



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Clonación del gen *groEL* de *B. canis* en el plásmido de expresión pQE60”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

Nancy Belem Beltrán Maldonado

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Beatriz Arellano Reynoso
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Rigoberto Hernández Castro
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”
Dra. Erika Margarita Carrillo Casas
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Ciudad Universitaria, CD. MX. Diciembre 2023



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT IT201017 “Desarrollo de mutantes como candidatos a vacuna y de proteínas recombinantes como antígenos, para el control integral de la brucelosis canina”. DGAPA-UNAM.

A CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Al Sistema Nacional de Investigadores por la beca otorgada como Ayudante de Investigador.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS	v
ABREVIATURAS	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVO GENERAL	18
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS	19
7. RESULTADOS	28
8. DISCUSIÓN	34
9. CONCLUSIÓN	37
10. PERSPECTIVA	37
11. FUENTES DE CONSULTA	38
12. ANEXO	52

RESUMEN

BELTRÁN MALDONADO NANCY BELEM. Clonación del gen *groEL* de *B. canis* en el plásmido de expresión pQE60 (Asesores: Beatriz Arellano Reynoso, Rigoberto Hernández Castro y MSc. Erika Margarita Carrillo Casas).

La brucelosis canina causada por *Brucella canis* (*B. canis*), es una enfermedad distribuida a nivel mundial, que afecta a perros y humanos. Los signos clínicos de la enfermedad están asociados con alteraciones del tracto reproductivo e incluyen abortos, orquitis y epididimitis, aunque también se ha reportado discospondilitis. Uno de los principales retos para el control de dicha enfermedad es el diagnóstico; por lo que es importante la búsqueda de más y mejores estrategias que ofrezcan mayor sensibilidad y especificidad en comparación con las ya existentes, esto con la finalidad de identificar perros asintomáticos y en etapas agudas de la infección.

El diagnóstico serológico de la brucelosis canina se realiza mediante la prueba de aglutinación en placa ó RSAT (RSAT, por sus siglas en inglés, *rapid slide agglutination test*), la cual es considerada como una prueba tamiz y detecta anticuerpos de las clases IgG e IgM del perro. La desventaja de dicha prueba es su baja sensibilidad al presentar reacciones cruzadas en contra del LPS de otros patógenos y la dificultad implícita en la manipulación de la cepa bacteriana para elaborar el antígeno. Las pruebas de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) son una alternativa para el diagnóstico serológico, debido a su sensibilidad y especificidad (>90%). En estudios previos se demostró que la proteína de choque térmico GroEL es un antígeno inmunodominante de *B. canis* que puede detectarse en perros infectados experimentalmente. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue expresar la proteína recombinante GroEL para ser empleada como antígeno de diagnóstico de la brucelosis canina.

Se estandarizó una PCR punto final para amplificar el gen *groEL* de *B. canis*, utilizando ADN de *B. canis* cepa RM6/66. El producto de 1,642 pb fue purificado y clonado en el vector de expresión pQE60 y se transformó en *E. coli* DH5α. La

construcción se analizó mediante restricción enzimática con las enzimas *Nco*I y *Bgl*II, posteriormente fue secuenciado en ambos sentidos en el Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM). Para la expresión, con la construcción se transformó *E. coli* M15 y se indujo con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido a 1 mM. Se realizaron ensayos de *Western blot* con dos anticuerpos de manera independiente para identificar a GroEL, que es una proteína de ~60 kDa.

Los resultados obtenidos en los experimentos de expresión bajo diferentes variables de inducción (densidad óptica, tiempo y temperatura), demuestran la importancia de identificar las condiciones adecuadas de sobreexpresión de dicha proteína. Por el momento estas condiciones quedan por ser definidas.

Palabras clave: *Brucella canis*, diagnóstico serológico, RSAT, GroEL.

ABSTRACT

BELTRÁN MALDONADO NANCY BELEM. Cloning of the *B. canis groEL* gene into the expression plasmid pQE60 (Advisors: Beatriz Arellano Reynoso, Rigoberto Hernández Castro, and MSc. Erika Margarita Carrillo Casas).

Canine brucellosis caused by *Brucella canis* (*B. canis*) is a globally distributed disease that affects dogs and humans. The clinical signs of the disease are associated with alterations of the reproductive tract and include abortions, orchitis, and epididymitis, although disco spondylitis has also been reported. One of the main challenges for the control of this disease is the diagnosis; Therefore, it is important to search for more and better strategies that offer greater sensitivity and specificity compared to existing ones, to identify asymptomatic dogs and those in acute stages of the infection.

The serological diagnosis of canine brucellosis is carried out by means of the RSAT (rapid slide agglutination test), which is considered a screening test and detects antibodies of the IgG and IgM classes. Of the dog. The disadvantage of this test is its low sensitivity when presenting cross-reactions against the LPS of other pathogens and the implicit difficulty in handling the bacterial strain to prepare the antigen. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests are an alternative for serological diagnosis because they have sensitivity and specificity >90%. Previous studies showed Heat shock protein GroEL as an immunodominant antigen of *B. canis* that can be detected in experimentally infected dogs. Therefore, this work aimed to express the recombinant protein GroEL to be used as a diagnostic antigen for canine brucellosis.

An endpoint PCR was standardized to amplify the *B. canis groEL* gene, using DNA from *B. canis* strain RM6/66. The 1,642 bp product was purified, cloned into the expression vector pQE60, and transformed into *E. coli* DH5 α . The construction was analyzed by enzymatic restriction with the enzymes *Nco*I y *Bgl*II, then it was sequenced in both directions at the Institute of Biotechnology (IBT-UNAM). For expression, *E. coli* M15 was transformed with the construct and induced with 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside. Western blots with two antibodies were performed independently to identify GroEL, which is a ~60 kDa protein.

The results obtained in the expression experiments under different induction variables (optical density, time, and temperature) demonstrate the importance of identifying the appropriate conditions for the overexpression of the said protein. Right now, these conditions remain to be defined.

Keywords: *Brucella canis*, serological diagnosis, RSAT, GroEL.

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1.	Regiones endémicas de perros seropositivos a <i>B. canis</i>	4
Figura 2.	Patogenia de <i>B. canis</i> en perros	10
Figura 3.	Gen <i>groEL</i> de <i>B. canis</i> cepa RM6/66	22
Figura 4.	Vector de expresión pQE-60	23
Figura 5.	Amplificación del gen <i>groEL</i> de <i>B. canis</i> por PCR	28
Figura 6.	Construcción <i>in silico</i> de pQE60/ <i>groEL</i>	29
Figura 7.	PCR de colonia de la construcción pQE60/ <i>groEL</i>	30
Figura 8.	Digestión enzimática de la construcción del plásmido pQE60/ <i>groEL</i> con <i>NcoI</i> y <i>BglII</i>	31
Figura 9.	Digestión enzimática de la construcción pQE60/ <i>groEL</i> con <i>HindIII</i>	31
Figura 10.	Secuenciación de la construcción	33
Cuadro 1.	Estandarización de la PCR para la amplificación del gen <i>groEL</i>	24

Abreviaturas

Mb	megabases
IFN γ	interferón gamma
TNF α	factor de necrosis tumoral alfa
Ag	antígeno
Ac	anticuerpo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ITS	internal transcribed spacer
kDa	kilodaltones
pb	pares de bases
mM	milimolar
nm	nanómetros
LPS	lipopolisacárido

1. INTRODUCCIÓN

El género *Brucella* se encuentra clasificada dentro del *phylum Proteobacteria*, clase $\alpha 2$ -*Proteobacteria*, orden *Rhizobiales*, familia *Brucellaceae* (von Bargen *et al.*, 2012; Wattam *et al.*, 2014). Es un patógeno intracelular facultativo, bacilo corto, Gram negativo, que mide de 0.5 a 0.7 μm de ancho y 0.6 a 1.5 μm de largo, es inmóvil, no esporulado, no posee flagelos, ni cápsula (Ardoino *et al.*, 2006).

Brucella posee 2 cromosomas, el cromosoma 1 tiene un tamaño de 2.1 Mb y el cromosoma 2 de 1.2 Mb (Wattam *et al.*, 2009), con excepción de *Brucella suis* biovar 3 que tiene solo 1 cromosoma (Jumas *et al.*, 1998). El contenido de G+C promedio del cromosoma 1 es de 57.1% y del cromosoma 2 es del 57.3% (Ficht, 2014), en el caso de *B. canis* el contenido de G+C es del 52 % (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2015). De acuerdo a las características fenotípicas, *Brucella* se divide en cepas lisas, las cuales se caracterizan porque su lipopolisacárido (LPS) posee lípido A, polisacárido central (core) y polisacárido O (antígeno O) y cepas rugosas, también llamadas lipo-oligosacáridas (LOS), donde la cadena O se encuentra ausente o de corta longitud (Fontana *et al.*, 2016).

Además *Brucella* spp., posee el gen *groEL* y *groES* que codifican la proteína denominada GroEL y GroES de la familia de las chaperonas (Ananda *et al.*, 2007). Los genes que codifican estas chaperonas se organizan en un solo operon (Ventura *et al.*, 2004). GroEL es un complejo cilíndrico que consta de 547 aminoácidos (aa) con un peso de 60 kDa y consta de 2 anillos, de siete subunidades cada uno (Ananda *et al.*, 2007). GroEL se compone de tres dominios: el dominio ecuatorial; que contiene un sitio de unión a nucleótidos que sirve de unión al ATP y funciona como factor modulador de los cambios conformacionales, el dominio medial; trasfiere señales del dominio ecuatorial y el dominio apical; que sirve como bisagra en los ajustes alostéricos y se une a GroES mediante interacciones hidrófobas (Ananda *et al.*, 2007; Lin y Rye, 2014). GroES es un anillo heptamérico en forma de domo de 10 kDa, expone una secuencia de bucle flexible de 22 residuos que media la interacción con las hélices H del dominio apical (Hayer-Halt, 2016).

La relevancia biológica de GroEL es que promueve una correcta estructura terciaria catalizando el plegamiento de polipéptidos no nativos, mediante el reconocimiento de aminoácidos hidrófobos invirtiendo estados de agregación y/o proteólisis (Sigler *et al.*, 1998). Además es importante mencionar que GroEL ha sido de gran utilidad en diagnóstico ya que se ha empleado como marcador filogenético para diferenciar especies de *Vibrio* spp., ya que la región ARNr 16S ha demostrado ser ineficaz para diferenciar especies estrechamente relacionadas (Silvester *et al.*, 2017).

En lo que respecta a las especies de *Brucella*, por lo general presentan preferencias de hospedero; sin embargo, la mayoría de las especies pueden infectar a otros mamíferos y al hombre, lo que revela su potencial zoonótico (Khurana, 2019). *B. abortus* y *B. melitensis* infectan a rumiantes: bovinos, caprinos, ovinos y caninos entre otros (*B. melitensis* es la principal causa de infecciones en humanos); *B. suis* a cerdos y caninos; *B. ovis* a ovinos; *B. canis* a caninos; *B. neotomae* a ratas del desierto; *B. inopinata* al humano; *B. pinnipedialis* a focas; *B. ceti* a delfines, marsopas y ballenas; *B. microti* a ratones de campo y zorros rojos (Ficht, 2014; Scholz *et al.*, 2016) y *B. vulpis* a zorros (Scholz *et al.*, 2016). A excepción de *B. ovis*, todas tienen el potencial de causar infección en el humano (Moreno, 2014).

Aislamiento microbiológico

Brucella canis (*B. canis*) crece en agar tripticasa soya, agar tripticasa soya con 5% de sangre de borrego, triptosa y medio Albimi, cabe mencionar que los medios selectivos como Kuzdas-Moorse y Thayer-Martin han sido empleados para aislar dicha bacteria de muestras contaminadas (Flores y Carmichael, 1981), además de los medios antes mencionados se encuentra el medio de cultivo monofásico Hemo *Brucella* (Lucero *et al.*, 2010), y el medio Farrel o el medio modificado Thayer-Martin (CFSPH, 2009). En muestras de leche y sangre se recomienda el medio bifásico Ruiz-Castañeda para aumentar la sensibilidad (Geresu y Kassa, 2015). Puede producir colonias mucoides (M+) a pH 7.2 y colonias no mucoides (M-) a pH 6.5. Crece en presencia de tionina, a una dilución 1: 25 000, pero se inhibe en presencia de fucsina básica, a una dilución 1: 50 000 (Scholz *et al.*, 2016).

Para observar su afinidad tintorial se emplea la tinción de Gram mostrando una coloración roja, es positiva a la tinción de Koster, es oxidasa positiva y en la prueba de urea es positiva a los 30 minutos (Brennan *et al.*, 2008), puede reducir nitratos y no produce H₂S. Además los cultivos de *B. canis* y *ovis* se pueden diferenciar de las *Brucellas* lisas mediante fagos R, R/O y R/C en una dilución corriente de prueba (D.C.P.) 10⁴ o dosis de rutina para prueba (DRP) (Ardoino *et al.*, 2006).

Antecedentes históricos y epidemiología

Brucella canis fue aislada por primera vez, en 1966 en Nueva Jersey, Estados Unidos, por el Dr. Leeland Carmichael (Carmichael, 1968), de una camada de una perra de raza Beagle, a partir de fetos abortados, placentas y descargas vaginales (Geresu y Kassa, 2015; Wanke, 2004).

B. canis, es un patógeno ampliamente distribuido (Figura 1), estudios epidemiológicos reportan casos en países de Sudamérica: Argentina (Boeri, 2008), Brasil (Keid, 2017), Chile (Tuemmers 2011), Colombia (Castrillón-Salazar, 2013; Laverde, 2021) y Perú (Zavala, 2011); en Norteamérica como: Canadá (Cosford, 2018) y Estados Unidos (Lovejoy *et al.*, 1976; Johnson *et al.*, 2018); en Europa: Alemania (Weber *et al.*; Holst *et al.*, 2012), 1978), Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Francia, Hungría, Italia, Suecia, Suiza (Buhmann 2019), Rusia (Denisov, 2013) y España (Mateu-de-Antonio, 1994); en Asia: China (Fu, 2013), India (Yoak, 2012) y Japón (Kawakami, 2019), y África (Oosthuizen, 2019); sin embargo; Australia y Nueva Zelanda son libres de esta enfermedad (Holst *et al.*, 2012; Buhmann *et al.*, 2019).



Figura 1.- Regiones endémicas de perros seropositivos de *B. canis*. Las líneas rojas indican los países libres de *B. canis* (ilustración creada en biorender.com)

Situación en México

En México, la brucelosis canina es considerada una enfermedad endémica, de notificación obligatoria (DOF, 2019). Los primeros reportes publicados de brucelosis canina datan de 1974 por Flores y Segura, donde se analizaron 500 muestras de perros del centro antirrábico de la Ciudad de México con resultados del 28% de seropositividad, además se analizaron 203 muestras de humanos, donde se obtuvo el 28% de seropositividad (Flores y Segura, 1975).

En 1977, se examinaron muestras de 59 perros de Ecatepec de Morelos, Estado de México y de la Ciudad de México. Se obtuvo 34 % de seropositivos y 7 aislamientos (Flores-Castro *et al.*, 1977).

Posteriormente, en 1980 se analizaron 107 muestras de perros, dos provenían de animales importados muestreados en el aeropuerto de la Ciudad de México, y el resto provenientes de diferentes clínicas. Se encontró 12 perros positivos, que representó el 11.21% de seropositividad (Gutiérrez-Hidalgo, 1980; González *et al.*, 2004).

En 1997 en la zona metropolitana de la Ciudad de México, se analizaron 207 muestras obtenidas del laboratorio de Diagnóstico de Salud Animal (DIAGSA) y posteriormente se remitieron al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), donde 94 fueron positivos lo que representó 45.4 % del total de las muestras (Velázquez, 1997).

En el año 2000, en la ciudad de Monterrey, de 164 muestras de perros (101 perros provenían de criadero y el resto de propietarios particulares), 71 sueros fueron positivos, tanto en la aglutinación directa como después del tratamiento con 2 β -mercaptoetanol (Ramos, 2012).

Por último, en 2017 en Culiacán Rosales, Sinaloa se analizaron 225 muestras de perros que llegaron a la unidad móvil de esterilización del Centro de Salud de la FMVZ de la Universidad Autónoma de Sinaloa y en dos clínicas veterinarias particulares de Culiacán, Sinaloa, del total de las muestras se observaron 6 sueros positivos, lo que representó el 2.6 % del total de las muestras analizadas mostrando un intervalo de confianza del 95% entre 0.55% y 4.69% (Flores, 2017).

Salud Pública

La brucelosis ocasionada por *B. canis*, no es de notificación obligatoria ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (WOAH, por sus siglas en inglés *World Organisation for Animal Health*) (Dentinger *et al.*, 2015) debido a la falta de reportes que reflejen el estatus epidemiológico de la enfermedad y su impacto a la salud pública (Castrillón, 1975); sin embargo, en Estados Unidos el Consejo de Epidemiólogos Estatales y Territoriales (CSTE) ha recomendado que todas las especies de *Brucella* que ocasionen brucelosis humana se notifiquen en el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (Monroe *et al.*, 1975), por lo que la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) aprobó una política para el control de *B. canis*, desarrollada por el Consejo de Salud Pública y Medicina Veterinaria Regulatoria, con el apoyo del Consejo de Servicios Veterinarios, donde se convoca a las agencias estatales y federales, para el manejo de enfermedades infecciosas incluida *B. canis*, además menciona que se aborde por separado los problemas relacionados con la brucelosis canina y propone que el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) mantenga un programa de vigilancia epidemiológica para la protección de la salud humana y animal (Dentinger *et al.*, 2015).

Asimismo, *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) ha reportado 52 casos de contagios en humanos (Dentinger *et al.*, 2015) y se asocia con el estrecho contacto con perros infectados (Ramos, 2012), lo que pone en el grupo de riesgo a veterinarios, trabajadores de refugio de animales, manejadores de exposiciones caninas y empleados de perreras (Krueger *et al.*, 2014; Monroe *et al.*, 1975; Ramos, 2012).

La brucelosis humana ocasionada por *B. canis*, en adultos provoca mialgias, náuseas, fatiga, dolor articular, fiebre, endocarditis y linfadenopatía; además, en niños ocasiona: fiebre, diarrea, vómitos y cefalea (Scholz *et al.*, 2016).

El primer caso reconocido de brucelosis canina en humanos se reportó en 1967 reportado por el CDC (Polt , 1982) (Lucero *et al.*, 2010; Oosthuizen *et al.*, 2019).

En 1973 en EU se realizó un estudio con muestras de 1, 208 militares (hombres de 18-26 años), mediante la prueba de aglutinación en placa ó RSAT (RSAT, por sus siglas en inglés, *rapid slide agglutination test*) de los cuales 5 resultaron positivos, lo que representó el 0.4 % de reacciones positivas (Lewis y Anderson, 1973).

Un estudio realizado en Florida con 274 perros (119 machos y 155 hembras) y 167 muestras provenientes del personal de diferentes refugios (116 hombres y 51 mujeres), evidenció el 3.65% (perros) y 4.34% (personal de refugios) de seropositividad mediante la prueba de aglutinación en placa (Hoff y Nichols, 1974).

De igual manera, se realizó un estudio en Oklahoma, en una cohorte de personas con diferente grados de exposición a *B. canis*, mediante la prueba de aglutinación en placa. Los grupos fueron identificados como: grupo 1.- personas sin previa exposición (193 sueros de recién nacidos), grupo 2.- personas con exposición promedio (2 026 sueros de pacientes de hospitales, empleados de hospitales y donantes de sangre), grupo 3.- grupo potencialmente alto de contagio (73 veterinarios) y grupo 4.- individuos con fiebre de origen indeterminado. Se observó un incremento en el porcentaje de seropositividad del 5.7 %, 67.8 % de, 72 % y 80 % respectivamente. Lo que demuestra el impacto de *B. canis* y su estrecha relación con el personal de la salud (Monroe, 1975).

En lo que respecta a México, en el Hospital General se emplearon 203 muestras de pacientes seleccionados al azar mediante la prueba de aglutinación en placa mostraron el 13.3% de positividad, con títulos de 1:200 (Scholz *et al.*, 2016).

Patogenia

Las principales vías de contagio de la brucelosis canina son la vía genital, oronasal y conjuntival (Figura 2) (Geresu y Kassa, 2015; DOF, 2009; Lucero *et al.*, 2005; Velazquez, 1997).

Asimismo, estudios sugieren la vía entérica de infección por ingestión de leche contaminada en cachorros y la presencia de *B. canis* en macrófagos del líquido amniótico confirman dicha vía de infección en cachorros naturalmente infectados y su posible eliminación a través de las heces (Figura 2) (Makloski, 2011). Las descargas vaginales, placenta y fetos abortados pueden contener hasta 1×10^{10} unidades formadoras de colonia/ml (UFC/ml); que equivalen a 100, 000 dosis infectantes; por vía oronasal la dosis infectante es de 2×10^6 UFC/ml y por vía conjuntival es de 10^4 UFC/ml (Hoff y Nichols, 1974; Hollet, 2006).

Además la orina y el semen, son otra vía de transmisión, después de 4-6 meses post infección (Holst *et al.*, 2012). En machos la excreción de bacterias en orina es de 10^3 – 10^6 /ml (Sánchez *et al.*, 2013).

Brucella se adhiere a mucosas y es fagocitada por el sistema fagocítico mononuclear mediante factores de virulencia como el sistema de secreción tipo IV (Cosford, 2018) o mediante la unión a receptores Scavenger clase A (SRA), la bacteria que fue opsonizada es internalizada por la vía receptor Fc o por receptores del complemento, las bacterias que no fueron opsonizadas a las células fagocíticas por medio de balsas lipídicas (Sánchez *et al.*, 2013), después viajan por el sistema retículo endotelial a linfonodos retrofaríngeos, inguinales, ilíacos, hígado, bazo y médula ósea (Cosford K, 2018).

La bacteria se establece en el torrente sanguíneo entre la primera y cuarta semana de infección y produce bacteremia entre la cuarta y sexta semana después de la

exposición oronasal y puede permanecer en sangre hasta 5 años (Gomez *et al.*, 2013; Makloski, 2011), mientras que en la bacteremia observada en las diferentes especies animales suele ser menor de 2 semanas (Makloski, 2011).

De acuerdo a lo anterior, un estudio realizado mediante inmunohistoquímica en fetos y neonatos infectados naturalmente mostró marcaje positivo (presencia de bacterias) en el citoplasma de eritrocitos a *B. canis*; similar a lo observado en eritrocitos de ratones infectados experimentalmente de *B. melitensis* dispuestas extra e intracelularmente, lo que podría explicar la detección intermitente de *B. canis* en sangre de perros infectados naturalmente (Kauffman y Petersen , 2019).

En el caso de los perros con infección crónica pueden encontrarse serológicamente positivos durante 5 años o más (Kauffman y Petersen, 2019; Wanke, 2004), después permanecen seronegativos, pero la bacteria queda alojada en linfonodos, hígado, bazo, próstata o aparato reproductor (Makloski, 2011), y después se dirige a las gónadas (próstata, testículos, epidídimos, útero y placenta) (Cosford, 2018), por el alto contenido de fructosa (Letesson *et al.*, 2017).

La fructosa, se origina a partir de la glucosa y se reduce a sorbitol en una reacción catalizada por la aldolasa reductasa a C₆-poliol, donde se oxida a fructosa por la sorbitol deshidrogenasa. Dicha ruta está involucrada en la producción de eritritol en fluidos fetales, placenta, epidídimo y semen; por lo que los convierte en un nicho de crecimiento de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* (Letesson *et al.*, 2017).

Las hembras contagiadas por vía genital cursan con infertilidad, aborto en el último tercio de la gestación, reabsorción embrionaria y endometritis, los cachorros nacidos muertos se encuentran autolisados, presentan edema, congestión y hemorragias subcutáneas, además de lesiones degenerativas en bazo, hígado, riñón e intestinos (Makloski, 2011). La muerte temprana del embrión ocurre a los diez o 20 días de gestación (Flores y Carmichael, 1981), en perros que alcanzan la pubertad se genera linfadenomegalia (Wanke, 2004).

Las hembras continuarán excretando bacterias por las secreciones vulvares semanas después del parto (Makloski, 2011); los machos pueden experimentar epididimitis, edema escrotal, orquitis, dermatitis escrotal, atrofia testicular (unilateral

o bilateral). En casos crónicos se observa disminución en el tamaño del epidídimo y atrofia testicular, anormalidades espermáticas, que incluyen acrosomas deformados, gotas protoplásmicas retenidas, colas enrolladas, cabezas desprendidas y macrófagos que fagocitan espermatozoides (Wanke, 2004); infertilidad, granuloma espermático y prostatitis (Holst *et al.*, 2012; Kauffman y Petersen, 2019).

El daño testicular inicia con la formación de anticuerpos antiespermáticos que se producen cuando los antígenos espermáticos, se liberan al torrente sanguíneo o líquido prostático después de ser reconocidos y procesados por macrófagos a 11^a ó 14^a semana postinfección (Flores y Carmichael, 1981; Makloski , 2011; Wanke, 2004). Los anticuerpos pueden detectarse en el suero o plasma seminal a partir de la 11^a o 14^a semana postinfección (Wanke, 2004).

Las manifestaciones clínicas no reproductivas, por lo general en infecciones crónicas son uveítis, discoespondilitis y endoftalmitis; en perros con enfermedad ocular pueden presentar blefarospasmo, sinequias, hipopión e hifema. En casos crónicos de uveítis anterior se ha logrado el aislamiento a partir del humor acuoso y los niveles elevados de anticuerpos confirman la presencia de *B. canis* (Flores y Carmichael, 1981). Además, también ha sido posible la identificación de *B. canis* mediante inmunohistoquímica en tejido adiposo adyacente a riñones, linfonodos, estómago, corazón y piel, similar a lo observado en *M. tuberculosis*, dado que los adipocitos son células permisivas para la infección bacteriana. Pueden representar un sitio de replicación y su probable fallo en el tratamiento y persistencia de la infección (Dominguez *et al.*, 2018).

Otros signos que pueden presentar los perros son hiperplasia folicular del bazo (Wanke, 2004), dermatitis piogranulomatosa, endocarditis, osteomielitis, meningoencefalitis (Kauffman y Petersen, 2019), discoespondilitis, compresión de médula y ataxia (Wanke, 2004). Asimismo, pueden presentar fiebre, letargia, fatiga,

intolerancia al ejercicio, disminución de apetito y pérdida de peso (Kauffman y Petersen, 2019).

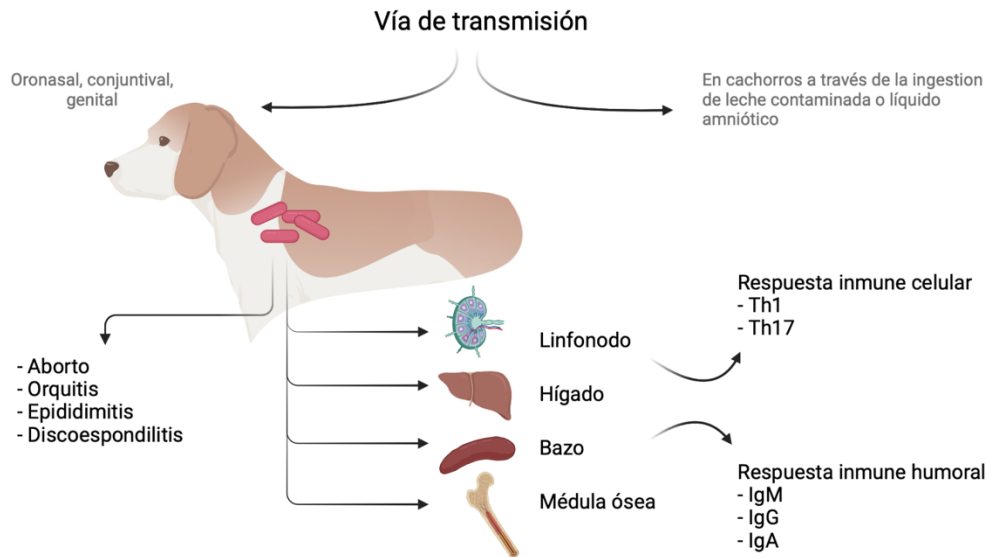


Figura 2.- Patogenia de *B. canis* en perros (ilustración creada en biorender.com)

Respuesta Inmune

Brucella spp., se replica en macrófagos, células dendríticas, placenta, trofoblastos, células de la microglia, células epiteliales y células endoteliales (de Figueiredo *et al.*, 2015).

En la respuesta inmune celular los receptores tipo Toll (TLR's), principalmente TLR2, TLR4 y TLR9 inician la señalización intracelular y activan el factor de transcripción NF- κ B (de Figueiredo *et al.*, 2015).

Cuando *Brucella* spp., establece su nicho de replicación dentro de los macrófagos, los linfocitos T cooperadores CD4 (TH1) y T citotóxicos CD8 producen IFN γ (Pollak *et al.*, 2015), citocinas derivadas de macrófagos como interleucina 1 (IL-1), 12 (IL-12) y TNF- α , contribuyen al control en la etapa temprana de la infección, a través de la vía IFN- γ que es un componente importante de la respuesta inmune celular tipo 1 (Th1) (Elfaki *et al.*, 2015). Además, estudios *in vitro* en células dendríticas de perro han mostrado que la respuesta inmune contra *B. canis* puede inducir la secreción de IL-17, IL-6 e IFN- γ hacia un perfil TH17 (T helper 17), este fenotipo

muestra ser un potente proinflamatorio y es eficaz contra patógenos intra y extracelulares, aunque se ha asociado a enfermedades crónicas como artritis reumatoide (Pujol *et al.*, 2017).

La respuesta inmune humoral contra *Brucella* es principalmente por IgG, IgM o IgA (Figura 2). En etapas agudas de la infección la primera en aparecer es IgM contra el LPS y en etapas crónicas es la IgG contra las proteínas citoplasmáticas de *Brucella* (Elfaki *et al.*, 2015).

Por el momento aún no existe vacuna para prevenir la brucelosis en perros, aunque existen estudios experimentales para el desarrollo de candidatos vacunales. Entre ellos se encuentra una vacuna que emplea una cepa de *B. canis* escasamente mucoide (M-) de baja patogenicidad; que emplea dosis altas para ocasionar bacteremia, ya que si la bacteremia no ocurre la protección es leve, por lo que es necesario estandarizar dosis y vía de administración para conferir una respuesta inmune eficiente (Flores y Carmichael, 1981).

Diagnóstico

Debido a las diferencias en el LPS (rugoso) de *Brucella canis* con las cepas lisas de otras especies de *Brucella*, las pruebas que se usan para diagnóstico de brucelosis en otras especies no puede emplearse para diagnóstico de brucelosis canina (Flores y Carmichael, 1981). Los anticuerpos contra *Brucella* pueden ser detectados a las 2 semanas posinfección (Wanke, 2004).

El aislamiento bacteriológico, se considera la prueba confirmatoria de la brucelosis canina (Keid *et al.*, 2009; Keid *et al.*, 2015; Pollak *et al.*, 2015; Wanke, 2004), dicha prueba sigue la metodología descrita en el manual de Alton (Alton *et al.*, 1988), las muestras empleadas para el aislamiento son exudado vaginal, fetos abortados, placenta, leche, orina, semen, médula ósea, linfonodos (Makloski, 2011) y sangre, este último tiene la desventaja de que la bacteremia es intermitente (Mol, 2020); por lo que puede dar resultados falsos negativos (Olivera *et al.*, 2011).

El método de diagnóstico de la brucelosis canina, considerado como prueba tamiz es la aglutinación rápida en placa desarrollada por Carmichael y Joubert (Carmichael y Joubert, 1987), la cual detecta anticuerpos IgG e IgM. La prueba de aglutinación con 2β-mercaptoetanol (RSAT con 2-βME), rompe los puentes disulfuro de la cadena J de la IgM (Rodríguez, 1996) esta prueba muestra niveles de sensibilidad del 70.5% y especificidad del 83.3% (González, 2015).

El suero tratado con 2-βME incrementa la especificidad pero disminuye la sensibilidad de la prueba (González, 2015; Keid *et al.*, 2009; Mol *et al.*, 2020). Títulos de 1:200 o mayores se consideran indicativos de infección (Mol *et al.*, 2020).

En la FMVZ-UNAM, el antígeno para la detección de anticuerpos dirigidos contra *B. canis* se elabora con *B. canis* RM6/66 Mucoide negativo (M-) cepa donada por el Dr. Leland Carmichael, la cual es inactivada con calor, teñida con rosa de bengala, concentrada al 6% y resuspendida en un tampón de pH 8.6. El resultado de la prueba se reporta como positivo o negativo y es debido a la presencia o ausencia de aglutinación respectivamente (González, 2015; Keid *et al.*, 2009). El uso de antígenos elaborados a partir *B. ovís* cepa REO 198 (independiente de CO₂) da como resultado el 62% de las reacciones falsas positivas, mientras que el uso de la cepa RM6/66 (M-) disminuyen dichas reacciones (Wanke, 2004).

Es importante mencionar que los sueros empleados en esta prueba deben estar libres de contaminación y hemólisis ya que puede interferir con la interpretación de los resultados ocasionando reacciones falsas positivas (Flores y Carmichael, 1981).

La prueba de aglutinación en tubo (TAT), es una prueba semicuantitativa (Hollet, 2006) (Wanke, 2004), que consiste en realizar diluciones seriadas del suero problema y se enfrenta al antígeno de *B. canis*. La dilución 1:25 - 1:50 indica que el animal es sospechoso (Zavala, 2011) y títulos de 1: 100 o superiores puede deberse a una infección activa (Hollet, 2006) (Hollet R, 2006; Keid L. *et al.*, 2009; Wanke M, 2004).

La prueba de TAT con 2-βME detecta IgG, ya que el compuesto produce alteraciones en los enlaces disulfuro y genera un impedimento estérico con las IgM

quedando monómeros sin capacidad de aglutinar (Miceli *et al.*, 2019). Los títulos de 1:200 o más se consideran positivos (Flores- Castro, 1977).

La prueba de Inmunodifusión Doble en Agar (AGID) fue descrita por Zoha y Charmichael en 1982 (Zoha, 1982), dicha prueba emplea antígenos de pared celular o antígenos proteico citoplasmático (Hollet, 2006). La prueba emplea un extracto salino caliente de *B. ovis* y un soporte de gel de agarosa al 0.8% (González, 2015). Esta prueba se usa principalmente para el diagnóstico de brucelosis ovina (Ebani, 2003), cuya sensibilidad y especificidad es del 91.8% y 100% respectivamente (Núñez-Torres, 1998), además se ha observado que se puede diferenciar el antígeno de *B. canis* de otros antígenos, por la forma de las bandas de precipitación (Zoha, 1982).

La inmunofluorescencia indirecta (IFA-i) emplea inmunoglobulina anti-canina marcada con fluoresceína (anti-IgG contra *Brucella*) dirigida contra el complejo Ag-Ac (Brennan *et al.*, 2008). El resultado se visualiza con un microscopio de fluorescencia, un resultado positivo se observa de color verde manzana (cocobacilos Gram negativos) y un resultado negativo se observa de color rojo. Un título de anticuerpos 1:50 indica una infección temprana, una respuesta de anticuerpos atenuada o el uso de antibióticos; 1:100 indica que se trata de un animal sospechoso y un título 1:200 indica que se trata de un animal positivo que debe confirmarse con una prueba de AGID (Fuller, 2009).

La prueba de inmunocromatografía es una prueba cualitativa para la detección de *B. canis* a partir de la segunda y tercera semana postinfección. Presenta una sensibilidad y especificidad del 95.8 y 99.7%. La prueba tiene una membrana de nitrocelulosa que contiene una ventana T donde se encuentra adherido el antígeno, ventana C que tiene la proteína específica de validación del ensayo que se unirá al anticuerpo con oro coloidal y ventana S donde se coloca la muestra que migra hacia la ventana T que reaccionará con el antígeno (Tuemmers *et al.*, 2013). Los antígenos empleados en esta prueba son proteínas de membrana externa y LPS de *B. ovis* (Mol *et al.*, 2020). Actualmente existen pruebas inmunocromatograficas

como FASTest® *Brucella* y *Brucella* IC® que detectan IgG en plasma o suero (Kritsiriwuthinan *et al.*, 2020).

La prueba de fijación del complemento fue descrita por Alton en 1976 (Alton, 1976) y Weber y Kraus en 1977 (Weber y Kraus 1977), es una prueba cuantitativa que detecta anticuerpos capaces de fijar el complemento (IgG₁) (Alton, 1976). Los antígenos empleados son LPS de *B. ovis*, *B. canis* (RM6/66) y la variante de *B. canis* menos mucoide (M-) (Carmichael y Kenney, 1968), esta última ocasiona menos reacciones falsas positivas (Carmichael, 1988). Esta técnica se realiza en dos etapas; en la primera se identifica la activación del complemento, se coloca el antígeno más el suero problema y se incuba en presencia de complemento de cuyo, en la segunda etapa se determina la cantidad de complemento libre mediante el sistema hemolítico formado por los eritrocitos de ovino absorbidos con anticuerpos de conejo (hemolisina). La ausencia de hemólisis (sedimentación del sistema hemolítico) indica una prueba positiva y una reacción de hemólisis indica una reacción negativa debido a la existencia de complemento libre que no formó inmunocomplejos ante la ausencia de anticuerpos anti-*Brucella* (Alton, 1976). Es importante mencionar que esta prueba no es de rutina, ya que el suero de perros tiene actividad anti-complemento (Alton, 1976; Weber y Kraus 1977), aunque es útil para diagnosticar infecciones crónicas por *B. canis* (Weber y Kraus 1977).

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas indirecta (ELISA-i), puede detectar perros positivos dentro de los primeros 30 días post infección (Lucero *et al.*, 2002). Se basa en la reacción de anticuerpos dirigidos en contra de antígenos de *B. canis* M- (Miceli, 2019), *B. canis* RM6/66, proteínas de superficie de citoplasma, bacterias inactivadas, extracto sonificado y también se han empleado antígenos de *B. abortus* (Heredia, 2012).

Estos antígenos se encuentran unidos a una superficie inmunoabsorbente, después se coloca un anticuerpo secundario dirigido contra los anticuerpos del suero, con anticuerpo Anti-IgG conjugado con peroxidasa que se une al complejo Ag-Ac y finalmente se agrega un sustrato empleado por la peroxidasa. La lectura de la

reacción, se cuantifica mediante un espectrofotómetro (Heredia, 2012; Lucero *et al.*, 2002). Los antígenos elaborados con la cepa *B. canis* M- son específicos pero poco sensibles y a partir de la cepa RM6/66 producen más reacciones falsas positivas, esta prueba tiene la ventaja de identificar pacientes asintomáticos, en etapas agudas o tratados con antibióticos (Wanke, 2004).

Dentro de las pruebas de ELISA, se encuentran las pruebas que usan antígenos completos; sin embargo, pueden incluir componentes bacterianos compartidos entre diferentes géneros bacterianos, lo que contribuye a disminuir la especificidad (Castro *et al.*, 2006), debido a que muchos antígenos son semejantes entre bacterias o células del propio hospedero (Sánchez *et al.*, 2020). Además también se encuentran las que emplean antígenos de superficie, sin embargo, pueden presentar reacciones cruzadas con otros géneros bacterianos como *Agrobacterium*, que pertenecen a la familia *Rhizobiaceae* *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* (Estein *et al.*, 2002). Cabe mencionar que al usar proteínas de membrana externa como citoplasmáticas se han detectado epítopes compartidos entre *B. suis*, *B. ovis* y *B. abortus*, y entre bacterias pertenecientes a la familia α -*Proteobacteria* como *Agrobacterium* spp., *Sinorhizobium* spp. y *Ochrobactrum* spp., por lo que el uso de estos antígenos disminuye la especificidad de las pruebas serológicas (Radojicic *et al.*, 2001). También se encuentran las que emplean LPS-R purificado para el diagnóstico de *B. ovis*, que disminuye las reacciones cruzadas contra *Phyllobacterium*, *Rhizobium* y *Agrobacterium*, aunque sigue presentando reacción contra *Ochrobactrum anthropi* (Gall *et al.*, 2003) y las que usan extractos con y sin LPS de *B. abortus* cepa S19 en el diagnóstico de brucelosis porcina, para incrementar la sensibilidad y especificidad, respectivamente (Castro *et al.*, 2006).

Dot-ELISA, es una prueba semicuantitativa en la que se emplea una membrana de nitrocelulosa. Esta prueba puede emplear diferentes antígenos como el LPS, proteínas de membrana y proteínas citoplasmáticas de la cepa *B. canis* RM6/66 (Radojicic *et al.*, 2001). En esta prueba existen dos variantes; Dot-ELISA-Ag,

detecta el Ag de *Brucella* a los 3 días postinfección y Dot-ELISA-Ac identifica anticuerpos del isotipo IgG contra proteínas citoplasmáticas de *Brucella* a 42 días postinfección (Onilude *et al.*, 2016). En un resultado positivo se observan puntos circulares de color marrón en la membrana (Radojicic *et al.*, 2001).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una prueba rápida, sensible y específica (Buhmann *et al.*, 2019), además es útil para detectar etapas agudas y subclínicas de infección (Mol, 2020). La PCR es capaz de detectar 3.8 fg (que corresponde al material genético de dos células de *Brucella*) de ADN de *Brucella* (Keid *et al.*, 2007). Las muestras empleadas son hisopados vaginales, prepuciales, semen, leche y sangre (Keid *et al.*, 2007; Olivera *et al.*, 2011). La sensibilidad de la PCR puede alterarse debido a la presencia de inhibidores de la PCR y sangre con heparina (Mol *et al.*, 2020).

En la PCR se han empleado los iniciadores ITS66 y ITS279, que amplifican la región ARN ribosomal 16S-23S con los iniciadores ITS66: ACATAGATCGCAGGCCAGTCA e ITS279: AGA- TACCGACGCAAACGCTAC (Keid L., Soares R., Vasconcellos S., *et al.*, 2007); iniciadores que amplifican el gen *bcs_p31* usando los iniciadores 5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3' y 5'-CGCGCTTGCCTTTCAAGGTCTG-3'.7, cuyo producto final es 223 pb (Mol *et al.*, 2020), o amplificando los genes *omp2b* y *omp2a* específicos de *B. canis* (Lucero, 2010), además se ha empleado una prueba de PCR anidada dirigida contra el gen *virB2* de *Brucella*, con los iniciadores B2N-1 5'GTCGCGATTCTACCTCACCT 3' y B2N-2 5'TAAGCAGGTAAGAGGAATTT 3' la cual tiene una sensibilidad de detección de 10² bacterias en el semen de perros (Keid 2007; Kim, 2006).

Bruce-ladder es una PCR multiplex recomendada por la WOA, para identificar diferentes especies de *Brucella* en animales y humanos. Esta prueba puede amplificar fragmentos específicos de *B. neotomae*, *B. abortus*, *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51, *B. melitensis* Rev.1, *B. canis* y *B. ovis*. Sin embargo, una de las desventajas es que algunas cepas de *B. canis* y *B. microti* pueden ser identificadas erróneamente como *B. suis* (Goñi *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

En la búsqueda de antígenos candidatos para el diagnóstico se realizó un estudio en el 2016, en el laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis en la FMVZ-UNAM, donde se evaluó una prueba de ELISA-i, empleando proteínas inmunodominantes obtenidas a través de Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (FPLC). Las fracciones purificadas fueron analizadas mediante espectrofotometría de masas y cromatografía líquida (LC-MS) y se evidenció que las bandas observadas en los anteriores experimentos correspondían a la proteína GroEL (Hsp) de 60 kDa, por lo que dicha proteína fue propuesta como candidata para el diagnóstico de la brucelosis canina (Morales, 2016). Por lo tanto, la clonación del gen *groEL* de *B. canis* permitirá obtener un templado para la producción de la proteína recombinante para su uso como antígeno en una prueba de ELISA-i para el diagnóstico de brucelosis canina.

Debido a lo anterior el diagnóstico oportuno es clave para el control y erradicación de cualquier enfermedad, como es el caso de la brucelosis canina, que representa un problema de salud pública y animal. Por esta razón las estrategias biotecnológicas como la clonación permitirá la producción de la proteína recombinante GroEL de *B. canis* para su uso en pruebas serológicas, ya que la obtención de antígeno nativo de *B. canis* se elaboran mediante un proceso riguroso a partir de cultivos bacterianos en laboratorios de bioseguridad nivel 3 (BSL-3), además para su correcta interpretación se requiere de personal capacitado.

3. HIPÓTESIS

La amplificación del gen *groEL* de *B. canis* se empleará como estrategia para la clonación en el plásmido de expresión pQE60, que servirá de templado en la producción de la proteína recombinante GroEL de *B. canis*.

4. OBJETIVO GENERAL

Realizar la clonación del gen *groEL* de *B. canis* en el plásmido de expresión pQE60 su posterior expresión.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Amplificar el gen *groEL* de *B. canis*.
2. Purificar y secuenciar el gen *groEL* de *B. canis*.
3. Clonar el gen *groEL* de *B. canis* en el plásmido de expresión pQE60.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Para la extracción y la amplificación del gen *groEL*, se empleó como template el ADN de la cepa RM6/66 de *B. canis* donada por el Dr. Leland E. Carmichael del James A. Barker Institute for Animal Health, EU, almacenada a 4 C hasta su uso. La cepa fue cultivada en agar TSA por 48 h a 37°C y posteriormente fue cosechada en PBS e inactivada con calor.

Para la etapa de clonación se empleó la cepa de *E. coli* DH5 α (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EU), número de catálogo: 18258012), genotipo F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1, dicha cepa presenta tres mutaciones: *recA1*; que permite alta estabilidad del inserto al reducir la recombinación homóloga, *endA1*; que otorga alto rendimiento al permitir la transferencia de plásmidos al disminuir la degradación por endonucleasas y *lacZ* Δ M15 que permiten el método de selección azul/blanco.

Extracción de ADN cromosómico bacteriano

La obtención de ADN cromosómico de la cepa *B. canis* RM6/66, se realizó mediante el método de lisis alcalina, siguiendo la técnica modificada de Pitcher y colaboradores (Pitcher *et al.*, 1989). Previo a la extracción de ADN, la biomasa del cultivo fue obtenida por colecta con una asa bacteriológica y suspendida en 5 ml de agua destilada estéril, se centrifugó a 1000 x g por 1 min y después se desechó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados agregando 1 ml de agua destilada estéril y posterior centrifugación mediante las condiciones antes descritas. La pastilla bacteriana se resuspendió en 300 μ l de PBS hasta su uso. Se tomaron 200 μ l de la pastilla bacteriana y se centrifugó a 1000 x g por 5 min, se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 100 μ l de buffer TE y se agregó 1 mg/ml de lisozima (50 mg/ml, Sigma Aldrich), posteriormente, se incubó a 37 C durante 30 min. A continuación, se agregaron 500 μ l de buffer de lisis (tiocianato de guanidina 5 M) y se

homogenizó con vortex durante 5 min y se colocó en hielo. Luego se adicionó 250 µl de acetato de amonio (10 M). Después se añadió 2 µl de RNAsa (10 mg/ml, Sigma Aldrich) y se incubó a 37 C durante 30 min.

La suspensión de lisis bacteriana se centrifugó por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo donde se colocaron 500 µl de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló en el vórtex hasta obtener una mezcla homogénea y se centrifugó a 25 000 x g por 10 min. En este paso se transfirió el sobrenadante a un microtubo nuevo, se recuperó la fase acuosa sin tomar la interfase.

Después se agregaron 0.54 volumen de isopropanol frío y se incubó a -20 C por 1 min. Posteriormente se centrifugó a 6500 x g durante 20 s. Al sobrenadante se le agregó un 1 ml de etanol frío al 70%, se mezcló en el vórtex y se centrifugó a 12 000 x g durante 1 min. Los lavados con etanol se realizaron 3 veces. Al finalizar los lavados la pastilla de ADN se secó a temperatura ambiente, para eliminar los restos de etanol. El ADN genómico se resuspendió en 100 µl de agua libre de RNAsas y se almacenó a -20 C.

Posteriormente el ADN genómico de *B. canis* fue cuantificado mediante espectrometría en NanoDrop™ One^C Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™) donde se obtuvieron 468.7 ng/µl y se observó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Diseño de iniciadores para la amplificación del gen *groEL* de *B. canis*

Para el diseño de los iniciadores se realizó la búsqueda de la secuencia del gen *groEL* de *B. canis* dentro del genoma reportado en la base de datos GenBank (CP007759.1) y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) que corresponde a la cepa RM6/66. La secuencia del gen tiene un tamaño de 1645 pb y codifica para la proteína GroEL de 546 aminoácidos.

Los iniciadores se diseñaron manualmente de acuerdo al Manual de clonación y expresión *QIAexpressionist System*™ (Qiagen, 2003). El extremo 5' del iniciador en sentido incluye una secuencia complementaria del vector de 4 pb y 21 pb al extremo 3' del gen de interés que comprende al codón de inicio. El iniciador *forward* se

encuentra el codón de inicio. La temperatura de alineamiento de los iniciadores fue de 65°C. El iniciador antisentido tiene una secuencia complementaria específica del vector de 4 pb, 6 pb del sitio de corte y 16 pb del gen de interés, al extremo 3', sin incluir el codón de paro (Figura 3).

La síntesis de los iniciadores se realizó en el Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM). La homología entre los iniciadores y la secuencia del gen *groEL* de *B. canis* cepa RM6/66 fue corroborada en la base de datos *The Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI). El tamaño del producto de la secuencia del gen *groEL* fue de 1654 pb sin péptido señal y 22 pb de los iniciadores. La secuencia amplificada se analizó *in silico* en *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) y se observó 100% y 99.88% de identidad con los genomas de *B. canis* y *B. suis*, respectivamente.

A)

groEL-F: 5' **AGTAC CATGGCTGCAAAAGACGTAAAA** 3'

groEL-R: 5' **GGACA GATCTGAAGTCCATGCCGCC** 3'

B)

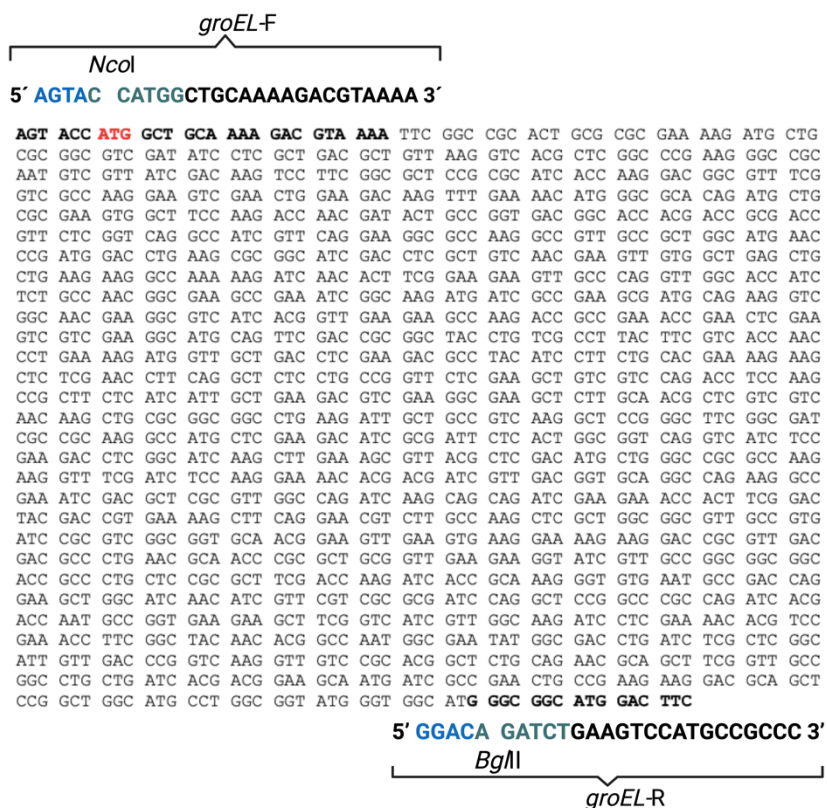


Figura 3.- Gen *groEL* de *B. canis* cepa RM6/66. A) Se señala la secuencia de los iniciadores que amplifican a *groEL*, secuencia específica del vector (color azul), sitios de restricción enzimática de *NcoI* y *BglII* (color verde) y secuencia complementaria específica de *groEL* (color negro). B) Secuencias de los iniciadores y fragmento que codifica la proteína GroEL de *B. canis* (sin péptido señal).

Vector de clonación

La clonación fue realizada en el plásmido pQE60 (Qiagen, USA) donado por el Dr. Ricardo Oropeza Navarro del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM). pQE es un plásmido de alto número de copias, cuyo tamaño es de 3,431 pb, tiene el origen de replicación ColE1, posee dos operadores *lac* (doble operador); que sirven de unión al represor *lacI*, el promotor T5; derivado del colifago T5 que es utilizado por la polimerasa *E. coli*, RBSII es el sitio de unión al ribosoma para la traducción, *lac* operador; la cual es una unidad genética de regulación negativa donde el represor se une al operador para inhibir la transcripción;

esta inhibición puede ser revertida mediante la adición de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), la región de término de la transcripción derivado del fago lambda (t0), región de término de la transcripción (T1) derivado del gen *rrnB* de *E. coli*, un péptido señal de histidinas (6xHis-tag) localizado en el extremo C-terminal, dos terminadores transcripcionales t0 del fago lambda y T1 del operón *rrnB* que evitan la transcripción de secuencias similares al promotor, además posee un cassette de resistencia a ampicilina (AmpR) y un sitio múltiple de clonación (MCS) (Figura 4).

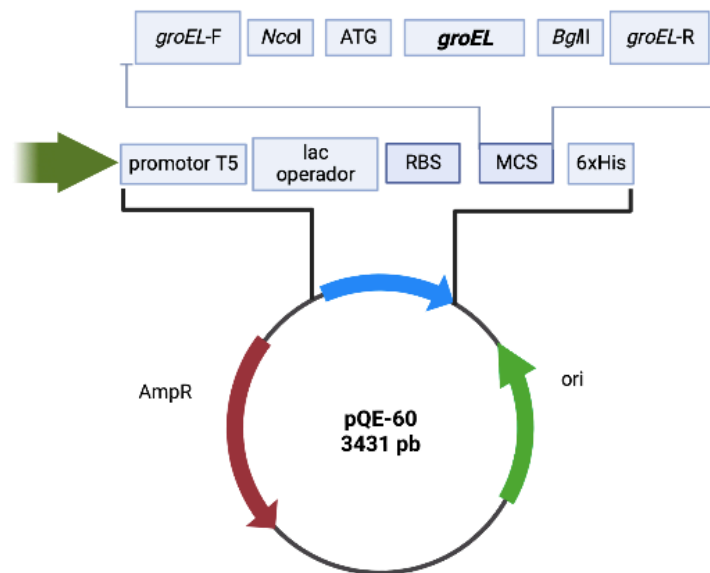


Figura 4.- Vector expresión pQE-60 (Qiagen, USA). Ori: origen de la replicación. Promotor T5: *lac* operador: regulación negativa de la transcripción. RBS: sitio de unión al ribosoma. 6xHis: etiqueta de histidinas. AmpR: confiere resistencia a ampicilina por β -lactamasas (imagen creada en biorender.com).

PCR del gen *groEL* de *B. canis*

Se estandarizó una PCR para amplificar el gen *groEL*, siguiendo el protocolo descrito por Sambrook & Russell (Sambrook y Russell, 2001). El ADN que se empleó fue el de *B. canis* cepa RM6/66.

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ l, ADN genómico 100 ng/ μ l, y oligos 10 μ M de acuerdo al Cuadro 1.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
H ₂ O	-	cbp 30 µl	17.1 µl
dNTP's	2 mM	0.2 mM	3 µl
<i>groEL</i> -F	10 mM	0.5 mM	1.5 µl
<i>groEL</i> -R	10 mM	0.5 mM	1.5 µl
Buffer DreamTaq	10X	1X	3 µl
DreamTaq polimerasa (Thermo Fisher Scientific)	5 U/ µl	2 U/rx	0.4 µl
MgCl ₂	30 mM	1.5 mM	1.5 µl
ADN	50 ng/ µl	100 ng/reacción	2 µl

Cuadro 1.- Estandarización de la PCR para la amplificación del gen *groEL* (Sambrook y Russell, 2001)

Se empleó el termociclador MaxyGene II Thermal Cycler (Axygen®, NY, USA) con las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; 30 ciclos a 95 °C por 30 s; 63 °C por 30 s y 72 °C por 1 min con 40 s; seguido de una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

La visualización del producto amplificado por PCR se realizó mediante un gel de agarosa al 1% con Tris-Acetato-EDTA (TAE), en una cámara de electroforesis horizontal, posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio y fotodocumentado en el equipo Kodak Gel Logic 200 Imaging System (Carestream Health, Inc, Woodbridge, USA).

Purificación y secuenciación del gen *groEL* de *B. canis*

El producto de la PCR del gen *groEL* se purificó mediante el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (General Electrics Healthcare Life Sciences, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y se cuantificó por espectrofotometría en un equipo

NanoDrop (*NanoDropTM One/One^C Spectrophotometer Microvolume UV-Vis*, Thermo Fisher Scientific, número de catálogo: ND-ONE-W) y se envió al IBT-UNAM, para ser secuenciado por el método de Sanger y resuelto mediante electroforesis capilar. Los cromatogramas de la secuenciación se editaron mediante la herramienta bioinformática ChromasPro. Las secuencias obtenidas del cromatograma se compararon en la herramienta BLAST de la base de datos GenBank.

Digestión enzimática de *groEL*

La digestión del producto purificado del gen *groEL* se realizó con las enzimas *NcoI* y *BglII*. La reacción se realizó con 10 µl de *NcoI* (10 U/ µl), 10 µl de *BglII* (10 U/ µl), 80 µl de buffer D (10X), y 6 µl del producto purificado de PCR (600 ng) y H₂O libre de nucleasas cbp para 800 µl. Después se incubó a 37 C, durante toda la noche, al finalizar el tiempo la reacción se colocó a -20° C. El producto de digestión enzimática se purificó mediante el kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen, U.S.A.) y se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% con TAE 1X a 80 V, durante 60 min.

Extracción de ADN plasmídico de pQE60

Se inocularon 50 µl de un cultivo de la cepa *E. coli* MC4100 transformada con pQE60, en caldo Luria Bertani (LB) con 50 µg/ml de ampicilina, se incubó en agitación orbital a 150 rpm a 37° C por 16 h; después de la incubación, se realizó una dilución 1:100 en caldo LB con ampicilina y se colocó en agitación orbital a 150 rpm a 37 C por 6 h. Después de la incubación el cultivo se centrifugó a 1000 x g durante 10 min, se decantó el sobrenadante. Se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante una columna *Qiagen Plasmid Plus Midi* (Quick Start Protocol, U.S.A.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ADN plasmídico se resuspendió en 250 µl de H₂O libre de nucleasas. Se realizó electroforesis en gel de agarosa para observar la integridad de la extracción y se cuantificó mediante espectrometría NanoDrop (*NanoDropTM One/One^C Spectrophotometer Microvolume UV-Vis*, Thermo Fisher Scientific, número de catálogo: ND-ONE-W). El producto de la extracción se conservó a -20 C.

Digestión enzimática de pQE60

Se realizó digestión enzimática del plásmido pQE60 con las enzimas *NcoI* (Roche Mannheim, Alemania, número de catálogo: 10835323001) y *BglII* (Takara Bio Inc., Japón, número de catálogo: 1021A) que generan extremos cohesivos 5'. La reacción de digestión se realizó con las siguientes condiciones: 347.82 µl de ADN plasmídico (23 ng/µl), 3 µl de *NcoI* (10 U/ µl), 3 µl de *BglII* (10 U/ µl), 2 µl de Buffer D (10X) y H₂O cbp 400 µl y se incubó a 37 C durante toda la noche. Se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% con (TAE 1X) a 80 V, durante 60 min para observar que el plásmido adquiriera una conformación lineal que confirma la digestión enzimática.

Clonación del gen *groEL* de *B. canis*

La clonación se realizó con las siguientes condiciones 1 µl de T4 ligasa (1 U/µl), 1.5 µl de buffer T4 ADN ligasa (10X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EU, número de catálogo: EL0012), 8 µl del producto purificado de la PCR de *groEL* (150 ng/µl), 1.5 µl del vector pQE60 (50 ng/µl) y cbp 15 µl de agua libre de nucleasas. La reacción se incubó a 4 C toda la noche y se almacenó -20 C.

A continuación, se tomaron 7 µl de la reacción de clonación para transformar 100 µl de células competentes *E. coli* DH5α por choque térmico. Después de la incubación las células transformadas se colocaron en 900 µl de caldo Luria Bertani (LB) y se incubó a 37°C en agitación orbital a 150 rpm durante 1 h. Al finalizar el tiempo de incubación se tomaron 300 µl de células transformadas, se sembraron en placas de agar LB con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37 C toda la noche.

Análisis de la construcción por PCR

Las colonias transformadas se seleccionaron mediante el método azul-blanco. Cada una de las colonias positivas se resuspendieron en 50 µl de agua libre de nucleasas y se colocaron en el termociclador (MaxyGene II Thermal Cycler) a 94° por 10 min. A partir de la lisis bacteriana se realizó PCR con las siguientes condiciones de reacción: 0.3 µl de los iniciadores *groEL*-F y *groEL*-R (10 µM), 1.5 µl

de dNTP's (2 mM), 0.75 µl de MgCl₂ (30 mM), 1.5 µl de Buffer DreamTaq (10X), DreamTaq polimerasa 0.4 µl de (5 U/ µl) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EU, número de catálogo: EPO402), 5 µl de lisado bacteriano y cbp 15 µl de agua libre de nucleasas.

El producto amplificado fue visualizado en el fotodocumentador (Kodak *Gel Logic 200 Imaging System*).

Análisis de la construcción por restricción enzimática

Se analizó la construcción por restricción enzimática con la enzima *HindIII* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EU), la cual tiene tres sitios de restricción dos en el inserto y uno en el vector. La reacción se llevó a cabo con las siguientes condiciones de 2 µl buffer R (10X), 1 µl *HindIII* (10 U/µl) y 20 µl de ADN plasmídico (50 ng/µl), cbp 50 µl de agua libre de nucleasas y se incubó a 37 C por 1 h. Después se realizó electroforesis del plásmido digerido en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml) y se visualizó en el fotodocumentador (Kodak *Gel Logic 200 Imaging System*).

Secuenciación de la construcción

Se realizó el análisis de la secuencia de pQE60/*groEL* para confirmar la correcta clonación.

Se realizó el análisis de los cromatogramas mediante el programa BioEdit, se editaron los errores de lectura, después se alinearon las secuencias de *groEL* con pQE60/*groEL* y los iniciadores *groEL-F* y *groEL-R* en el programa ClustalX.

7. RESULTADOS

Amplificación del gen *groEL* de *B. canis* por PCR

El fragmento amplificado de la PCR del gen *groEL* fue de 1654 pb, como se muestra en la Figura 5.

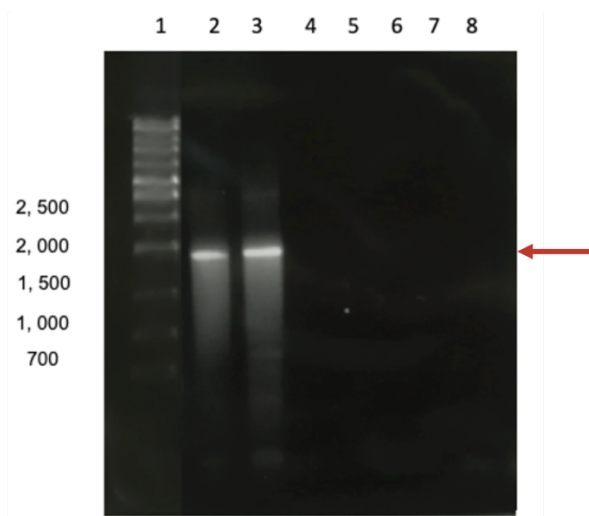


Figura 5.- Amplificación del gen *groEL* de *B. canis* por PCR. 1: carril 1 Kb Ladder DNA marker (Axygen Biosciences, EUA), carril 2-3: fragmento de 1654 pb del gen *groEL* de *B. canis*, carril 4: agua, carril 5-6: *E. coli* β 2163, carril 7-8: control negativo (sin ADN). La flecha roja indica el fragmento de 1654 pb que corresponde a *groEL*.

Clonación del gen *groEL* de *B. canis*.

La construcción *in silico* del plásmido pQE60/*groEL* basada en la secuencia del plásmido pQE60 en la que se puede identificar el sitio de restricción de las enzimas *NcoI* y *BglII*, la posición del inserto de 1640 pb y la posición de la etiqueta de histidinas 6xHis (Figura 6).

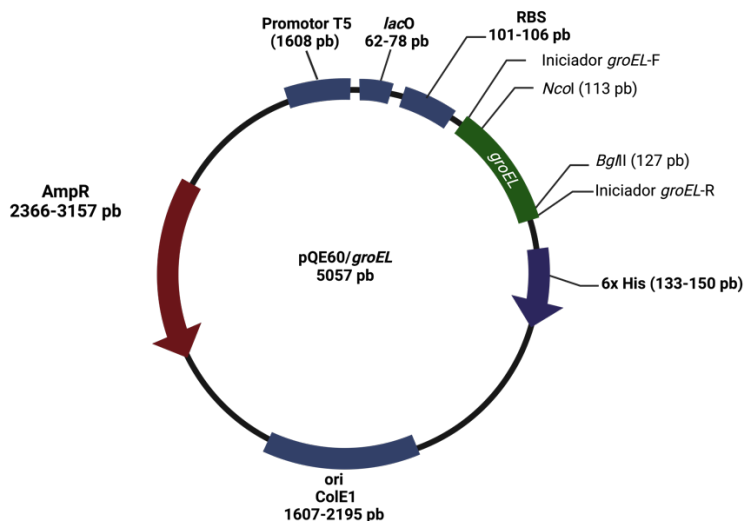


Figura 6.- Construcción *in silico* de pQE60/*groEL*. Promotor T5: sitio de reconocimiento para la ARN polimerasa, *lacO*: represor *lac* para el control de la expresión basal del promotor T5, RBS: sitio de unión al ribosoma, 6xHis: etiqueta de histidinas, ori ColE1: origen de replicación, AmpR: resistencia a la ampicilina por β -lactamasas. La línea verde indica la posición del inserto de 1640 pb (imagen creada en biorender.com).

Análisis de la construcción por PCR

Se realizó PCR a partir de una colonia de la construcción del plásmido pQE60/*groEL*, con los iniciadores *groEL*-F y *groEL*-R (Figura 7). Se amplificó un producto de 1654 pb.

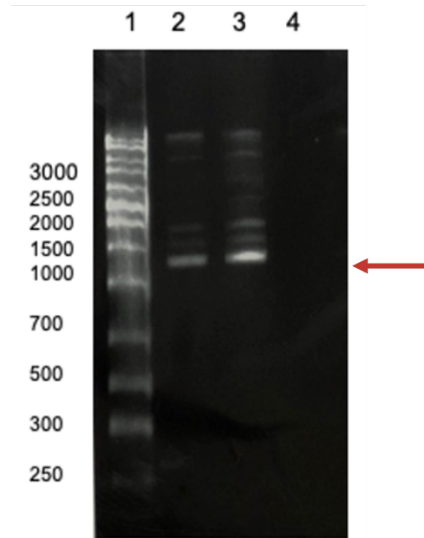


Figura 7.- PCR de colonia de la construcción pQE60/*groEL*. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb Ladder DNA marker (Axygen Biosciences, EUA), carril 2 y 3: fragmento de 1654 pb que corresponde al gen *groEL* (flecha roja), carril 4: control negativo (reactivos de la PCR sin ADN).

Análisis de la construcción por restricción enzimática

La restricción enzimática del plásmido pQE60 se realizó con las enzimas de restricción *NcoI* y *BglII*, se observó la linearización del plásmido con un tamaño de 3417 pb (Figura 8). La restricción con la enzima *HindIII*, que tiene tres sitios de corte resultó en cuatro productos de 168 pb, 285, 289 y 4315 pb (Figura 9).

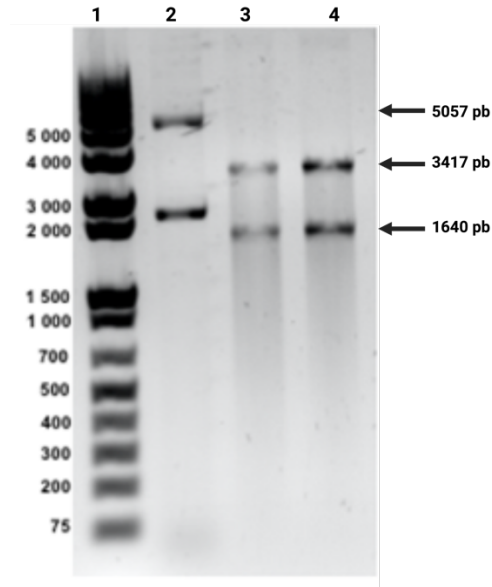


Figura 8.- Digestión enzimática de la construcción del plásmido pQE60/*groEL* con *NcoI* y *BglII*. Gel de agarosa al 1 % y TAE 1X. Carril 1: marcador de peso 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific GeneRuler™), carril 2: plásmido pQE60/*groEL* sin digerir, fragmento de 5057 pb, carril 3: plásmido pQE60/*groEL* (clona 23) digerido con *NcoI* y *BglII*, fragmentos 3417 pb y 1640 pb y carril 4: plásmido pQE60/*groEL* (clona 29) digerido con *NcoI* y *BglII*, fragmentos 3417 pb y 1640 pb.

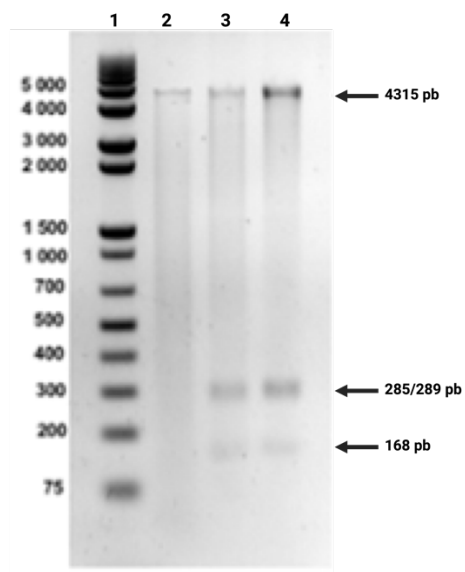


Figura 9.- Digestión enzimática de la construcción pQE60/*groEL* con *HindIII*. Gel de agarosa al 1 % y TAE 1X. Carril 1: 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific

GeneRuler™), carril 2: pQE60/*groEL* sin digerir: fragmento de 5057 pb, carril 3 y 4: pQE60/*groEL* (clona 23 y clona 29, respectivamente) digerido con *Hind*III fragmentos de 4315 pb, 285 pb, 289 pb y 168 pb.

Secuenciación de la construcción

Se realizó el alineamiento de las secuencias del plásmido pQE60 y las secuencias de la construcción pQE60/*groEL* en sentido con el iniciador *groEL*-F y el iniciador antisentido *groEL*-R sin gaps. La construcción se encuentra en sentido y en fase correcta (Figura 10).



Figura 10.- Secuenciación de la construcción. En el alineamiento se resalta en negritas la homología de las tres secuencias, en color azul la homología en dos secuencias, el corchete rojo identifica los sitios de alineación de los iniciadores empleados para amplificar *groEL* y la flecha roja señala la posición de inicio de la transcripción.

8. DISCUSIÓN

En la búsqueda para obtener nuevos y mejores antígenos que detecten anticuerpos IgG e IgM en perros con brucelosis canina (Sanchez, 2020), se propuso clonar el gen *groEL* de *B. canis* para uso como templado en la producción de GroEL recombinante y ser empleada como antígeno en una prueba serológica como la ELISA. Esta estrategia de diagnóstico permitirá identificar perros asintomáticos y en etapas agudas de la infección (Lee *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 1996; Lucero *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2020), como se ha observado en las pruebas dot ELISA e inhibición de la aglutinación (Kritsiriwuthinan *et al.*, 2020).

GroEL ha sido usada como antígeno en la prueba de aglutinación en látex en leptospirosis bovina, donde mostró ser una herramienta específica de diagnóstico durante brote (Karthik *et al.*, 2007). Asimismo, se ha usado para diferenciar a *Burkholderia pseudomallei* de *Pseudomonas* spp. en el diagnóstico de melioidosis (Kritsiriwuthinan *et al.*, 2020; Woo *et al.*, 2001)

Además GroEL se ha empleado como antígeno vacunal contra *Brucella abortus*, en dos investigaciones diferentes, esta proteína se inoculó en ratones BALB/c y se observó inducción de la respuesta inmune celular Th1 con alta producción de INF- γ y seguida de la respuesta inmune humoral con producción de IgG (Bae *et al.*, 2002; Vemulapalli *et al.*, 2000).

Debido a las características inmunogénicas Lee y colaboradores clonaron el gen *groEL* de *B. canis* en el vector pCOLD1 y expresaron la proteína recombinante (rGroEL) por choque frío (15°C durante 30 minutos). La proteína rGroEL fue inoculada en ratones y estimuló altos niveles de IgG, IgG1 e IgG2a en comparación con el control (PBS) (Lee *et al.*, 2013).

En un trabajo realizado por Morales en 2016; obtuvo proteínas inmunodominantes a partir de sueros de perros positivos a *B. canis* a través de Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (FPLC). Las fracciones purificadas fueron analizadas mediante

espectrometría de masas y cromatografía líquida (LC-MS). Se observó que las bandas correspondían a la proteína nativa GroEL de 60 kDa (Hsp60) (Morales A., 2016), estos resultados hacen conveniente tener una proteína recombinante que nos permita obtener cantidades suficientes de antígeno de manera más económica sin tener que realizar el cultivo de *B. canis* cada vez que se requiera extraer y purificar la proteína.

En este trabajo se amplificó y clonó el gen *groEL* de *B. canis* RM6/66 en pQE60, ya que puede expresar proteínas recombinantes en sistemas bacterianos, pero también en baculovirus y levaduras (Qiagen, 2003).

En este trabajo se logró la clonación del gen *groEL* de *B. canis* RM6/66 (pQE60/*groEL*) para su posterior expresión, además el gen clonado podría servir como templado para subclonarse en otro vector de expresión como los derivados de pACYC, que demostraron la sobreexpresión de proteínas chaperonas como: GroES-GroEL y DnaK/DnaJ/GrpE; (Rosano y Ceccarelli, 2014) o los vectores pBB, ofrecen una alternativa para la expresión de la proteína GroEL ya que la proteína recombinante podría mejorar la estandarización en las pruebas serológicas, en comparación con bacterias completas o el LPS (Navarro *et al.*, 2015).

En la siguiente etapa de este trabajo se deberán explorar las condiciones de expresión debido a que GroEL se expresa bajo condiciones de estrés oxidativo, cambios de pH y altas temperaturas como lo observado por Lin y colaboradores que clonaron el gen *groEL* de *B. abortus* en pBluescript II KS+ y realizaron la inducción a 42° y 46° C (Lin *et al.*, 1992), además otro grupo de investigación clonaron los segmentos C-terminal del dominio ecuatorial del gen *groEL* (residuo 23-42 y 507-536 aa) y del gen *groES* de *E. coli*, *Pseudoalteromonas* sp., y *Thermus* sp. En pQE30 y pQE60, demostraron que a 10° C hay mayor crecimiento bacteriano en comparación con el plásmido vacío y que a 14° C inicia el plegamiento de los residuos de GroEL a GroES para la formación del anillo en una bacteria mesófila como *E. coli*, por lo que la temperatura fue un factor crucial para la actividad de

GroEL, el crecimiento y supervivencia de bacterias psicrófilas, mesófilas y termófilas (Nakamura *et al.*, 2014). Aunado a lo anterior se ha empleado para la inducción de proteínas chaperonas alcohol bencílico, complementar el medio de cultivo con prolina, glicina-betaína, trehalosa o cofactores como hierro, azufre y magnesio lo que ha demostrado mejorar el rendimiento de proteínas solubles (Rosano y Ceccarelli, 2014).

En el presente trabajo se comenzaron a explorar diferentes condiciones para la expresión sin obtener resultados favorables; por lo que aún queda por determinar las condiciones de expresión adecuadas.

Además de la expresión y purificación de la proteína GroEL, se deberá estudiar la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA-i, donde se utilice este antígeno como lo observado por Palacios, donde se comparó el antígeno crudo sonicado (AC) de la cepa *B. canis* RM6/66 y la fracción purificada de GroEL de *B. canis* obtenida por Morales (Morales, 2016), la fracción soluble purificada por cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC). En este trabajo se determinó el punto de corte, repetibilidad y precisión inmediata; así como variación de temperatura en la prueba de ELISA-i. Cabe mencionar se deben utilizar sueros de animales enfermos con otro tipo de microorganismos, y sueros de animales sanos. (Palacios, 2021).

9. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se logró la clonación del gen *groEL* de *B. canis* que expresará a GroEL recombinante o podrá ser empleado como un vector de mantenimiento para su posterior subclonación en otro vector de expresión.

10. PERSPECTIVAS

La clonación del gen *groEL* en el plásmido pQE60 permitirá la expresión del gen *groEL* de *B. canis*, además también podrá servir de templado para la subclonación en un vector de expresión para la obtención de rGroEL de *B. canis*. La proteína rGroEL será purificada mediante cromatografía de afinidad de Ni-NTA. La obtención de este antígeno podrá ser empleado en el diagnóstico de la brucelosis canina. Finalmente, es importante identificar dentro de la secuencia de *groEL* de *B. canis* los oligopéptidos que puedan ser antígenos diana en el diagnóstico de la brucelosis canina.

11. FUENTES DE CONSULTA

1. Alva J, Arellano B, Hernández R, Suárez F (2014). The *invA* gene of *Brucella melitensis* is involved in intracellular invasion and is required to establish infection in a mouse model. *Virulence*, 5(4), 563–574. <https://doi.org/10.4161/viru.28589>
2. Alton G, Jones L, Pietz D (1976). *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris, France, INRA.
3. Ananda K, Venkateswara G, Sambasiva K (2007). Chaperonin GroEL: Structure and Reaction Cycle. *Current Protein & Peptide Science*, 8(5), 418–425. <https://doi.org/10.2174/138920307782411455>
4. Ardoino S, Baruta D, Toso R (2006). Brucellosis canina. *Ciencia Veterinaria*, 8(1), 50–57.
5. Bae J, Schruring G, Toth T (2002). Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins: Use of *baculovirus* recombinant-expressing whole insect cells, purified *Brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens. *Veterinary Microbiology*, 88(2), 189–202. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00101-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00101-3)
6. Brennan S, Ngeleka M, Philibert H, Forbes L, Allen A (2008). Canine brucellosis in a Saskatchewan kennel. *Canadian Veterinary Journal*, 49(2), 703.
7. Boeri E, Escobar G, Ayala S, Sosa-Estani S, Lucero N (2008). Brucellosis canina en perros de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina*, 68(4), 291–297.
8. Bosu W, Prescott J (1980). A serological survey of dogs for *Brucella canis* in southwestern Ontario. *Canadian Veterinary Journal*, 21(7), 198–200.
9. Buhmann G, Paul F, Herbst W, Werner H, Falk M, Wolf G, Hartmann K, Fisher A (2019). Canine brucellosis: Insights into the epidemiologic situation in Europe. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(May), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00151>
10. Carmichael L (1988). Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *The Cornell Veterinarian*, 28(2), 329–333.

<https://doi.org/10.2308/aud.2009.28.2.329>

11. Carmichael L, Bruner D (1968). Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *The Cornell Veterinarian*, 48(4):579, 7346.
12. Carmichael L, Kenney R (1968). Canine abortion caused by *Brucella canis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 152(6), 5688953.
13. Castrillón-Salazar L, Giraldo-Echeverri C, Sánchez-Jiménez M, Olivera-Angel M (2013). Factors associated with *Brucella canis* seropositivity in kennels of two regions of Antioquia, Colombia. *Cadernos de Saude Publica*, 29(10), 1975–1987. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00133013>
14. Castro H, González S, Prat M, Baldi P (2006). Detección de anticuerpos anti-*Brucella* spp. en cerdos mediante técnicas de aglutinación y ELISA indirecto en las provincias de Buenos Aires y La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(2), 75–78.
15. Chen R (2012). Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1102–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013>
16. Cosford K (2018). *Brucella canis*: An update on research and clinical management. *Canadian Veterinary Journal*, 59(1), 74–81.
17. de Figueiredo P, Ficht T, Rice-Ficht A, Rossetti C, Adams G (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of *Brucella*-host interactions. *American Journal of Pathology*, 185(6), 1505–1517. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.003>
18. Denisov A, Sclyarov O, Salmakov K, Shumilov K(2013). The Russian experience in brucellosis veterinary public health. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 32(1), 229–237. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2199>
19. Dentinger C, Jacob K, Lee L, Mendez H, Chotikanatis K, McDonough P, Chico D, Tiller R, Traxler R, Campagnolo E, Schmitt D, Guerra M, Slavinski S (2015). Human *Brucella canis* Infection and Subsequent Laboratory Exposures Associated with a Puppy, New York City, 2012. *Zoonoses and Public Health*, 62(5), 407–414. <https://doi.org/10.1111/zph.12163>

20. Diario Oficial de la Federación. (2016). Acuerdo mediante el cual se enlistan las plagas y enfermedades exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
21. Domínguez T, Furtado T, Pinto J, Menezes J, Ferreira M, Alves T, Lima R (2018). Tissue distribution and cell tropism of *Brucella canis* in naturally infected canine fetuses and neonates. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25651-x>
22. Ebani V, Cerri D, Fratini F, Bey R, Andreani E (2003). Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. *New Microbiologica*, 26(1), 65–73.
23. Elfaki M, Alaidan A, Al-Hokail A (2015). Host response to *Brucella* infection: Review and future perspective. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(7), 697–701. <https://doi.org/10.3855/jidc.6625>
24. Estein S, Baldi P, Bowden R (2002). Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis* in infected flocks. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14(5), 407–411. <https://doi.org/10.1177/104063870201400508>
25. Ficht T (2014). *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiology*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.52.Brucella>
26. Flores-Castro R, Suárez F, Ramirez-Pfeiffer C, Carmichael L (1977). Canine brucellosis: Bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico City. *Journal of Clinical Microbiology*, 6(6), 591–597. <https://doi.org/10.1128/jcm.6.6.591-597.1977>
27. Flores C (2017). *Seroprevalencia de brucelosis canina (Brucella canis) en perros de Culiacán, Sinaloa [Tesis de licenciatura]*. Universidad Autónoma de Sinaloa.
28. Flores R, Segura R (1975). Estudio sobre *Brucella canis* en México. *Técnica Pecuaria*, 54–58.
29. Flores R, Carmichael L (1981). Brucelosis causada por *Brucella canis*. *Ciencia Veterinaria*, 78.
30. Fontana C, Conde R, Stahle J, Holst O, Iriarte M, Zhao Y, Arce V, Hanniffy S,

- Pierre J, Moriyón I, Widmalm G (2016). Structural studies of lipopolysaccharide-defective mutants from *Brucella melitensis* identify a core oligosaccharide critical in virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7727–7741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701540>
31. Fuller (2009). MediMark Europe Sarl. An Indirect fluorescence immunoassay for the detection of IgG class antibody against *Brucella canis*.
32. Gall D, Nielsen K, Vigliocco A, Smith P, Perez B, Rojas X, Robles C (2003). Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Ruminant Research*, 48(3), 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00013-0](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00013-0)
33. Geresu M, Kassa G (2015). A Review on Diagnostic Methods of Brucellosis. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 07(03). <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000323>
34. Gómez G, Adams L, Rice-Ficht A, Ficht T (2013). Host-*Brucella* interactions and the *Brucella* genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(MAY), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00017>
35. Goñi L, Yoldi D, Marín C, de Miguel M, Muñoz P, Blasco J, Jacques I, Grayon M, Cloeckert A, Ferreira A, Cardoso R, Correa de Sa M, Walravens K, Albert D, Garin-Bastuji B (2008). Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3484–3487. <https://doi.org/10.1128/JCM.00837-08>
36. González A (2015). *Comparación de las pruebas de ELISA indirecta, inmunodifusión doble y aglutinación rápida en placa para el diagnóstico de brucelosis canina [Tesis de licenciatura]*. Universidad Nacional Autónoma de México.
37. González H, Páramo R, Flores R (2004). Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. *Veterinaria Mexico*, 35(2), 121–128.
38. Gutiérrez-Hidalgo R. (1980). *Contribución al estudio sobre Brucella canis en perros nacionales y en perros introducidos al país por la aduana del*

- Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México [Tesis de maestría].* Universidad Nacional Autónoma de México.
39. Hayer-Halt M, Bracher A, Ulrich F (2016). The GroEL-GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1), 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.009>
 40. Hensel M, Negron M, Arenas A (2018). Brucellosis in dogs and public health risk. *Emerging Infectious Diseases*, 24(8), 1401–1406. <https://doi.org/10.3201/eid2408.171171>
 41. Heredia A (2012). *Identificación de proteínas inmunogénicas de la membrana externa de Brucella canis [Tesis de licenciatura].* Universidad Nacional Autónoma de México.
 42. Hoff G, Nichols J (1974). Canine brucellosis in Florida: Serologic survey of pound dogs, animal shelter workers and veterinarians. *American Journal of Epidemiology*, 100(1), 35–39. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112006>
 43. Hollet R (2006). Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology*, 66(3 SPEC. ISS.), 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.011>
 44. Holst B, Löfqvist K, Ernholm L, Eld K, Cedersmyg M, Hallgren G (2012). The first case of *Brucella canis* in Sweden: Background, case report and recommendations from a northern European perspective. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-18>
 45. The Center for Food Security and Public Health (CFSPH). Iowa State University. (2009). Brucellosis canina : *Brucella canis*. *The Center for Food Security and Public Health*, 2007–2010. Retrieved from http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf
 46. Johnson C, Carter T, Dunn J, Baer S, Schawlow M, Bellay Y, Guerra M, Frank N (2018). HHS Public Access. Veterinary Medical Research & Development, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.2460/javma.253.3.322>. Investigation
 47. Jumas E, Michaux S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M (1998). Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*.

- Molecular Microbiology*, 27(1), 99–106. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00661.x>
48. Karthik V, Kanagavel M, Vanithamani S, Veerapandian R, Anandagiri S, Natarajaseenivasan K (2007). Recombinant GroEL based latex agglutination (GroEL-LAT) for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Veterinary Research Communications*, 31, 9–15. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3364-7>
49. Kauffman L, Petersen C (2019). Canine Brucellosis: Old Foe and Reemerging Scourge. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 49(4), 763–779. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.013>
50. Kawakami N, Wakai Y, Saito K, Imaoka K (2019). Chronic brucellosis in Japan. *Internal Medicine*, 58(21), 3179–3183. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.2961-19>
51. Keid L, Chiebao D, Batinga M, Faita T, Diniz J, Oliveira T, Ferreira H, Soares R (2017). *Brucella canis* infection in dogs from commercial breeding kennels in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(3), 691–697. <https://doi.org/10.1111/tbed.12632>
52. Keid L, Soares R, Vasconcellos S, Chiebao D, Megid J, Salgado V, Richtzenhain L (2007). A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology*, 67(7), 1203–1210. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.01.003>
53. Keid L, Diniz J, Oliveira T, Ferreira H, Soares R (2015). Evaluation of an Immunochromatographic Test to the Diagnosis of Canine Brucellosis Caused by *Brucella canis*. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(6), 939–944. <https://doi.org/10.1111/rda.12612>
54. Keid L, Soares R, Vasconcellos S, Chiebao D, Salgado V, Megid J, Richtzenhain L (2007). A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology*, 68(9), 1260–1270. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.021>
55. Keid L, Soares R, Vasconcellos S, Megid J, Salgado V, Richtzenhain L (2009). Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination

- test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Research in Veterinary Science*, 86(1), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.05.012>
56. Keid L, Soares R, Vieira N, Megid J, Salgado V, Vasconcellos S, da Costa M, Gregori F, Richtzenhain L (2007). Diagnosis of canine brucellosis: Comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. *Veterinary Research Communications*, 31(8), 951–965. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-0109-6>
57. Khurana S, Sehrawat A, Tiwari R, Prasad M, Gulati B, Shabbir M, Chhabra R, Karthik K, Patel S, Pathak, M, Iqbal M, Gupta K, Dhama K, Sah R, Chaicumpa W (2021). Bovine brucellosis—a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 41(1), 61–88. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1868616>
58. Kim S, Lee D, Suzuki H, Watarai M (2006). Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in canine semen by multiplex nested PCR. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(6), 615–618. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.615>
59. Kritsiriwuthinan K, Wajanarogana S, Choosang K, Pimklang T (2020). Comparison of Dot ELISA Using GroEL Recombinant Protein as an Antigen and an Indirect Hemagglutination Assay for Serodiagnosis of Melioidosis. <https://doi.org/10.2174/1874285802115010036>
60. Krueger W, Lucero N, Brower A, Heil G, Gray G (2014). Evidence for unapparent *Brucella canis* infections among adults with occupational exposure to dogs. *Zoonoses and Public Health*, 61(7), 509–518. <https://doi.org/10.1111/zph.12102>
61. Laverde A, Restrepo-Botero D, Hernández-Pulido D, Rodríguez-Bautista J, Sandoval I (2021). Seroprevalence of *Brucella canis* in dogs of a pet shelter in Bogotá, Colombia. *Biomedica*, 41(2), 1–28. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5409>
62. Lee H, Kim J, Lee K, Her M, Kim J, Kang S, Jung S (2013). Immunological

- analyses for recombinant GroEL of *Brucella canis*. *Preventive Veterinary Medicine*, 37(1), 29–34.
63. Letesson J, Barbier T, Zúñiga A, Godfroid J, De Bolle X, Moriyón I (2017). *Brucella* genital tropism: What's on the menu. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00506>
64. Lewis G, Anderson J (1973). The incidence of *Brucella canis* antibodies in sera of military recruits. *American Journal of Public Health*, 63(3), 204–205. <https://doi.org/10.2105/AJPH.63.3.204>
65. Lin J, Ficht T (1995). Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infection and Immunity*, 63(4), 1409–1414. <https://doi.org/10.1128/iai.63.4.1409-1414.1995>
66. Lin J, Adams G, Ficht T (1992). Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroEL heat shock proteins. *Infection and Immunity*, 60(6), 2425–2431. <https://doi.org/10.1128/iai.60.6.2425-2431.1992>
67. Lin J, Adams L, Ficht T (1996). Immunological response to the *Brucella abortus* GroEL homolog. *Infection and Immunity*, 64(10), 4396–4400. <https://doi.org/10.1128/iai.64.10.4396-4400.1996>
68. Lin Z, Rye H (2014). GroEL-Mediated Protein Folding: Making the Impossible, Possible. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1080/10409230600760382.GroEL-Mediated>
69. Lovejoy G, Carver H, Moseley I, Hicks M (1976). Serosurvey of dogs for *Brucella canis* infection in Memphis, Tennessee. *American Journal of Public Health*, 66(2), 175–176. <https://doi.org/10.2105/AJPH.66.2.175>
70. Lucero N, Escobar G, Ayala S, López G (2002). Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *Journal of Medical Microbiology*, 51(8), 656–660. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-8-656>
71. Lucero N, Escobar G, Ayala S, Jacob N (2005). Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *Journal of Medical Microbiology*, 54(5), 457–461. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45927-0>

72. Lucero N, Corazza R, Almuzara M, Reynes E, Escobar G, Boeri E, Ayala S (2010). Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. *Epidemiology and Infection*, 138(2), 280–285. <https://doi.org/10.1017/S0950268809990525>
73. Mateu-de-Antonio E, Martín M, Casal J (1994). Comparison of serologic tests used in canine brucellosis diagnosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 6(2), 257–259. <https://doi.org/10.1177/104063879400600220>
74. Makloski C (2011). Canine Brucellosis Management. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 41(6), 1209–1219. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.08.001>
75. [57]. Miceli G, Pérez L, Peralta L, Mortola E (2019). Detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* en perros en contacto con zona rural. *Analecta Veterinaria*, 39(2), 14. <https://doi.org/10.24215/15142590e038>
76. Mol J, Guedes A, Eckstein C, Quintal A, Souza T, Mathias L, Haddad J, Paixão T, Santos R (2020). Diagnosis of canine brucellosis: comparison of various serologic tests and PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(1), 77–86. <https://doi.org/10.1177/1040638719891083>
77. Monroe P, Silberg S, Morgan P, Adess M (1975). Seroepidemiological investigation of *Brucella canis* antibodies in different human population groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 2(5), 382–386. <https://doi.org/10.1128/jcm.2.5.382-386.1975>
78. Morales A (2016). Estandarización de una prueba de ELISA indirecta a partir de proteínas inmunodominantes de *Brucella canis* [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
79. Moreno E (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAY), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00213>
80. Nakamura T, Tanaka M, Maruyama A, Higashi Y, Kurusu Y (2014). A nonconserved carboxy-terminal segment of GroEL contributes to reaction

- temperature. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(12), 2498–2504. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.2498>
81. Navarro M, Morales A, Álvarez G, Ramírez C, Tamez P, Gómez R (2015). Recombinant Proteins as Antigens in Serological Diagnosis of Brucellosis. In INTECH (Ed.), *Updates on Brucellosis* (pp. 161–169). <https://doi.org/10.5772/61762>
82. Núñez-Torres E, Díaz-Aparicio E, Tenorio V, Hernández L, Marín C, Suárez-Güemes F (1998). Stability of antigen and agarose used in a double immunodiffusion serologic test for *Brucella ovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10(1), 113–115. <https://doi.org/10.1177/104063879801000125>
83. Olivera M, Giraldo C, Di Lorenzo C (2011). Identificación por PCR de *Brucella canis* en sangre y leche canina. Reporte de un caso. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43(3), 295–298. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2011000300012>
84. Onilude P, Yusoff S, Emikpe B, Tanko P, Shahrom S, Effendy M (2016). Development and application of dot-enzyme-linked immunosorbent (dot-ELISA) assay for detection of *Brucella melitensis* and evaluation of the shedding pattern in infected goats. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 38(1), 82–99. <https://doi.org/10.1080/15321819.2016.1220395>
85. Oosthuizen J, Oguttu J, Etsebeth C, Gouws W, Fasina F (2019). Risk factors associated with the occurrence of *Brucella canis* seropositivity in dogs within selected provinces of South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 90(2019), 1–8. <https://doi.org/10.4102/jsava.v90i0.1956>
86. Palacios V, Arellano B, Benítez A, Molares A, Suárez F (2021). Desarrollo y validación de dos inmunoensayos para la detección de *Brucella canis* en perros Development and validation of two immunoassays for the detection of *Brucella canis* in dogs. *Abanico Veterinario*, 11(Diciembre), 1–13.
87. Pitcher D, Saunders N, Owen R (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4), 151–

156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
88. Pollak C, Wanke M, Estein S, Delpino M, Monachesi N, Comercio E, Fossati C, Baldi P (2015). Immunization with *Brucella* VirB proteins reduces organ colonization in mice through a Th1-type immune response and elicits a similar immune response in dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, 22(3), 274–281. <https://doi.org/10.1128/CVI.00653-14>
89. Polt S, Dismukes W, Flint A, Schaeffer J (1982). Human brucellosis caused by *Brucella canis*. Clinical features and immune response. *Annals of Internal Medicine*, 97(5), 717–719. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-97-5-717>
90. Pujol M, Castillo F, Rojas C, Borie C, Ferreira A, Vernal R (2017). Variability in the response of canine and human dendritic cells stimulated with *Brucella canis*. *Veterinary Research*, 48(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0476-8>
91. Qiagen (2003). *The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. The QIAexpress System* (5th ed.).
92. Radojicic S, Lako S, Bosiljka D, Valcic (2001). DOT ELISA as a rapid method for serological diagnosis of canin brucellosis. *Acta Veterinaria*, 51, 317–324.
93. Ramos R (2012). *Detección molecular y aislamiento de Brucella canis en perros del area metropolitana de Monterrey, N.L. [Tesis de Maestría]*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Retrieved from <https://repositorio.uam.es/handle/10486/683661>
94. Rodríguez M (1996). Estandarización de un antígeno de *Brucella canis* M(-) para el diagnostico de brucelosis canina por medio de la prueba de aglutinación en placa [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
95. Rosano G, Ceccarelli E (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(April), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
96. Sambrook J, Russell D (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual* (Cold Sprin, Vol. 3). New York.
97. Sánchez-Jiménez M, Isaza J, Alzate J, Olivera M (2015). Comparison of

- Brucella canis* genomes isolated from different countries shows multiple variable regions. *Genomics*, 106(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.03.004>
98. Sánchez M, de la Cuesta J, Garcia G, Dabral N, Alzate J, Vemulapalli R, Olivera M (2020). Diagnosis of human and canine *Brucella canis* infection: development and evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *Brucella* proteins. *Heliyon*, 6(7). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04393>
99. Sánchez M, Giraldo C, Olivera M (2013). Infección por *Brucella canis* en humanos: propuesta de un modelo teórico de infección a través de la ruta oral. *Infectio*, 17(4), 193–200. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(13\)70731-8](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(13)70731-8)
100. Scholz H, Revilla S, Zygmunt M, Cloeckert A, Koylass M, Whatmore A, Blom J, Vergnaud G, Witte A, Aistleither K, Hofer E (2016). *Brucella vulpis* sp., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*vulpes vulpes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(5), 2090–2098. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000998>
101. Sigler P, Xu Z, Rye H, Burston S, Fenton W, Horwich A (1998). Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 581–608. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.581>
102. Silvester R, Alexander D, Antony A, Hatha M (2017). GroEL PCR-RFLP – An efficient tool to discriminate closely related pathogenic *Vibrio* species. *Microbial Pathogenesis*, 105, 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.029>
103. Tuemmers C, Lüders C, Rojas C, Serri M, Castillo C, Espinoza R (2013). Detección de. *Revista Chilena de Infectología*, 30(4), 395–401.
104. Velázquez R (1997). Estudio descriptivo de la frecuencia de *Brucella canis* en perros, en el area metropolitana de la ciudad de México [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
105. Vemulapalli R, He Y, Boyle S, Sriranganathan N, Schurig G (2000).

- Brucella abortus* strain RB51 as a vector for heterologous protein expression and induction of specific Th1 type immune responses. *Infection and Immunity*, 68(6), 3290–3296. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3290-3296.2000>
106. Ventura M, Canchaya C, Zink R, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Characterization of the groEL and groES loci in *Bifidobacterium breve* UCC 2003: genetic, transcriptional, and phylogenetic analyses. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Oct;70(10):6197-209. doi: 10.1128/AEM.70.10.6197-6209.2004. PMID: 15466567; PMCID: PMC522111.
107. von Bargen K, Gorvel J, Salcedo S (2012). Internal affairs: Investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), 533–562. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00334.x>
108. Wanke M (2004). Canine brucellosis. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.005>
109. Wattam A, Foster J, Mane S, Beckstrom-Sternberg S, Beckstrom-Sternberg J, Dickerman A, Keim P, Pearson T, Shukla M, Ward D, Williams K, Sobral B, Tsolis R, Whatmore A, O’Callaghan D (2014). Comparative phylogenomics and evolution of the brucellae reveal a path to virulence. *Journal of Bacteriology*, 196(5), 920–930. <https://doi.org/10.1128/JB.01091-13>
110. Wattam A, Williams K, Snyder E, Almeida N, Shukla M, Dickerman A, Crasta O, Kenyon R, Lu J, Shallom J, Yoo H, Ficht T, Tsolis R, Munk C, Tapia R, Han C, Detter J, Bruce D, Brettin T, Sobral B, Boyle S, Setubal J (2009). Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3569–3579. <https://doi.org/10.1128/JB.01767-08>
111. Weber A, Kraus H (1977). Zum serologischen Nachweis von *Brucella canis*-Infektionen bei Hunden mittels Komplementbindungsreaktion. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B*, 24(9), 746–752. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1977.tb01049.x>
112. Weber A, Schliesser T (1978). [The occurrence of antibodies to *Brucella canis* in domestic dogs in the Federal Republic of Germany]. *Berliner*

- Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 91(2), 28–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/623618>
113. Woo P, Leung P, Wong S, Ho P, & Yuen K (2001). *groEL* encodes a highly antigenic protein in *Burkholderia pseudomallei*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(4), 832–836. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.4.832-836.2001>
114. Xiang F, Xia Z, Wu Q, Chen Y, Yu J, Wan J (2013). Seroepidemiology of canine brucellosis in Beijing, China. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(1), 38–42. <https://doi.org/10.3906/vet-1106-19>
115. Yoak A, Reece J, Gehrt S, Hamilton I (2014). Disease control through fertility control: Secondary benefits of animal birth control in Indian street dogs. *Preventive Veterinary Medicine*, 113(1), 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.09.005>
116. Zavala M (2011). Seroprevalencia de *Brucella canis* en caninos del distrito de Pucusana. [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
117. Zoha S, Carmichael L, Leland E (1982). Serological responses of dogs to cell wall and internal in the female and epididymitis and testicular atrophy in the male. (8); 35–50.

12. ANEXO

Buffer TE (Tris 10 mM EDTA 1 mM) 1L

Tris-HCl 10 mM pH 7.4	10.6 g
EDTA 1 mM pH 8.0	3.94 g

Buffer de lisis/ 100 ml

Tiocianato de guanidina 5 M	60 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 ml
Sarcosyl al 0.5% (N-Lauryl sarcosine sodium salt)	relación 1:1
Agua Milli-Q®	20 ml

Amortiguador TAE 50X

Tris Base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 ml

Amortiguador TAE 1X / 1L

TAE 50X	20 ml
Agua destilada	980 ml