



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* y *rpoB* de
Brucella abortus y *B. melitensis* y su asociación con
susceptibilidad a quinolonas y rifampicina**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:

Aldo Rivera Pérez

Tutor principal:

Dr. Francisco Suárez Güemes

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Comité Tutor:

Dra. Beatriz Arellano Reynoso

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Dr. Rigoberto Hernández Castro

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	Página
GLOSARIO.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	7
JUSTIFICACIÓN.....	34
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVO GENERAL.....	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
RESULTADOS.....	44
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	69
REFERENCIAS.....	71

DEDICATORIA

“Indecencia, vulgaridad, obscenidad, están estrictamente confinadas al hombre; él las inventó. Entre los animales superiores no hay rastro de ellas. Los animales no esconden nada. No están avergonzados”.

Mark Twain

A mis padres. Por el apoyo incondicional que siempre me han otorgado.

A Eréndira. Mi hermana, porque sin tu ayuda no hubiera logrado este proyecto.

A Adriana. Por tus consejos, tu amor y ayuda incondicional en todo momento.

A mis amigos. Porque sin ustedes nada sería igual.

A mi familia. Gracias por apoyarme siempre.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutor, por su confianza, consejos, enseñanzas, apoyo y paciencia en este proyecto.

A la Dra. Beatriz por su paciencia, enseñanzas y ayuda en la realización de este trabajo.

Al Dr. Francisco por la gran ayuda otorgada para el desarrollo y finalización de esta tesis.

Al Dr. Rigoberto por su apoyo en el desarrollo y finalización de esta investigación.

A los integrantes y alumnos del laboratorio de brucelosis, ya que sus valiosos consejos, enseñanzas y ayuda han sido de gran valía para poder finalizar este trabajo.

A la UNAM, por todo lo que he podido aprender y realizar en sus instalaciones, y sobre todo por tener ahora más preguntas que respuestas.

A mis sinodales Dra. Ahidé, Dr. Rogelio, Dr. José Ángel, Dr. Enrique y Dr. Francisco por sus correcciones, sugerencias y apoyo para finalizar mi tesis.

A todos los doctores y profesores tanto de la UNAM como del INIFAP por su interés, confianza, enseñanzas, aprendizaje y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

**Proyecto financiado por PAPITT IT22511 y CONACyT-SAGARPA:
Sustentabilidad Leche Bovinos**

Convocatoria 2010

Alumno Becario

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

AN: Ácido nalidíxico

CPX: Ciprofloxacino

LVX: Levofloxacino

MXF: Moxifloxacino

NFX: Norfloxacino

OFX: Ofloxacino

RIF: Rifampicina

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria (del inglés: *Minimum Inhibitory Concentration*)

MBC: Concentración Mínima Bactericida (del inglés: *Minimum Bactericidal Concentration*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (de inglés: *Polymerase Chain Reaction*)

QRDR: Región que determina la resistencia a quinolonas (del inglés: *Quinolone Resistance Determining Region*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (del inglés: Desoxirribonucleic acid)

RNA: Ácido ribonucleico (del inglés: Ribonucleic acid)

A: Cepa de *Brucella* de origen animal

H: Cepa de *Brucella* de origen humano

RIF^s: Sensible a rifampicina

RIF^r: Resistente a rifampicina

MHB: Caldo Mueller-Hinton (del inglés: Mueller-Hinton Broth)

RESUMEN

La brucelosis es una infección causada por bacterias intracelulares del género *Brucella*, que requiere de un tratamiento de quimioterapéuticos combinado y prolongado. Esta enfermedad es la zoonosis más común, se presentan alrededor de 500, 000 nuevos casos anualmente. México aún permanece como uno de los principales reservorios de brucelosis humana. La infección en humanos suele ser severa con fiebres altas y recurrentes, con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, caracterizadas por complicaciones focales, de curso crónico, así como recaídas y fallas en la terapia, lo cual provoca condiciones incapacitantes en quienes la padecen. Se ha encontrado evidencia de mutaciones en genes de *Brucella* que pueden modificar la susceptibilidad de la bacteria a los antimicrobianos como la rifampicina y las quinolonas.

El objetivo de este estudio fue determinar en 38 aislamientos mexicanos de *Brucella melitensis* y *B. abortus* tanto de origen animal como humano, mutaciones en los genes *rpoB*, *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* y evaluar su relación con resistencia a quinolonas y rifampicina; utilizados frecuentemente en el tratamiento de la enfermedad en humanos.

En las *QRDRs* (*Quinolone Resistance-Determining Regions*) del gen *gyrA* de las 22 muestras de origen animal no se observaron sustituciones de aminoácidos; en las muestras de origen humano hubo variación de aminoácidos; en donde la muestra 1H hubo cambios en la posición Ala103Ser, las muestras 6H y 8H presentaron sustituciones en las posiciones Gln90Leu y Gln90His, las muestras

7H y 14H en las posiciones Ser81Thr, en la muestra 9H hubo variación en la posición Ser81Ala, en la muestra 14H se presentaron cambios en Met104Ile y Thr107Ser, la muestra 15H mostró variaciones en las posiciones Tyr47Leu, Arg48Pro, Lys49Gln, Val54Leu, Gly55Val, Arg56Glu, Val57Phe, Met58Trp; dentro de las *QRDRs* de los genes *gyrB*, *parC* y *parE* no se encontraron mutaciones. Dentro del gen *rpoB1* se presentaron sustituciones en la secuencias de origen animal 19A en las posición Met132Leu y en la muestra 22A en Thr139Ala; para el gen *rpoB2* la muestra 2A mostró varios cambios en las posiciones: Gln523Ala, Phe524Val, Asp526Gly, Gln527pro y Thr528Asp. Los aislamientos 15H y 16H mostraron MICs de 64-128 mg/L para rifampicina (RIF), 15H mostró MICs de 8-16 mg/L para moxifloxacino (MFX) y ofloxacino (OFX). Los aislamientos 1A, 4A y 6A mostraron MICs de 8-16 mg/L, 5A, 7A y 8A 16-32 mg/L con rifampicina, 3A mostró una MIC de 8-16 mg/L, 22A de 32-64 mg/L para norfloxacin, para moxifloxacino 11A y 14A tuvieron MICs de 8-16 mg/L, levofloxacino seguido de ciprofloxacino mostraron las MICs más bajas, y ofloxacino mostró MICs de 4-8 mg/L en las muestras: 11A, 12A, 13A, 14A y 15A.

Con los resultados obtenidos no se pudo asociar mutaciones en los genes descritos, con la resistencia a los antimicrobianos en aislamientos de *Brucella*, esto quizá debido a que varios factores pueden estar implicados en el proceso de resistencia a quinolonas y rifampicina como es la generación de bombas de eflujo y mutaciones en otras áreas del genoma bacteriano no analizadas es este trabajo.

ABSTRACT

Brucellosis is an infection caused by intracellular bacteria and requires combined, antimicrobial treatment. The disease is the commonest worldwide bacterial zoonosis with more than 500 000 new cases annually. Mexico remains as an important reservoir of human Brucellosis. Human illness is severe, febrile, with a broad spectrum of clinical manifestations and is characterized by focal complications, chronic courses, relapses and therapeutic failures which cause disability conditions in patients. There is some evidence about certain mutations in *Brucella* genes that confer antimicrobial resistance like rifampicin and fluoroquinolones.

The aim of this study is to determine, using molecular methods and antimicrobial tests, whether mutations in *rpoB*, *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* genes are present in *Brucella* spp. isolates from Mexico and if there is antimicrobial resistance to rifampicin and quinolones, which are frequently used for treatment of the disease.

38 *Brucella* spp. isolates from humans and farm animals were prepared for Polymerase Chain Reaction (PCR) test, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assay and sequencing.

There were not amino acid substitution in the *QRDRs* (Quinolone Resistance-Determining Regions) of *gyrA* in 22 samples of animal origin, there were variation in samples of human origin: 1H in Ala103Ser, 6H and 8H Gln90His Gln90Leu and position the 7H and 14H Ser81Thr sequences, and the Ser81Ala 9H, 14H Met104Ile in and Thr107Ser, 15H Tyr47Leu, Arg48Pro, Lys49Gln, Val54Leu, Gly55Val, Arg56Glu, Val57Phe, Met58Trp, in *gyrB*, *parC* and *parE* mutations were

not found. Within rpoB1 there were no change in the sequences Met132Leu 19A and 22A Thr139Ala; rpoB2 2A sequence for ranged in Gln523Ala, Phe524Val, Asp526Gly, and Thr528Asp Gln527pro. The isolates showed MICs of y16H 15H 64-128 mg/L for rifampicin (RIF), 15H showed MICs 8-16 mg/L for moxifloxacin (MFX) and ofloxacin (OFX). Isolates 1A, 4A and 6A showed MICs of 8 to 16 mg/L, 5A, 7A and 8A 16-32 mg/L to rifampicin; 3A showed a MIC of 8 to 16 mg/L and 22A of 32-64 mg/L to norfloxacin; 14A and 11A samples showed MICs of 8-16 mg/L. levofloxacin followed by ciprofloxacin showed the lowest MICs in this study; samples 11A, 12A, 13A, 14A and 15A showed the highest MICs of 4-8 mg/L to ofloxacin.

The results antimicrobial resistance in some samples, although not all are associated with mutations, several factors may be involved in the development of resistance to quinolones and rifampicin, as generating pumps efflux and mutations in other areas of the bacterial genome that were not analyzed in this work.

INTRODUCCIÓN

Definición y etiología

La brucelosis también conocida como fiebre de Malta, fiebre ondulante, fiebre recurrente o fiebre del mediterráneo, es una infección zoonótica granulomatosa crónica provocada por bacterias intracelulares facultativas del género *Brucella* (1, 2). Afecta a varias especies de animales domésticos y silvestres, donde produce el aborto epizootico y una enfermedad febril septicémica o infecciones focalizadas en el humano, se ha mantenido como una de las zoonosis de mayor distribución e importancia a nivel mundial y existen pocos países libres de la enfermedad (1, 2, 3).

La brucelosis humana es considerada la zoonosis de mayor prevalencia en el mundo, con más de 500, 000 casos nuevos reportados cada año, principalmente en países del Mediterráneo, Asia Central, Península Arábiga, India y América Latina; los países con mayor incidencia son Argentina, México y Perú. México permanece como uno de los principales reservorios de brucelosis. Desde 1905 se acepta su existencia en México, aunque el primer aislamiento de una cepa de *Brucella melitensis* se realizó años después por Pláceres en Puebla (1, 2, 3, 4). Hoy en día provoca grandes pérdidas económicas a la ganadería del país y constituye uno de los principales problemas de salud pública (1, 2, 5). Actualmente se reconocen 10 especies dentro del género, las cuales son: *B. abortus*, que infecta normalmente al ganado bovino, *B. melitensis* afecta a borregos y cabras, *B. suis* a cerdos, *B. canis* infecta perros, *B. ovis* afecta específicamente a borregos, *B. neotomae* a roedores, *B. pinnipedialis* a focas, *B. ceti* a cetáceos, *B. microti*

topillo común y zorro rojo y *B. inopinata* recientemente aislada de un implante mamario en una mujer; sin embargo algunas especies de *Brucella* pueden infectar a otras especies de animales. El humano puede ser infectado por *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*; donde puede afectar varios órganos y tejidos provocando artritis, endocarditis, meningitis, nefritis, etc. El lipopolisacárido liso o rugoso está correlacionado con el tipo de presentación de la enfermedad en humanos, siendo las cepas lisas las más virulentas; es considerada también como una enfermedad ocupacional, de laboratorio y adquirida por viajar; una baja incidencia de brucelosis en humanos se relaciona directamente con una baja incidencia en animales (1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

Taxonomía

El género *Brucella* pertenece a la familia *Brucellaceae* (familia III) junto con *Mycoplana* y *Ochrobactrum*, en el orden Rizobiales y en la clase α -2 de las proteobacterias junto con *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Agrobacterium*, *Bartonella* y *Rickettsia*, los miembros de ésta clase incluyen familias de microorganismos que pueden ser patógenos o simbioses de mamíferos o plantas. *Brucella* spp. es una bacteria en forma de bacilo pequeño (0,5-0,7 por 0.6-1.5 μ m), Gram negativo, inmóvil, no capsulado, aerobio estricto, de crecimiento lento, no forma esporas, intracelular facultativo capaz de replicarse en células fagocíticas y no fagocíticas estableciendo una infección crónica tanto en humanos como en animales. (1, 2, 7, 8, 9, 10, 12).

Genoma de *Brucella abortus* y *B. melitensis*

Con base en los estudios de hibridación ADN-ADN, los miembros del género *Brucella* presentan una similitud del 95% entre sus especies. *Brucella melitensis* y *B. abortus* poseen dos cromosomas circulares de 2.1 y 1.5 Mb, con un 58-59% de GC y no contienen plásmidos. No se ha reportado la evidencia de sistemas de intercambio genético natural entre los miembros de este género. En ambos replicones están codificadas las funciones metabólicas y replicativas. Dentro del cromosoma I de *Brucella* se encuentran los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *ParE*, y *rpoB* los cuales se han asociado con la resistencia a quinolonas y rifampicina en diversas bacterias, estos genes son el tema central de estudio en el presente trabajo; cabe mencionar que las quinolonas y rifampicina son utilizadas para el tratamiento de la brucelosis en humanos. (1, 2, 7, 12).

Patogenia y factores de virulencia

La capacidad de *Brucella* spp. para causar enfermedad requiere de algunos pasos críticos durante la infección. *Brucella* spp. puede invadir células epiteliales del hospedero, permitiendo la infección a través de las mucosas: las células M de intestino son la principal vía de entrada del patógeno. Una vez que ha invadido puede sobrevivir dentro de células fagocíticas y no fagocíticas y posee la capacidad de interferir en el tránsito intracelular, previniendo la fusión de la vacuola que contiene a *Brucella* BCV (*Brucella*-Containing Vacuola) con el lisosoma; lo realiza mediante marcadores lisosomales, redirigiendo la vacuola hacia el retículo endoplásmico rugoso (RER), en el cual la bacteria se puede

replicar fácilmente (1, 2, 3, 13). Los mecanismos que permiten la invasión del microorganismo a la célula aun no son claros; sin embargo, aunque no se han identificado receptores específicos del hospedero que interactúen con *Brucella*, la internalización de la bacteria dentro de las células requiere de cambios en el citoesqueleto (13, 14). La invasión de *Brucella* a través del tracto digestivo no provoca respuesta inflamatoria del hospedero, por lo que el sistema inmune innato no puede detectar al patógeno, de hecho *Brucella* posee mecanismos que previenen la activación del sistema inmune innato, como el receptor Toll-1 de interleucina (TIR) que contiene un dominio proteico que previene la señalización del receptor tipo Toll-2 (TLR) hacia MyD88, también se inhibe la maduración de células dendríticas (DC), secreción de citocinas y presentación de antígenos (13, 14, 15). *Brucella abortus* induce la supresión de la transcripción de mediadores pro-inflamatorios en células trofoblásticas en etapas tempranas de la infección. Los trofoblastos son células de la placenta que son objeto de infección durante la preñez en vacas. *Brucella abortus* induce la secreción de quimiocinas pro-inflamatorias en cultivos de células trofoblásticas, lo que se correlaciona con el perfil de expresión observado *in vivo* en la placenta de vacas infectadas. *Brucella* spp. no posee los factores de virulencia clásicos, tales como exotoxinas, citolisinas, no tiene cápsula, fimbrias, flagelos, fagos lisogénicos, lipopolisacárido endotóxico (LPS) e induce apoptosis en las células del hospedero. Sin embargo, el LPS liso juega un papel importante en la virulencia de *Brucella* ya que previene la activación del complemento y previene su destrucción, protege a la bacteria de péptidos antimicrobianos como defensinas y lactoferrina, altera la capacidad de células infectadas de presentar antígenos ante el sistema MHC II (*complejo mayor*

de *histocompatibilidad*) lo cual impide la destrucción de éstas células por el sistema inmune. Las cepas de *Brucella* que tienen un LPS rugoso que ha perdido parte de la cadena O son poco virulentas y no inhiben la apoptosis. Después que *Brucella* invade la mucosa, es fagocitada y activa otro importante mecanismo de virulencia: el sistema de dos componentes BvrS/BvrR, necesario para la invasión celular mediante la regulación del citoesqueleto de la célula del hospedero y para la regulación de proteínas de la membrana externa bacteriana, algunas de las cuales son necesarias para la completa virulencia del patógeno. Los glucanos cíclicos β -1, 2, que son parte de la membrana externa, también son requeridos por la bacteria para sobrevivir intracelularmente. *Brucella* spp. posee un sistema de secreción tipo IV (T4SS) codificado en el operón *virB*; a diferencia de otros sistemas tipo IV que se expresan extracelularmente, el operón *virB* es inducido específicamente dentro de macrófagos y la acidificación del fagosoma es clave para la expresión de *virB* que es crucial para la supervivencia intracelular y virulencia *in vivo* de *Brucella*. La proteína de choque térmico 60 (Hsp60), la cual es miembro de la familia de chaperoninas GroEL, se expresa en la superficie de *Brucella* spp. parece tener un papel en la adherencia a la molécula celular priónica llamada PrPr, y como su exportación es *virB*-dependiente, puede ser un factor de virulencia más. La mayoría de las bacterias son eliminadas por la fusión fagolisosoma, sobreviviendo únicamente del 15 al 30% dentro de compartimientos que contienen a la bacteria, los cuales comienzan a acidificarse, limitando la actividad de los antibióticos, posteriormente, su replicación se lleva a cabo en el retículo endoplásmico donde se libera con la ayuda de hemolisinas, induciendo necrosis celular (1, 2, 9, 10, 13, 14).

Respuesta inmune

La respuesta inmune en humanos refleja características únicas de *Brucella*. El LPS liso no activa la vía alterna del complemento. *Brucella* es resistente al daño por células polimorfonucleares debido a que suprime los sistemas mieloperoxidasa-hidrógeno-peróxido-haluro y superóxido dismutasa cobre-zinc y la producción de adenilato monofosfato y guanín monofosfato. Afecta la actividad de las células asesinas naturales NK y la generación de reactivos intermediarios de oxígeno y factores de regulación de interferón por parte del macrófago. Los linfocitos CD4 tienen un papel limitado; ya sea facilitando la expansión clonal de otras células citolíticas, tales como CD8 o funcionando como efectores citolíticos. El incremento de linfocitos γ/δ es característico en la infección por *Brucella*, como es la importancia del receptor de células T V γ 9 δ (2). Estudios realizados con humanos voluntarios que fueron vacunados con la cepa Rev-1 de *B. melitensis*, han mostrado la producción de anticuerpos específicos contra el microbio. Las inmunoglobulinas de clase M contra el LPS aparecen en la primera semana de infección, seguidas por las IgG en el comienzo de la segunda semana, ambas duran 4 semanas, el uso de antibióticos disminuye los títulos de las dos inmunoglobulinas. Las IgM persisten a niveles séricos más elevados que las IgG más de 6 meses, aunque ambas están presentes casi un año. La aparición de IgA e IgG juntas por más de 6 meses es consistente con la enfermedad crónica. Aunque la respuesta humoral es muy útil en el diagnóstico de brucelosis, juega un papel limitado en la respuesta del hospedero (2). El interferón γ es crucial en la patogenia de la infección: debido a la activación de macrófagos, que producen

especies reactivas de oxígeno e intermediarios de nitrógeno; mediante la inducción de apoptosis, mejora la diferenciación celular y la producción de citocinas; convirtiendo IgG a IgG2a e incrementando la expresión de moléculas presentadoras de antígeno. El interferón gamma juega un papel central en la evolución de la brucelosis por el efecto de un polimorfismo genético en el alelo +874^a (2). Los pacientes que son homocigotos en este alelo son más susceptibles a la brucelosis y tuberculosis (2). Los niveles séricos de interferón γ en pacientes infectados con *Brucella* están elevados. La importancia del factor de necrosis tumoral alfa en humanos (TNF- α) es cuestión de debate, ya que en modelos murinos se induce la producción de TNF- α , sin embargo, en humanos se suprime, en las etapas tempranas cruciales de la infección. Esta inhibición quizá esté dada por la pobre respuesta de las células asesinas naturales (NK: *natural killers*) debido a mecanismos que involucran a la proteína de membrana externa 25 (OMP 25), la cual se ha identificado como represora de TNF- α . El papel de la interleucina 12 (IL-12), es principalmente como reguladora de la producción de IF γ . La respuesta inmune celular de tipo Th1, es la que controla la infección y la eliminación completa de las bacterias (1, 2, 3, 9, 10, 16, 17).

Epidemiología de la enfermedad

Al ser la brucelosis una zoonosis, la principal fuente de infección la constituyen los animales infectados, que en su mayoría son aquellas especies productoras de alimento, las cuales excretan gran cantidad de bacterias junto con los tejidos y productos de abortos, en la leche, y en menor medida en las secreciones genitales, contaminando de esta forma el suelo, los corrales, la paja de las camas

y el agua entre otros, provocando su diseminación. Recientemente se ha identificado la infección en mamíferos marinos como focas, delfines y marsopas; esto podría ser un riesgo ocupacional emergente en personas expuestas a las especies mencionadas. El riesgo y la severidad de la enfermedad está determinado por la especie de *Brucella* que infecte al individuo, a menudo la enfermedad es subclínica cuando es provocada por *B. abortus*; el cuadro es más severo si la infección es causada por *B. suis* o *B. melitensis*, esta última es la especie que con más frecuencia se reporta y se aísla de humanos. Las vacas y sus productos son la fuente de infección más común, aunque los perros que cohabitan en los corrales pudieran tener un papel importante en la epizootiología de la enfermedad (1). En base a los estudios bacteriológicos realizados en México, se conoce la existencia de los biovars 1, 4, 5 y 6 de *B. abortus*, siendo el 1 el más común y el 4 el más virulento para el humano. *B. melitensis* es la especie que más se notifica en nuestro país y se aísla de los casos humanos en un 90%, afecta principalmente a cabras y borregos, aunque la infección por esta especie en vacas es un problema importante en México (1). *Brucella* es capaz de sobrevivir y persistir en el medio ambiente por periodos relativamente largos de tiempo. El consumo de carne cruda o mal cocida representa un riesgo menor por la baja cantidad de bacterias en estos tejidos, en cambio el consumo de vísceras, ubres y testículos mal cocinados representan un riesgo mayor. El contagio de persona a persona es muy raro, sólo se tiene evidencia circunstancial que sugiere que la transmisión se produjo por vía sexual. De mayor importancia es la infección como resultado de una transfusión sanguínea o de un trasplante de tejido, siendo la médula ósea la de mayor riesgo. En nuestro país la infección se presenta tanto en

la población rural como urbana, de ambos sexos, económicamente activa, entre los 20 y 45 años de edad con mayor número de casos en mujeres. La mortalidad reportada es de alrededor de 30 casos anuales (1, 2, 3, 18).

Trasmisión

Las posibles vías de infección en humanos son: persona a persona (no está comprobado que suceda), o de forma más significativa en las donaciones de tejidos y trasplantes, sobre todo de médula ósea; la infección por el medio ambiente debido al tránsito de animales en áreas pobladas, donde éstos contaminan el suelo, el agua, especialmente si se producen abortos, la inhalación de polvo contaminado, el contacto directo con las mucosas de los animales; la exposición ocupacional en las personas que trabajan en explotaciones, fabrican derivados cárnicos o lácteos, veterinarios, personal de laboratorios y todo aquel que esté involucrado en el proceso; la transmisión por alimentos la cual es usual en las poblaciones urbanas, debido al consumo de leche y derivados frescos, no pasteurizados, menos común por el consumo de vísceras mal cocidas y vegetales que tuvieron contacto con animales infectados (1, 2, 3, 4, 18, 19).

Signos y síntomas clínicos

La brucelosis es esencialmente una enfermedad de animales donde los humanos son hospederos accidentales por lo tanto es una zoonosis. Usualmente se presenta un cuadro febril agudo o subagudo persistente acompañado de malestar, anorexia y postración, el cual sin tratamiento específico puede durar semanas o meses y puede derivar en una enfermedad crónica incapacitante con varias

complicaciones tales como pérdida de peso, hepatomegalia y esplenomegalia, otros síntomas comúnmente descritos son la artritis, espondilitis, osteomielitis, epididimitis y orquitis, así como complicaciones severas tales como neurobrucelosis, abscesos hepáticos, y endocarditis. La enfermedad es aguda en alrededor de la mitad de los casos, con un periodo de incubación de dos o tres semanas. En la otra mitad la infección es insidiosa, con signos y síntomas que se desarrollan a lo largo de semanas o meses y las manifestaciones clínicas son variadas e inespecíficas, tales como fiebre, sudoración, fatiga, malestar, anorexia, pérdida de peso, dolor de cabeza, artralgia y dolor de espalda. Comúnmente las personas se sienten bien en la mañana y los síntomas empeoran en el transcurso del día, el deseo de descansar es alto y la depresión es generalizada. Si no hay tratamiento se presenta un patrón denominado “fiebre ondulante” en el que hay periodos febriles que luego menguan durante varios días. La inflamación está presente en todas las etapas de la enfermedad lo cual es evidente en todos los tejidos afectados. La infección focal se presenta en aproximadamente el 30% de los pacientes, siendo las complicaciones osteoarticulares las más frecuentes (hasta el 70% de los casos), lo que puede afectar las articulaciones periféricas, las sacro ilíacas o la espina dorsal, donde la sacroileítis es muy común, frecuentemente descrito por el paciente como un dolor de espalda que llega hasta las piernas (ciática). Los niños evitan caminar y apoyar peso en la extremidad afectada. En los exámenes radiológicos y gammagrafías óseas tempranas no se observan alteraciones, pero en las tomografías computarizadas y resonancias magnéticas se observa un estrechamiento de los espacios intervertebrales. En los exámenes de perfusión con radionucleidos se observa osteomielitis o destrucción

de los cuerpos vertebrales. Las vértebras lumbares son más frecuentemente afectadas que las torácicas. Los abscesos paravertebrales son poco comunes. Se ha descrito espondilo artropatía post infección que involucra varias articulaciones por la circulación de complejos inmunes circulantes. Aunque el hígado es afectado (un tercio de los pacientes presentan hepatomegalia) durante la infección, las pruebas de función hepática resultan normales o poco alteradas. Los cambios histológicos son variables, en la infección por *B. abortus* se pueden ver granulomas epitelioides como los causados por sarcoidosis; en cuanto a *B. melitensis* puede haber pequeños focos de inflamación dispersos como los que se observan en la hepatitis viral. Ocasionalmente hay grandes agregados de células inflamatorias y necrosis hepatocelular en el parénquima del órgano. Se pueden encontrar pequeñas áreas con granulomas epitelioides y células gigantes. La cirrosis post necrótica es muy rara después de la infección, se han descrito abscesos hepáticos y lesiones crónico-supurativas en casos por *B. suis*. Se ha reportado colecistitis crónica y aguda en asociación con la brucelosis. En hombres las complicaciones genitourinarias más comunes son la epididimitis y la orquitis, usualmente unilateral, aunque en el semen se ha recuperado el patógeno hay poca evidencia de transmisión sexual. En mujeres se han reportado casos raros de abscesos pélvicos y salpingitis. Las lesiones renales son raras y se parecen a las causadas por la tuberculosis renal. Durante el transcurso de la preñez y la lactancia hay riesgo de aborto espontáneo o infección intrauterina al producto. Aunque en la mujer al aborto no se asocia a la placentitis que se genera en animales debido al eritritol (factor de crecimiento para *B. abortus*), sino más bien a la bacteriemia, especialmente en el primer trimestre de la gestación. Es muy rara

la transmisión por la lactancia y se han reportado pocos casos. La infección mediante aerosoles puede traer consigo complicaciones respiratorias tales como: linfadenopatía traqueal e hilar, neumonitis intersticial, bronconeumonía, nódulos pulmonares, efusiones pleurales y empiema, sin embargo, es raro el aislamiento de la bacteria del esputo. Las complicaciones cardiovasculares se presentan en el 2% de los casos y representan la principal causa de muerte donde la endocarditis infecciosa afecta principalmente a las válvulas del corazón principalmente la aorta. La neurobrucelosis ocurre en aproximadamente el 5% de los casos por *B. melitensis* donde se presenta la invasión directa del sistema nervioso central provocando meningitis o meningoencefalitis. La meningitis puede ser aguda o crónica. Otras manifestaciones incluyen la vasculitis cerebral, abscesos cerebrales y epidurales, infartos, hemorragia y ataxia cerebelar. El aislamiento de *Brucella* del líquido cerebro-espinal es raro. Los problemas cutáneos se manifiestan como erupciones, nódulos, pápulas, eritema nodoso, petequias y púrpura. Puede haber afección oftálmica, la uveítis es el signo más común, también puede haber iridociclitis crónica, queratitis numular, coroiditis multifocal y neuritis óptica (1, 2, 4, 9, 18, 20).

En animales la brucelosis se presenta como una enfermedad subaguda o crónica generalmente focalizada en el sistema reproductor tanto de machos provocando epididimitis y orquitis, como de hembras, donde causa placentitis seguida de abortos en último tercio de la gestación, no se presentan signos patognomónicos de la enfermedad por lo que se requiere de las pruebas serológicas y/o aislamiento del agente etiológico para el diagnóstico. Puede haber retención

placentaria, partos prematuros, higromas, abscesos, baja producción láctea, infertilidad temporal debido a que el aborto se presenta comúnmente sólo una vez, las ubres quedan permanentemente infectadas en cabras y vacas, la bacteriemia persistente es más común en perros y cerdos que en rumiantes (1, 2, 18).

Brucelosis crónica

Los pacientes que presentan infección crónica pueden ser divididos en tres grupos: aquellos con una infección focalizada, como la espondilitis, aquellos que sin tener la enfermedad focalizada, presentan una salud muy pobre y tienen síntomas de fatiga crónica, dolor musculoesquelético, depresión y ansiedad y los que presentan recaídas post tratamiento. Es aceptado que un paciente es crónico después de presentar síntomas clínicos durante doce o más meses posteriores a la fecha en que fue diagnosticada la enfermedad. Los pacientes con infección crónica focal presentan osteomielitis o abscesos en tejidos profundos, manifiestan la signología en forma intermitente y tienen títulos elevados de IgG en el suero, el foco de infección debe ser removido con cirugía y debe darse terapia antimicrobiana. Los pacientes que no responden al tratamiento presentan síntomas inespecíficos como fiebre, los títulos de IgG declinan, pueden presentar desórdenes de personalidad y la terapia antimicrobiana no les favorece, se desconoce la causa de ello. Las personas que sufren recaídas, usualmente después de 6 meses de terapia, pueden ser positivas o no al cultivo bacteriano, presentan títulos elevados de IgG, es rara la presentación de resistencia antimicrobiana a menos que en el tratamiento se haya utilizado monoterapia sólo

con rifampicina o estreptomina. Estos pacientes pueden ser tratados nuevamente con los mismos antibióticos pero en combinación (1, 2, 4, 18).

Situación actual de la brucelosis en México

La brucelosis es una enfermedad de distribución mundial principalmente en los países mediterráneos de Europa y África, el Oriente Medio, América Central y América del Sur, Asia Central, India y México donde es endémica. Las fuentes de infección y el microorganismo causal varían con la zona geográfica. La brucelosis se considera una enfermedad ocupacional de personas que trabajan con animales infectados o sus tejidos, en particular granjeros, veterinarios y trabajadores de mataderos, por lo cual es más frecuente en los hombres. Se presentan casos esporádicos y brotes epidémicos en consumidores de leche cruda y productos lácteos de vaca, oveja y cabra (especialmente de productos no pasteurizados). En nuestro país tiene un impacto significativo en la salud pública y en la industria animal, en cuanto al sexo el 64.5% de los casos que se registraron en 2011 fue en mujeres y el 35.5% en hombres. El grupo de edad más afectado en 2011 fue el de 45-49 años con una tasa de incidencia de 4.7 por 100 000 habitantes del grupo de edad, seguido por el de 50-59 años con una incidencia de 4.23. (1, 2, 3, 4, 5, 11, 21, 22).

La brucelosis está actualmente en la lista única de, “Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE) en vigor en 2015”. Pertenece al grupo de enfermedades de declaración obligatoria ante la OIE, El manual de bioseguridad para laboratorios elaborado por la Organización

Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los microorganismos del género *Brucella* en el Grupo de Riesgo III (23).

B. abortus es la especie más extendida en el mundo y probablemente en México, sin embargo, se aísla poco de casos humanos. La infección en el hombre es a menudo subclínica, y cuando se presenta alguna sintomatología es, en general, menos severa que la causada por *B. melitensis* o *B. suis*. Con base en los estudios bacteriológicos realizados en México, se conoce la existencia de los siguientes biovars de *B. abortus*: 1, 4, 5 y 6, siendo el biovar 1 el más frecuente y el biovar 4, el más virulento para el hombre. *B. melitensis* es la que más se notifica como causa de enfermedad, se aísla con mayor frecuencia de los casos humanos, casi en un 90%. Es la especie más virulenta y está asociada a una enfermedad aguda severa, la bacteria infecta principalmente a cabras y borregos, pero otras especies no quedan exentas. La infección en vacas, se ha visto como un problema de gran trascendencia epizootológica en algunos países del sur de Europa, del Medio Oriente y en México, su presencia en bovinos es un problema potencialmente grave, por el gran volumen de leche infectada que se produciría por animal y por la contaminación que se vertería al medio ambiente con un solo aborto (de 10^9 - 10^{13} bacterias / ml). En el territorio nacional *B. melitensis* biovar 1 es más frecuente, aunque en algunos casos se han aislado el biovar 2 y el 3. *B. suis*, se presenta como una infección más restringida a las áreas rurales. En forma local es una fuente importante de casos humanos, que pueden ser tan severos como los producidos por *B. melitensis*. En México solo se ha aislado *B. suis* biovar 1, tanto de casos humanos como de cerdos (1, 2).

En el periodo de 2007 a 2011 se han registrado 12,214 casos de brucelosis con un promedio anual de 2,443 casos en este periodo; en el año 2007 se registraron 1,874 casos, con una incidencia de 1.7 por 100, 000 habitantes y en el año 2011 se registraron 3,436 casos, con una incidencia de 3.1, lo anterior representa un incremento en la incidencia del 77% para el 2011 con respecto a 2007. Los estados que presentan la mayor incidencia de casos en 2011 son: Sinaloa con una incidencia de 21.0 casos por 100,000 habitantes, seguido por Tlaxcala con 14.3, San Luis Potosí 12.6, Guanajuato 8.2, Zacatecas 7.0, Nuevo León 5.5, Michoacán 5.1, Puebla 4.6, Chihuahua 4.5 y Coahuila 4.4 casos por 100, 000 habitantes (21).

En el año 2012 se reportaron 2,179 casos en todo el país, siendo los estados con más reportes: Guanajuato con 548, Puebla 165, Michoacán 158, Nuevo León 145, Zacatecas 102, Sinaloa 93 y Sonora con 92 casos; en el año 2013 hubo 2670 casos reportados en el país donde los estados con más número de reportes fueron: Guanajuato con 424, Michoacán 286, Sinaloa 251, Puebla 308, Jalisco 167 y Sonora 109, en el año 2014 se reportaron 2579 casos, siendo los estados con más reportes: Guanajuato con 307, Sinaloa con 219, Michoacán con 191, Puebla 170 y Jalisco 108 casos reportados, hasta la semana 8 del presente año se reportan 245 casos (22).

Diagnóstico de la brucelosis

El diagnóstico de la brucelosis en humanos debe contemplar tres factores principales, la historia clínica del paciente, las pruebas serológicas y el aislamiento del microorganismo. Los métodos de diagnóstico para la enfermedad están basados principalmente en estudios serológicos donde la prueba presuntiva, cualitativa de Rosa de Bengala, en la cual se utiliza una suspensión celular bacteriana al 9-10%, ofrece un monitoreo rápido, sensible y sencillo que determina anticuerpos totales anti-*Brucella*, aunque para confirmar la infección se requieren de otros métodos serológicos complementarios que determinen el tipo de anticuerpo y el título del mismo. Las pruebas de aglutinación estándar SAT y de aglutinación con 2-mercaptoetanol ofrecen un diagnóstico confirmatorio indirecto cuantitativo. La prueba de SAT utiliza bacterias inactivadas y diluciones del suero problema y permite determinar la cantidad de aglutininas totales (IgM, IgG e IgA) anti-*Brucella* en suero, líquido cefalorraquídeo y otros fluidos, se considera positiva con títulos iguales o mayores a 1:80. La prueba de 2-mercaptoetanol, como su nombre lo indica, utiliza como diluyente 2-mercaptoetanol que rompe la molécula de IgM, detectando principalmente IgG, se considera positiva cuando el título es igual o mayor a 1:20. De manera complementaria se puede detectar al anticuerpo específico de IgM, frente al antígeno de *Brucella* mediante la prueba de ELISA, la cual es sensible y específica para la detección de éstos anticuerpos. La presencia de un nivel importante o creciente de IgM sugiere una infección activa, para la prueba se pueden emplear como antígeno de captura células enteras o lipopolisacárido (LPS). Los métodos moleculares como la reacción en cadena de

la polimerasa (PCR) ofrecen la ventaja de ser rápidos, sensibles y específicos ya que permiten identificar el ADN libre o procedente de bacterias muertas. El diagnóstico definitivo se establece aislando el microorganismo a partir de cultivos bacteriológicos de sangre que es el fluido utilizado con mayor frecuencia, aunque se estima que la proporción de cultivos positivos es del 20-25%, en médula ósea la proporción de cultivos positivos se estima en 92% u otros tejidos; debe tenerse en cuenta que el paciente no esté bajo terapia antibiótica y de preferencia debe tomarse la muestra en la fase aguda de la enfermedad, por la tarde, antes del pico febril. Para el diagnóstico de la brucelosis en animales se utilizan principalmente pruebas serológicas como la de Rosa de Bengala, SAT, aglutinación con 2-mercaptoetanol y fijación del complemento (1, 2, 3, 4, 5, 18, 24).

Tratamiento de la infección en humanos

Brucella aunque es susceptible a la mayoría de los antimicrobianos *in vitro*, no siempre hay una correlación con la efectividad *in vivo*. Se recomienda seleccionar aquellos que penetren dentro de las células blanco y el tiempo de administración sea el adecuado. Las sulfonamidas, los aminoglucósidos, las tetraciclinas, la rifampicina y las quinolonas; todos ellos son activos contra *Brucella in vitro* a concentraciones mínimas inhibitorias bajas. Los antibióticos beta lactámicos como la penicilina, las cefalosporinas y los macrólidos son los menos eficaces ya que se asocian con una elevada tasa de recaídas. En algunos casos de brucelosis crónica se ha reportado el aislamiento de colonias en forma L que están formadas, por bacterias con pared celular modificada inducida entre otros factores por antibióticos como la penicilina. La enfermedad en animales con excepción del

perro, no se trata debido al tiempo, los costos, el riesgo y la baja efectividad de un tratamiento a largo plazo. (1, 2, 4, 18).

Los esquemas para el tratamiento de la enfermedad sugeridos por la Organización Mundial de la Salud son los siguientes:

Tratamiento para adultos y niños mayores de 8 años en brucelosis no complicada

- A) Tetraciclinas: 500 mg tabletas cada 6 horas vía oral por 6 semanas, doxiciclina es una mejor alternativa ya que tiene menos efectos gastrointestinales que la tetraciclina; se utiliza a razón de 100mg dos veces al día o 200 mg vía oral cada 24 horas por 6 semanas.
- B) Aminoglucósidos: debido a que la monoterapia con tetraciclinas presenta un índice de recaídas del 10-20%, se recomienda el uso conjunto de tetraciclinas más aminoglucósidos durante las dos o tres primeras semanas de tratamiento. La estreptomina 1g/día intramuscular con tetraciclinas es sinérgica y funciona mejor que la monoterapia. Otra alternativa es el uso de gentamicina 5mg/kg/día vía intramuscular o intravenosa durante 7 a 10 días en combinación con doxiciclina por seis semanas.
- C) Rifampicina la cual es altamente liposoluble y se acumula dentro de las células eucariotas, se utiliza a razón de 600/900mg/día en combinación con doxiciclina 200mg/día durante 6 semanas es una alternativa eficaz al tratamiento de estreptomina y doxiciclina.

Terapia secundaria alternativa

- D) Fluoroquinolonas: presentan una gran actividad *in vitro*, se absorben bien vía oral y penetran dentro de las células fagocíticas; aunque la concentración mínima bactericida es cuatro veces mayor que la concentración mínima inhibitoria, pierden actividad bactericida en niveles de pH bajos comparables a los que hay dentro de las células. No deben usarse en monoterapia ya que se presenta un alto índice de recaídas, pueden combinarse con doxiciclina o rifampicina.
- E) Trimetoprim (TMP) con sulfametoxazol (SMZ) o cotrimoxazol: se usa la combinación de estos dos quimioterapéuticos con una relación fija de 1:5 (80mgTMP/400mg SMZ), aunque *in vitro* posee una actividad superior a los demás antibióticos solos, se presentan recaídas, por lo tanto debe usarse en combinación con doxiciclina, rifampicina o estreptomina.

Tratamiento de brucelosis complicada

- F) Espondilitis: la cual es la principal complicación de brucelosis, se requiere de una terapia prolongada de 8 semanas o más con doxiciclina. El drenaje quirúrgico de abscesos se realiza de forma esporádica.
- G) Neurobrucelosis: debido a que se requieren concentraciones antibióticas elevadas en el líquido cerebro-espinal, y antimicrobianos que atraviesen la barrera hemato-encefálica, se recomienda el uso de rifampicina o cotrimoxazol en conjunto con la terapia estándar de doxiciclina y estreptomina por un periodo superior a las 6-8 semanas.

Endocarditis: se presenta en 1% de los casos puede resultar fatal, por lo que aparte del uso de quimioterapéuticos donde se puede utilizar doxiciclina más estreptomina o cotrimoxazol más rifampicina, por un tiempo mínimo de 8 semanas, quizá sea necesario el remplazo de las válvulas cardiacas quirúrgicamente.

H) Tratamiento durante la gestación

Durante esta etapa existen varios factores que impiden el uso de la terapia convencional contra *Brucella*; la capacidad del antimicrobiano de penetrar la barrera placentaria en concentraciones adecuadas, la toxicidad hacia al feto o la posible teratogénesis de algunos medicamentos. La gentamicina es una opción al igual que el cotrimoxazol y la rifampicina al menos 45 días.

I) Tratamiento en niños menores a 8 años

El uso de tetraciclinas está contraindicado debido a que lesionan el esmalte dental y afectan el crecimiento óseo. Se puede utilizar gentamicina, cotrimoxazol y rifampicina, sin embargo los fabricantes no recomiendan el uso de estos dos últimos en niños y en monoterapia se presentan recaídas. El trimetoprim con sulfametoxazol 8/40 mg/kg/día dos veces al día vía oral durante 6 semanas más estreptomina 30mg/kg/día una vez al día vía intramuscular por tres semanas o gentamicina 5mg/kg/día intramuscular o intravenosa 7-10 días, rifampicina 20mg/kg/día vía oral por 6 semanas (1, 2, 4, 18, 25, 26, 27).

Esquemas de tratamiento de brucelosis aprobados por la Norma Oficial Mexicana 022 con excepción de los esquemas alternos que no incluye la Norma.

Esquema	Medicamentos	Dosificación
A	Tetraciclina, tabletas o comprimidos	Tetraciclina 500 mg cada 6 horas por 21 días
	Estreptomina, frasco ampula de 1 g. Solución inyectable.	Estreptomina 1 g. intramuscular cada 24 horas por 21 días
B	Rifampicina tabletas, comprimidos o cápsulas 300 mg.	Adultos: 300 mg cada 8 horas, por 21 días. Niños: 20 mg/kg/día dividido en tres dosis, por 21 días.
	Trimetoprim con Sulfametoxazol, tabletas o comprimidos de 80/400 mg. Suspensión 40/80 mg en 5 ml.	Adultos: 160/800 mg cada 12 horas por 21 días. Niños: 8/40 mg/kg/día dividido en dos dosis por 21 días.
C	Doxiciclina, tabletas o cápsulas de 100 mg.	Adultos: Doxiciclina 200 mg, cada 24 horas por seis semanas. Niños: Doxiciclina 4-5 mg/kg/día, por seis semanas dividido en tres dosis
	Rifampicina tabletas, comprimidos o cápsulas 300 mg.	Adultos: 600 - 900 mg cada 24 horas, por 6 semanas. Niños: 20 mg/kg/día dividido en tres dosis, por 6 semanas.
Primer esquema alternativo	Ciprofloxacino, cápsulas o tabletas 250 mg	Ciprofloxacino 1500 mg por día, dividido en dos dosis, 750 mg cada 12 horas por 45 días
	Rifampicina tabletas, comprimidos o cápsulas 300 mg.	Rifampicina 300 mg cada 8 horas, por 45 días.
Segundo esquema alternativo	Levofloxacino, tabletas de 500 y 750 mg.	Levofloxacino 1500 mg, cada 24 horas por 45 días
	Rifampicina tabletas, comprimidos o cápsulas 300 mg.	Rifampicina 300 mg cada 8 horas, por 45 días.

Fig. 1. Tratamientos recomendados por la Secretaria de Salud en México (28).

Susceptibilidad antimicrobiana y asociación con mutaciones en *Brucella* spp.

Los ensayos *in vitro* muestran que *Brucella* es susceptible a los aminoglucósidos, las tetraciclinas, la rifampicina y las quinolonas, a concentraciones mínimas inhibitorias bajas, las cepas muestran variación en la susceptibilidad según su origen geográfico, sin embargo, existe un índice de recaídas con los quimioterapéuticos convencionales como la tetraciclina, aminoglucósidos, o sulfonamidas. También existe una desventaja que comparten la rifampicina y las fluoroquinolonas y es el rápido surgimiento de bacterias resistentes a estos fármacos. Recientemente, se ha reportado el incremento de la resistencia de *Brucella* spp. al cotrimoxazol (1, 28, 29) y a las quinolonas(30, 31, 32, 33). Existe una clara asociación entre la resistencia a rifampicina y la modificación del objetivo o blanco del antibiótico que involucra mutaciones específicas dentro del gen *rpoB*, donde está codificada la subunidad β de la ARN polimerasa (ARNP) ADN-dependiente. Esta relación se ha observado *in vitro* en cepas de *Brucella* spp. mutantes, donde se ha notado la correlación entre mutaciones específicas en gen *rpoB* y susceptibilidad reducida a rifampicina que al ser uno de los antibióticos de amplio espectro más potentes, es uno de los componentes efectivos en las terapias multifármacos para el tratamiento de la brucelosis humana. Se ha reportado que la adición de rifampicina a medios de cultivo de *B. abortus* tiende a generar cepas rugosas menos virulentas y resistentes al fármaco, por lo tanto se utilizó este antimicrobiano para desarrollar una cepa vacunal rugosa, estable y poco virulenta de *B. abortus*, a partir de la cepa lisa virulenta 2308, denominada

RB51 (34). Esta vacuna induce una adecuada respuesta inmune mediada por células y no interfiere con las pruebas serológicas estándar utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad. La rifampicina tiene como blanco a la subunidad β de la ARN polimerasa ADN-dependiente (ARNP) en procariontes. La actividad bactericida de la rifampicina se deriva de su alta afinidad e inhibición de la ARNP bloqueando la vía de elongación del ARN transcrito al final de 5'. Las sustituciones de aminoácidos en el complejo de unión de rifampicina del patógeno le confieren resistencia al antibiótico, a través de pequeñas distorsiones estructurales de la proteína (35). Se han caracterizado varias mutaciones dentro de la subunidad β de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, y *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a rifampicina (Rif^r) (36, 37). En un trabajo previo se identificaron mutaciones en *rpoB* asociadas al fenotipo resistente Rif^r en la cepa vacunal rugosa RB51 y en 20 clones estables Rif^r derivadas de dos aislamientos de *B. melitensis* sensibles a rifampicina Rif^s (35). La región de codificación de *rpoB* comprende 4, 134 pares de bases (bp) y dentro de ésta hay dos regiones denominadas zonas o puntos calientes (*hot regions*) donde se ha identificado que se presentan las mutaciones denominadas; región 5' final localizada entre los codones 118-240 y región central entre los codones 473 a 606 de *rpoB* (31, 35).

Las quinolonas poseen la capacidad de penetrar en las células eucariotas, presentan alta biodisponibilidad por vía oral, en general son, bien toleradas, aunque están contraindicadas en mujeres embarazadas y niños pequeños, *in vitro* muestran concentraciones mínimas inhibitorias bajas (MICs); se consideraron como una alternativa promisorio en el tratamiento de la brucelosis humana, sin

embargo, el uso de estos fármacos como terapia única en pacientes con brucelosis lleva con frecuencia a recaídas y fallas terapéuticas, no sólo debidas a los quimioterapéuticos sino también a las personas que no llevan a cabo el tratamiento de forma puntual. La combinación de fluoroquinolonas con otro antibiótico (especialmente rifampicina) no es más eficiente que los regímenes antibióticos actualmente disponibles, se ha observado un alto número de recaídas en la terapia con ciprofloxacino y puede haber desarrollo de resistencia, con la consecuente resistencia cruzada hacia otros miembros de la familia, así que no están recomendadas como primera opción en el tratamiento de la enfermedad (32, 33). Se han propuesto varias hipótesis para explicar las discrepancias en la actividad *in vitro* en *in vivo* de las quinolonas. Las fluoroquinolonas no tienen actividad bactericida contra *Brucella* spp. ya sea *in vitro* o *in vivo*, o en modelos animales, por otra parte, *Brucella* spp. se multiplica en fagosomas que se acidifican, tanto en células fagocíticas profesionales como no profesionales, lo cual reduce la acción de éstos fármacos, que aunque penetran a la célula, su actividad decrece considerablemente en pH ácido, finalmente, *in vivo* se han mencionado posibles cepas de *Brucella* spp. resistentes a las quinolonas (31, 32, 33). *In vitro*, solo se han reportado pequeñas variaciones entre varias cepas de *Brucella* en MICs utilizando fluoroquinolonas. Éstos fármacos actúan como inhibidores de la las ADN topoisomerasas bacterianas, la ADN girasa y la topoisomerasa IV, son dos enzimas que catalizan los cambios topológicos necesarios para la replicación del ADN y la transcripción. Se han descrito dos mecanismos principales de resistencia a las fluoroquinolonas: a) Mutaciones en los genes de la topoisomerasa II que codifican para la ADN girasa y la topoisomerasa tipo IV,

blancos principales para la acción de las fluoroquinolonas y, b) Sobreexpresión de bombas de eflujo que reducen la acumulación del fármaco dentro de la bacteria. Usualmente el blanco primario para las fluoroquinolonas en las bacterias Gram negativas es la ADN girasa, mientras que en las Gram positivas es la topoisomerasa IV. La resistencia a las fluoroquinolonas en las Gram negativas surge frecuentemente a través de mutaciones en la ADN girasa codificada en el gen *gyrA*, especialmente en una región caliente correspondiente a los nucleótidos 199-318 de la secuencia de *gyrA* de *Escherichia coli* (codificando los aminoácidos 67-106 de la secuencia proteica GyrA de *E. coli*). Esta región específica de 41 aminoácidos dentro de una porción N-terminal, es referida como la región determinante de resistencia a quinolonas, por sus siglas en inglés (*QRDR*), la cual está cerca del supuesto sitio activo y al parecer es el sitio de interacción entre la subunidad A de la ADN girasa y las quinolonas. Se ha determinado una estructura de alta resolución para esta región. El gen *parC* es el gen homólogo que codifica para la topoisomerasa IV. Las mutaciones en la región *QRDR* de este gen pueden ocurrir aunque de forma menos frecuente y quizá expliquen la resistencia a quinolonas. En trabajos recientes se ha tratado de determinar cuáles son los genes y las moléculas involucradas en la resistencia antimicrobiana de *B. melitensis* y *B. abortus* tales como: *gyrA/gyrB/parC/parE*, mediante la generación *in vitro* de mutaciones y una detección molecular posterior de los genes o moléculas involucrados en esta resistencia a fluoroquinolonas, en estos estudios se han encontrado las zonas calientes de los genes (*QRDRs*): *quinolone resistance-determining regions*) que le confieren resistencia a este patógeno,

principalmente mutaciones en *gyrA* y quizá en bombas de eflujo *NorMI* y *NorMII*.
(31, 32, 33, 34, 38, 39, 40).

JUSTIFICACIÓN

La brucelosis es un problema de salud pública que ocasiona pérdidas económicas en la industria pecuaria y afecciones en quienes la padecen. Se han observado altos índices de recidivas en pacientes brucelosos aun cuando el tratamiento es el indicado; una de las posibles explicaciones de este fenómeno sería la presencia de resistencia a quimioterapéuticos generada por mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* y *rpoB* que modifican la susceptibilidad del patógeno a los antimicrobianos como las quinolonas, las cuales se utilizan como terapia alternativa y a la rifampicina que se emplea comúnmente en el tratamiento de la enfermedad en humanos, ya que en animales de producción no se da tratamiento; por lo cual es necesario determinar si hay mutaciones presentes que afectan la susceptibilidad de *Brucella* spp. a éstos quimioterapéuticos, en aislamientos obtenidos en nuestro país, en diferentes épocas, tanto de origen humano como animal.

HIPÓTESIS

Las mutaciones dentro de las zonas *QRDRs* de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* y *rpoB* de *Brucella* spp. permiten asociar al patógeno a resistencia hacia quinolonas y rifampicina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de mutaciones en las regiones denominadas *QRDRs* (*Quinolone Resistance-Determining Regions*) de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* y en la región central y terminal del gen *rpoB* en los aislamientos mexicanos de *Brucella melitensis* y *Brucella abortus*.

Objetivos específicos

- Amplificar las regiones QRDRs de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* y *rpoB* de *Brucella* spp. mediante la PCR punto final.
- Secuenciar los productos de PCR obtenidos para evidenciar mutaciones en estas regiones genéticas.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de los antimicrobianos rifampicina y fluoroquinolonas, utilizados en el tratamiento de la enfermedad en humanos, para las diferentes cepas de *Brucella* spp.
- Discutir la relación de la susceptibilidad a quimioterapéuticos con la presencia o ausencia de mutaciones puntuales en los diferentes genes seleccionados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas y aislamientos utilizados

Se obtuvieron las cepas de referencia de *B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16M y *B. abortus* RB51, del cepario de la FMVZ-UNAM y 38 aislamientos de *Brucella* spp. identificados mediante serología, pruebas bioquímicas y PCR, de éstos 16 eran *B. abortus* de origen bovino, 2 cepas *B. melitensis* de caprinos, 2 *B. abortus* aisladas de cabras y 16 de *B. melitensis* aislados de humanos. Los aislamientos con los que se trabajó fueron acumulados a lo largo del tiempo en el laboratorio de brucelosis de la FMVZ-UNAM por lo cual no se tienen datos clínicos precisos.

Cultivo de las cepas

Las cepas de referencia y los 38 aislamientos fueron crecidos por duplicado en agar *Brucella* por 48 horas a 37°C con 5% de CO₂ en el laboratorio de bioseguridad de la FMVZ-UNAM. Todas las cepas bacterianas fueron almacenadas en crio-tubos con medio de mantenimiento hecho a base de caldo nutritivo y glicerol al 10% como crioprotector, y congeladas a -80°C para su uso posterior.

Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN de todas las cepas y aislamientos mediante el uso de un *kit* comercial *Insta Gene Matrix* (BIORAD): se tomaron 12 colonias bacterianas de cada aislamiento las cuales se diluyeron en 200 µl de agua destilada estéril, posteriormente se centrifugaron las muestras a 8050 X g/1min, se

desecharon los sobrenadantes y a los *pellets* se les añadió 100 µl del producto comercial, los tubos se incubaron a 56°C durante 30 min, después se homogeneizaron las muestras durante 10 segundos en el vortex, los tubos se incubaron nuevamente a 100°C durante 8 min, se homogeneizaron durante 10 seg. en el vortex, finalmente los tubos se centrifugaron 3 min a 8050 X g, se colectaron los sobrenadantes que contenían el ADN de cada aislamiento para la posterior realización de la PCR.

Estandarización de la PCR y purificación de los productos

Los iniciadores para los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* y *rpoB* fueron obtenidos de reportes previos, y se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (32, 35).

El tamaño de cada amplicón para cada par de iniciadores utilizados fue obtenido de la base de datos del *GenBank* para corroborar los datos con los de la literatura citada, utilizando las secuencias de cada iniciador y buscándolas con el programa *BLAST alignment*; así que para la región caliente del gen *gyrA* se encontró que se amplificaba un producto de 293 bp, en *gyrB* un producto de 349 bp, en *parC* un producto de 429 bp, en *parE* un producto de 473 bp, en *rpoB1* región caliente un producto de 366 bp y en *rpoB2* región central un producto de 401 bp (32, 33, 35).

Las PCR fueron estandarizadas para cada *QRDR* de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* y región central y terminal de *rpoB* en reacciones de 50µl con las siguientes concentraciones de cada reactivo por reacción: mezcla de dNTPs 10mM (marca),

magnesio 1.5mM, iniciador forward 10pmol/μl, iniciador reverse 10pmol/μl, Taq Platinum (*Invitrogen*) polimerasa 1U, buffer 1x, ADN 500ng/μl, agua 20.8μl.

Después de haber sido estandarizadas las condiciones óptimas de amplificación, se utilizó la polimerasa PFX la cual tiene una mayor fidelidad (10-100x).

Las constantes de la PCR fueron las siguientes 94°C por 5 min, 94°C por 1 min, 63°C para *gyrA*, 65°C para *gyrB*, 60°C para *parC*, 67°C para *parE*, 60°C para *rpoB1* región caliente, 62°C para *rpoB2* región central, 72°C durante 1:30 min y finalmente 72°C por 7 min, todas las PCRs fueron sometidas a 35 ciclos.

Se amplificaron las regiones *QRDRs* de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* y las regiones central y terminal de *rpoB* mediante el uso de la PCR de punto final con el equipo PCR Express Thermo hybrid con los siguientes iniciadores: *gyrA* (forward 5' ACGGCCTGAAGCCTGTGCAT 3'y reverse 5' CGACAGGAGGGATTCCGTGA 3'), *parC* (forward 5' TCGGCTCTTGAGGAACGTTA 3' y reverse 5'CGATGGGTTCTTCGTCTTCC 3'), *gyrB* (forward 5' GTTGTCGAGAAGGTCATTCAGG 3' y reverse 5' GCGTTGAAGCCGTGCGTTTC 3'), *parE* (forward 5' AGGTGCGGAATTGTTTCATCGTGG 3'y reverse 5' CCAAGCCCCTTGAAACGTCC 3') (16) y *rpoB* (forward 5' TGCGAAGTCCATCAAGGACAT 3' y reverse 5'ACGGGTATAGGTGACAGTCTTG 3'), *rpoB* región central (forward 5'AGTATCGCGTCGGTCTGCTCCGC 3'y reverse 5'ATCGACAACCTTGCGATACG 3'); Posteriormente se realizaron 4 repeticiones de la PCR para cada cepa y aislamiento utilizando polimerasa PFU,

para obtener una gran cantidad de producto de PCR (200µl), el cual se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a un voltaje de 40 mv, las bandas fueron seccionadas del gel con un bisturí para su posterior purificación por un método de columna (*QIAquick PCR Purification Kit*). Los productos de PCR de todas las cepas de referencia y aislamientos, se almacenaron a -20°C para su posterior secuenciación.

Secuenciación

Los productos de la PCR de las muestras de origen animal y humano fueron enviadas al Instituto de Biotecnología IBT-UNAM para su secuenciación, la cual se realiza mediante el método de Sanger utilizando didesoxiterminadores fluorescentes con un secuenciador automático de DNA (*Applied Biosystems*, modelo 3130xl) de 16 capilares en los cuales se realizan las separaciones electroforéticas.

Análisis bioinformático de las secuencias

Después de la secuenciación se realizó la comparación entre las secuencias obtenidas de nuestros aislamientos y las ATCC de *Brucella* spp. reportadas en la base de datos del *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*), mediante el uso del programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), para verificar si nuestras secuencias coincidían con las de *Brucella melitensis* y *B. abortus* ATCC ya reportadas, y si correspondían con las zonas de los genes que amplificamos; posteriormente se realizó la traducción de las secuencias a aminoácidos y se

realizó el alineamiento a este nivel mediante el programa Vector NTI en el Hospital General Manuel Gea González (41).

Pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida

Para determinar la cantidad de bacterias presentes en el cultivo original y realizar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Bactericida (MBC) mediante el método de microdilución en caldo, se realizó el conteo de colonias bacterianas donde las cepas y aislamientos de *Brucella* fueron crecidas en 50ml de caldo tripticasa-soya (TSA) durante 48 horas a 37°C, se realizaron diluciones seriadas en una placa de 96 pozos con un amortiguador de fosfatos (PBS), posteriormente cada dilución de cada cepa ATCC fue sembrada en agar TSA por triplicado, a 37°C durante 48 horas y se determinó la cantidad de bacterias presentes, posteriormente se obtuvieron alícuotas de 1ml las cuales se ajustaron a una concentración de 5×10^5 que es el estándar para realizar los MICs, también se utilizó el estándar de *Mc Farland* 0.5 para la preparación de la concentración bacteriana. Los antimicrobianos fueron disueltos según las recomendaciones del fabricante y tomando en cuenta factores como solubilidad, potencia, fecha de expiración, estabilidad en solución y condiciones de almacenaje (referencia). Para la preparación de la solución base de cada antimicrobiano se utilizó la siguiente fórmula: $1000/P \times V \times C = W$, donde P= Potencia dada por el fabricante ($\mu\text{g}/\text{mg}$), V= volumen requerido (mL), C= concentración final de la solución (en múltiplos de 1000) (mg/L), y W= peso del antimicrobiano a ser disuelto en volumen V (mL). La concentración base de todos los antibióticos fue de

10,000 mg/L. La rifampicina fue disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO) y agua destilada estéril, para la disolución de las quinolonas se utilizó agua destilada estéril e hidróxido de sodio a una concentración base de 10,000mg/L para posteriormente poder diluirse con agua estéril en concentraciones requeridas para los MICs. Las diluciones utilizadas para los MICs fueron dobles (128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 Y 0.06 mg/L) según lo marca el protocolo y se colocaron 50µl de cada dilución (al doble 256, 128, 64, sucesivamente para obtener una concentración de 128, 64, 32, etc. Al diluir con el MHB con la cepa) de rifampicina (RIF), ácido nalidíxico (AN), norfloxacino (NFX), ofloxacino (OFX), ciprofloxacino (CPX), levofloxavino (LVX) y moxifloxacino (MFX) en una placa de 96 pozos, después se agregaron 50µl de cada cepa ATCC y aislamiento humano y animal diluidos en caldo Mueller-Hinton (MHB) a 5×10^5 , se realizó la observación de la placa para determinar visualmente la concentración del antibiótico a la que ya no había turbidez después de 48 horas de incubación a 37°C y poder obtener la MIC de cada aislamiento. Posteriormente se tomaron 20µl de cada dilución de bacterias y antibióticos de las placas de 96 pozos, se sembraron en agar TSA para determinar la MBC de cada cepa y aislamiento de *Brucella* y se observó a que concentración del antimicrobiano había ausencia de crecimiento bacteriano (42, 43). Se utilizaron las cepas ATCC de *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus aureus* 29213 para estandarizar las pruebas de microdilución en caldo y sus respectivos puntos de corte reportados en *EUCAST*; se incluyeron también los puntos de corte de *Haemophilus influenzae* por ser una bacteria de crecimiento lento como *Brucella* spp. para poder realizar las comparaciones, ya que no existen oficialmente datos para *Brucella* spp. (44).

RESULTADOS

Amplificación de las regiones *QRDRs* de *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* y región central y terminal de *rpoB*.

Para el gen *gyrA* se obtuvo un producto de 293pb, en *gyrB* se amplificó un producto de 350pb, en *parC* se obtuvo un producto de 429pb, del gen *parE* se amplificaron 473pb, en la región central de *rpoB* se amplificaron 366pb y para la región terminal de *rpoB* se obtuvo un producto de 401 pb, como se observa en las figuras 2 a 7.



Figura.2. Amplificación de *gyrA* de *B. melitensis*, 1H-11H: aislamientos de origen humano. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 100 pb.

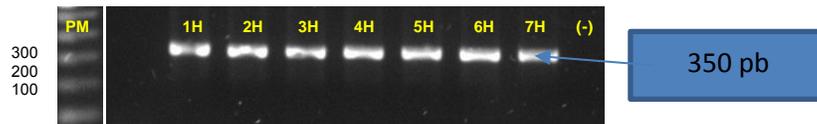


Figura.3. Amplificación de *gyrB* de *B. melitensis*, 1H-7H: aislamientos de origen humano. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 100 pb.

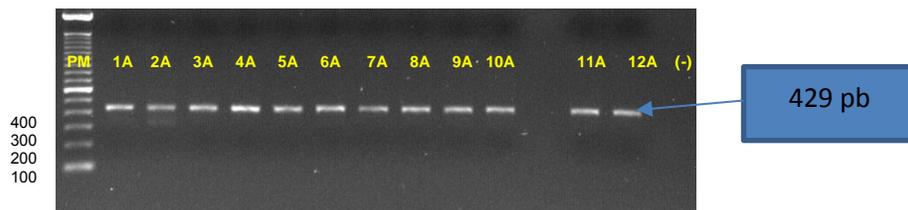


Figura. 4. Amplificación de *parC* de *B. abortus*, 1A- 12A: aislamientos de origen animal. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 100 pb.

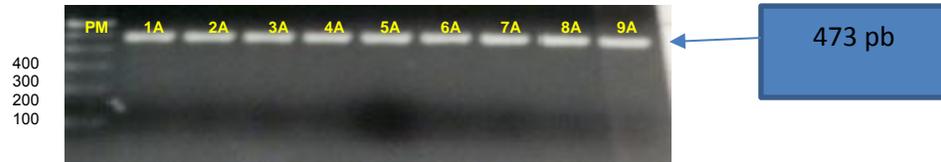


Figura. 5. Amplificación de *parE* de *B. abortus*, 1A-9A: aislamientos de origen animal. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 100 pb.

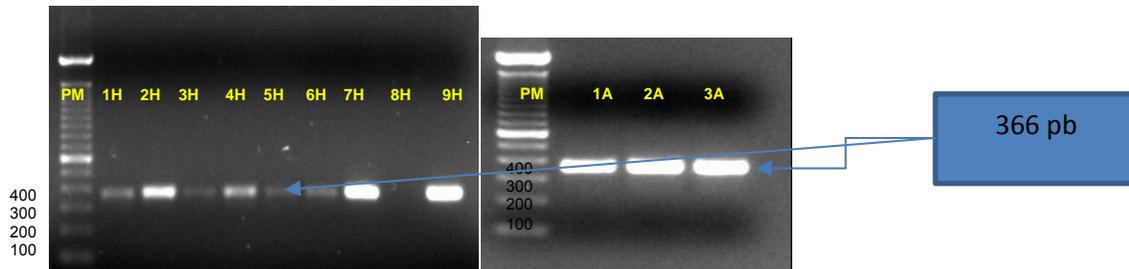


Figura. 6. Amplificación de *rpoB1* región caliente de *B. melitensis* 1H-9H: aislamientos de origen humano (imagen de la izquierda) y de *B. abortus*, 1A-3A: aislamientos de origen animal (imagen derecha). Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 100 pb.



Figura. 7. Amplificación de *rpoB2* región central de *B. abortus*, 1A-9A: aislamientos de origen animal. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 100 pb.

Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR de *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *rpoB1* y *rpoB2* de los aislamientos de origen humano y animal fueron purificados a partir de gel, el cual se sometió a electroforesis y posteriormente se seccionó la banda por el tamaño correspondiente a cada gen, la muestra se colocó en columnas de la marca comercial Qiagen (*QIAquick PCR Purification Kit*) para el proceso de purificación. Todas las muestras se sometieron a electroforesis nuevamente para comprobar la existencia del producto purificado, ver ejemplo en las figuras 8 y 9.



Figura. 8. 200 μ l de Producto de PCR sin purificar de *rpoB* región terminal de *B. abortus* 1A: aislamiento de origen animal, para posterior purificación. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 100 pb.

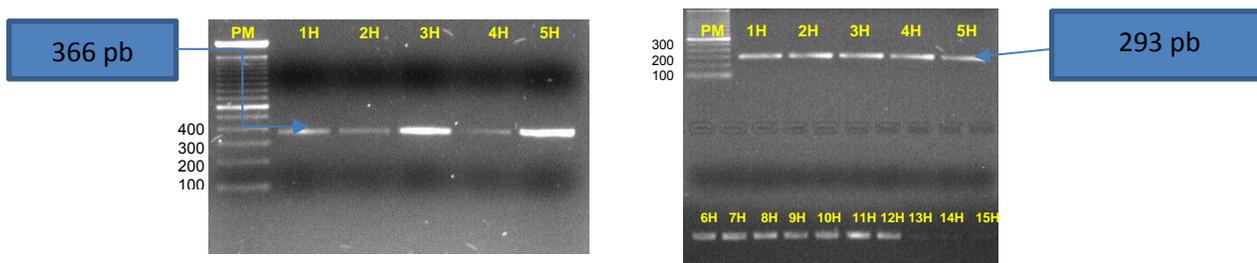


Figura. 9. Productos de PCR purificados correspondientes a los genes *rpoB1* región caliente de *B. melitensis* 1H-5H: aislamientos de origen humano y *gyrA* de *Brucella melitensis* 1H-15H: aislamientos de origen humano. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 100 pb.

Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de GyrA, GyrB, ParC, ParE, RpoB1 y RpoB2

Una vez purificados los productos de la PCR y con las secuencias reportadas de todas las muestras de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *rpoB1* y *rpoB2*; se realizaron los alineamientos a nivel de nucleótidos, con las secuencias obtenidas en el *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, mediante el programa bioinformático *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* para confirmar que pertenecen al género *Brucella*, y después con las regiones *QRDRs* reportadas de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, y regiones central y terminal de *rpoB1* y *rpoB2* de *Brucella*. Una vez que se comprobó que todas las secuencias correspondían con el género *Brucella* se tradujeron en aminoácidos utilizando el mismo programa, para su posterior análisis con el programa Vector NTI, donde se compararon con la secuencias de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Brucella melitensis* 16M, *Brucella abortus*, clonas mutantes de *B. abortus* reportadas en trabajos previos (32, 33) y demostrar la presencia o ausencia de variaciones en la secuencias de aminoácidos correspondientes a una mutación. En las tablas posteriores se observan los resultados de los alineamientos obtenidos con el programa Vector NTI de las secuencias de aminoácidos de GyrA, GyrB, ParC, ParE, RpoB1 región final y RpoB2 región central; se observan polimorfismos silenciosos y también no silenciosos o no sinónimos en los resultados mostrados en las siguientes tablas.

correspondiente a 106 de *E. coli* en el cual se han reportado sustituciones de Gln106Arg en aves, en las secuencias 7H y 14H hubo un cambio en Ser81Thr, y en la 9H cambió Ser81Ala correspondientes a 97 de *E.coli*, en 14H hubo dos cambios más en Met104Ile y Thr107Ser correspondientes a 120 y 123 de *E.coli*, en la secuencia 15H hubo sustituciones en Tyr47Leu, Arg48Pro, Lys49Gln, Val54Leu, Gly55Val, Arg56Glu, Val57Phe, Met58Trp correspondientes a 63, 64, 65, 70, 71, 72, 73 y 74 respectivamente, del sistema numérico de *E. coli*; ver figura 10.

GyrB

		391	426	447	483
<i>E. coli</i> 25922		MTRKSGALDAGLPGKLDACQERDPAKSE	LYVEGDSAGGSAKQGRNRKNOAILPLR	GKILNVEARFDKMISSQEV	TLITALGCGIGDE
<i>B. abortus</i>	1 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	2 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	3 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	4 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	5 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	6 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	7 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	8 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	9 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	10 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	11 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	12 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	13 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	14 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	15 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	16 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	17 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	18 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	19 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	20 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	21 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	22 A	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
<i>B. melitensis</i>	1 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	2 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	3 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	4 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	5 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	6 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	7 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	8 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	9 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	10 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	11 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	12 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	13 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	14 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	15 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT
	16 H	DITRKSNSLVS	LPGKLADQERDPAKSE	FIIVEGDSAGGSAKSGRSRQ	NOAILPLRKGILNVERVRFDRMISSDOVGT

Fig. 11. Variación de aminoácidos en el gen *gyrB*, se observa que las secuencias son idénticas por lo que no se encontraron mutaciones en este gen.

Dentro de las regiones *QRDR* del gen *gyrB* no se encontraron sustituciones de aminoácidos en las posiciones 426 y 447 de *E. coli* donde se han reportado

cambios (45), ni en ningún otro sitio de las secuencias, tanto de animales como de humanos, figura 11.

ParC

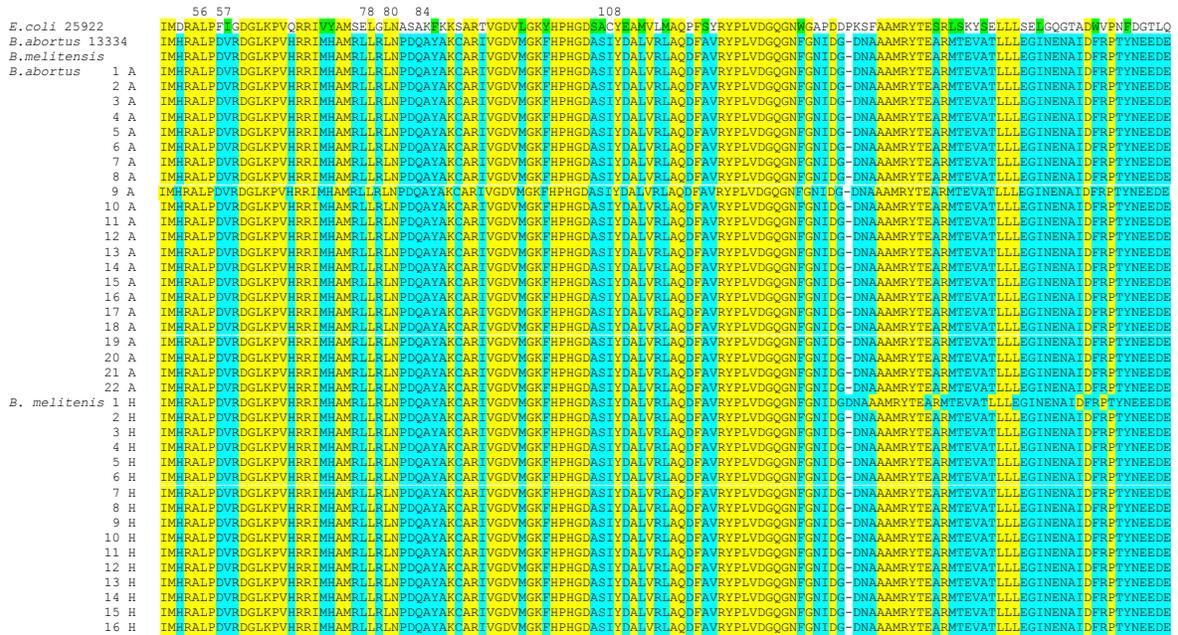


Fig. 12. Variación de aminoácidos en el gen *parC*; no se observan diferencias entre las secuencias.

En las secuencias de ParC no se encontró variación de aminoácidos, como se observa en la figura 12 donde las secuencias son idénticas a las de referencia tanto en las muestras de humanos como en las de animales.

ParE

E. coli 25922

	444	458	475	529														
	GGSAKQARD	EYQAT	PLRKGKILN	TWEVSS	ELASQ	EHDSVA	IG	IDPDSDDL	S-Q	LRYG	C	ADADS	DGLHIA	LLCAL	FVKHFRAL	HGHVMA	PPLYR	DLG
16M	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
1 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
2 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
3 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
4 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
5 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
6 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
7 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
8 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
9 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
10 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
11 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
12 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
13 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
14 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
15 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
16 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
17 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
18 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
19 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
20 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
21 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
22 A	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
1 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
2 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
3 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
4 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
5 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
6 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
7 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
8 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
9 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
10 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
11 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
12 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
13 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
14 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
15 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						
16 H	GGSAKQARNRANQA	ILPLRKGKILN	VASAGREKLTANQ	QIADLVQAL	GGCTRKNYREDD	LDYDRVIVMT	DADVDG	AHIASLLIT	FFYQEMPEL	IRNGHLY	LAVPPLYR	LSQG						

Fig. 13. Variación de aminoácidos en el gen *parE*; en estas secuencias tampoco hubo sustitución de aminoácidos.

Según el análisis de las secuencias de *ParE* no hubo sustitución de aminoácidos tanto en las muestras humanas como animales en las regiones *QRDRs* que se amplificaron, ya que son idénticas a la de *B. melitensis* 16M, figura 13.

RpoB1 región final 5'

	132	139	154
<i>B. melitensis</i>	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV	IPYRGSWLDIEFDSKDIVYARIDRRRKLPA
<i>B. melitensis</i> clona 14	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV	IPYRGSWLDIEFDSKDIVYARIDRRRKLPA
<i>B. abortus</i>	1 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	2 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	3 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	4 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	5 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	7 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	8 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	9 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	10 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	11 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	13 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	14 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	15 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	16 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	17 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	18 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	19 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	20 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	21 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	22 A	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	1 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	2 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	3 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	4 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	5 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	7 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	8 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	9 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	10 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	11 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	12 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	13 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	14 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	15 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV
	16 H	MGDPLMTDNGTFIVNGTERIVSQMHRSPGV	FDHDKGKTHSSGKLLFAARV

Fig. 14. Variación de aminoácidos en RpoB1 región terminal donde se observan sustituciones en la secuencia 19A en la posición 132 y en la 22A en la posición 139, aunque no corresponden con la mutación reportada en Val154Phe de *B. melitensis* clona 14 (35).

Dentro de RpoB1 región terminal se observaron variaciones de aminoácidos en la secuencia 19A en la posición Met132Leu y en la secuencia 22A se observó otra sustitución en la posición Thr139Ala. En *Brucella* se ha descrito una mutación que afectan la sensibilidad a la rifampicina en la posición Val154Phe, como se observa en la figura 14, donde la clona 14 de *B. melitensis* que ha sido reportada, es resistente (35).

RpoB2 región central

	526	536	539	541	574	
<i>B. melitensis</i> 16M	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
<i>B. abortus</i> 2308	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
<i>B. abortus</i> RB51	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
<i>B. melitensis</i> clona 9	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
<i>B. melitensis</i> clona 11	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
<i>B. melitensis</i> clona 15	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
<i>B. melitensis</i> clona 17	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
<i>B. melitensis</i> clona 18	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
<i>B. melitensis</i> clona 19	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
<i>B. abortus</i>	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
1 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
2 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
3 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
4 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
5 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
6 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
7 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
8 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
9 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
10 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
11 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
12 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
13 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
14 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
15 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
16 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
17 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
18 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
19 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
20 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
21 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
22 A	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
<i>B. melitensis</i>	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
1 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
2 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
3 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
4 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
5 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
6 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
7 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
8 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
9 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
10 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
11 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
12 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
13 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
14 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
15 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE
16 H	DLINAKPAAAAVREFPFGS	SQLSOFMDQTNPLSEIT	HKRRLSALGPGGL	TRERAGFEVRD	VHPHYGRICPIET	EGPNIGLINSLATFARVNKYGFIESE

Fig. 15. Variación de aminoácidos en el gen *rpoB2* región central

Con respecto a la secuencias de RpoB2 región central, se encontró que el aislamiento 2A presentó varios cambios en diversas posiciones, el primer cambio fue en la posición Gln523Ala, después en Phe524Val, se observaron otros en Asp526Gly, Gln527pro y Thr528Asp. La mutación en la posición 526 ya ha sido reportada y descrita en cepas resistentes a rifampicina en trabajos anteriores, figura 15 (35).

Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida

Se realizaron las pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC), de los aislamientos de origen humano y animal con el fin de asociar el fenotipo resistente a quinolonas y rifampicina con mutaciones en los genes previamente descritos. Se utilizaron las cepas ATCC de *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus aureus* 29213 para estandarizar las MICs mediante el método de microdilución en caldo con sus respectivos puntos de corte y los datos de *EUCAST* sobre *Haemophilus influenzae* también con sus puntos de corte para comparar los valores obtenidos con nuestros datos de *Brucella*, como punto de referencia para nuestro ensayo, debido a que no hay datos sobre sensibilidad o resistencia descritos oficialmente para *Brucella* spp. (42, 43, 44).

Tabla 1. Puntos de corte obtenidos de la base de datos de *EUCAST* de las cepas de referencia.

Antimicrobianos	Rifampicina		Norfloxacino		Ácido nalidixico		Levofloxacino		Ofloxacino		Moxifloxacino		Ciprofloxacino	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
Punto de corte de la MIC (mg/L)														
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	0.5	1	NA	NA	1	2	0.5	1	0.5	1	0.5	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	NA	NA	1	2	-	-	-	-	0.5	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0.06	0.5	NA	NA	NA	NA	1	2	1	1	0.5	1	1	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	1	-	-	NA	NA	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Donde S ≤: sensible si el valor es menor o igual, R >: resistente si el valor es mayor al mostrado, NA= no aplica y - significa que no se recomienda utilizar el antimicrobiano para el ensayo.

En la tabla 1 se muestran los puntos de corte en mg/L obtenidos de la *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (EUCAST) donde se observan los valores de sensibilidad **S** y resistencia **R** de las cepas ATCC utilizadas como punto de referencia para este trabajo, un valor intermedio **I**, sería si se encuentra entre el rango de sensibilidad y resistencia, por ejemplo : **I** 0.125 0.5; si el rango va de: **S** \leq 0.06 a **R** $>$ 0.5 mg/L.

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (mg/L) de las cepas de referencia donde observamos los valores obtenidos al realizar la MIC por el método de microdilución en caldo.

Antimicrobianos	Rifampicina	Norfloxacino	Ácido nalidixico	Levofloxacino	Ofloxacino	Moxifloxacino	Ciprofloxacino
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1-2	-	8-16	-	1-2	-	1-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	64-128	2-8	128	-	2-4	-	2-4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	2-4	2-4	0.5-1	0.5-1	0.5-1	2-4

En la tabla 2 se observan los valores en mg/L obtenidos al realizar la MIC de las cepas ATCC, *E. coli* 25922 mostró valores de 1-2 mg/L para CPX y OFX, para NFX, MFX y LVX no se encontró crecimiento en ninguna dilución, RIF y AN mostraron valores de MIC resistentes, que sin embargo no son utilizados regularmente para pruebas de sensibilidad en *E. coli*, *P. aeruginosa* 27853 mostró para CPX una MIC de 2-4 mg/L, LVX y MFX no hubo datos, las MICs de RIF y AN

se observan en la tabla 2, para *S. aureus* 29213 se observan MICs de 0.5-1 mg/L en OFX, MFX y LVX, para CPX, AN y NFX de 2-4 mg/L, y en RIF no hubo datos, algunos los valores obtenidos en nuestro ensayo son ligeramente superiores a los reportados en EUCAST como se puede observaren las tablas 1 y 2.

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (mg/L) de cepas de *Brucella* de referencia.

Antimicrobianos	Rifampicina	Norfloxacino	Ácido nalidíxico	Levofloxacino	Ciprofloxacino	Ofloxacino	Moxifloxacino
<i>B. abortus</i> 2308	1-2	0.5-1	64-128	0.5-1	0.5-1	0.5-1	0.5-1
<i>B. abortus</i> S19	1-2	0.5-1	64-128	0.5-1	0.5-1	0.5-1	0.5-1
<i>B. abortus</i> RB51	128	0.5-1	64-128	0.5-1	0.5-1	0.5-1	0.5-1
<i>B. melitensis</i> 16M	2-4	0.5-1	64-128	1-2	1-2	1-2	1-2
<i>B. melitensis</i> Rev-1	0.5-1	0.5-1	64-128	1-2	1-2	1-2	1-2
<i>B. melitensis</i> 133	16-32	0.5-1	64-128	2-4	2-4	2-4	2-4
<i>B. canis</i> 666	4-8	0.5-1	128	1-2	1-2	1-2	1-2
<i>B. suis</i> 1330	(-)	0.5-1	64-128	0.5-1	0.5-1	0.5-1	0.5-1

Las MICs obtenidas para las cepas de referencia de *Brucella* muestran valores ligeramente superiores al compararlos con los datos obtenidos de *EUCAST*. Al comparar con las MICs de las cepas de referencia de *E. coli* 25922, *P. aeruginosa* 27853 y *S. aureus* 29213, los valores son muy similares aunque la especie bacteriana no sea la misma.

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria (mg/L) de los aislamientos de origen humano.

Antimicrobianos <i>B. melitensis</i>	Rifampicina	Norfloxacino	Ácido nalidíxico	Levofloxacino	Ciprofloxacino	Moxifloxacino	Ofloxacino
1H	4-8	4-8	64-128	0.5-2	0.5-1	1-2	1-2
2H	4-8	4-8	64-128	0.5-4	0.5-1	1-2	1-2
3H	4-8	8-16	64-128	0.25-4	0.5-1	1-2	1-2
4H	4-16	4-8	64-128	0.25-4	0.5-1	2-4	1-2
5H	4-8	4-8	64-128	0.25-4	1-2	1-2	1-2
6H	4-16	4-8	64-128	0.25-4	0.5-1	1-2	1-2
7H	4-16	4-8	64-128	0.25-4	1-2	2-4	0.5-1
8H	4-16	4-8	64-128	0.25-4	1-2	2-4	2-4
9H	4-8	4-8	64-128	0.25-4	0.5-1	2-4	1-2
10H	4-8	0.5-4	64-128	0.25-4	2-4	0.5-1	2-4
11H	2-4	4-8	64-128	0.25-4	1-2	0.5-1	2-4
12H	2-8	4-8	64-128	0.25-4	2-4	1-2	2-4
13H	4-8	4-8	64-128	0.5-4	2-4	0.5-1	1-2
14H	2-8	4-8	64-128	0.5-4	0.12-0.25	1-2	1-2
15H	64-128	4-8	64-128	0.5-4	2-4	8-16	8-16
16H	64-128	4-8	16-64	0.25-4	2-4	2-4	1-2

Debido a que no existen puntos de corte reportados oficialmente para *Brucella* spp. se compararon los resultados obtenidos con los valores de las cepas de referencia de *Brucella* y con los datos de las cepas ATCC de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Haemophilus Influenzae*. En la tabla 3 se observan las MICs para los aislamientos de origen humano en mg/L; los valores de MIC resistentes se observan en AN (*Brucella* spp. es resistente a este antibiótico) donde las muestras 1H a 15H presentan una MIC de 64-128mg/L, con excepción de 16H con 16-64mg/L. Los aislamientos 1H a 14H mostraron MICs en un rango de 2-16 mg/L, 15H y 16H mostraron MICs de 64-128 mg/L para RIF, por lo cual estas dos últimas se consideraron resistentes al antibiótico, para NFX las MICs de todos los aislamientos estuvo en el rango de 4-8 mg/L con excepción de 3H que

fue de 8-16 mg/L y 10H de 0.5-4 mg/L. Todos los aislamientos humanos mostraron MICs superiores a las observadas en la tabla 2 de las cepas ATCC de *Brucella* con excepción de 10H 0.5-4 mg/L, los aislamientos presentaron las MICs más bajas en CPX 0.12 a 4 mg/L y LVX 0.25 a 4 mg/L, seguido del MFX 0.5 a 4 mg/L, al comparar los valores con los de la tabla 2 observamos MICs ligeramente superiores, el aislamiento 15H se consideró resistente a OFX y MFX con MICs de 8 a 16 mg/L para ambos antimicrobianos.

Tabla 5. Concentración Mínima Bactericida (mg/L) de aislamientos humanos.

Antimicrobianos <i>B. melitensis</i>	Rifampicina	Norfloxacino	Ácido nalidíxico	Levofloxacino	Ciprofloxacino	Moxifloxacino	Ofloxacino
1H	8	8	128	2	1	2	2
2H	8	8	128	4	1	2	2
3H	8	16	128	4	1	2	2
4H	16	8	128	4	1	4	2
5H	8	8	128	4	2	2	2
6H	16	8	128	4	1	2	2
7H	16	8	128	4	2	4	1
8H	16	8	128	4	2	4	4
9H	8	8	128	4	1	4	2
10H	8	4	128	4	4	1	4
11H	4	8	128	4	2	1	4
12H	8	8	128	4	4	2	4
13H	8	8	128	4	4	1	2
14H	8	8	128	4	0.25	2	2
15H	128	8	128	(-)	4	16	16
16H	128	8	64	4	4	4	2

La concentración mínima bactericida (MBC) más elevada fue observada en RIF y NFX, donde los aislamientos 15H y 16H fueron resistentes a rifampicina, 15H presentó MBC más alta para MFX y OFX respecto a los demás aislamientos humanos. El AN solo se utilizó para evidenciar la resistencia de *Brucella* spp. a este quimioterapéutico, del cual se derivan las quinolonas.

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria (mg/L) de aislamientos de origen animal, en esta tabla se observa baja sensibilidad a rifampicina en 1A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A principalmente.

Antimicrobianos <i>B. abortus</i>	Rifampicina	Norfloxacino	Ácido nalidixico	Levofloxacino	Ciprofloxacino	Moxifloxacino	Ofloxacino
1A	8-16	4-8	16-32	0.06-0.12	1-2	1-2	2-4
2A	4-8	4-8	16-32	0.06-0.12	2-4	1-2	2-4
3A	4-8	8-16	16-32	0.06-0.12	1-2	0.5-1	1-2
4A	8-16	4-8	16-32	0.06-0.12	2-4	2-4	2-4
5A	16-32	4-8	16-32	0.06-0.12	2-4	2-4	2-4
6A	8-16	4-8	16-32	0.06-0.12	2-4	2-4	2-4
7A	16-32	4-8	16-32	0.06-0.12	1-2	1-2	2-4
8A	16-32	4-8	16-32	0.06-0.12	2-4	1-2	2-4
9A	2-4	2-4	16-32	0.06-0.12	1-2	1-2	1-2
10A	2-4	2-4	8-16	0.06-0.12	1-2	0.5-1	0.5-1
11A	1-4	4-8	16-32	0.06-0.12	1-2	8-16	4-8
12A	4-8	1-2	32-64	0.06-0.12	1-2	2-4	4-8
13A	0.25-0.5	4-8	16-32	0.06-0.12	1-2	2-4	4-8
14A	2-4	0.5-8	16-32	0.06-0.12	2-4	8-16	4-8
15A	4-8	0.5-8	16-32	0.06-0.12	2-4	0.5-1	4-8
16A	4-8	0.5-8	16-32	0.06-0.12	1-2	2-4	2-4
17A	4-8	0.5-8	16-32	0.06-0.12	1-2	1-2	1-2
18A	4-8	1-4	16-32	0.06-0.12	1-2	1-2	1-2
19A	4-8	0.5-1	16-32	0.06-0.12	1-2	1-2	1-2
20A	4-8	1-2	16-32	0.06-0.12	1-2	1-2	1-2
21A	2-4	4-8	16-32	0.06-0.12	1-2	1-2	1-2
22A	0.25-2	32-64	32-64	0.25-0.5	1-2	1-2	1-2

Según las MICs observadas en las cepas ATCC de *Brucella* spp. y lo descrito por Merino et al. en 2004 (46), los aislamientos de *B. abortus* de origen animal 1A, 4A y 6A mostraron MICs que se consideraron resistentes de 8-16 mg/L, 5A, 7A y 8A de 16-32 mg/L para RIF, 3A mostró una MIC de 8-16 mg/L, 22A de 32-64 mg/L para NFX, para MFX hubo dos aislamientos con MICs resistentes: 11A y 14A con 8-16 mg/L, LVX seguido de CPX mostraron las MICs más susceptibles y OFX mostró MICs sensibles, con excepción de 11A, 12A, 13A, 14A y 15A que fue de 4-8 mg/L.

Tabla 7. Concentración mínima bactericida (mg/L) de aislamientos de origen animal donde 1A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A, presentaron sensibilidad intermedia a RIF, 3A y 22A mostraron resistencia a CPX, 11A y 14A también presentaron MBCs altas para MFX.

Antimicrobianos <i>B. abortus</i>	Rifampicina	Norfloxacinó	Ácido nalidíxico	Levofloxacinó	Ciprofloxacino	Moxifloxacino	Ofloxacino
1A	16	8	32	0.12	2	2	4
2A	8	8	32	0.12	4	2	4
3A	8	16	32	0.12	2	1	2
4A	16	8	32	0.12	4	4	4
5A	32	8	32	0.12	4	4	4
6A	16	8	32	0.12	4	4	4
7A	32	8	32	0.12	2	2	4
8A	32	8	32	0.12	4	2	4
9A	4	4	32	0.12	2	2	2
10A	4	4	16	0.12	2	1	1
11A	4	8	32	0.12	2	16	8
12A	8	8	64	0.12	2	4	8
13A	0.5	8	32	0.12	2	4	8
14A	4	8	32	0.12	4	16	8
15A	8	8	32	0.12	4	1	8
16A	8	8	32	0.12	2	4	4
17A	8	8	32	0.12	2	2	2
18A	8	8	32	0.12	2	2	2
19A	8	8	32	0.12	2	2	2
20A	8	4	32	0.12	2	2	2
21A	4	8	32	0.12	2	2	2
22A	2	64	64	0.5	2	2	2

Las MBCs más elevadas se observan en los aislamientos 1A, 4A, 5A, 6A, 7A y 8A de 16-32 mg/L para RIF, 3A y 22A presentaron MBC de 16 y 64 mg/L respectivamente, 11A y 14A de 16 mg/L para MFX, 11A, 12A, 13A, 14A y 15A mostraron MBC de 8 mg/L para OFX, LVX y CPX presentaron MBCs más sensibles.

No se encontraron correlaciones entre las mutaciones de *Brucella melitensis* y *B. abortus* encontradas en algunas secuencias humanas y animales, y los valores elevados de MICs tanto para la rifampicina, como para las fluoroquinolonas utilizadas en este estudio.

DISCUSIÓN

Las infecciones en humanos causadas por *Brucella* spp. se tratan generalmente con una combinación de doxiciclina más aminoglucósidos como estreptomina o gentamicina y doxiciclina más rifampicina (1, 2, 4, 18), aunque en México se utiliza más el cotrimoxazol y la rifampicina, se utiliza también tetraciclina y doxiciclina (1). Las quinolonas han sido utilizadas como tratamiento alternativo debido a su capacidad de penetrar a las células; sin embargo, en ambos casos se presentan altos índices de recaídas a pesar de que *Brucella* es susceptible a la mayoría de los antimicrobianos *in vitro* (32, 33), sin embargo, en nuestro país el uso inadecuado y la prescripción errónea de los quimioterapéuticos puede jugar un papel importante en las recidivas de la brucelosis (1). Se han realizado trabajos para desarrollar mutantes de *B. abortus* y *B. melitensis* resistentes a las quinolonas (32, 33), y se han realizado estudios para determinar las bases genéticas de la resistencia a rifampicina (35), así como monitoreos moleculares en poblaciones con brucelosis clínica causada por *B. melitensis* con el objetivo de estudiar si se presentan mutaciones en *Brucella* spp. que generen resistencia a los antimicrobianos empleados en su tratamiento (31), cabe mencionar que en nuestro país actualmente no se realizan monitoreos de rutina ni aislamientos bacteriológicos (1). Las regiones QRDRs (*Quinolone Resistance Determining Regions*) de *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, han sido estudiadas ampliamente en patógenos como *E. coli*, donde se han determinado mutaciones puntuales que permiten la resistencia a quinolonas, así mismo en la región central y terminal de

rpoB, se han encontrado mutaciones que determinan fenotipos de *Brucella* resistentes a rifampicina (32, 33, 35, 39, 40, 45).

Los genes *gyrA* y *gyrB* codifican para la enzima tetramérica ADN girasa; existen estudios previos que han reportado la presencia de mutaciones en la regiones denominadas *QRDRs* de estos genes, que dan como resultado la resistencia a fluoroquinolonas; *parC* y *parE* codifican para la topoisomerasa IV, las cuales son el objetivo principal donde actúan estos fármacos. La zona *GyrA QRDR*, donde actúan principalmente las quinolonas en bacterias Gram negativas, se ubica entre los aminoácidos alanina 67 a glutamina 106 (Ala67-Gln106) (31, 32, 33, 39, 40, 45, 46).

Se han desarrollado *in vitro* cepas de *Brucella* resistentes a las quinolonas con el fin de localizar los sitios donde se presentan las mutaciones y el cambio de aminoácidos permitiendo asociar la presencia de la mutación con el fenotipo resistente. Estos aminoácidos involucrados en la resistencia al fármaco son Ala67, Gly81, Asp87 y Gln106 según el sistema de numeración de *E. coli*. El residuo Ala67 de *Brucella* correspondiente al Ser83 de *E. coli* se ha correlacionado con niveles bajos de resistencia a fluoroquinolonas debido a que la mutación Ser83Ala incrementa las MICs de fluoroquinolonas en *E. coli* (32, 33); en el presente trabajo encontramos que las secuencias de aminoácidos de *GyrA* de los aislamientos de *B. abortus* de origen animal no mostraron cambios respecto a la cepa de *B. melitensis* 16M y *B. abortus* 2308 susceptibles, sin embargo, en las secuencias de origen humano se encontraron sustituciones de aminoácidos en la muestra 1H en las posiciones: Ala103Ser (119 de *E. coli*), Cys109Ser y Arg110Gly

(correspondientes a 125 y 126 de *E. coli*); en la secuencias de las cepas 6H y 8H hubo cambios en: Gln90Leu y Gln90His (equivalente al 106 de *E. coli*), en el cual se han reportado mutaciones en la posición Gln106Arg/His, descritas por Ruiz *et al.* 2003 (47) en cepas de *E. coli* resistentes a las quinolonas; también se encontraron mutaciones en los aislamientos 7H y 14H en la posición: Ser81Thr, y en la muestra 9H en la posición: Ser81Ala (correspondiente a 97 de *E. coli*); hubo cambios en 14H en la posición: Met104Ile y Thr107Ser (corresponden a 120 y 123 de *E. coli*), en la secuencia de la cepa hubo sustituciones 15H en las posiciones: Tyr47Leu, Arg48Pro, Lys49Gln, Val54Leu, Gly55Val, Arg56Glu, Val57Phe, Met58Trp correspondientes a (63, 64, 65, 70, 71, 72, 73 y 74 de la numeración de *E. coli*); Ravanel *et al.* 2009 (32) reportan en un estudio desarrollado *in vitro*, una única sustitución en la posición Ala67Val (83 en el sistema numérico de *E. coli*) en cinco mutantes de *Brucella melitensis* 16M resistentes al MFX con una MIC de 32 mg/L, tres mutantes con MIC de 16 mg/L no presentaron mutaciones dentro de los genes de la topoisomerasa II (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*), aunque todas fueron resistentes al MFX y a otras fluoroquinolonas en forma variable; de forma interesante, en nuestro trabajo encontramos en el aislamiento 15H una MIC de 8-16 mg/L para MFX y OFX aunque dicha secuencia presentó varias sustituciones, ninguna corresponde a lo reportado en trabajos anteriores; las secuencias 11A y 14A tuvieron MICs de 8-16 mg/L para MFX aunque sin mostrar sustituciones en *GyrA*; por otra parte Turkmani *et al.* 2008 (33) desarrollaron mutantes resistentes al CPX y al OFX con una resistencia cruzada variable hacia otras fluoroquinolonas, las mutantes que obtuvieron mostraron MICs que van desde 8 µg/mL hasta 64 µg/mL respecto a las cepas parentales que presentaron una MIC

de 0.5µg/mL. Al secuenciar las zonas *QRDRs* de *gyrA* y *parC*, únicamente encontraron mutaciones dentro de *gyrA* en las posición Asp91Tyr/Asn y Ala87Val (correspondientes a las posiciones 87 y 83 de *E. coli*), sin embargo, una cepa mutante y resistente no presentó ninguna sustitución dentro de la zona *QRDR*; Lázaro *et al* 2009 (48) encontró una sustitución en Ala71Ser (67 en *E. coli*) y una inserción en Ala340 en cepas mutantes ATCC 23457 de *B. melitensis* biovar 2 resistentes a CPX con MICs de 2-32 mg/L, los autores sugieren un mecanismo de eflujo debido al incremento de las MICs en cada paso del ensayo, Valdezate *et al.* 2010 estudiaron 62 aislamientos de *B. melitensis* de origen humano en España, en los cuales no encontraron mutaciones en las *QRDRs* de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* de las 62 muestras clínicas, salvo una sustitución en Val264Ala fuera de *QRDR* de *gyrA* (con una MIC de 0.25-0.50 mg/L), en nuestro trabajo sólo se observaron cambios en GyrA, consistentemente con lo que ha sido reportado en trabajos previos (32, 33).

La resistencia a rifampicina generada por mutaciones en el gen *rpoB* que codifica para la RNA polimerasa ha sido descrita en trabajos anteriores; Marianelli *et al.* 2004 (35), ahondaron en las bases genéticas de la resistencia a rifampicina en *Brucella* spp. donde identificaron las mutaciones asociadas con el fenotipo rugoso y resistente a rifampicina de la cepa vacunal de *B. abortus* RB51 y 20 clonas resistentes que desarrollaron a partir de dos aislamientos de *B. melitensis* sensibles a rifampicina, al suplementar el medio de cultivo de la bacteria con concentraciones crecientes del antibiótico hasta obtener cepas estables y resistentes, para posteriormente identificar las mutaciones presentes relacionadas

a este fenotipo. La posición del aminoácido afectado para la cepa vacunal RB51 es Asp526Tyr y para las clonas mutantes son: Asp526Tyr/Asn/Gly, His536Leu/Tyr, Arg539Ser, Ser541Leu y Pro574Leu, en la llamada región caliente de la zona central del gen *rpoB*; en la región final del gen *rpoB* solo se encontró una sustitución en Val154Phe (35); en nuestro trabajo encontramos dentro de RpoB1 región final, cambios en la muestra 19A en la posición Met132Leu y 22A en la posición Thr139Ala las cuales no corresponden a lo descrito en trabajos anteriores; las secuencias restantes tanto de origen animal como humano no presentaron ninguna mutación siendo idénticas a las cepa de referencia de *B. melitensis* 16M. En la región central de RpoB2, todas las secuencias de *Brucella melitensis* y *abortus* tanto humanas como animales fueron idénticas a las cepas de referencia de *B. abortus* y *B. melitensis* con excepción de la muestra 2A en la que se encontraron varias sustituciones en las posiciones: Gln523Ala, Phe524Val, Asp526Gly, Gln527pro y Thr528Asp; de manera interesante, la mutación encontrada en la posición Asp526Gly, ha sido reportada previamente por Marianelli *et al.* 2004 en una cepa mutante, desarrollada *in vitro*, denominada CT-19 de fenotipo rugoso y resistente a rifampicina (35).

En lo que respecta a la susceptibilidad de *Brucella spp.* a los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la enfermedad en humanos, un trabajo realizado en nuestro país por López-Merino *et al.* 2004 (49) que analizó la susceptibilidad *in vitro* de aislamientos de *Brucella* de diversas fuentes, encontró MICs para CPX y MFX de 0.25-0.5 µg/ml; en el presente trabajo encontramos MICs de 0.5 a 4 mg/L (0.5-4 µg/ml) para CPX; en el caso del MFX obtuvimos MICs de 0.5-16 mg/L (0.5-

16 µg/ml), valores superiores a los reportados por López-Merino *et al.* 2004 (49); los aislamientos 15H, 11A y 14A, mostraron MICs de 8-16 mg/L (8-16 µg/ml) para MFX, similar las MICs mostradas de 4-32 µg/ml por Turkmani *et al.* 2008 (33), y de 16-32 µg/ml obtenidos por Ravel *et al.* 2009 (32) a partir de las mutantes resistentes a quinolonas que ambos autores desarrollaron *in vitro*; por otra parte, de nuestros tres aislamientos, sólo la muestra 15H presentó cambios en GyrA, aunque éstas sustituciones no se han reportado en trabajos anteriores, se encuentran dentro de la zona QRDR. En otros trabajos como el de Safi *et al.* (50) 2012 en Siria se reportan MICs para ciprofloxacino de 0.07-6.25 µg/ml, y para MFX de 1.5-100 µg/ml dependiendo de la región geográfica de dicho país. Las MICs encontradas en 2013 en Turquía fueron para ciprofloxacino de 0.19 µg/ml y para rifampicina de 1 µg/ml; Turkmani *et al.* (33) 2008 reportan en Grecia en 2006 MICs para ciprofloxacino de 0.016 a 0.75 mg/L, para norfloxacino de 0.125-4 mg/L, levofloxacino 0.064-0.75 mg/L y rifampicina 0.094-1.5 mg/L; Maves *et al.* 2011(51) reporta MICs para ciprofloxacino de 0.094-0.25µg/ml en Perú; en el caso de la rifampicina, en nuestro trabajo determinamos un rango de MICs de 0.25-128 mg/L (0.25-128 µg/ml), donde dos aislamientos de *B. melitensis* de humano 15H y 16H mostraron MICs de 64-128 mg/L (64-128 µg/ml), contrastando con el trabajo de López-Merino *et al.* 2004 donde obtuvieron MICs para RIF de 0.25 a 4 µg/ml (49); Safi *et al.* 2012 (50) reportan MICs para RIF de 25-50 µg/ml en aislamientos de *B. melitensis* y *B. abortus* obtenidos de animales; un trabajo de Ziya *et al.* 2013 (52) en Turquía del 2013 encontró una resistencia a rifampicina del 9.7% en 41 aislamientos de *B. melitensis* obtenidos de borregos infectados en forma natural; Marianelli *et al.* 2007 (53) en Sicilia 2007, describen MICs de 0.75-2 µg/ml para

rifampicina y 0.094-0.5 µg/ml para CPX en aislamientos humanos de *B. melitensis*. En el caso de la MBC un trabajo Rolain *et al.* 2000 (54) describe para ciprofloxacino MBCs de >16 mg/L y para rifampicina de >32 mg/L para la cepa ATCC de *B. abortus* S19; en nuestro trabajo obtuvimos MBCs con un rango de 8-128 mg/L para RIF donde dos aislamientos de *B. melitensis* de humanos 15H y 16H mostraron MBCs de 128 mg/L mostrando resistencia a este antibiótico; las muestras 4H, 6H, 7H y 8H mostraron MBCs de 16 mg/L; tres de los aislamientos de *B. abortus* de animales: 1A, 4A y 6A mostraron MBCs de 16 mg/L, 5A, 7A y 8A presentaron MBCs de 32 mg/L para RIF; en el caso de la MBC para CPX de todos nuestros aislamientos se observó un rango de 1-4 mg/L siendo menor al descrito por Rolain *et al.* 2000 (54).

Los distintos valores de MICs y MBCs observados en trabajos de diferentes partes del mundo indican que existe una susceptibilidad variable de *Brucella* spp. en función de su origen geográfico y también quizá ser debido a los diferentes métodos empleados (*E-test*, dilución en caldo, microdilución en caldo, dilución en agar) en los estudios para determinar la MICs que pueden variar hasta 4 veces con valores tanto superiores como inferiores. (1, 31, 32, 33, 35, 42, 43, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54).

Los datos obtenidos en este trabajo muestran que las mutaciones en *gyrA* de los aislamientos humanos pudieran influir en parte a la resistencia de *B. melitensis* a las fluoroquinolonas evaluadas en este estudio. No todas las secuencias presentaron mutaciones y aun así las cepas presentaron valores de MICs considerados resistentes a estos antimicrobianos, principalmente al NFX que

mostró ser el menos eficaz para *Brucella* con valores de MICs entre 0.5-64 mg/L, tanto para las muestras animales como humanas. Estos resultados sugieren que quizá exista la intervención de otros factores descritos previamente, que incluyen las mutaciones en las QRDRs de *gyrA* principalmente, *gyrB*, *parC*, *parE*, *rpoB* región central y final, sobreexpresión de bombas de eflujo y otros, como la naturaleza intracelular de la bacteria, que influyen en la resistencia o susceptibilidad de *Brucella*, la cual, también varía su susceptibilidad según su origen geográfico, así como las fallas en el tratamiento de la enfermedad en humanos (1, 32, 33, 38, 39, 40, 45, 46).

Son necesarios los monitoreos bacteriológicos y moleculares constantes tanto de la población afectada como de los animales para poder obtener valores precisos de MIC y MBC para este patógeno ya que los datos en nuestro país son escasos; es de gran importancia obtenerlos para la implementación de tratamientos eficaces y para evitar la selección de cepas resistentes por el uso inapropiado de antimicrobianos; debido a que no existen puntos de corte para *Brucella* spp. ni ensayos de MICs estandarizados reviste gran importancia el desarrollo de los mismos para tener valores de referencia precisos en cuanto a sensibilidad o resistencia de la bacteria ya que al comparar nuestros resultados con los MICs de referencia de otros géneros bacterianos (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* o *Haemophilus*), el resultado es poco fiable.

CONCLUSIONES

- Es el primer trabajo realizado en México que incluye el estudio a nivel molecular de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* y *rpoB1* región central y *rpoB2* región final, utilizando la PCR y secuenciación para la detección y asociación de mutaciones a resistencia a antimicrobianos de *Brucella melitensis* y *abortus* de diversos orígenes, junto con los ensayos de MICs para rifampicina RIF y fluoroquinolonas: CPX, OFX, MFX, LVX y NFX, utilizados en el tratamiento de la enfermedad en humanos.
- Se detectaron mutaciones silenciosas en la región *QRDR* del gen *gyrA* en los aislamientos 1H, 6H, 7H, 8H, 14H y 15H de origen humano; en el gen *rpoB1* en las secuencias 19A y 22A de origen animal, y en el gen *rpoB2* en la secuencia 2A de origen animal se encontraron mutaciones en las posiciones: Gln523Ala, Phe524Val, Asp526Gly, Gln527pro y Thr528Asp. La mutación no sinónima en la posición 526 ha sido reportada en una cepa resistente a RIF desarrollada *in vitro*.
- Aunque no era uno de los objetivos de este trabajo, se determinaron las MBCs de las cepas de referencia y los aislamientos de *Brucella*, siendo el primer reporte con este dato en nuestro país.
- Según los datos obtenidos de MICs y MBCs a partir de este trabajo, las fluoroquinolonas más eficaces contra *B. melitensis* y *B. abortus* fueron LVX seguido de CPX; MFX y OFX mostraron valores intermedios y NFX mostró las MICs y MBCs más altas, siendo poco recomendable su uso en el tratamiento; las MICs y MBCs obtenidas para RIF muestran valores de

resistencia en algunos casos por lo que no se recomienda su utilización como terapia única.

- Los datos obtenidos de la secuenciación y los MICs no permitieron asociar del todo las mutaciones encontradas en *gyrA* y *rpoB* con resistencia a fluoroquinolonas y rifampicina en aislamientos de *Brucella* de origen humano y animal ya que, aunque no todos los aislamientos presentaron mutaciones, si mostraron resistencia a estos antimicrobianos, por lo que otros factores como las bombas de eflujo o el posible tratamiento previo o ineficaz de las personas pudieran jugar un papel clave en esta susceptibilidad variable.
- El uso de fluoroquinolonas o rifampicina como terapia única de pacientes con brucelosis no debería utilizarse debido a la posibilidad de provocar recaídas y seleccionar bacterias resistentes.
- Aun es recomendable la utilización de la tetraciclina más estreptomicina o rifampicina y cotrimoxazol para el tratamiento de primera línea contra la brucelosis.

REFERENCIAS

- 1) López MA, Contreras RA. Brucella. México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. 2001, 1-19.
- 2) Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos EV. Brucellosis. The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE, 2005; 352 (22): 2325-2336.
- 3) Castro HA, González SR, Prat MI. Brucellosis: una revisión práctica. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 2005; 39 (2): 203-16.
- 4) Vega López CA, Andraca Ariza R, Rodríguez Weber LF. Brucelosis. Una infección vigente. ACTA MÉDICA GRUPO ÁNGELES, 2008; 6 (4): 158-165.
- 5) Suárez Güemes F, Arellano Reynoso B, Díaz Aparicio E. Brucelosis: Importancia en la salud pública y el ámbito pecuario, su control y diagnóstico. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; CENID-Microbiología, INIFAP SAGARPA. 2009; 1-12.
- 6) International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. <http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>. Citado el 18 de febrero del 2015.
- 7) Ficht T. *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiol*, 2010; 5 (6): 859-866.
- 8) Teane MA Silva, Erica A Costa, Tatiane A Paxiao, Renée M Tsohis, Renato L Santos. Laboratory Animal Models for Brucellosis Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011; 1-9.

- 9) Zwerdling A, Delpino MV, Pasquevich KA, Barrionuevo P, Cassataro J, García SC, Giambartolomei GH. *Brucella abortus* activates human neutrophils. *Microbes and Infection*, 2009; (11): 689-697.
- 10) Vassalos CM, Economou V, Vassalou E, Papadopoulou C. Brucellosis in humans: why is it so elusive? *Reviews in Medical Microbiology*, 2009; 20: 63-73.
- 11) Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6 (2): 91-9.
- 12) López GI, O' Callaghan D. *Brucella*: Molecular Microbiology and Genomics. Caister Academic Press, 2012; (1, 2): 1-37.
- 13) Poester FP, Samartino LE, Santos RL. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, 2013; 32 (1): 105-115.
- 14) Xavier MN, Tatiane AP, Andréas B, Renée MT, Renato LS. Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal*, 2010; 4, 109-118.
- 15) P.C. Baldi, G.H. Giambartolomei. Pathogenesis and pathobiology of zoonotic brucellosis in humans. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.* , 2013; 32 (1), 117-125.
- 16) P. Skendros, P. Boura. Immunity to brucellosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2013; 32 (1), 137-147.

- 17) Yongqun He. Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2012.
- 18) MJ Corbel. *Brucellosis in humans and animals*. World health Organization, Division of Bacteriology, National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG, England.2006; 1.
- 19) Moreno E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis *Front Microbiol.*, 2014; 13 (5): 213.
- 20) MG Elzbieta, Z Jerzy *Brucellosis in humans-etiology, diagnostics, clinical forms*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2013; 20 (2), 233–238.
- 21)http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/03_2012_Manual_Brucelosis_vFinal_13nov12.pdf
- 22)http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2013/completo/se_m36.pdf
- 23)www.oie.int/ESP/ES_INDEX.HTM. Consultado el 10 de febrero de 2015.
- 24)<http://utep.inifap.gob.mx/pdfs/MANUAL%20BRUCELOSIS.pdf>. Consultado el 12 de febrero de 2015.
- 25) Alavi SM, Alavi L. Treatment of brucellosis: a systematic review of studies in recent twenty years. *Caspian J Intern Med* 2013; 4(2): 636-641.

- 26)** Skalsky K, Yahab D, Bishara J, Pitlik S, Leibovici L, Paul M. Treatment of human brucellosis: systemic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*, 2008; 336 (7646): 701-704.
- 27)** PR Matthew, Halliday EB, Cleaveland S, AC John. Brucellosis in low-income and middle-income countries. *Curr Opin Infect Dis*. 2013; 26(5): 404–412.
- 28)** <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m022ssa24.html>. Consultado el 11 de febrero de 2015.
- 29)** Bannatyne RM, Rich M, Memish ZA. Co-trimoxazole resistant *Brucella*. *J Trop Pediatr*. 2001; 47 (1): 60.
- 30)** Kinsara A, A. Al-Mowallad, A. O. Osoba. 1999. Increasing resistance of brucellae to co-trimoxazole. *Antimicrob. Agents Chemother*. 43:1531.
- 31)** Valdezate S, Navarro A, Medina M, Carrasco G, Sáez-Nieto J. Molecular screening for rifampicin and fluoroquinolone resistance in a clinical population of *Brucella melitensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010; 65: 51-53
- 32)** Ravanel N, Gestin B, Maurin M. In vitro selection of fluoroquinolone resistance in *Brucella melitensis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009; 34: 76-81.
- 33)** Turkmani A, Psaroulaki A, Christidou A, Chochlakis D, Tabaa D, Tselentis Y. In vitro-selected resistance to fluoroquinolones in two *Brucella* strains associated with mutational changes in *gyrA*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008; 32: 227-232.

- 34)** GG Schurig, RM Roop, T Bagchi, S Boyle, D Buhrman, N Sriranganathan. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology*, 1991; 28: 171-188.
- 35)** Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R. Genetic Bases of the Rifampin Resistance Phenotype in *Brucella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; 42 (12): 5439-5443.
- 36)** JJ Ding, GA Carol. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *Journal of Molecular Biology*, 1988; 202: 45-58.
- 37)** Taniguchi H, Aramaki H, Nikaido Y, Mizuguchi Y, Nakamura M, Koga T, Yoshida S. Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*, *FEMS Microbiology Letters* 1996; 144: 103-108.
- 38)** Martine B, Laurence G, Michel SZ. Functional Characterization of *Brucella melitensis* NorMI, an Efflux Pump Belonging to the Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2002; 3050–3053.
- 39)** Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003; 51, *Suppl. S1*, 29-35.
- 40)** Jacoby GA. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 2005; 41, *Suppl. S2*, 120-126.
- 41)** <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

- 42) [Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration \(MIC\). *Nature Protocols*, 2008; 3: 163, 175.](#)
- 43) M. Andrews J. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001; 48: 5-16.
- 44) http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- 45) H Yoshida, M Bogaki, M Nakamura, Laurie M, Yamanaka, S Nakamura. Quinolone Resistance-Determining Region in the DNA Gyrase *gyrB* Gene of *Escherichia coli*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 1991; 1647-1650.
- 46) Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. Poole K. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 2000; 44: 2233-2241.
- 47) Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003; 51: 1109–1117.
- 48) García Lázaro FG, Rodríguez-Tarazona RE, García-Rodríguez JA. Fluoroquinolone-resistant *Brucella melitensis* mutants obtained *in vitro*. *Int J Antimicrob Agents*, 2009; 34: 252–4.
- 49) López-Merino A, Contreras A, Migranas R, Orrantía R, Hernández GM, Gutiérrez AT, Cardeñosa O. Susceptibility of Mexican *Brucella* Isolates to Moxifloxacin, Ciprofloxacin and other Antimicrobials Used in the Treatment of Human Brucellosis. *Scand J Infect Dis*, 2004; 36 (9): 636-638.

- 50)** Safi M, Al-Mariri A. Efficacy evaluation of some antibiotics against *syrian brucella* spp isolates, *in vitro*. *Braz J Microbiol*, 2012; 43 (4): 1269-1273.
- 51)** Maves RC, Castillo R, Guillen A, Espinosa B, Meza R, Espinoza N, Núñez G, Sánchez L, Chacaltana J, Cepeda D, González S, Hall ER. Antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* isolates in Peru. *AntimicrobAgents Chemother*, 2011; 55 (3): 1279-1281.
- 52)** Ilhan Z, Solmaz H, Ekin IH. *In Vitro* Antimicrobial Susceptibility of *Brucella melitensis* Isolates from Sheep in an Area Endemic for Human Brucellosis in Turkey. *J Vet Med Sci*. 2013; 75 (8): 1035-1040.
- 53)** Marianelli C, Graziani C, Santangelo C, Xibilia MT, Imbriani A, Amato R, Neri D, Cuccia M, Rinnone S, Di Marco V, Ciuchini F. Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy. *J Clin Microbiol*. 2007; 45 (9): 2923-2928.
- 54)** Rolain JM, Maurin M, Raoult D. Bactericidal effect of antibiotics on *Bartonella* and *Brucella* spp.: clinical implications. *J Antimicrobial Chemotherapy*. 2000; 46 (5): 811-814.