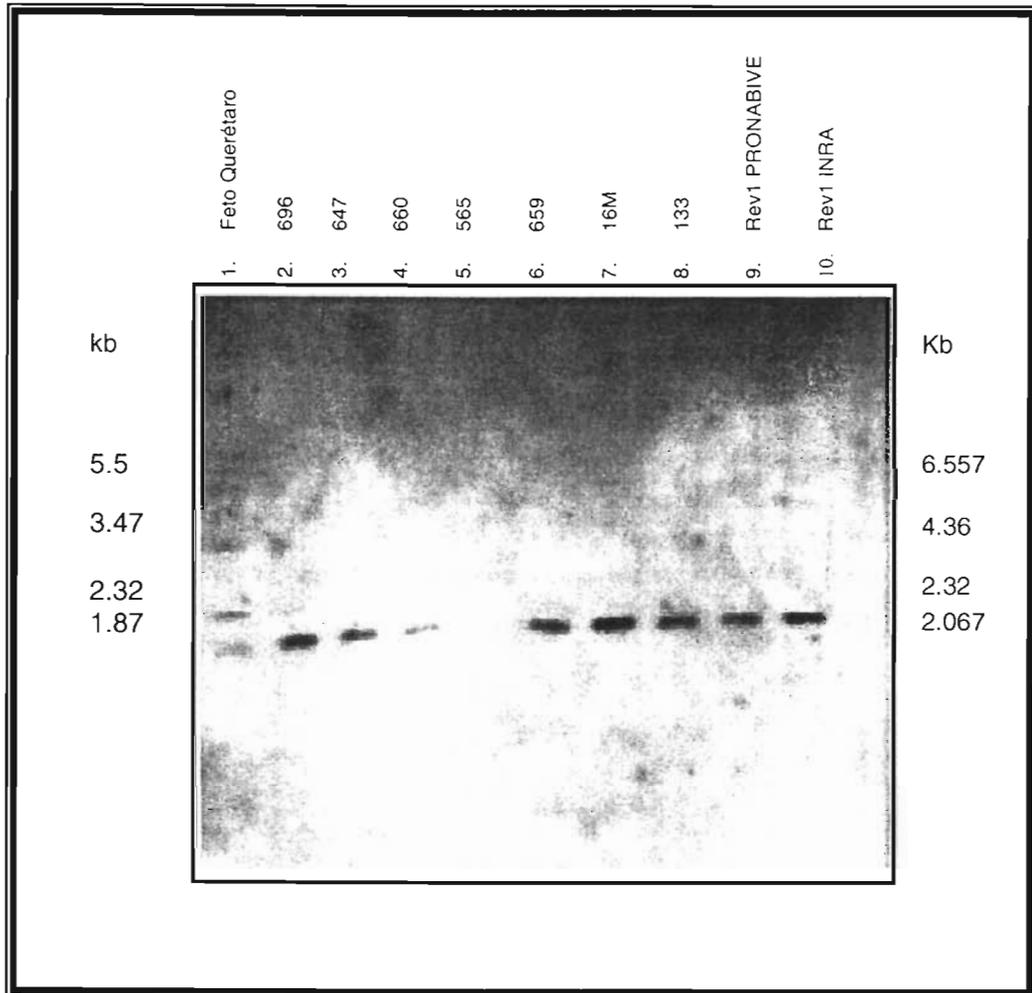


Figura 7 Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de diferentes cepas de *Brucella melitensis*, tanto de aislamiento de campo como cepas vacunales digerido con la enzima, *EcoRI* e hibridado con la sonda 21.2.

Se observa como todas las cepas hibridan con un fragmento de 1.87 Kb en tanto que las cepas de aislamiento de campo 696 (carril 9) presenta un fragmento extra de 2.32 Kb. La cepa de aislamiento de campo nombrada feto de Querétaro (carril 10) presenta un total de cuatro fragmentos.

La sonda 22.1 solo permite la diferenciación de las cepas vacunales de seis de las cepas de aislamiento de campo: 234, 551, 553, 658, 696, feto de Querétaro; el resto mostraron el mismo perfil que las vacunales (Tabla 5; Figuras 8 y 8a).

Tabla 5. ANALISIS DE HIBRIDACION CON LA SONDA 22.1

CEPAS DIGERIDAS CON <i>EcoRI</i>	Kilo bases
Rev1 PRONABIVE	2
Rev1 INRA	2
16M	2
133	2
234	2, 3.7
244	2
551	2, 2.40, 3.7
553	2, 3.70
562	No hibridó
565	2
647	2.1
658	2, 3.7
659	2.1
660	2.1
696	2.1, 3.78
Feto de Puebla	2
Feto de Querétaro	2.1, 3.78, 4.38, 4.63, 5.91

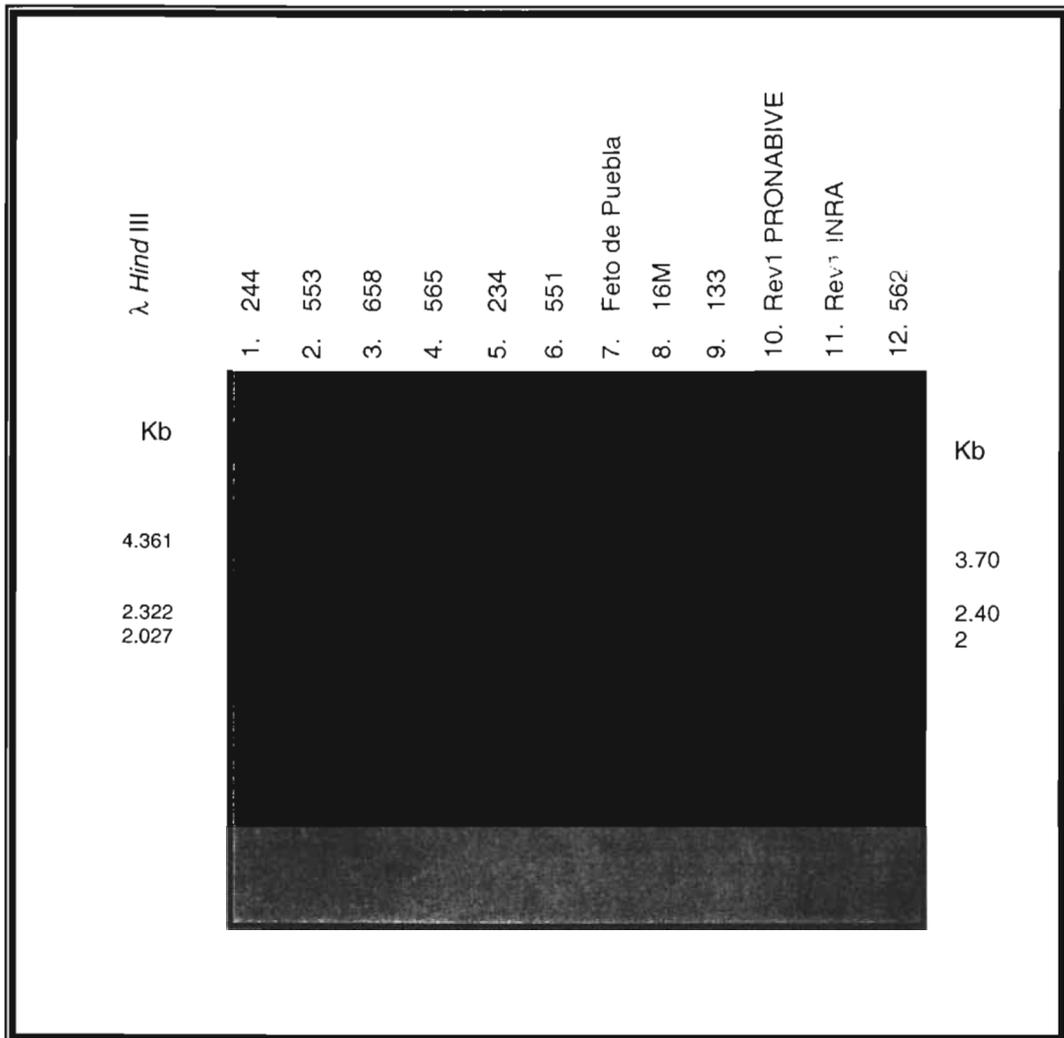


Figura 8 Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de diferentes cepas de *Brucella melitensis*, tanto de aislamiento de campo como cepas vacunales digerido con la enzima *EcoRI* e hibridado con la sonda 22.1.

Se observa como todas las cepas hibridan con un fragmento de 2.0 Kb; sin embargo la cepa 551 (carril 6) presenta un patrón totalmente diferente al resto de las cepas ya que tiene un total de tres fragmentos. También se pueden observar las cepas 658 y 234 (carriles 3 y 5) que presentan un patrón con dos fragmentos los cuales las hacen distintas de las demás cepas probadas.

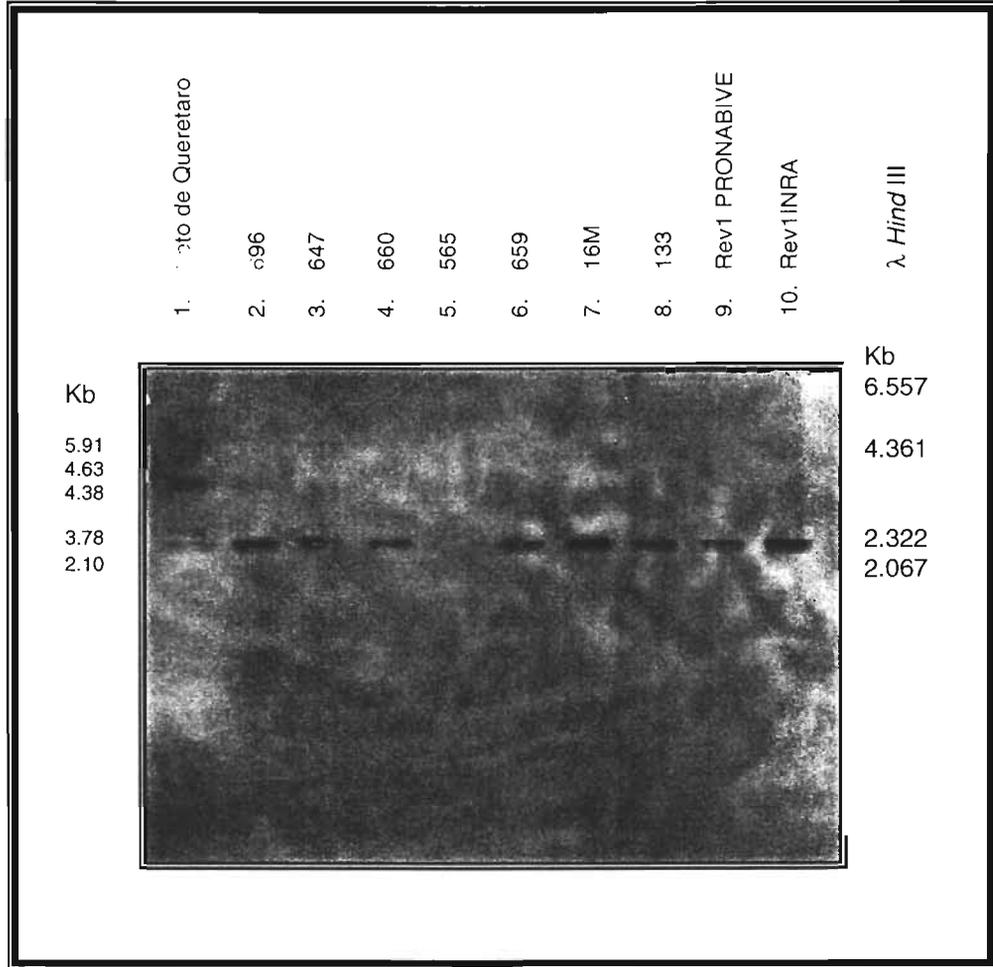


Figura 8a Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de diferentes cepas de *Brucella melitensis*, tanto de aislamiento de campo como cepas vacunales digerido con la enzima, *EcoRI* e hibridado con la sonda 22.1.

Se observa como todas las cepas hibridan con un fragmento de 2.10 Kb; sin embargo en el caso de la cepa de aislamiento de campo Feto de Querétaro (carril 1) hibrida un total de cinco fragmentos, patrón que la diferencia de las demás.

La sonda 22.2 se comporto de manera similar a la sonda 22.1, en este experimento se lograron diferenciar de las cepas vacunales las cepas de aislamiento de campo nombradas como: 551, 565, 658, 696, feto de Puebla y feto de Querétaro (Tabla 6; Figura 9 y 9a)

Tabla 6. ANALISIS DE HIBRIDACION CON LA SONDA 22.2

CEPAS DIGERIDAS CON EcoRI	Kilo bases
Rev1 PRONABIVE	2
Rev 1 INRA	2
16M	2
133	2
234	2
244	2
551	2, 2.40, 3.70
553	2
562	No hibridó
565	2, 2.4
647	2.1
658	2, 2.4
659	2
660	2
696	2.1, 3.78
Feto de Puebla	2, 2.4, 3.7
Feto de Querétaro	2.1, 3.78, 4.63, 4.38, 5.91

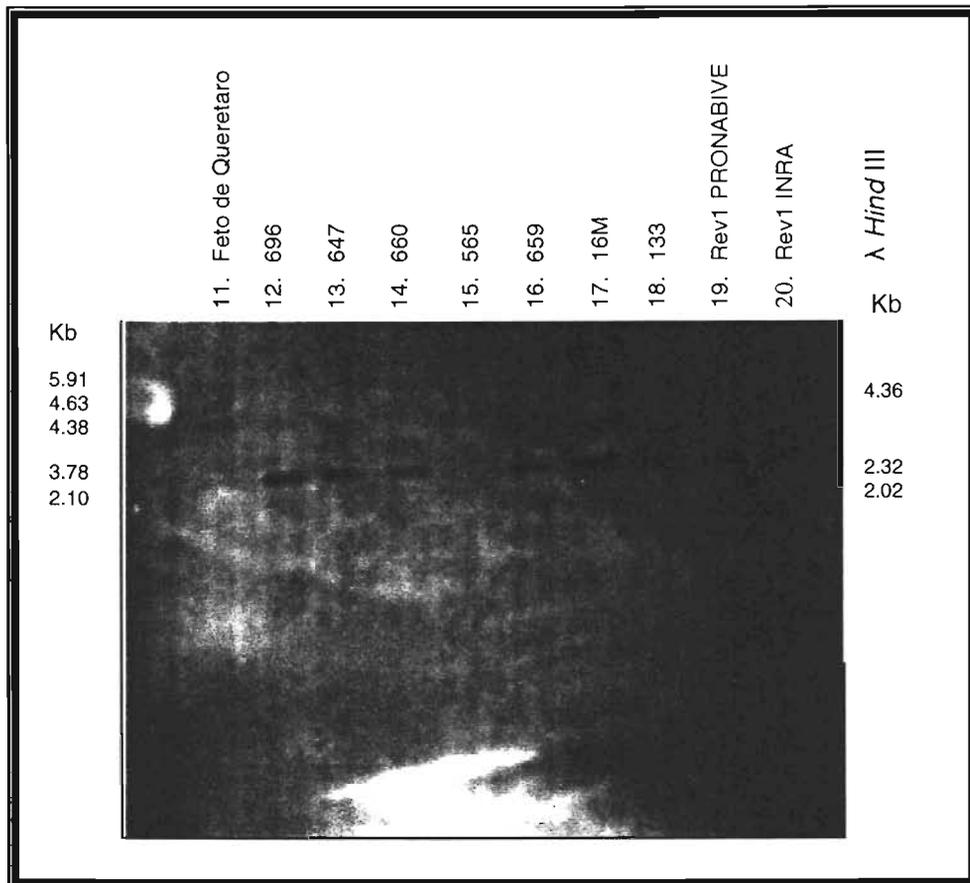


Figura 9 Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de diferentes cepas de *Brucella melitensis*, tanto de aislamiento de campo como cepas vacunales digerido con la enzima, *EcoRI* e hibridado con la sonda 22.2.

Se observa como todas las cepas hibridan con un fragmento de 2.10 Kb; aunque durante este experimento la cepa 565 (carril 5) no presenta hibridación. Sin embargo la cepa de aislamiento de campo Feto de Querétaro (carril 1) hibrida un total de cinco fragmentos, patrón que la diferencia de las demás cepas, la cepa 696 (carril 2) hibrida con dos fragmentos lo cual la hace distinta también a todas las cepas probadas en este experimento

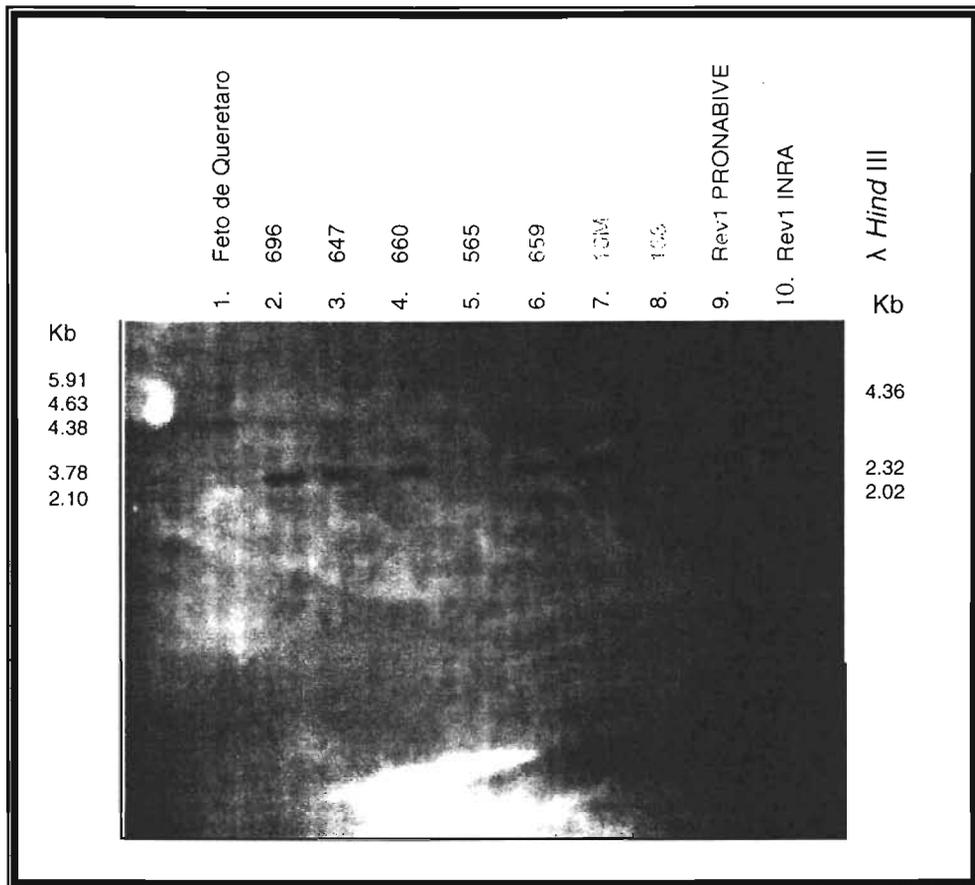


Figura 9a Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) del ADN de diferentes cepas de *Brucella melitensis*, tanto de aislamiento de campo como cepas vacunales digerido con la enzima, *EcoRI* e hibridado con la sonda 22.2.

Se observa como todas las cepas hibridan con un fragmento de 2.10 Kb; aunque durante este experimento la cepa 565 (carril 5) no presenta hibridación. Sin embargo la cepa de aislamiento de campo Feto de Querétaro (carril 1) hibrida un total de cinco fragmentos, patrón que la diferencia de las demás cepas, la cepa 696 (carril 2) hibrida con dos fragmentos lo cual la hace distinta también a todas las cepas probadas en este experimento

7. DISCUSION Y CONCLUSIONES

7.1 Extracción de ADN

El método más usado para la extracción de ADN de suspensiones celulares y muestras con *Brucella spp* ha sido el fenol-cloroformo (Baily *et. al.*, 1992.; Bricker and Halling, 1994; Fekete *et. el.*, 1992; Leal *et. al.*, 1995.) por lo que para este trabajo fue el método que se utilizó, obteniendo buenos resultados. Fue necesario implementar la utilización de botellas Roux y agar *Brucella* para obtener mayor cantidad y calidad de ADN. La integridad del ADN de las cepas fue evaluada en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio observados bajo luz ultravioleta, para asegurar que los fragmentos reconocidos por las sondas fueran producto de las digestiones y no del deterioro del ADN.

7.2 Bacterología

La vacunación realizada por vía subcutánea con la vacuna Rev1 de *Brucella melitensis* produce una fuerte y persistente respuesta serológica con la multiplicación del microorganismo (Zundel, *et. al.* 1992; Mandsen, 1993). Sin embargo, en este trabajo no se aisló la cepa vacunal. Mientras que la cepa de desafío fue aislada de varios órganos, no obstante que el desafío de los animales se realizó en el momento en que existe mayor respuesta inmunológica. En ninguno de los animales estudiados se obtuvo un 100% de aislamientos para cada uno de los tejidos, los nódulos submaxilares fueron los que presentaron mayor

frecuencia de aislamientos de *Brucella sp.* debido a que estos nódulos son los más cercanos al sitio de inoculación (vía conjuntival). Para lograr un mayor número de aislamientos se puede considerar la utilización de dos medios de cultivo distintos al mismo tiempo, tal y como lo sugiere Marin-CM, et al. (1996) en un estudio similar logra aumentar significativamente el número de aislamientos. También se han implementado sistemas automatizados en hemocultivo aunque esto se ha hecho con humanos podría intentarse en animales por ejemplo siendo estos metodos más eficientes que el método clásico de Castañeda ya que se logra recuperar al microorganismo incluso durante la primera semana de incubación aún en casos sin sospecha clínica (Ariza, 2005).

7.3 Análisis de restricción e hibridación

El análisis de restricción ha sido utilizado para la diferenciación de cepas de *Brucella sp.*, con enzimas como *EcoRI* y *HindIII* sin embargo con este tipo de estudio no se ha podido concluir la existencia de diferencias contundentes en el ADN de *Brucella*, por esto es que en el estudio realizado por Shrikrishna *et. al.* (2001), sugieren la utilización de sondas genéticas para poder evidenciar las diferencias observadas por ellos, con las enzimas antes mencionadas.

La utilización de técnicas moleculares basadas en la detección de ácidos nucleicos por medio de sondas, ha permitido una mejor identificación y clasificación taxonómica de diferentes géneros así como establecer con mayor

certidumbre relaciones filogenéticas entre los géneros y especies de bacterias (Collins *et. al.*, 1989; Greissen *et. al.*, 1994).

Las sondas de ADN se han utilizado para el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción permitiendo distinguir entre especies dentro del género *Brucella*, así como para reconocer relaciones filogenéticas (Grimont, 1992; Gandara, 2001).

Las seis especies principales reconocidas en *Brucella* sp, estudiadas por hibridación ADN-ADN revelan una muy limitada diversidad genética dentro del género, lo que hace difícil su diferenciación (Gandara, *et. al.* 2001). Sin embargo sondas de genes específicos han sido usadas para identificar los subtipos de algunas especies de *Brucella* ya que el uso de sondas de oligonucleótidos específicos de especie son una alternativa para identificar las diferencias que pueden ser incluso parte de una adaptación de dichas bacterias al medio ya que como lo describe Moreno (1998) las bacterias del grupo α aunque no poseen plásmidos presentan plasticidad fenotípica, logrando adaptarse a ambientes diversos, dichas adaptaciones deben encontrarse en su ADN.

Las sondas utilizadas en este estudio se obtuvieron a partir de una biblioteca genómica por selección al azar. No se utilizaron sueros hiperinmunes para el tamizado de la biblioteca genómica ya que este procedimiento habría permitido la selección de clonas recombinantes con secuencias que codifican para antígenos inmunodominantes que podrían estar presentes tanto en cepas vacunales como de campo.

En los experimentos preliminares se encontraron diferencias entre las

cepas Rev1 INRA y la 133 digeridas con la enzima *EcoRI* al hibridarlas con la sonda 21.1. La sonda hibridó con los fragmentos de 23.13 kb, 10 kb, 7 kb y 2.32 kb de la cepa 133; mientras que en la cepa Rev1 INRA solo hibridó con un fragmento de 23.13 kb. Por otra parte, esta misma sonda al hibridar con ambas cepas digeridas con *Sau3AI* mostró un fragmento de 0.56 kb en el caso de la cepa 133, y dos fragmentos de 23.13 kb y 0.56 kb en el caso de la cepa Rev1 INRA (Figura 4).

La sonda 22, que incluye las sondas 22.1 y 22.2, hibridó a los fragmentos 23.13 kb, 6.55 kb y 2.66 kb de ADN de la cepa 133 digerida con *EcoRI*, mientras que solo hibridó con un fragmento de 2.66 kb de la cepa Rev1 INRA. No se observó hibridación cuando las cepas 133 y Rev1 INRA fueron digeridas con la enzima *Sau3AI*. La sonda 22 hibridó con un fragmento de 27.66 kb de ADN sin digerir de ambas cepas. Es importante destacar que las digestiones observadas fueron uniformes en ambas cepas con las dos enzimas utilizadas (Figura 5).

Se observaron diferencias en los perfiles de hibridación cuando se utilizó la sonda 21.1 para hibridar a ADN de las cepas de campo y vacunales digeridas con *EcoRI* por 12 hrs. La sonda hibridó a los fragmentos de 2.7 y 1.4 kb de las cepas 551 y feto de Puebla y cepa vacunal Rev1 PRONABIVE; sin embargo solo hibridó a un fragmento de 1.4 kb de las demás cepas de campo y la Rev1 INRA. Esto permite la diferenciación de cepas vacunales de las de campo excepto con la 551 y la del feto de Puebla. La cepa 133 no mostró los cuatro fragmentos observados en digestiones de 45 minutos posiblemente debido a la digestión total en 12 hrs (Tabla 3, Figura 6).

Se observaron diferencias en los perfiles de hibridación cuando se utilizó la sonda 21.2 para hibridar a ADN de las cepas de campo y vacunales digeridas con *EcoRI* por 12 hrs. La sonda hibridó con todas las cepas con un fragmento de 1.87 kb, aparentemente, este fragmento muestra la conservación de sus sitios de restricción *EcoR1* en todas las cepas. Dos cepas mostraron perfiles de hibridación diferentes, la 696 muestra los fragmentos de 1.87 y 2.32 kb y la cepa “feto de Querétaro” los fragmentos de 1.87, 2.32, 3.47 y 5.5 kb. Estos perfiles no permiten la diferenciación de las cepas vacunales de las cepas de campo (Tabla 4, Figura 7).

Se encontraron diferencias en los perfiles de hibridación utilizando la sonda 22.1 para hibridar ADN de las cepas de campo y vacunales digeridas con *EcoRI* por 12 hrs. La sonda hibridó con un fragmento de 2 ó 2.1 Kb presente en todas las cepas pero único en las cepas de campo 133, 647, 659, 660, 16M, “feto de Puebla”, 565, 244, y las cepas vacunales. Sin embargo, en el caso de la cepa “feto de Querétaro”, hibridó con cinco fragmentos de 2.1, 3.78, 4.38, 4.63 y 5.91 kb; en las cepas 658 y 234, con dos fragmentos de 2 kb, y 3.7 kb; en la cepa 696 con dos fragmentos de 2.1 kb y 3.78 kb; la cepa 551 hibridó con tres fragmentos 2, 2.4 y 3.7 kb (Tabla 5, Figura 8 y 8a).

Se observaron diferencias en los perfiles de hibridación utilizando la sonda 22.2 para hibridar ADN de las cepas de campo y vacunales digeridas *EcoRI* por 12 hrs. La sonda hibridó con un fragmento de 2 kb presente en todas las cepas; pero único en las vacunales y de campo 133, 647, 659, 660, 234, 244 y 553; la cepa “feto de Querétaro” con cinco fragmentos de 5.91 kb, 4.63 kb, 4.38 kb, 3.78 kb y

2.1 kb; la cepa “feto de Puebla” con tres fragmentos de 2 kb, 2.40 kb y 3.70 kb; las cepas 565 y 658 con dos fragmentos 2 kb y 2.4 kb; la cepa 696 con dos fragmentos 2.1 kb y 3.78 kb; la cepa 551 con tres fragmentos 2 kb, 2.4 kb y 3.7 kb (Tabla 6, Figura 9 y 9a).

La sonda 21.1 fue la única capaz de diferenciar la cepa vacunal Rev1 PRONABIVE de las cepas de aislamiento de campo; sin embargo, no fue posible diferenciar las cepas 551 y “feto de Puebla”, de la cepa Rev1 PRONABIVE. Es importante señalar que esta misma sonda mostró diferencias entre las dos cepas vacunales utilizadas en este estudio; ya que la Rev1 PRONABIVE mostró dos fragmentos mientras que la cepa vacunal Rev1 INRA mostró uno solo, cuestión que sugiere un cambio en la cepa vacunal de PRONABIVE. Por otra parte, las sondas 21.2, 22.1 y 22.2, utilizadas en este estudio si bien, mostraron mayor diversidad en los perfiles de hibridación a los fragmentos de restricción, esto no fue de valor para diferenciar entre cepas de campo y vacunales. Las diferencias observadas originalmente con las sondas 22 (22.1 y 22.2) y 21.1 en los estudios preliminares con digestiones con *Sau3AI* y *EcoRI* por 45 minutos de las cepas 133 y Rev1 INRA, no se mantuvieron cuando la digestión se extendió a 12 hrs. Debido a que estas diferencias se pueden deber principalmente a que en 45 minutos no se logra una digestión total del ADN, por lo que es probable que no sean producto del polimorfismo, por lo que se decidió utilizar la digestión completa del ADN por 12 hrs.

Se encontraron diferencias en la longitud de los fragmentos de restricción

con las diferentes cepas incluyendo las vacunales. Sin embargo, no fue posible diferenciar al 100% las cepas vacunales de las de campo. No se descarta la posibilidad de que los aislamientos donados por el INDRE, sean casos de infecciones humanas con la cepa Rev1 PRONABIVE.

En un estudio epidemiológico realizado por Bardenstein *et. al.* (2005) utilizando los sitio polimórficos del gen *omp2* comprobaron que la cepa vacunal puede ser eliminada en la leche, de esta forma lograron identificar a dicha cepa tanto en aislamientos humanos como de animales, incluso a alguna de estas cepas la nombran como cepa vacunal Rev1 atípica. Esto en comparación con el trabajo realizado pudiéramos tomarlo en cuenta en especial con las cepas 551 y feto de Puebla que al ser hibridadas con la sonda 21.1 presentan el mismo patrón que la cepa vacunal de PRONABIVE.

Las sondas genéticas han sido utilizadas para el seguimiento epidemiológico (Rogers *et. al.*, 2003), por lo que en este trabajo al realizar el estudio retrospectivo sobre el origen de las cepas de aislamiento de campo, tanto de origen animal como humano se pudieran confirmar las sospechas sobre la posible infección con la cepa vacunal Rev1, que presentan perfiles similares a la cepa de vacunal Rev1 PRONABIVE.

La cepa nombrada feto de Querétaro en todos los experimentos presento un perfil diferente, aunque durante los estudios bacteriológicos convencionales esta cepa se confirmo como *B. melitensis* biotipo 1, lo cual difiere de los estudios que han sido realizados con más de una cepa infectante de *B. melitensis* (Verger, 1998).

Es necesario realizar un mayor número de estudios, utilizando estas y algunas sondas nuevas a partir que permitan la diferenciación en el 100% de los casos.

8. BIBLIOGRAFIA.

1. Alton, GG., Jones LM, Agnus RD and Verger JM. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique. París.
2. Alton, GG. 1972. *B. melitensis* Rev1 and *B. abortus* 45/20 vaccine in goats: Immunity Am. J. Res. 33: 1747-1750.
3. Anónimo. 1988. Report of the International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 450-452.
4. Alvarez, PE. 1998. Situación de la brucelosis en América. Panorama General Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis. Acapulco Gro. 23-31
5. Ariza, CJ. 2005. Brucelosis: Aspectos actuales de principal interés. Control Callidad SEIMC.
6. Baily, GG, Krahn BS, Drasar BS and Stoker NG. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J. of Tropical Medicine and Hygiene, 95: 271-275.
7. Bardenstein, S, Mandelboim M. Ficht TA, Baum M and Banai M. 2005. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev1 in Animals and human in Israel by PCR analysis of the *PstI* site polymorphism of its *Omp 2* gene. J. Of Clin. Microbiol. 28:1475-1480.
8. Blasco, JM. 1990. Control y Profilaxis Ovis, 8:51-64.
9. Bricker, BJ, Hlling SM. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv 1,2, and 4

- Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* by PCR. J. of Clinical Microbiology; 32:11, 2660-2666.
10. Brown, MR, Anwar H and Costerton JW. 1988. Surface antigens in vivo: a mirror for vaccine development. Can J. Microbiol. 34, 494-498
 11. Cloeckert, A, Verger J-M, Grayon M, Paquet J-Y, Garin-Bastuji B, Foster G, Godfroid J. 2001. Classification of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. Microb. and Infec. 3, 729-738.
 12. CONASA. 1994. Perspectivas de la investigación sobre brucelosis caprina. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, México, 515-517.
 13. Corbel, MJ and Brinley-Morgan WJ. 1984. Genus *Brucella* En N.R. Krieg y J.G. Holt (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1 The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p 377-387.
 14. Collins, MD, Ash C, Farrow JAE, Walbanks S. and Williams AM. 1989. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., J. Appl. Bacteriol., 67:453-460
 15. Davis, GL, Dibner MD and Battey JM. 1986. Basic Methods in Molecular Biology. Ed. El Seoir. EUA.
 16. DelVecchio, VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, LosT, 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 PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N and Overbeek R. 2002. The genome sequence of facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*.

Genome Biology 3(4):reports 0020.

17. Díaz, AE, Prado A F, Ontiveros ML y Batalla CD. 1984. Evaluación serológica de anticuerpos posvacunales en cabras vacunadas con dosis reducida de Rev1 en una zona enzootica de brucelosis. *Técnica pecuaria México*. 47:128-132.
18. Díaz, AE. 1993. Diagnóstico de brucelosis en cabras. Tesis Doctoral de la Facultad de Ciencias de Navarra España.
19. El-Begaway-MB, Abd-el-Aal-HI and El-Karaksy-SM-Bashandy-M Refaat. 1994. Clinopathological studies on the use of levamisole in treatment of brucellosis Egyptian-Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology 7:1, 117-140.
20. FAO/OMS. 1986. Comité Expertos de Brucelosis, 6o. Informe Ginebra. Serie de Informes Técnicos No. 464.
21. Farrell, ID. 1974, The development of a new selective medium for isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res. Vet Sci.* 16, 280-286.
22. Fekete, A, Bantle JS and Halling SM. 1992. Detection of *Brucella* by polimerase reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4,79-83.
23. Fekete, A, Bantle JS and Halling SM and William SR. 1992. Amplification fragment length polimorphism in *Brucella* strains by use of polimerase chain reaction with arbitrary primers *J. Bacteriol.* 173:23, 7778-7783.

24. Fernandez-Prada CM, Nikolich M, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Boyle SM, Shurig GG, Hadfield TL and Hoover D L. 2001. Deletion of *wbo A* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect. and Imm.* 69:7 4407-4416.
25. Ficht, TA, Hussein HS, Derr A and Bearden SW., 1996. Species- Specific sequences at the Omp2 locus of *Brucella* type strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 329-331.
26. Frank, FJ 1991. Networking in Brucellosis Research Report of the United Nations University Brucellosis Research Network U.S.A.
27. Flores, CR. 1990. Infección por *Brucella melitensis* en ovinos y caprinos. Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios en Tuberculosis y Brucelosis Bovina. S.A.R.H./C.N.M.V.Z.M.
28. Fosgate, PA, Carpenter TE, Chomel BB, Case JT, DeBess EE and Reilly KF. 2002. Time.space clustering of human brucellosis, California 1973-1992. *Emerg. Infect. Dis.* 8:672-678.
29. Gandara, B. Merino MA, Rogel MA and Martinez-Romero E. 2001. Limited genetic diversity of *Brucella spp.* *J. Clin. Microbiol.* 39,235-240.
30. Greissen, K, Loeffelholz M, Purohit A and Leong D. 1994, PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 32, 335-351.
31. Grimont, F, Verger JM, Cornelis P, Limet J, Lafevre M, Grayon M, Regnault B, Van Brock J and Grimont PAD. 1992. Molecular typing of *Brucella* with cloned DNA probes. *Res. Microbiol.* 143, 55-65.

32. Gurría, TFJ. 1998. Importancia de la Erradicación de la Brucelosis en México. Conferencia Magistral. En Luna-Martínez, J E y Suárez GF (Eds.), III Foro Nacional de Brucelosis. Memorias. SGAR, CONASAG, MVZ, UNAM, OPS, México
33. Hermant, L and De Ridder H H. 1992. Identification of *Brucella spp.* by using the polymerase Chain reaction Applied and Environmental Microbiology 58:6, 2099-2101.
34. Hernández, BBA, García RP, Cruz EA y Rojo J 1999. Seroprevalencia de brucelosis en donantes de sangre del Hospital General de México. Revista del Hospital General de Mexico SS. 62:2, 107-112.
35. Hernández-Castro, R, Verdugo-Rodríguez A, Gutierrez-Pabello JA, ADAMS LG, Suarez-Guemes F and Sahagun-Ruiz A. 2000. Identification of four genes of the *Brucella melitensis* ATP synthase operon F0 sector: relationship with the Rodospirillaceae family. Microb Comp. Genomics.5:3, 163-171.
36. Hitchcock, P L, Leiven P, Mäkela H. Rietschel E T, Trittmatter W and Morrison D C. 1986. Lipopolisaccharide nomenclature past, present and future. J. Bacteriol. 166, 699-705.
37. Jahans, KL, Foster G and Broughton ES. 1997. The characterisation of brucella strains isolated from marine mammals. Veterinary Microbiology 57,373-382.
38. Jimenez de Bagües, MP, Marín, Blasco JM, Moriyón I and Gamazo C. 1991. An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjuntival *B. melitensis* Rev 1 vaccination. Vet. Microbiol. 30, 233-241.

39. Jiménez de Bagües, MP, Terraza A, Gross A and Dornard J. 2003. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella spp.*: Relationship to virulence. *Infect. Immun.* 9, 3456-3469.
40. Jumas-Bilak, E, Michaux-Charachon S. Bourg J, Ramuz M and Allardet-Servent A. 1998. Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of Proteobacteria. *Journal of Bacteriology* 180:10, 2749-2757.
41. Kapperud, GJ, Lassen J, Dommarsnes K, Krichtiansen BE, Caugant DA, Ask E and Jahkola M. 1989. Comparison of epidemiological marker methods for identification of *Salmonella typhimurium* isolates from an outbreak caused by contaminated chocolate. *Journal of Clinical Microbiology.* 27:9, 2019-2024.
42. Kaufmann, AF, Fox MD, Boyce JM, Anderson DC, Potter ME, Martone WJ and Patton CM. 1980. Airborne spread of brucellosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 353, 105-114.
43. Koneman, 1984. *Diagnostico Microbiológico, Texto y atlas color.* Ed. Médica Panamericana S.A. Buenos Aires Argentina p. 200-255
44. Leal, KDS, Martinez VIO, López MA and Martinez SJP. 1995. Single-Step PCR for detection of *Brucella spp* from blood and milk of infected animals. *Journal Of Clinical Microbiology;* 33:12, 3087-3090.
45. López, MA, López R, Ocampo DA, Hernandez I y Gonzalez F. 1991. *Brucelosis: Avances y perspectivas, Publicación técnica del INDRE, México.*
46. Luna-Martínez, JE and Mejía-Terán C. 2002. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet. Microbiol.* 90, 19-30.
47. Madsen, M. 1993. The serological response to vaccination with *Brucella abortus*

- strain 19 and *Brucella melitensis* Rev1, as measured by Rose Bengala, serum agglutination and complement fixation tests. Zimbabwe Vet. J.. 24:1,13-21
48. Mancera, MA. 1990. Respuesta Serológica de cabras juvenes inoculadas con diferentes dosis de la cepa Rev 1 de *Brucella mellitensis*. Comparación de pruebas y hallazgos al desafío controlado. Tesis de Maestria FMVZ-UNAM. México.
49. Manual del II Taller monográfico de Biología Molecular Básica aplicada al laboratorio clínico. 1995. Hospital Infantil de México Federico Gomez. 15-19 mayo de 1995.
50. Marín, CM, Jimenez de Bagües MP, Barberán M, Blasco JM. 1996. Comparison of two media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. Vet. Rec. 138, 409-411.
51. Marin, NL and Hancock REW. 1990. Function and structure of the major components of the outer membrane of gram-negative bacteria, p. 55-75. En, L.G. Adams (ed.), Advances in brucellosis research. Texas A & M University Press, College Station.
52. Meljem, MJ, Flores LJL. 1998. Control Sanitario de productos lacteos como medida de prevención de brucelosis. Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis. Acapulco Gro. 33-45.
53. Meyer, M.E. 1990. Taxonomy. En animal Brucellosis editors K. Nielsen and J.R. Duncan CRC. Press, Inc Boca Raton Florida.
54. Michaux, S. y J. Pallisson, M.J. Carles-Nurit, G. Bour, A. Allardet-Servet y M. Ramuz. 1993. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella*

melitensis 16M genome. J. Bacteriol. 175, 701-705.

55. Mikolon, AB, Ian GA, Hietala SH. Hernandez de Andaj. Ch EP, Hennager SG and Edmonson AJ 1998 J. Clin. Microbiol. 36:6, 1716-1722.
56. Miller, C.D. Songer J.R. and Sullivan J.F. 1987. A twenty-five year review of laboratory- acquired human infections at the National animal Disease Center. Am. Ind. Hyg. Assoc. J.
57. Moreno E. 1998. Genome evolution withing the alpha-*Proteobacteria*: Why do some bacteria not possess plasmids and other exhibit mor than one different chromosome? FEMS Microbiol. Rev. 22, 255-275.
58. Moreno, E. Cloeckeaert A., Moriyón I. 2002. *Brucella* evolution and Taxonomy . Veterinary Microbioloy 90, 209-227.
59. Morris, J.A., Corbel MJ and Phillip JIH. 1973. Caracterización of three phages lytic for *Brucella* Species. Journal General Virol. 20, 63-73. Great Britain.
60. Niccooletti, P. 2002. A short history of brucellosis. Vet. Microb.. ElSevier. 90, 5-9.
61. O'Hara, MJ, Collins DM and De Lisle GW. 1985. Restriction endonuclease analysis of *Brucella* species. Vet. Microbiol. 10, 425-429.
62. Pacheco, HA, Luna-Martinez JE, 1999. Identificación de factores de riesgo de brucelosis como zoonosis en la República Mexicana. LIII Reunion Anual de la Sociedad Mexicana de Salud Pública. Monterrey, p41.
63. Payeur JB, Ewalt DR, Stevens AD, Teig KD. 1993. Laboratory Procedures for isolating, identifying and Typing *Brucella*. National Veterinary Services

Laboratories. Iowa.

64. Rogers, GB, Hart CA, Mason JR, Hughes M, Walshaw MJ and Bruce KD. 2003. Bacterial diversity in cases of Lung infection in cystic fibrosis patients 16S ribosomal DNA (rDNA) length polymorphism profiling. *J. Clin. Microbiol.* 41:8,3548-3558.
65. Sambrook, J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
66. Shrikrishna, I, Suryanarayana WS, Satyanarayana Rao M and Rajasekhar M. 2001. Restriction endonuclease analysis of selected *Brucella* strains. *Online J. of Vet. Res.* 5, 233-238.
67. Velásquez, MO. Dominguez OJ y Lecuona OLA. 1998. La Brucelosis como problema de la salud pública en México. *Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis*. Acapulco Gro.
68. Verger, JM, Grimot D, Grimont PAD and Grayon M. 1985. *Brucella*, a monoespecific genus as show by deoxiribonucleic acid and hybridization *Inst. J. Syst. Bacteriol.* 35, 292-295.
69. Verger, JM, Grayon M, Tibor A, Wansard V, Letesson JJ and Cloeckaert A. 1998. Differentiation of *Brucella melitensis*, *B. ovis* and *B. suis* biovar 2 strains by use of membrane protein-or cytoplasmic protein-specific gene probes. *Res. Microbiol.* 149, 509-517.
70. UFAW 1967. Humane killing of animals. *The universities Federation for animal Welfare* p 8.

71. Zundel. E, Verger JM, Grayon M, Michel R. 1992. Conjugal vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev1 vaccine: safety and serological responses. Ann. Recherch. Vet. 23:, 177-188.