



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACION MOLECULAR DE LAS CEPAS VACUNALES S19 Y RB51 DE *Brucella abortus*

TESIS PRESENTADA ANTE LA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DE LA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
POR

LUARY CAROLINA MARTINEZ CHAVARRIA

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



MEXICO, D.F.

2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis padres, Pedro Martínez Servín y Guadalupe Chavarría León, a quienes debo mi vida, y los que desde ese momento se encargaron de inculcar en mí los principios y valores necesarios para alcanzar mis metas y realizar lo que me haga sentir satisfecha.

A mi hermano Antínoo, porque sé que tus comentarios siempre significaron que siguiera mi camino y que lo acabara de la misma forma en que lo empecé.

A mi tío Pedro (mi único tío), mi tía Carmela, Chumpi, la Güera y Emanuel, porque siempre he tenido la seguridad de que después de mis padres, son las personas en las que más puedo confiar y de las que siempre tendré apoyo en los momentos buenos y malos.

A Ernesto, porque estuvo a mi lado en la mayor parte de este proceso, y la persona que más me ha apoyado, querido y aguantado. Gracias horri.

A la Familia Cerda Guerrero, porque fueron mi familia durante mucho tiempo, y en especial al señor Octavio, que sin serlo, se preocupó por mí siempre como un padre.

A Montse (doc, doc), Juanelo, Raúl (palindromis), Emiliano (cosa rara), Cinthya (sincitio), Món, Adriana y Alma (ardillitas), Rodrigo, Marisa, Carlos, Bianca y Arturo, porque con cada uno de ustedes he vivido las etapas más bonitas y tristes de mis estudios, y siempre han tenido el tiempo, la palabra, la mente y el corazón puestos en hacer que esos momentos queden grabados para siempre. Los quiero mucho

A Héctor (Mac Fly; ;) y Jos por la amistad, la complicidad, los abrazos, el cariño y el apoyo sinceros que siempre me han demostrado.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Investigación en Tuberculosis, al lado de los que realicé mi trabajo y por quienes mi cariño creció a la par de mi tesis: Silvichis, Xóchil, Elihú, Alejandro (gracias por ser tan parecido a mí y por tu hombro para llorar), Toñito (gracias por las pláticas, el cariño y el apoyo) e Irasema (Pónte viva; ;)

A Gil, quien me dio tregua y dejó de molestarme para apoyarme en las etapas finales de mi tesis. Gracias por la confianza y tus palabras, grandote

A Alfonso, por las pláticas, el trabajo, el estudio y la música aquellas mañanas en que madrugábamos en el Laboratorio de Microbiología. Gracias por las ponchidrinas

A mi abuelo, quien siempre se interesó en mis estudios y porque sé que le hubiera dado gusto saber que culminé mi carrera.

A mi primo Daniel, porque sé que adonde quiera que vaya, siempre tiene un pensamiento para mí y porque siempre me ha permitido entrar en su vida

A mis tías Hilda y Olga, porque son las únicas que están pendientes de mi familia y siempre tienen el consejo, el apoyo, o las bromas, para los que quiero

A Lupita Patiño, Rosalba Rincón y la Sra. Ma. Luisa Fraire por ese apoyo y esa palabra de aliento en los momentos difíciles

A la señora Francis porque siempre me apoyó para no seguir caminos diferentes a los míos

A ti, parte esencial del mundo de sentimientos que me hiciste descubrir, y el que espero sigamos habitando. Quién si no?

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater, por darme el orgullo de formar parte de ella

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a los maestros que contribuyeron a mi formación personal y profesional durante estos cinco años

Al Departamento de Microbiología e Inmunología que es como mi casa desde hace algunos años y en donde encontré conocimiento, experiencia y amigos verdaderos.

A mi asesor Rigoberto Hernández Castro, principal responsable de mi interés y fascinación por las bacterias, mi mejor amigo, mi guía, y quien me hizo conocer desde el enojo, la tristeza y la desesperación, hasta la dicha, la responsabilidad y el orgullo de trabajar a su lado.

A mi asesor Antonio Verdugo Rodríguez porque siempre tuvo el consejo, el comentario o la anécdota, que me ayudara a mejorar mi trabajo, a ver la vida menos difícil y a arriesgarme a tomar decisiones.

A mi jurado, por las críticas, las sugerencias y los elogios hacia mi trabajo.

Al grupo de investigación de la Dra. Yolanda López Vidal, en especial a Gonzalo Castillo Rojas y Mauricio Castañón Arreola por las facilidades que me dieron en la última etapa de mi trabajo

A Marisela Leal Hernández y a Efrén Díaz Aparicio del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por la donación las cepas de campo utilizadas en este trabajo

Al Dr. Gilberto Chávez Gris por el apoyo que me dio para realizar mi trabajo y por haber contribuido a una parte de mi formación durante mi estancia en el Departamento de Patología

A ellos, por quienes construí hace mucho tiempo este sueño que hoy se hace realidad... los animales

Este trabajo fue financiado por los Proyectos de Investigación
IN205701 e IN245802 del Programa de Apoyo a Proyectos de
Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo del
Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de
Investigación (PROBETEL)

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Historia y situación actual de la brucelosis	3
1.2 <i>Brucella</i> spp.	5
1.3 Brucelosis bovina	10
1.3.1 <i>Brucella abortus</i>	10
1.3.2 Patogenia, signos y lesiones de la brucelosis bovina	11
1.3.3 Factores de virulencia	14
1.3.4 Diagnóstico	19
Aislamiento	20
Serología	22
Técnicas moleculares	23
1.3.5 Control y prevención	25
1.4 Justificación	30
1.5 Hipótesis y objetivos	31

2. MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1 Cepas bacterianas	32
2.2 Extracción de ADN	33
2.3 PCR a partir de ADN extraído	
de cultivo puro	34
2.4 PCR a partir de colonias bacterianas	36
3. RESULTADOS	
3.1 Extracción de ADN	38
3.2 PCR a partir de ADN extraído de	
cultivo puro	39
3.3 PCR a partir de colonias bacterianas	42
3.4 PCR para las cepas de campo	44
4. DISCUSIÓN	47
5. CONCLUSIONES	54
6. LITERATURA CITADA	55

RESUMEN

Martínez Chavarría Luary Carolina. Identificación molecular de las cepas vacunales S19 y RB51 de *Brucella abortus*. (Bajo la dirección del M. en C. Rigoberto Hernández Castro y Dr. Antonio Verdugo Rodríguez)

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de origen bacteriano que afecta tanto al humano como a diferentes especies animales domésticas y silvestres. Esta enfermedad tiene una amplia distribución mundial y es enzoótica en México; está incluida en la lista B de enfermedades de acuerdo con las disposiciones de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), que comprende "enfermedades transmisibles importantes desde el punto de vista socioeconómico y sanitario a nivel nacional y cuyas repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal son considerables". El impacto de esta enfermedad se ve reflejado en tres áreas: salud animal, salud pública y pérdidas económicas en el sector agropecuario.

Debido a las serias consecuencias médicas y económicas de la brucelosis, los esfuerzos se dirigen a la prevención de la enfermedad por medio del uso de vacunas. En la década pasada, la vacuna que se usaba ampliamente en los bovinos, era la cepa vacunal *B. abortus* S19. La cepa S19 tiene una delección en uno de los genes del operón *ery* que participa en el catabolismo del eritritol. En México, desde 1997, se aprobó el uso de la vacuna *B. abortus* RB51. Esta cepa presenta una secuencia de inserción (IS) conocida como elemento IS711, interrumpiendo el gen *wboA*. La presencia de una delección en la cepa S19, así como del elemento IS711 interrumpiendo el gen *wboA* en la cepa RB51, puede evidenciarse fácilmente mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Con base en este hecho se estandarizó un ensayo de PCR que permite identificar y diferenciar a las cepas S19 y RB51 de todas las demás especies y biotipos de *Brucella*.

Esta técnica se utilizó para la caracterización de 11 cepas de campo de *Brucella abortus* procedentes de leche bovina. Las once muestras dieron un producto de amplificación de 456 pb con el PCR que identifica a la cepa vacunal RB51, descartando con ello la presencia de alguna cepa vacunal RB51 dentro de las cepas de campo. Con la PCR que identifica a la cepa S19, nueve de las once muestras amplificaron un producto de 1063 pb, mientras que dos de ellas amplificaron un producto de 361 pb, lo que significa que estas dos cepas de campo correspondían a cepas vacunales S19 de *B. abortus*.

Los resultados obtenidos en este trabajo comprueban que la presencia de una delección en la cepa S19, así como del elemento IS711 interrumpiendo a la cepa RB51, características únicas en ambas cepas, son evidenciables fácilmente mediante la técnica de PCR.

La PCR estandarizada en este trabajo permitió la caracterización de cepas de campo de *Brucella abortus* procedentes de leche bovina. El hallazgo de cepas vacunales dentro de dichas cepas es de importancia tanto a nivel epidemiológico como a nivel oficial, debido a las implicaciones directas e indirectas que tiene sobre la Campaña Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina.

Summary

Martínez Chavarría Luary Carolina. Molecular identification of vaccine strains S19 and RB51 of *Brucella abortus*. (Under the tutoring of M. en C. Rigoberto Hernández Castro and Dr. Antonio Verdugo Rodríguez)

Brucellosis is an infectious disease caused by bacteria of the genus *Brucella* which affects various domestic and wild life animals, as well as humans. This disease is of worldwide distribution and still remains endemic in our country; it is included in the List B of diseases according with dispositions of the Office International des Epizooties (OIE), which comprises "transmissible diseases that are considered to be of socio-economic and/or public health importance within countries and that are significant in the international trade of animals and their products"

The significance of brucellosis is seen in three areas: animal health, public health and livestock economics due to restrictions applied to infected animals and their products.

Because of the serious economic and medical consequences of brucellosis, efforts have been made to prevent the infection through the use of vaccines. Until the past decade, strain 19 (S19) was used as the vaccine for brucellosis in cattle. Strain S19 carries a deletion in one of the genes of the *ery* operon, responsible for the erythritol catabolic pathway.

Since 1997, *B. abortus* strain RB51 was officially approved for use as a vaccine for cattle, replacing S19. This strain has an insertion sequence named IS711 which interrupts the *wboA* gen.

Based on the presence of a deletion in strain S19, and an IS711-like element disrupting strain RB51, we developed a PCR assays that can identify and distinguish S19 and RB51 from other *Brucella* species and strains.

These assays were used for characterization of 11 field strains of *Brucella abortus* isolated from milk of cattle. All strains amplified a 456-bp DNA fragment with the PCR that identifies RB51, discarding the presence of vaccine strain RB51 among the field strains. With PCR that identifies strain S19, nine (9) of eleven (11) strains amplified a 1063-bp DNA fragment, while two of them were identified as vaccine strains S19 by amplification of a 361-bp DNA fragment.

These results verify that the deletion in strain S19, as well as the IS711-like element in strain RB51, are evident by means of PCR.

The standardized PCR in this work allowed the characterization of *B. abortus* field strains isolated from milk of cows. The discovery of vaccine strains among this isolates is crucial in both epidemiological and government level, due to their direct and indirect implications on the National Campaign for Control and Eradication of Bovine Brucellosis.

1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de origen bacteriano que afecta tanto al humano como a diferentes especies animales domésticas y silvestres. Esta enfermedad tiene una amplia distribución mundial; en México se considera enzoótica. En algunos países los programas de control y erradicación desarrollados, han permitido su eliminación total como es el caso de Inglaterra, Noruega, Suecia, Dinamarca y Finlandia; o bien reducir considerablemente su incidencia como lo es Japón, Nueva Zelanda, Australia y Alemania.^{1,2}

La brucelosis está incluida en la lista B de enfermedades, de conformidad con las disposiciones de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), que comprende "enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista socioeconómico, sanitario, o ambos, a nivel nacional y cuyas repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal son considerables".³

1.1 Historia y situación actual de la brucelosis

Las primeras descripciones de la brucelosis fueron realizadas en 1751; posteriormente, durante la Guerra de Crimea, de 1854 a 1856, se observaron varios casos de fiebres persistentes que eran distintas de las enfermedades de la época. El mayor número de casos se encontró en la isla de Malta. Posteriormente la enfermedad fue descrita en otras áreas del Mediterráneo.^{2,4}

Fue en el año de 1886 cuando David Bruce aisló por primera vez el agente etiológico de la enfermedad, a partir del bazo de un soldado que murió por la infección, llamándolo en esa época, debido a su morfología cocoide, *Micrococcus melitensis*; veinte años después se determinó la forma de contagio para el humano, gracias a la aislamiento del agente a partir de la leche y la orina.

Once años después del descubrimiento de *M. melitensis*, Bang aisló el agente etiológico del aborto infeccioso, al cual se le da el nombre de bacilo de Bang; y en 1911 se establece el papel que juegan los bovinos en la transmisión de la enfermedad, al aislar al bacilo de Bang a partir de leche de vaca.^{2,4}

Teniendo en cuenta las similitudes existentes entre el agente causal de la fiebre de Malta y del bacilo de Bang con bases morfológicas, de cultivo y bioquímicas, se sugirió incluir a estas bacterias en el género *Bacterium*, que incluía a los microorganismos causantes de enfermedades intestinales como tifoidea y disentería; sin embargo Meyer y Shaw, en 1920, debido a que pueden causar una diferente entidad nosológica, al producir aborto en distintas especies animales, propusieron incluir estos microorganismos en un nuevo género, para el cual se eligió el nombre de *Brucella* en honor a David Bruce.^{2,5}

En 1914, otra especie de *Brucella* fue aislada por Traum en Estados Unidos a partir de un feto abortado de cerdo, y se le llamó *B. suis*. Posteriormente, en 1953 Buddle y Boyes en Australia, y Simmons y Hall en Nueva Zelanda, aislaron *B. ovis* como causa de epididimitis en los borregos. En 1957 *B. neotomae* fue aislada de ratas del desierto por Stoenner y Lackman en Estados Unidos, y no fue sino hasta 1968 cuando Carmichael y Bruner en Estados Unidos identificaron a *B. canis* como causa de aborto en perros.^{1,4}

En América Latina la llegada de la enfermedad fue debida a la introducción de animales infectados por los españoles durante el tiempo de la colonia. En México, desde 1906, se sospechó de la presencia de brucelosis al estudiar un caso de fiebre remitente de donde se intentó sin éxito, el aislamiento de *M. melitensis*. Así se sucedieron los informes de casos sospechosos de brucelosis, y en 1912 se relacionó la enfermedad con la importación de cabras murcianas en 1910. En México se aísla por primera vez *M. melitensis* en 1921, lo que

trajo consigo varios estudios bacteriológicos y serológicos. Posteriores a estos informes se realizaron estudios encaminados a conocer la distribución de la enfermedad en el país, y se encontró que los estados más afectados eran los del centro de la República, mismos en donde la explotación del ganado caprino es importante.²

Actualmente, la brucelosis es una de las más importantes enfermedades bacterianas en México y el mundo. El impacto de esta enfermedad se ve reflejado en tres áreas: salud animal, salud pública y pérdidas económicas en el sector agropecuario, que resultan de la enfermedad en el ganado y de las restricciones aplicadas tanto a los animales infectados como a los productos de éstos. Debido a que la producción animal representa una de las principales fuentes de ingresos para México, la entonces Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR), actualmente SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), creó la Campaña Nacional para la Erradicación de la Brucelosis Animal en el año de 1995.⁶

1.2 *Brucella* spp

De acuerdo a estudios moleculares sobre la unidad 16S ARNr, el género *Brucella* pertenece a la subdivisión α -2 de la clase *Proteobacteria*.⁷ El análisis de las secuencias cromosomales de otras especies pertenecientes a esta clase, permitió la comparación con el género *Brucella*, con lo que se estableció que este género se encuentra relacionado a patógenos y simbiontes de plantas tales como *Rhizobium* y *Agrobacterium*, a parásitos intracelulares animales como *Bartonella* y *Rickettsia* y a bacterias de vida libre y oportunistas como *Ochrobactrum* y *Caulobacter*.^{8,9}

Los microorganismos pertenecientes al género *Brucella*, son cocobacilos Gram negativos, intracelulares facultativos, no móviles, no capsulados

y no forman esporas. Crecen lentamente en los medios ordinarios; el crecimiento puede mejorar mediante la adición de sangre o suero, y en algunos casos con la suplementación de CO₂, el cual es esencial para algunas especies. La temperatura requerida para su crecimiento es de 37°C, y el pH óptimo es de 6.6 a 7.4. Su metabolismo es aerobio; el crecimiento no se da bajo condiciones estrictas de anaerobiosis. Estos microorganismos tienen poca o nula acción fermentativa sobre los carbohidratos en medios convencionales. Oxidan ciertos aminoácidos, así como intermediarios del ciclo de la urea. Son catalasa positivos y usualmente oxidasa positivos, reducen nitratos e hidrolizan la urea en diferentes grados. Además, no producen hemólisis, no fermentan el medio TSI, no utilizan el citrato como única fuente de carbono y resultan negativos en las pruebas de indol y rojo de metilo.^{1,2} La mayoría posee dos cromosomas, con excepción de *B. suis* biotipo 3, que posee un solo cromosoma;¹⁰ el porcentaje de Guanina+Citosina en el ADN es de 58-59%.¹

De acuerdo a su preferencia por el hospedero, el género *Brucella* ha sido clasificado en seis especies clásicas: *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (cabras y ovejas), *B. suis* (cerdo), *B. ovis* (ovejas), *B. canis* (perros) y *B. neotomae* (rata del desierto).⁸ *Brucella abortus* ha sido clasificada en 7 biotipos, *B. suis* en 5 biotipos y *B. melitensis* en tres biotipos; las demás permanecen como especies únicas. La diferenciación entre especies y biotipos se realiza mediante pruebas que permitan la caracterización fenotípica de antígenos de superficie (lipopolisacárido), requerimientos de CO₂, producción de H₂S, susceptibilidad a fagos, sensibilidad a colorantes (tionina y fuçsina), producción de ureasa y propiedades metabólicas (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Pruebas de diferenciación de las especies de *Brucella*

Especie	Lisis a la DCP por los bacteriófagos				Morfología colonial habitual	Exigencia de suero	Oxidasa	Ureasa	Hospedador preferencial
	Tb	Wb	Iz	R/C					
<i>B. melitensis</i>	-	-	+	-	lisa	-	+	+	Oveja, cabra
<i>B. abortus</i>	+	+	+	-	lisa	-	+	+	Bovino Biotipo 1: cerdo Biotipo 2: liebre
<i>B. suis</i>	-	+	+	-	lisa	-	+	+	Cerdo Biotipo 4: reno Biotipo 5: roedores silvestres
<i>B. neotomae</i>	-	+	+	-	lisa	-	-	+	Rata del desierto
<i>B. canis</i>	-	-	-	+	rugosa	-	-	+	Perro
<i>B. ovis</i>	-	-	-	+	rugosa	+	-	+	Ovino

Tabla 2. Pruebas de diferenciación de los biotipos de *Brucella*

Especies	Biotipo	CO ₂	H ₂ S	Colorantes		Aglutinación		
				Tionina	Fucsina	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+ ^a	+	-	+	+	-	-
	2	+ ^a	+	-	-	+	-	-
	3	+ ^a	+	+	+	+	-	-
	4	+ ^a	+	-	+	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	-	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	-	+	+	-
	5	-	-	+	-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>		-	+	-	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>		+	-	+	-	-	-	+
<i>B. canis</i>		-	-	+	-	-	-	+

^a Positivo para la mayoría de las cepas

En fauna silvestre, la brucelosis ha sido reportada en camellos, dromedarios, búfalos, bisontes, yaks, ciervos y antílopes.³ En los

últimos años se han descrito bacterias del género *Brucella* infectando a mamíferos marinos.^{11,12,13} Dichos aislamientos comprenden al menos dos grupos de acuerdo a la preferencia por el hospedador: cetáceos (delfines, marsopas y ballenas) y pinnípedos (focas y lobos marinos). Estudios moleculares han demostrado que dichos aislamientos difieren de los encontrados en los animales terrestres y entre ellos pueden ser diferenciados de acuerdo a características fenotípicas y metabólicas como requerimientos de CO₂, crecimiento primario en medio Farrell y actividad metabólica sobre la galactosa. Con base en sus características fenotípicas y moleculares, se ha aceptado la inclusión de dichos aislamientos dentro del género *Brucella*, para los que se han propuesto dos nuevas especies: *B. cetaceae* y *B. pinnipediae*.^{1,14,15,16,17} Los estudios de hibridación de ADN-ADN han revelado un alto grado de similitud (más del 90%) entre las seis especies reconocidas de *Brucella* y los recientes aislamientos en mamíferos marinos.^{18,19,20,21} La validez taxonómica de este hecho ha sido aceptada, pero la nueva nomenclatura propuesta, en la que *Brucella* constituiría un género monoespecífico con *B. melitensis* como única especie y las restantes como biotipos de ésta, se ha encontrado con oposiciones en el campo práctico.¹

En México, han sido aisladas cinco de las seis especies identificadas. Entre éstas se encuentran *B. melitensis* biotipo 1-3; *B. abortus* biotipos 1, 2, 4-6; *B. suis* biotipo 1, *B. canis* y *B. ovis*. Algunos de estos aislamientos se han realizado en hospedadores no tradicionales, por lo que parece que el contacto de un animal con otro, ayuda a diseminar la enfermedad.²²

La brucelosis es además una zoonosis muy importante, ya que algunas especies de *Brucella* pueden ser transmitidas al humano y causar una enfermedad (*B. abortus*: fiebre ondulante o *B. melitensis*: fiebre de Malta), que puede clasificarse como aguda (menos de 8 semanas),

subaguda (de 8 a 52 semanas), o crónica (más de 1 año). La infección puede adquirirse por vía conjuntival, por aerosoles o a través de piel lesionada, pero el consumo de leche cruda y productos derivados constituye la principal fuente de transmisión. Los síntomas de la brucelosis humana son inespecíficos; la mayoría de los pacientes presentan fiebre, debilidad, anorexia, dolor de cabeza y artralgia. Esta enfermedad puede afectar varios sistemas, en los que produce diversos signos y síntomas, tales como artritis, espondilitis, osteomielitis, meningoencefalitis, endocarditis, abscesos hepáticos y esplénicos, orquitis y neumonía.^{23,24} El diagnóstico requiere el aislamiento del microorganismo a partir de sangre o tejidos corporales, así como la serología y manifestaciones clínicas. Entre los antibióticos utilizados para el tratamiento de la enfermedad se encuentran las tetraciclinas, doxiciclina, rifampicina, estreptomycin y sulfas-trimetoprim.²³

México produce entre 9000 y 10000 millones de litros de leche de vaca al año. De este volumen, el 35% es consumido como quesos y leche sin pasteurizar. De los 120 millones de litros de leche de cabra producida, casi el 85% es consumido como quesos sin pasteurizar, que no cuentan con vigilancia sanitaria. En los últimos años se reporta un promedio de 3500 casos anuales de brucelosis en humanos; casi 20 muertes al año se relacionan directamente con la brucelosis. La prevalencia es mayor en las mujeres que en los hombres, principalmente entre los 25 y 64 años de edad, y se encuentra presente tanto en áreas rurales como urbanas.²²

Brucella abortus, *B. melitensis* y *B. suis* constituyen las principales especies patógenas para el ser humano. En México, del total de los casos anuales, el 93% de los humanos son infectados con *B. melitensis* de origen caprino, 5% con *B. melitensis* de origen bovino, 1.5% con *B. abortus* de origen bovino y 0.5% con *B. suis* de origen bovino.²⁵

La brucelosis animal se encuentra ampliamente difundida en diferentes regiones del país. El Programa Nacional de Erradicación ha detectado hatos positivos con diferentes niveles de prevalencia en casi todos los Estados de la República. Los estados de Chihuahua, Hidalgo y Guanajuato, tienen la más alta prevalencia en hatos bovinos, mientras que los estados de Coahuila, Chihuahua, Jalisco y Zacatecas la tienen en rebaños de caprinos.²²

1.3 Brucelosis bovina

La brucelosis en el ganado bovino es causada casi exclusivamente por *B. abortus*; existen algunas áreas en donde la co-existencia del ganado con los pequeños rumiantes (cabras principalmente) facilita la infección del ganado con *B. melitensis*. *Brucella suis* rara vez causa infección en el ganado.^{3,22}

1.3.1. *Brucella abortus*

Los microorganismos pertenecientes a esta especie de *Brucella* son catalasa y oxidasa positivos y generalmente requieren la suplementación con CO₂ para su crecimiento, especialmente en el aislamiento primario. Producen sulfuro de hidrógeno a partir de proteínas o aminoácidos. Generalmente crecen en presencia de concentraciones estándar de colorantes como fucsina básica, metilvioleta, pironina y safranina O, pero no en presencia de tionina. Reducen los nitratos a nitritos e incluso pueden reducir los nitritos también. Dentro de los aminoácidos que pueden oxidar se encuentra la L-alanina, D-alanina, L-asparagina, L-ácido glutámico, D-galactosa, D-glucosa, D-ribosa y el isoeritritol; no pueden oxidar la D-xilosa, L-arginina, DL-citrulina, DL-ornitina o L-lisina.¹

1.3.2. Patogenia, signos y lesiones de la brucelosis bovina

La infección se produce principalmente por ingestión del organismo, pero puede producirse a través de la vagina, la conjuntiva y la piel lesionada. Puede producirse infección durante el coito, pero es poco frecuente. La ingestión del microorganismo es favorecida por la contaminación del alimento, de los pastos o de los fomites, por líquidos placentarios infecciosos, por tejidos, por fetos o por leche. Los bovinos jóvenes pueden ser infectados por las vías habituales, incluyendo la ingestión de leche. El organismo puede persistir en determinados productos animales y en el ambiente durante periodos prolongados bajo circunstancias favorables, como humedad y temperatura bajas.^{3,26,27}

Cualquiera que sea la vía de infección, el desarrollo y el establecimiento de la misma dependerán de la edad y del estado reproductivo del animal, de su resistencia inherente y la dosis y virulencia de la cepa infectante. Una vez establecida la infección en animales sexualmente maduros, y especialmente en hembras, tiende a persistir indefinidamente.²⁶

Una vez que ocurre la penetración de las mucosas, el organismo se dirige a los nodos linfáticos regionales y en ellos se multiplica, ocasionando una linfadenitis aguda.³ La infección puede ser vencida por éstos, pero si se establece, suele difundirse durante la fase de linfadenitis regional aguda. La difusión es principalmente hematógena y la bacteremia puede persistir por varios meses, dependiendo de la susceptibilidad o la resistencia del hospedador. A medida que la infección se torna crónica, la bacteremia se hace intermitente, en algunos animales cesa y en un 5 a 10% de los animales, recurre irregularmente por lo menos durante dos años.

La infección se restringe básicamente al bazo, glándula mamaria, linfonodos regionales y útero gestante en la hembra; y tejido

linfoide, testículos y glándulas accesorias en el macho; tales localizaciones se producen durante las fases bacterémicas iniciales. La enfermedad usualmente se presenta sin signos en las hembras no gestantes; los machos adultos pueden desarrollar orquitis.^{26,27}

Una manifestación común de la brucelosis, son los higromas, usualmente involucrando la articulaciones de la pierna, y pueden ser el único indicador obvio de la infección; los fluidos del higroma frecuentemente se encuentran infectados con *Brucella*.³

La infección del útero gestante, especialmente en la segunda mitad de la gestación, resulta en una placentitis progresiva que implica al corion, seguida de una endometritis y de la infección de la placenta fetal.^{26,27}

Diversos estudios han tratado de explicar los mecanismos por medio de los cuales *B. abortus* causa aborto en el ganado. Es reconocida la preferencia que presenta esta bacteria por los tejidos placentarios, y mucho se ha discutido sobre el papel del eritritol en este particular tropismo, al ser dicho azúcar un constituyente normal de los fluidos fetales y una fuente de carbono y energía para la bacteria.²⁸

La entrada inicial de *B. abortus* a la placenta ocurre en los trofoblastos eritrofagocíticos de los placentomas. Los trofoblastos corioalantoideos adyacentes son infectados también, permitiendo así la diseminación de la bacteria hacia las células de la membrana corioalantoidea, provocando su ulceración y ruptura, con la consecuente reacción inflamatoria.²⁸

La obstaculización del aporte sanguíneo al feto, los efectos endotóxicos sobre él, y la infección, son factores que coadyuvan en la subsiguiente pérdida de viabilidad del feto y en el aborto. La mayoría de los abortos ocurren desde los 5 meses de gestación hasta cerca del término de la misma.

La lesión fetal importante es la neumonía, presente en algún grado en casi todos los casos de abortos. Los pulmones pueden parecer normales al examen macroscópico, pero el examen histológico revela la presencia de focos de bronquitis y bronconeumonía. Las lesiones vasculares en el feto son variables, incluyendo arteritis necrotizante, especialmente de los vasos pulmonares, áreas focales de necrosis y granulomas con formación de células gigantes en los linfonodos, hígado, bazo y riñón.²⁶

La severidad de las lesiones uterinas es sumamente variable, y esto se refleja en parte, en el curso de la infección local. Si la lesión es severa, probablemente resulte en aborto o parto prematuro y si la lesión es menos severa, el ternero nace a término y puede o no ser viable.

La apariencia externa de un útero gestante infectado es normal. En las infecciones iniciales el endometrio está relativamente ileso; más tarde hay endometritis severa. Las lesiones placentarias no son uniformes; los cotiledones pueden aparecer necróticos y con exudado en diferentes grados. El estroma placentario contiene numerosos leucocitos, principalmente mononucleares y algunos neutrófilos. Las células epiteliales coriónicas presentan abundante cantidad de bacterias y muchas de ellas se descaman.²⁶

La brucelosis puede ser causa de infertilidad y el retorno al servicio. Incluso cuando no se presenta aborto, la excreción del microorganismo ocurre profusamente por medio de la placenta, descargas vaginales y fluidos fetales. Gestaciones subsecuentes usualmente son llevadas a término, pero la infección uterina y mamaria es recurrente, con números menores de organismos excretados.^{26,27}

1.3.3. Factores de virulencia

El conocer la interacción hospedero-parásito es de vital importancia, por lo que se hace necesario el estudiar los mecanismos de virulencia de la bacteria en relación a sus hospederos, para así poder establecer las estrategias más adecuadas para el diagnóstico y control.

A diferencia de otras bacterias patógenas, en el género *Brucella* no han sido descritos factores clásicos de virulencia, tales como exotoxinas, citolisinas, cápsulas, fimbria, flagelos, plásmidos, fagos lisogénicos, formas resistentes, variación antigénica, o inductores apoptóticos. Los verdaderos factores de virulencia de *Brucella* son aquellas moléculas que le permiten invadir, resistir la muerte intracelular y alcanzar su nicho replicativo en fagocitos profesionales y no profesionales.²⁹

La habilidad de *Brucella* para sobrevivir dentro de las células fagocíticas y no fagocíticas es de origen multifactorial, y hasta ahora, ningún factor ha sido demostrado como el único responsable de la virulencia de *Brucella*.²⁹

Una vez que *Brucella* invade la mucosa, entra en contacto con las células fagocíticas, y es internada por éstas. El modo por el que se lleva a cabo este evento en los fagocitos profesionales, parece influir en el destino de la bacteria dentro de los compartimentos intracelulares. En las células M, los neutrófilos y los macrófagos, la internación de *Brucella* se realiza mediante fagocitosis tipo zipper. En el caso de los fagocitos no profesionales se ha demostrado la participación del citoesqueleto de actina y microtúbulos para la ingestión de la bacteria. Además, para la internación en estas células se requiere de la activación de GTPasas de la subfamilia Rho, tales como Rho, Rac y Cdc42, que actúan como reguladores del citoesqueleto.³⁰ Otro factor que se encuentra implicado en la internación de *Brucella* en fagocitos profesionales y no profesionales, es el sistema de dos

componentes BvrR-BvrS. Este parece estar involucrado en la homeostasis funcional y estructural de la membrana externa. Cepas mutantes que carecen de este sistema son avirulentas en ratón, son más susceptibles a cationes bactericidas y surfactantes, pierden la capacidad de evitar la fusión lisosomal y son deficientes en varias proteínas de la membrana externa, principalmente Omp25 (ahora Omp3a) y Omp3b.³¹ Además son incapaces de activar directamente GTPasas como Cdc42 y en consecuencia, incompetentes para invadir a las células, indicando que este sistema controla la expresión de determinantes moleculares necesarios para la invasión.^{32,33,34}

La internación y el tráfico intracelular son dos eventos independientes durante la infección de *Brucella*. Sólo unas cuantas de las bacterias que fueron internadas son capaces de evitar la fusión lisosomal y redirigir su tráfico intracelular hacia su nicho replicativo final en el retículo endoplásmico; este proceso no muestra diferencias entre los fagocitos profesionales y no profesionales.³⁵

En las primeras etapas del tráfico intracelular, *Brucella* requiere de la activación de GTPasas Rab, así como la acidificación del medio.^{33,36} Este hecho puede ser necesario para la activación de genes de virulencia tales como el operón *virB*, que codifica para el sistema de secreción tipo IV presente en *Brucella*.^{37,38,39}

El sistema de secreción tipo IV regula el tráfico intracelular de *Brucella* desde el fagosoma hacia su nicho replicativo y aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual este sistema controla dichos eventos, se cree que exporta moléculas capaces de modular la biosíntesis del nicho replicativo de *Brucella*.³³ El sistema VirB es activado durante las primeras horas después de la internación de *Brucella*. Este sistema participa en los eventos tardíos del tráfico intracelular, y se encuentra implicado en la maduración del

autofagosoma de *Brucella*. Posteriormente, su expresión disminuye, lo que corresponde a la replicación dentro del nicho.³⁹

Recientemente se pensaba que el nicho replicativo de *Brucella* correspondía al retículo endoplásmico; esta hipótesis fue sostenida por el hecho de que este compartimiento es co-localizado con marcadores específicos para el retículo endoplásmico, tales como calnexina, sec61b y PDI. Sin embargo, el análisis de los genes de virulencia necesarios para la replicación de *Brucella*, demostró que el nicho replicativo carece de aminoácidos o bases nucleotídicas, y que es por tanto, un compartimiento aislado. Además se ha observado que la infección de las células con *Brucella* no afecta el tráfico de proteínas, lo que sugiere la separación entre el retículo endoplásmico funcional y el nicho replicativo de *Brucella*. Se ha propuesto que la bacteria utiliza la membrana del retículo endoplásmico para la construcción del nicho replicativo, lo que justificaría la presencia de marcadores que no definen realmente su función.⁴⁰

Dentro de los factores estructurales de *Brucella* que contribuyen a su virulencia, se encuentra el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de la membrana externa (OMP). Se ha comprobado que el LPS de *Brucella* es importante para la sobrevivencia intracelular, y por lo tanto para su virulencia, debido a que las cepas que han perdido la cadena O del LPS, nombradas mutantes rugosas, son menos virulentas que aquellas cepas con morfología colonial lisa, que tienen completa la cadena O de polisacáridos como parte de su LPS.⁴¹

La actividad biológica del LPS de *Brucella* es cualitativa y cuantitativamente diferente a aquella del LPS de otras bacterias Gram negativas.^{42,43} Así, en el modelo murino el LPS de *Brucella* no es pirógeno, no activa el complemento a ningún nivel y se comporta como un mitógeno muy débil para las células B.^{41,44,45}

Diferentes grupos de proteínas de membrana externa (OMP) se han descrito en *Brucella* spp. Los dos principales grupos de OMP de *B. abortus* fueron identificados mediante la extracción de la envoltura celular con detergentes y fueron designados como grupo 2 o porinas (36-38 kDa) y grupo 3 (25-27 kDa).^{46,47}

Los genes que codifican para las proteínas del grupo 2 fueron identificados en la década de los 80s; se encuentran en el locus *omp2* que consiste de 2 genes, *omp2a* y *omp2b*, los cuales comparten un grado de identidad mayor al 85%. Sin embargo, sólo se ha demostrado la expresión de *omp2b*.⁴⁶

En la década de los 90's, se identificaron dos genes que codificaban para las OMP del grupo 3 y fueron nombrados *omp25* (actualmente *omp3a*) y *omp31*.

El papel hipotético de las OMP en la virulencia, puede inferirse de su capacidad para generar una respuesta inmune protectora dirigida contra ellas. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales para ellas son menos eficaces contra la infección con *B. abortus*, que aquellos anticuerpos dirigidos contra el LPS.⁴⁸

La eliminación de organismos extracelulares por las células fagocíticas depende de la capacidad de estas células para convertir el oxígeno en metabolitos microbicidas, incluyendo intermediarios tóxicos de oxígeno tales como el anion superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las bacterias aeróbicas contienen enzimas protectoras encargadas de detoxificar esos compuestos, tales como superóxido dismutasa (SOD), glutatión sintetasa, catalasas y glutatión reductasa.⁴⁹

La enzima superóxido dismutasa (SOD) protege a la célula de los efectos tóxicos de los radicales superóxido convirtiéndolos en peróxido de hidrógeno y agua. En *B. abortus*, se han descrito dos tipos de SOD: una SOD Cu/Zn y una SOD Mn.⁵⁰

La enzima catalasa forma parte también del sistema antioxidante de la bacteria y protege a *Brucella* de los intermediarios tóxicos de oxígeno liberados por los macrófagos durante la fagocitosis.^{51,52} La localización periplásmica de esta enzima en *B. abortus* hace suponer que protege a la bacteria del peróxido de hidrógeno exógeno, convirtiéndolo en agua y oxígeno.⁴¹

La enzima RecA está involucrada en varias funciones del metabolismo del ADN, incluyendo la recombinación entre fragmentos homólogos de ADN y la reparación de ADN dañado. Los rearrreglos genéticos mediados por esta enzima pueden incrementar la virulencia de un patógeno o capacitarlo para evadir las defensas del hospedador, especialmente en un medio en el que hay daño en el ADN, como el que existe dentro de los macrófagos durante el estallido oxidativo.⁴¹

La enzima purE es necesaria para que *Brucella* produzca purinas necesarias para su crecimiento y replicación dentro de los macrófagos. La secreción de enzimas lisosomales por los macrófagos es inhibida por nucleótidos de adenina convertibles a adenosina. *B. abortus* expresa componentes nucleotídicos que inhiben la liberación de gránulos primarios y mieloperoxidasa por los leucocitos polimorfonucleares.⁵³

HtrA funciona como proteína de respuesta al estrés; los patógenos intracelulares facultativos, como *B. abortus*, generalmente expresan altos niveles de este tipo de proteínas cuando crecen en el medio intracelular. Las proteínas de respuesta al estrés juegan un importante papel en la adaptación fisiológica de la bacteria hacia el medio hostil que encuentra dentro del fagosoma del hospedador. HtrA degrada péptidos anormales generados durante el estallido oxidativo, con lo que impide que éstos se acumulen a niveles tóxicos en el periplasma de la bacteria.^{33,41,54,55}

Desde 1950, se demostró que el eritritol, era el único azúcar que soportaba el crecimiento de todas las cepas analizadas de *Brucella* y pertenecientes a la especie de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*.

La habilidad de catabolizar el eritritol es casi universal en el género *Brucella*. La cepa vacunal S19 de *B. abortus* ha perdido la capacidad de utilizar el eritritol, y es la única cepa de *Brucella* que es inhibida por la presencia de eritritol (1mg/ml) en el medio.⁵⁶

El eritritol se encuentra presente en la placenta de bovinos, borregos, cabras y cerdos, pero se encuentra ausente en la placenta de humanos y en mínimas cantidades en la placenta de roedores en general.⁵⁷

Existe gran controversia debido a la posible relación entre el uso del eritritol y la virulencia de *Brucella*. Un argumento que apoya este hecho es su síntesis en los tejidos donde *Brucella* es encontrada en altas concentraciones: placenta, vesícula seminal y testículos.

Los argumentos en contra son: (i) la predominante proliferación de brucelas que no oxidan el eritritol (*B. ovis*) o que incluso son inhibidas por él (S19), en la placenta de rumiantes, (ii) aunque bajas concentraciones de este azúcar son encontradas en la placenta de roedores, *B. abortus* se localiza especialmente en estos tejidos; y (iii) el eritritol no está presente en los macrófagos.⁴¹

1.3.4. Diagnóstico

La brucelosis en animales ha sido un tema de actividad tanto para clínicos, como para médicos oficiales responsables de las campañas e investigadores que tratan de mejorar las técnicas ya existentes que permitan adecuarse a los métodos de campaña específicos en cada región. Así, la estandarización de los métodos de aislamiento e identificación ha sido descrita en diversos manuales internacionales.

Aislamiento

La brucelosis puede ser diagnosticada por medio del aislamiento del microorganismo y su posterior análisis bacteriológico. Dependiendo del número de características fenotípicas analizadas, los organismos pueden ser identificados como género, especie, biotipo y algunas veces cepa, particularmente en el caso de las cepas vacunales.⁵⁸

Los cultivos realizados para obtener el aislamiento, se pueden hacer a partir de la placenta, descargas vaginales, tejidos fetales o contenido abomasal, leche o calostro y de tejidos colectados en el estudio postmortem, como glándula mamaria, útero, linfonodos, testículos, epidídimo y glándulas accesorias. Existen diversos medios que son adecuados para esto, tales como el agar dextrosa suero (SDA), el agar tripticasa soya (TSA) y el agar sangre; éstos pueden ser suplementados con bacitracina, polimixina B y vancomicina.³

Brucella produce colonias de 0.5 a 1 mm de diámetro, convexas, de borde entero, después de 72 h de incubación a 37°C. Bajo la luz directa, las colonias con morfología lisa son brillantes, amarillentas, pero bajo el reflejo de la luz son gris azuladas y ligeramente opalescentes; las colonias rugosas son similares en cuanto a tamaño y forma, pero son menos transparentes y aparecen de color blanco o amarillento bajo el reflejo de la luz.^{2,3}

Para aquellos aislamientos sospechosos se debe realizar una tinción de Gram o de Stamp; si se observan organismos que presenten la morfología de *Brucella*, se realiza la tinción con cristal violeta (las colonias rugosas se tiñen de rojo) y la aglutinación con acriflavina (sólo las colonias rugosas aglutinan). De acuerdo a la morfología de las colonias, se prueban con antisueros específicos para cepas lisas o para rugosas, según sea el caso.^{2,3}

La identificación adicional se realiza mediante pruebas metabólicas o susceptibilidad a los fagos Tb, Wb, Iz y R/C.² La identificación de

biotipos se hace con base en el crecimiento a diferentes concentraciones de colorantes (tionina y fucsina básica), producción de H₂S, requerimientos de CO₂ y aglutinación con antisueros específicos.³

Para identificar las cepas vacunales *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51, se realizan pruebas adicionales.² En el primer caso, la pérdida de requerimientos de CO₂, la inhibición del crecimiento con benzilpenicilina, tionina azul y eritritol, aprovechamiento de glutamato y baja virulencia residual en cuyes, son características que permiten diferenciar a la cepa S19.^{3,59} Para el caso de la cepa RB51, las características que se toman en cuenta son: morfología rugosa (tinción con cristal violeta y aglutinación con acriflavina), la resistencia al crecimiento en presencia de rifampicina, y la incapacidad para producir cadena O de polisacáridos.

El aislamiento e identificación a partir de muestras clínicas ha sido la prueba de oro durante mucho tiempo debido a que es confiable y definitivo. Pero aún así, todo este proceso también tiene desventajas. Primero, la duración desde que se obtiene la muestra clínica hasta la identificación es de dos semanas, tiempo que puede ser crucial para el ganadero, procesador de alimentos o paciente enfermo. Segundo, las pruebas son complejas y deben realizarse por personal capacitado en un laboratorio autorizado. Algunas de las características son subjetivas, y requieren por tanto la experiencia del personal que las realiza. Tercero, la naturaleza zoonótica de *Brucella* es un riesgo potencial para el personal del laboratorio, quien debe manipular al agente infeccioso durante las pruebas. Finalmente, los resultados no siempre son definitivos. Debido al gran número de características analizadas y a las pequeñas diferencias entre algunas especies y biotipos, una mutación menor puede dar como resultado datos conflictivos y complicar la interpretación.⁵⁸

Serología

Desde 1897 se ha desarrollado un número considerable de pruebas serológicas, y es de esta manera como se lleva a cabo el diagnóstico oficial de la brucelosis. Ninguna prueba es apropiada para todos y cada uno de los casos. Se debe tomar en consideración todos los factores que puedan influir en el método y en los resultados de las pruebas para una buena interpretación diagnóstica y su posterior aplicación.³

Ante una infección con *B. abortus* en el ganado se presenta una respuesta temprana de anticuerpos del tipo IgM en el hospedador, hecho que depende de la ruta de exposición, la cantidad de bacterias y el estado de salud del animal. La respuesta por IgM es seguida casi inmediatamente por la producción de anticuerpos IgG1 y más tarde por pequeñas cantidades de anticuerpos IgG2 e IgA.

El tipo de respuesta que se da en caso de reacciones cruzadas, es principalmente del tipo IgM, por tanto, dicha respuesta no es deseable. Puesto que la IgG2 y la IgA se acumulan después de la exposición y usualmente se encuentran presentes en cantidades pequeñas, el principal isotipo a medir en las pruebas serológicas es la IgG1. Por lo tanto, aquellas pruebas que midan predominantemente a la IgG son las de mayor utilidad diagnóstica.⁶⁰

En México, el diagnóstico obligatorio de la Campaña incluye pruebas serológicas oficiales: rosa de bengala y rivanol, como pruebas primarias; fijación del complemento como prueba complementaria y confirmatoria; y la prueba de anillo en leche o anillo de Bang como prueba de vigilancia epidemiológica.⁶

Asimismo se ha descrito una gran variedad de pruebas que ayudan a resolver de una forma más rápida y precisa el diagnóstico de la brucelosis, como la ELISA indirecta, ELISA competitiva, y la fluorescencia polarizada.^{2,3,60}

Técnicas moleculares

La microbiología molecular no ha estado ausente en el importante rubro del diagnóstico, habiéndose desarrollado diferentes oligonucleótidos para ser usados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y así identificar y diferenciar a las especies de *Brucella*.

La PCR es un método altamente sensible, muy específico, poco costoso y fácilmente adaptable para cumplir con altas demandas.⁶¹ Desde que fue introducido en 1987 se han hecho excelentes progresos en el desarrollo de numerosos ensayos para la identificación de *Brucella*. Los primeros ensayos fueron diseñados para explotar un locus único que era altamente conservado en *Brucella*, como el gen *BCSP31* o el operón *16S-23S* ARNr.^{62,63} Estos ensayos son útiles cuando una PCR género específica es suficiente, en los que la identificación de especies o biotipos no es crítica, como es el caso del diagnóstico de brucelosis humana o la detección del microorganismo en alimentos.⁵⁸ Por otro lado se han desarrollado numerosas PCR's para diferenciar entre especies y biotipos de *Brucella*. Estos ensayos son dirigidos hacia locus variables entre especies y biotipos. Mientras que se han encontrado deleciones o rearrreglos dentro de algunas especies o biotipos, la mayoría de las diferencias consisten en polimorfismos de nucleótidos simples; son muy raras las regiones hipervariables entre especies y biotipos.

Los ensayos que diferencian entre especies o biotipos son particularmente útiles para la vigilancia epidemiológica o para aquellos programas de erradicación especie-específicos. Estratégicamente, los intentos para desarrollar pruebas de PCR cada vez más específicas han ido dirigidos hacia tres vías:

(1) ensayos diseñados con oligonucleótidos altamente específicos bajo condiciones estrictas. Los oligonucleótidos amplifican secuencias cepa-específicas o regiones hipervariables del ADN. La ventaja de este

método es que se utilizan oligonucleótidos específicos, de 20 a 25 pb y que permiten el uso de condiciones estrictas en el ensayo, lo cual reduce el riesgo de reacciones falsas positivas. Sin embargo, la principal desventaja que presentan es que se requiere información substancial de las secuencias del ADN, y en el caso de *Brucella* las divergencias son difíciles de encontrar.

Ejemplo de este método es la AMOS-PCR, llamada así por las especies que es capaz de identificar y diferenciar (*abortus*, *melitensis*, *ovis* y *suis*), que explota el hecho de que muchas especies presentan al menos una secuencia de inserción IS711 con localización cromosomal única.^{64, 65, 66, 67}

(2) ensayos diseñados con oligonucleótidos semiespecíficos

En estos se explotan secuencias repetidas de ADN que son muy similares pero no idénticas. Debido a que los iniciadores no son perfectamente homólogos, se deben emplear condiciones moderadamente permisivas para maximizar la hibridación hacia la secuencia blanco. Esto a su vez aumenta la incidencia de amplificaciones erróneas o parciales, resultando en un número variable de amplicones.

ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus) y REP-PCR (repetitive extragenic palindromic) son dos buenos ejemplos de PCR en los que se usan oligonucleótidos semiespecíficos. Estos ensayos amplifican pequeñas secuencias repetidas de ADN (aproximadamente de 35 a 125 pb) que se encuentran dispersas en el cromosoma (s) de muchas bacterias.

(3) ensayos basados en la amplificación con oligonucleótidos al azar

Una desventaja de emplear oligonucleótidos altamente específicos es la necesidad de conocer bien la secuencia de ADN que se busca. Para evitar esto se crearon la AP-PCR (Arbitrary primed PCR) y la RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA PCR).⁶⁸ Estas emplean oligonucleótidos cortos, diseñados arbitrariamente, que se alinean a

secuencias de ADN bajo condiciones muy permisivas, lo que permite la hibridación al azar de secuencias parcialmente homólogas. Al ser pequeños los iniciadores, la hibridación que se presenta es débil, por lo que pequeños cambios en las condiciones del ensayo pueden influir fácilmente en la eficiencia del alineamiento y alterar significativamente los resultados.

Varios laboratorios han desarrollado métodos para el análisis directo de las muestras clínicas: tejidos, semen y sangre.^{69,70,71,72,73,74} Estos ensayos tienen la ventaja de que los resultados pueden ser determinados inmediatamente. La tecnología de la PCR también ha sido aplicada a la detección de *Bruceella* en alimentos como la leche y queso^{75,76,77} por medio de PCR género específicas, así como al diagnóstico de la brucelosis en humanos a partir de muestras de sangre periférica.^{78,79,80}

1.3.5. Control y Prevención

En México se expidió en 1995 la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995 denominada Campaña Nacional contra la brucelosis en los animales,⁶ que tiene como objetivo establecer los procedimientos, actividades, criterios, estrategias y técnicas para el control y eventual erradicación de la brucelosis en las especies susceptibles en todo el territorio nacional.

La Campaña reconoce el concepto de regionalización, pudiendo establecer, previo cumplimiento a los requisitos establecidos, zonas de control, erradicación y libres en el ámbito municipal, estatal, regional y nacional, lo que favorece el avance paulatino y constante de la campaña en diferentes regiones del país.

Las estrategias de la campaña son básicamente dos: la constatación de hatos y la vacunación. La primera tiene como objetivo final el establecimiento de hatos libres, a través del muestreo y la

eliminación de animales reactivos. Para llevar a cabo estas acciones se reconocen tres fases o zonas: control, erradicación y libre de brucelosis.

La NOM también incluye la propuesta de monitorear en rastros y mataderos animales que, independientemente de sus antecedentes de muestreo en campaña, sean sujetos de muestreo al momento del sacrificio para, en su caso, iniciar las acciones de seguimiento e investigación epidemiológicas correspondientes.

Para llevar a cabo todas estas acciones la SAGARPA tiene instrumentado un esquema de aprobación de Médicos Veterinarios en ejercicio libre, para que desarrollen actividades de campaña y apliquen esta normatividad.

Para el diagnóstico de la brucelosis bovina se utilizan las pruebas serológicas primarias y confirmatorias antes mencionadas y para la vacunación se cuenta con la vacuna oficial RB51 de *B. abortus*. Asimismo se propone el uso cotidiano de la prueba de anillo en leche para la vigilancia epidemiológica de la enfermedad en zonas de recolección lechera o cuencas productoras.

Debido a las serias consecuencias médicas y económicas de la brucelosis, los esfuerzos se dirigen a la prevención de la enfermedad por medio del uso de vacunas.

En la década pasada, se usaba en los bovinos la cepa vacunal *B. abortus* S19. Fue descrita en 1930 y aislada originalmente a partir de la leche de una vaca Jersey como cepa virulenta en 1923, pero después de mantenerle a temperatura ambiente durante un año, llegó a ser atenuada.⁸¹ Esta vacuna fue usada desde 1942 en México, pero no fue sino hasta la época de 1970 que su uso llegó a ser obligatorio.²²

La presencia de cadena O en el lipopolisacárido (LPS) de esta cepa, explica la aparición y persistencia de anticuerpos en el suero de los animales vacunados. Estos anticuerpos son detectados en las pruebas

serológicas usadas para el diagnóstico de la brucelosis y son uno de los principales inconvenientes para el uso de esta vacuna, puesto que hacen imposible distinguir animales infectados con cepas de campo, de aquellos que han sido vacunados. Asimismo, aunque esta cepa es de baja virulencia en los bovinos, el uso de esta vacuna en hembras gestantes puede ocasionar abortos bajo condiciones de campo.⁸² Otra consecuencia adversa menos frecuente de la vacunación con esta cepa es el desarrollo de una artropatía asociada a complejos inmunes en las articulaciones afectadas.^{83,84,85}

La *B. abortus* S19 es una cepa lisa atenuada incapaz de crecer en presencia de eritritol.⁸⁶ El metabolismo del eritritol es la diferencia más importante entre la S19 y otras cepas de *Brucella abortus*, ya que, más que promoverlo, el eritritol inhibe el crecimiento de la S19.^{55,87}

El metabolismo del eritritol en *B. abortus* ha sido estudiado desde la perspectiva metabólica. La degradación del polialcohol comienza con la fosforilación del eritritol seguida de un paso de deshidrogenación que produce D-eritrolosa 1-fosfato. Se requiere de dos deshidrogenaciones más y una reacción de descarboxilación para producir dihidroxiacetona fosfato y dióxido de carbono.^{88,89}

Los cuatro genes que participan en el catabolismo del eritritol (*eryA*, *eryB*, *eryC* y *eryD*), se encuentran organizados como un operón, conocido como operón *ery*. Con la caracterización completa del operón *ery*, se ha podido dilucidar el papel de cada uno de los genes en el catabolismo del eritritol. La introducción de diferentes combinaciones de los genes en *E. coli* indicó que *eryAB* y *C* son suficientes para llevar a cabo la degradación del eritritol. De acuerdo a estos estudios se le asignó el papel de eritritol cinasa y eritritol fosfato deshidrogenasa a *eryA* y *eryB*, respectivamente; a *eryC* el de una eritrolosa-fosfato deshidrogenasa, y a *eryD* el de una proteína con probable función reguladora.⁹⁰

Estudios sobre el metabolismo de la cepa vacunal S19 han confirmado que esta cepa no presenta la enzima D-eritruosa-1-fosfato-deshidrogenasa.⁸⁹ Este defecto bloquea la degradación del eritritol y resulta en la disminución de los niveles de ATP debido a la actividad de la enzima eritritol cinasa. Al analizar la secuencia del operón *ery*, se encontró una deleción de 702 pb que afecta los genes *eryC* y *eryD*, lo que puede explicar entonces la sensibilidad de esta cepa hacia el eritritol.^{91,92}

Dicha deleción provee de un método rápido y confiable para distinguir a la cepa S19 del resto de las cepas de *Brucella* mediante la amplificación de esta región genómica por medio de PCR. Tal método de diagnóstico podría ayudar además al control de calidad de la producción de vacunas así como a solventar algunos de los problemas debidos al uso de esta vacuna en el control de la brucelosis bovina.

En México, desde 1997, se aprobó el uso de la cepa *B. abortus* RB51 como vacuna oficial para los bovinos.²² Sin embargo la cepa vacunal S19 se continúa utilizando en otros países. La cepa RB51 es una cepa rugosa atenuada derivada de *B. abortus* 2308, cepa lisa y virulenta.^{81,93}

Estudios sobre las propiedades biológicas de esta cepa indican que es una cepa rugosa estable *in vitro* e *in vivo*, ya que no revierte a la forma lisa, y que sólo presenta cantidades traza de cadena O en el lipopolisacárido (LPS).^{93,94} Debido a su mínima producción de cadena O en el lipopolisacárido, los anticuerpos inducidos por la vacunación con esta cepa no interfieren con la serología convencional⁹⁵ y la inmunidad que induce es igual o mejor que la inducida por la cepa S19.^{96,97} En adición, no se ha reportado hasta el momento, la presentación de aborto en animales vacunados con esta cepa.^{93,98,99}

De acuerdo con estudios moleculares se sabe que el gen *wboA* de *B. abortus* codifica para una glicosiltransferasa, enzima que es esencial en la biosíntesis del antígeno O. En la cepa RB51 de *B. abortus*, este

gen se encuentra interrumpido por una secuencia de inserción (IS) conocida como elemento IS711.¹⁰⁰

Las secuencias de inserción son secuencias de ADN móvil que codifican para proteínas requeridas para su transposición. Típicamente se unen por secuencias invertidas; su transposición genera duplicaciones de las secuencias del genoma donde se insertan. Dentro del género *Brucella*, la IS711 fue encontrada inicialmente en *B. ovis*; está presente en varias especies de *Brucella* y parece ser estable en número y posición dentro del cromosoma.¹⁰¹ Sin embargo, se han reportado diferencias en el número de elementos; en adición, todas las IS711 de *B. abortus* son distintas de todas las demás especies de *Brucella*.¹⁰⁰

Aunque la estabilidad de la cepa RB51 ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro*, la mutación (es) que contribuye a su fenotipo rugoso y a su atenuación no han sido identificadas hasta ahora. Estudios llevados a cabo en los que se complementa a la RB51 con un gen *wboA* funcional (es decir, sin interrupciones) dan como resultado la producción de antígeno O; sin embargo no se da la reversión hacia el fenotipo liso y su atenuación tampoco se ve afectada. Esto sugiere que la cepa RB51 contiene mutaciones adicionales que probablemente afectan la exportación del antígeno O hacia la superficie, el acoplamiento del antígeno O al lipopolisacárido, o ambos eventos.¹⁰²

Explotando el hecho de que el gen *wboA* se encuentra interrumpido por el elemento IS711, se han desarrollado técnicas que puedan distinguir a la cepa RB51 de otras cepas de *B. abortus*, hecho que resulta sumamente útil en estudios en los que se necesita detectar a la *B. abortus* RB51, como aquellos casos en los que existe el riesgo potencial de aborto, mismos que pueden ocurrir en caso de animales gestantes que son vacunados con esta cepa.

JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha puesto a disposición el genoma de tres especies del género *Brucella*: *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*. El análisis de la secuencia de estos tres genomas permitirá encontrar secuencias altamente específicas que permitan identificar y diferenciar de manera rápida y precisa a estos microorganismos.

Hasta el momento se han desarrollado ensayos de PCR para diferenciar entre las distintas especies y biotipos de *Brucella*. Estos ensayos son especialmente útiles en aquellos programas de erradicación especie-específicos.

La presencia de una delección en la cepa S19, así como un elemento IS711 interrumpiendo el gen *wboA* en la cepa RB51, puede evidenciarse fácilmente mediante PCR. Esto provee un método diagnóstico para diferenciarlas de todos los demás miembros del género *Brucella*, además de que podría ayudar al control de calidad de la producción de vacunas, así como a resolver algunos de los problemas debidos al uso de estas vacunas en el control de la brucelosis.

HIPÓTESIS

El uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa permitirá la identificación y diferenciación de las cepas vacunales RB51 y S19.

OBJETIVO

Estandarizar un ensayo de PCR que permita identificar y diferenciar a las cepas vacunales RB51 y S19 de *B. abortus*, de otras especies de *Brucella*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificación molecular de la cepa vacunal RB51 de *B. abortus* mediante la detección del elemento IS711 que interrumpe el gen *wboA*

- Identificación molecular de la cepa vacunal S19 de *B. abortus* mediante la detección de una delección en el locus *ery*

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 1. La cepa *B. abortus* 2308 es una cepa virulenta resistente al ácido nalidíxico; *B. ovis* es una cepa no dependiente de CO₂. Las cepas de campo de *B. abortus* fueron aisladas a partir de leche y fueron identificadas utilizando la metodología descrita por Alton.¹⁰³ Todos los demás microorganismos enlistados son cepas representativas de diferentes especies del género *Brucella*.

Todas las cepas fueron crecidas en Agar *Brucella*^{*}, Caldo *Brucella*[†] y Agar Tripticasa Soya (TSA)[‡] a 37°C de 24 a 72 horas, de acuerdo a la especie de que se tratara. Cuando fue necesario, los medios de cultivo fueron suplementados con ácido nalidíxico a una concentración final de 15 mg/ml.

El medio de conservación fue preparado a base de Caldo *Brucella* adicionado con 50% de glicerol y las cepas se almacenaron a -80°C.

* Oxoid, Hampshire, England

† Oxoid, Hampshire, England

‡ Becton Dickinson Bioxon, México

Especie	Biotipo	Cepa	Hospedero	Origen geográfico	Fuente
<i>B. abortus</i>	1	S19	Bovino	México	Brovel
<i>B. abortus</i>	1	S19	Bovino	México	Pronabive
<i>B. abortus</i>	1	RB51	Bovino	E.U	Dr. J.M. García-Lobo
<i>B. abortus</i>	1	RB51	Bovino	México	Pronabive
<i>B. abortus</i>	1	RB51	Bovino	México	Schering Plough
<i>B. abortus</i>	1	2308	Bovino	España	Dr. J.M. García-Lobo
<i>B. abortus</i>	1	544	Bovino	E. U.	Dr. J.M. García-Lobo
<i>B. melitensis</i>	1	16M	Caprino	España	Laboratorio de Biología molecular
<i>B. melitensis</i>	1	Rev1	Caprino	Francia	Laboratorio de Biología molecular
<i>B. melitensis</i>	1	Rev1	Caprino	México	Laboratorio de Biología molecular
<i>B. canis</i>		037	Perro	México	Cepa de campo
<i>B. canis</i>		059	Perro	México	Cepa de campo
<i>B. canis</i>		298	Perro	México	Cepa de campo
<i>B. ovis</i>		Reo1 98	Ovino	Francia	INIFAP
<i>B. abortus</i>	1	136 187 259 325 499 596 615 657 700 708 720	Bovino	México	Cepas de campo INIFAP

2.2. Extracción de ADN

Para cada una de las cepas la extracción de ADN se realizó mediante la técnica de tiocianato de guanidina.¹⁰⁴ El cultivo de inicio se obtuvo al resuspender las colonias crecidas de dos cajas de medio de cultivo en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos (NaCl, KCl, Na₂HPO₄ y KH₂PO₄) (PBS). El cultivo fue centrifugado a 400 rpm durante 10 min.

Posteriormente se le agregaron 550 μ l de una solución de lisis (tiocianato de guanidina 5M, EDTA 0.1 M, sarkosyl 0.5%) y se mezcló de 5 a 10 min. Se le adicionaron 250 μ l de acetato de amonio 7.4M y se colocó en hielo durante 10 min. Se agregaron 500 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 V/V) y se mezcló por 5 min, para posteriormente centrifugar a 10 000 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y una vez más se agregaron 500 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico, mezclándose por 5 min y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min. El ADN fue precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol. El ADN fue lavado tres veces con etanol al 70%. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 100 μ l de agua estéril, almacenándose a 4°C. El ADN fue visualizado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ADN extraído de cultivo puro

Los oligonucleótidos usados para la amplificación (5' TTA AGC GCT GAT GCC ATT TCC TTC AC 3'; 5'GCC AAC CAA CCC AAA TGC TCA CAA 3')* fueron diseñados con base en la secuencia del gen *wboA* descrita previamente para la cepa *B. abortus* 2308 (número de acceso: AF107768). Dichos oligonucleótidos flanquean la secuencia de inserción IS711 en la cepa vacunal *B. abortus* RB51. El oligonucleótido 5-3', llamado oligonucleótido 1 se encuentra localizado 406 pb corriente abajo del punto de inserción del elemento IS711; el oligonucleótido 3-5', llamado oligonucleótido 3 se encuentra localizado 50 pb corriente arriba del sitio de término de la IS711. (Fig. 1)

La reacción de la PCR se realizó en un volumen de 50 μ l, el cual contenía amortiguador para PCR 1X†, 1 mM de magnesio*, 200 μ M de cada

* Invitrogen, Carlsbad, California

† Promega, Madison WI, USA

nucleótido trifosfatado[†], 1 µM de cada oligonucleótido, 100 ng de ADN genómico y dos unidades de Taq polimerasa[†].

Los ciclos de la reacción fueron los siguientes: Desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 30 s, 60°C por 30 s y 72°C por 1.30 min y una extensión final a 72°C por 5 min.

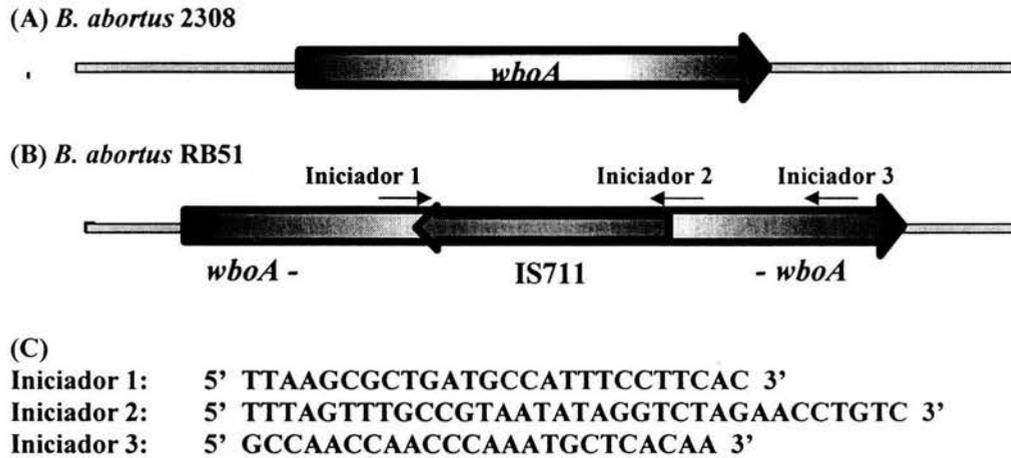


Fig. 1 Mapa del gen *wboA* en *B. abortus* 2308 (A) y *B. abortus* RB51 (B). Interrupción del gen *wboA* por el elemento IS711 en *B. abortus* RB51 y localización de los oligonucleótidos (flechas) usados en el PCR. (C) Secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos.

Para la cepa S19, se diseñaron dos oligonucleótidos a partir de la secuencia de los genes del catabolismo del eritritol en la cepa *B. abortus* 2308 (5' TTG GCG GCA AGT CCG TCG GT 3'; 5' CCC AGA AGC GAG ACG AAA CG 3')[§]. Estos oligonucleótidos se encuentran flanqueando la deleción encontrada en la cepa vacunal *B. abortus* S19. El oligonucleótido 5-3' denominado oligonucleótido 1, se encuentra localizado 185 pb corriente arriba del sitio en el que se encuentra la deleción; el oligonucleótido 3-5' denominado oligonucleótido 2 se

* Promega, Madison WI, USA

† Promega, Madison WI, USA

‡ Promega, Madison WI, USA

§ Invitrogen, Carlsbad, California

encuentra localizado 176 pb corriente abajo del sitio de la deleción (Fig. 2).

La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 μ l, amortiguador para PCR 1X, 1 mM de magnesio, 200 μ M de cada nucleótido trifosfatado, 1 μ M de cada oligonucleótido, 100 ng de DNA genómico y dos unidades de Taq polimerasa.

Los ciclos para esta reacción fueron los siguientes: Desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 1 min, 59°C por 30 s y 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 2 min.

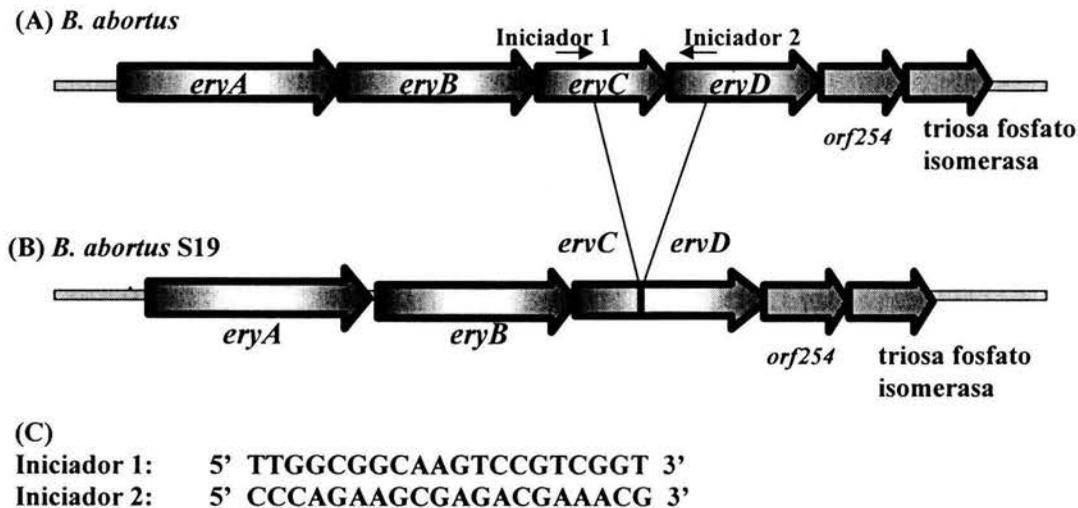


Fig. 2 Mapa del operón *ery* en *B. abortus* 2308 (A) y *B. abortus* S19 (B). Presencia de una deleción en los genes *eryC* y *eryD* de *B. abortus* S19 y localización de los oligonucleótidos (flechas) usados en el PCR. (C) Secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos.

2.4. PCR a partir de colonias bacterianas

Una colonia bacteriana de 2 mm de diámetro fue tomada del medio de cultivo y resuspendida en 200 μ l de agua estéril. Posteriormente se incubó en baño María a 90°C por 15 min, y fue centrifugada a 8000 rpm

durante 5 min. 10 μ l del sobrenadante fueron usados como template de ADN para llevar a cabo la PCR en un volumen total de 50 μ l, mismo que contenía amortiguador para PCR 1X^{*}, 1 mM de magnesio[†], 200 μ M de cada nucleótido trifosfatado[‡], 1 μ M de cada oligonucleótido[§] y 2 unidades de Taq polimerasa^{**}.

Los oligonucleótidos empleados en cada caso, así como las condiciones empleadas en cada ciclo de la reacción correspondían a aquellos empleados para identificar ya sea a la cepa *B. abortus* S19 o a la cepa *B. abortus* RB51, según fuera el caso.

* Promega, Madison WI, USA

† Promega, Madison WI, USA

‡ Promega, Madison WI, USA

§ Invitrogen, Carlsbad, California

** Promega, Madison WI, USA

3. RESULTADOS

3.1. Extracción de ADN

Mediante el método de tiocianato de Guanidina se extrajo el ADN de cultivo puro de todas las cepas. El ADN fue resuspendido en agua grado biología molecular y fue almacenado a -20°C hasta su uso. Asimismo se cuantificó mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm, lo que nos reportó en promedio para todas las muestras la cantidad de $3.4 \mu\text{g}$ de ADN/ μl . El ADN se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Figura 3 y 4).

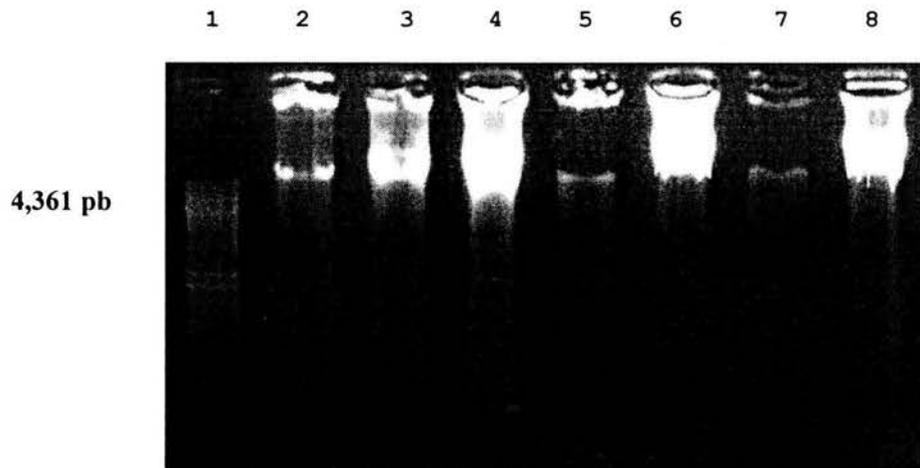


Fig. 3 Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio en el que se muestra el ADN genómico extraído mediante el método de tiocianato de Guanidina. Carril 1: Marcador de peso molecular λ /HindIII (λ). Carril 2: *B. abortus* 2308. Carril 3: *B. abortus* 544. Carril 4: *B. abortus* S19 (Brovel). Carril 5: *B. abortus* S19 (Pronabive). Carril 6: *B. abortus* RB51 (E.U.). Carril 7: *B. abortus* RB51 (Pronabive). Carril 8: *B. abortus* RB51 (Schering Plough).

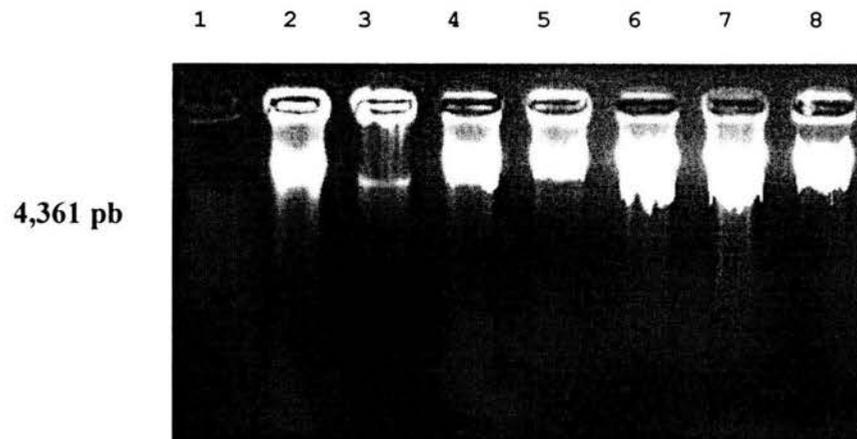


Fig. 4 Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio en el que se muestra el ADN genómico extraído mediante el método de tiocianato de Guanidina. Carril 1: Marcador de peso molecular lambda/*HindIII* (λ). Carril 2: *B. melitensis* 16M. Carril 3: *B. melitensis* Rev 1 (México). Carril 4: *B. melitensis* Rev1 (Francia). Carril 5: *B. ovis* Reol98. Carril 6: *B. canis* 037. Carril 7: *B. canis* 059. Carril 8: *B. canis* 298.

3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ADN extraído de cultivo puro

El ADN extraído a partir de cultivos puros fue utilizado para realizar la PCR para identificar las cepas vacunales S19 y RB51 de *Brucella abortus*.

PCR para la cepa RB51 de *B. abortus*

Para la identificación y diferenciación de la cepa vacunal RB51 de *B. abortus* se emplearon los oligonucleótidos descritos por Vemulapalli ⁹⁹, que amplifican la secuencia de ADN del gen *wboA* en la que se encuentra la secuencia de inserción IS711. Dicha secuencia de inserción tiene un tamaño de 842 pb.

Así, para las cepas control los oligonucleótidos amplificaron un producto de 456 pb, mientras que para la cepa vacunal RB51 se obtuvo un producto de amplificación de 1298 pb, confirmando la presencia del elemento de inserción (Fig. 5 y 6)

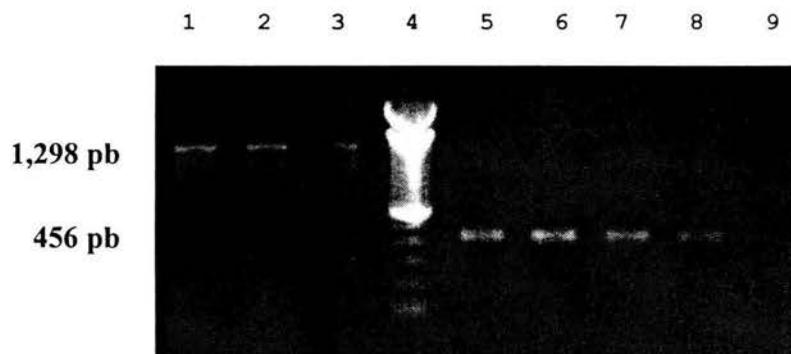


Fig. 5 Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio que muestra los productos amplificados con la PCR para identificación de *B. abortus* RB51 a partir de ADN extraído de cultivo puro. Carril 1: *B. abortus* RB51 (EU). Carril 2: *B. abortus* RB51 (Pronabive). Carril 3: *B. abortus* RB51 (Schering Plough). Carril 4: Marcador de peso molecular 100 pb *Ladder*. Carril 5: *B. abortus* 2308. Carril 6: *B. abortus* 544. Carril 7: *B. abortus* S19 (Brovel). Carril 8: *B. abortus* S19 (Pronabive). Carril 9: control negativo (agua).

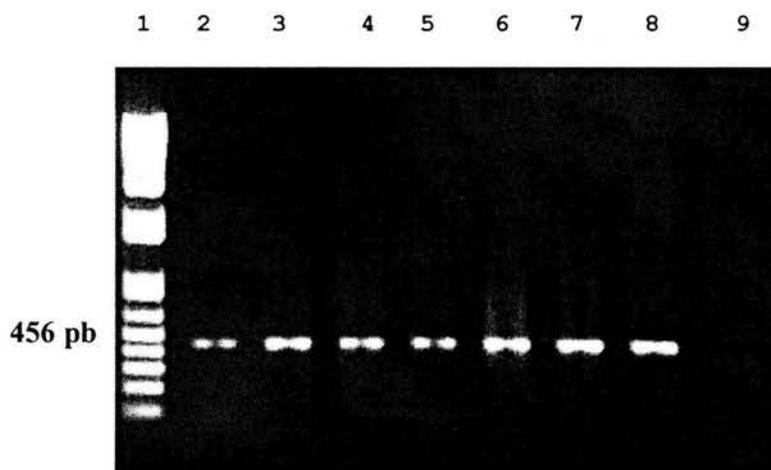


Fig. 6 Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio que muestra los productos amplificados con la PCR para identificación de *B. abortus* RB51 a partir de ADN extraído de cultivo puro. Carril 1: Marcador de 1kb plus *Ladder*. Carril 2: *B. ovis* Reol98. Carril 3: *B. melitensis* 16M. Carril 4: *B. melitensis* Rev1 (Francia). Carril 5: *B. melitensis* Rev1 (México). Carril 6: *B. canis* 037. Carril 7: *B. canis* 059. Carril 8: *B. canis* 298. Carril 9: control negativo (agua).

PCR para la cepa S19 de *B. abortus*

Para la cepa S19 de *B. abortus* se emplearon los oligonucleótidos previamente descritos por Sangari.⁹⁰ Dichos oligonucleótidos se encuentran flanqueando la secuencia de los genes del locus *ery* en la que se encuentra la delección característica de la cepa vacunal S19. El producto de amplificación obtenido a partir de la cepa S19 fue de 361 pb. Las cepas control, al poseer el locus *ery* completo, dieron como resultado un producto de amplificación de 1063 pb (Fig. 7 y 8).

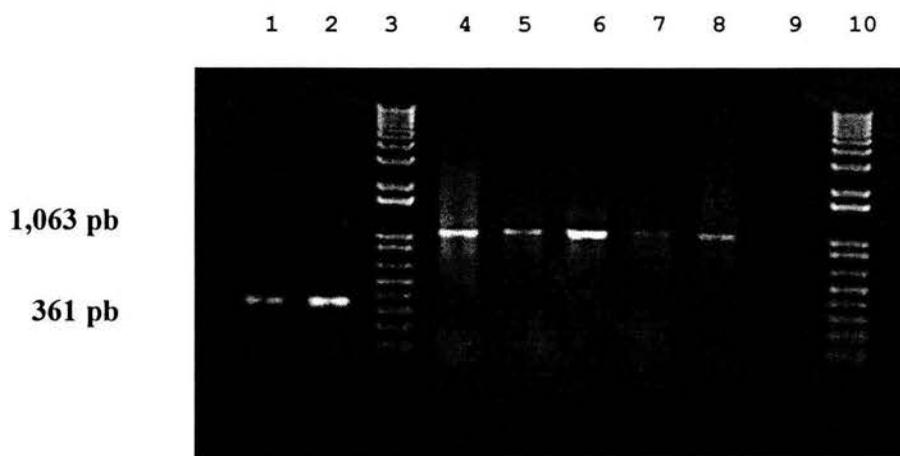


Fig. 7 Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio que muestra los productos amplificados con la PCR para identificación de *B. abortus* S19 a partir de ADN extraído de cultivo puro. Carril 1: *B. abortus* S19 (Brovel). Carril 2: *B. abortus* S19 (Pronabive). Carril 3: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*. Carril 4: *B. abortus* 2308. Carril 5: *B. abortus* 544. Carril 6: *B. abortus* RB51 (EU). Carril 7: *B. abortus* RB51 (Pronabive). Carril 8: *B. abortus* RB51 (Schering Plough). Carril 9: control negativo (agua). Carril 10: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*.

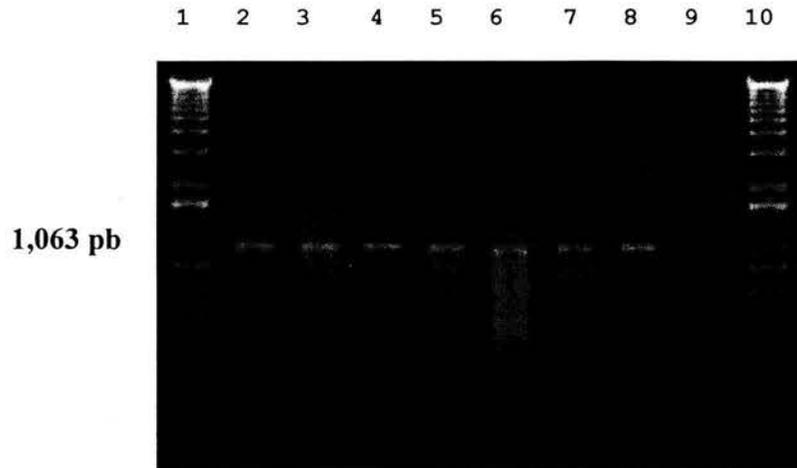


Fig. 8 Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio que muestra los productos amplificados con la PCR para identificación de *B. abortus* S19 a partir de ADN extraído de cultivo puro. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*. Carril 2: *B. ovis* Reol98. Carril 3: *B. melitensis* 16M. Carril 4: *B. melitensis* Rev1 (Francia). Carril 5: *B. melitensis* Rev1 (México). Carril 6: *B. canis* 037. Carril 7: *B. canis* 059. Carril 8: *B. canis* 298. Carril 9: control negativo (agua). Carril 10: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*.

3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de colonias bacterianas

A partir de las colonias de las cepas vacunales, así como de las cepas controles, se estandarizó un PCR para identificar y diferenciar a las cepas RB51 y S19 a partir de los cultivos bacterianos, sin necesidad de realizar la extracción de ADN.

Cepa RB51

Los oligonucleótidos amplificaron un producto de 1298 pb cuando se trataba de la cepa RB51, y un producto de 456 pb cuando se trataba de las cepas control, ya que éstas no presentan el elemento IS711 en el gen *wboA* (Fig. 9).

Cepa S19

Los oligonucleótidos amplificaron un producto de 361 pb cuando se trataba de la cepa S19, y en el caso de las cepas control se obtuvo un

producto de amplificación de 1063 pb, ya que estas cepas poseen completo el locus *ery* (Fig.10).

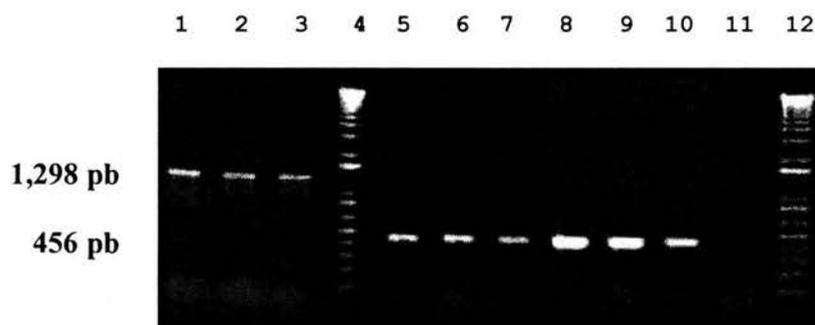


Fig. 9 Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio que muestra los productos amplificados con la PCR para identificación de *B. abortus* RB51 a partir de colonias bacterianas. Carril 1: *B. abortus* RB51 (EU). Carril 2: *B. abortus* RB51 (Pronabive). Carril 3: *B. abortus* RB51 (Schering Plough). Carril 4: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*. Carril 5: *B. abortus* 2308. Carril 6: *B. abortus* S19 (Brovel). Carril 7: *B. abortus* S19 (Pronabive). Carril 8: *B. canis* 037. Carril 9: *B. canis* 059. Carril 10: *B. canis* 298. Carril 11: control negativo (agua). Carril 12: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*.

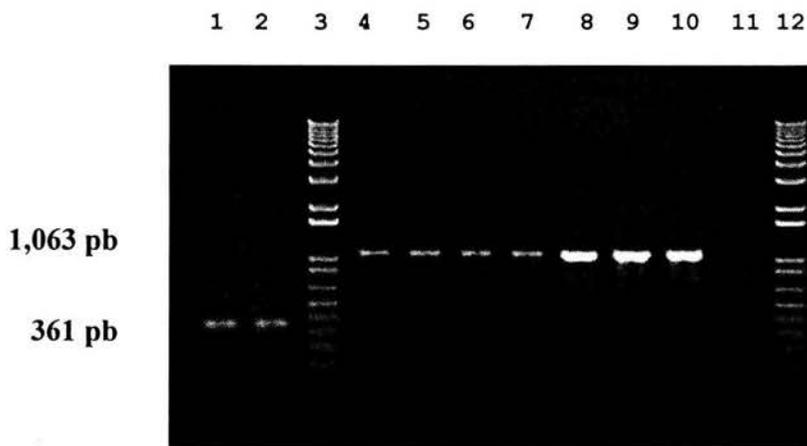


Fig. 10 Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio que muestra los productos amplificados con la PCR para identificación de *B. abortus* S19 a partir de colonias bacterianas. Carril 1: *B. abortus* S19 (Brovel). Carril 2: *B. abortus* S19 (Pronabive). Carril 3: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*. Carril 4: *B. abortus* 2308. Carril 5: *B. abortus* RB51 (EU). Carril 6: *B. abortus* RB51 (Pronabive). Carril 7: *B. abortus* RB51 (Schering Plough). Carril 8: *B. canis* 037. Carril 9: *B. canis* 059. Carril 10: *B. canis* 298. Carril 11: control negativo (agua). Carril 12: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*.

3.4. PCR para las cepas de campo

Una vez que se estandarizó la técnica de PCR a partir de colonias bacterianas de las cepas vacunales se decidió utilizar esta técnica para la caracterización de 11 cepas de campo de *Brucella abortus* procedentes de leche bovina. A todas las cepas se les realizó la PCR que identifica a la cepa S19, así como la PCR que identifica a la cepa RB51.

Las once muestras dieron un producto de amplificación de 456 pb con el PCR que identifica a la cepa vacunal RB51, descartando con ello la presencia de alguna cepa vacunal RB51 dentro de las cepas de campo (Fig. 11 y 12).

Con el PCR que identifica a la cepa S19, 9 de las once muestras amplificaron un producto de 1063 pb, mientras que dos de ellas amplificaron un producto de 361 pb, lo que significa que estas dos cepas de campo correspondían a cepas vacunales S19 de *B. abortus* (Fig. 13 y 14)

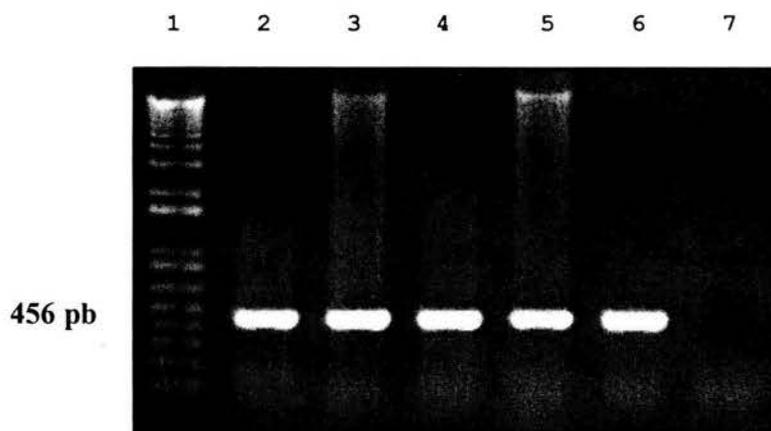


Fig. 11 Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio que muestra los productos amplificados con la PCR para identificación de *B. abortus* RB51 a partir de cepas de campo. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*. Carril 2: *B. abortus* 325. Carril 3: *B. abortus* 596. Carril 4: *B. abortus* 657. Carril 5: *B. abortus* 708. Carril 6: *B. abortus* 720. Carril 7: control negativo (agua).

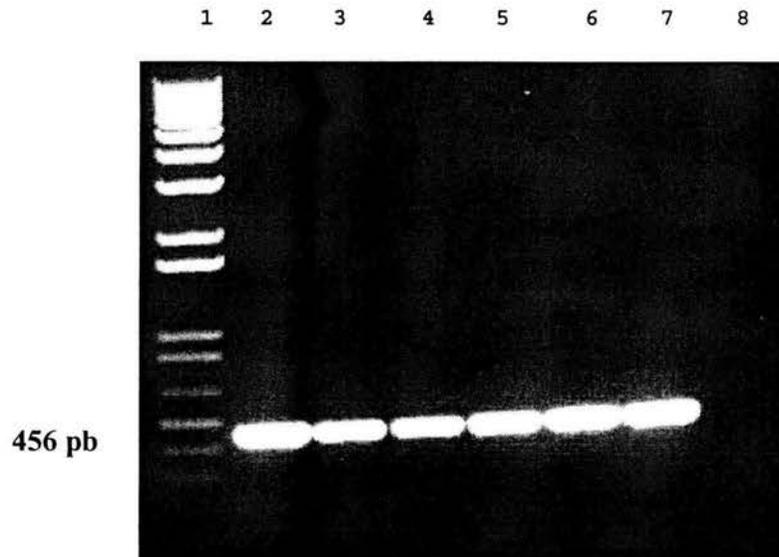


Fig. 12 Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio que muestra los productos amplificados con la PCR para identificación de *B. abortus* RB51 a partir de cepas de campo. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*. Carril 2: *B. abortus* 136. Carril 3: *B. abortus* 187. Carril 4: *B. abortus* 259. Carril 5: *B. abortus* 499. Carril 6: *B. abortus* 615. Carril 7: *B. abortus* 700. Carril 8: control negativo (agua).

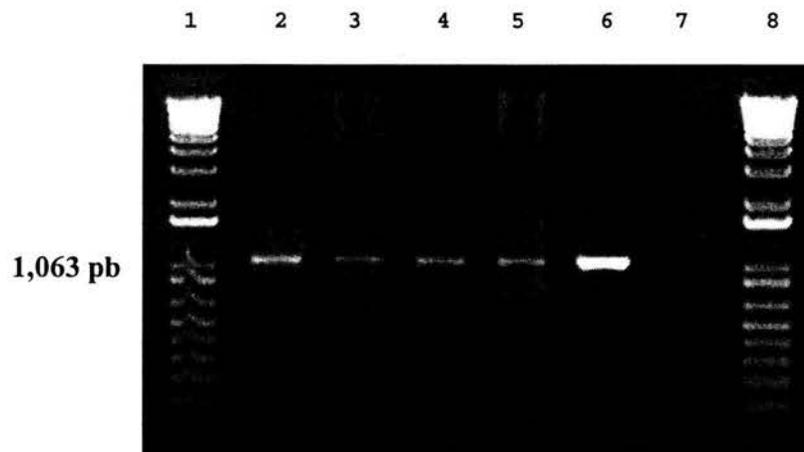


Fig. 13 Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio que muestra los productos amplificados con la PCR para identificación de *B. abortus* S19 a partir de cepas de campo. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*. Carril 2: *B. abortus* 325. Carril 3: *B. abortus* 596. Carril 4: *B. abortus* 657. Carril 5: *B. abortus* 708. Carril 6: *B. abortus* 720. Carril 7: control negativo (agua). Carril 8: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*.

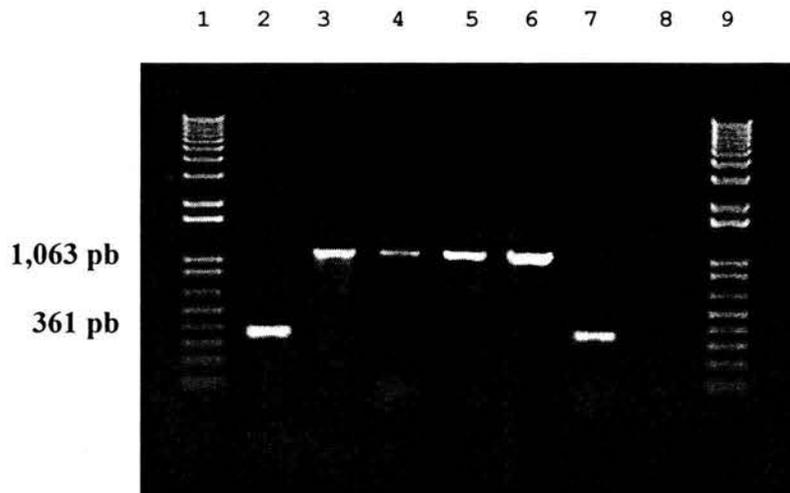


Fig. 14 Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio que muestra los productos amplificados con la PCR para identificación de *B. abortus* S19 a partir de cepas de campo. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*. Carril 2: *B. abortus* 136. Carril 3: *B. abortus* 187. Carril 4: *B. abortus* 259. Carril 5: *B. abortus* 499. Carril 6: *B. abortus* 615. Carril 7: *B. abortus* 700. Carril 8: control negativo (agua). Carril 9: Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder*.

4. DISCUSIÓN

La PCR estandarizada en este trabajo se utilizó para verificar de manera rápida y precisa la presencia o ausencia de cepas vacunales en once aislamientos de campo de *B. abortus* procedentes de leche de vacas. Las 11 cepas analizadas fueron identificadas previamente por medio de pruebas microbiológicas estándar para *Brucella*,¹⁰³ con lo cual se comprobó que todos los aislamientos correspondían a *B. abortus* biotipo 1.

Al utilizar la PCR para la identificación de la cepa RB51 se observó que las once cepas de campo amplificaron un producto de 456 pb, con lo cual se descartó la presencia de la cepa vacunal RB51 de *B. abortus*.

En el caso de la PCR para identificar a la cepa S19, nueve de las cepas de campo amplificaron un producto de 1063 pb; sin embargo, dos cepas amplificaron un producto de 361 pb, lo que reveló la presencia de dos cepas vacunales S19 de *B. abortus* dentro de las 11 cepas de campo.

Este hecho es de importancia tanto a nivel epidemiológico como a nivel oficial, debido a las implicaciones directas e indirectas que tiene en relación a la Campaña Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina.⁶

Desde 1997, la cepa RB51 de *Brucella abortus* fue aprobada en México como cepa vacunal oficial en el ganado bovino. Puesto que el lipopolisacárido de la cepa RB51 carece de cadena O, los anticuerpos inducidos por la vacunación con esta cepa no interfieren con la serología convencional.⁹³

McQuiston et al.,¹⁰⁵ caracterizaron el gen *wboA* de *B. abortus* que codifica una glicosiltransferasa, enzima esencial en la biosíntesis del antígeno O. Ellos demostraron que una mutación en el gen *wboA* en cepas lisas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, resulta en la conversión de estas cepas hacia un fenotipo rugoso.

Así mismo, Vemulapalli et al.,¹⁰⁰ demostraron que el gen *wboA* en la cepa RB51 de *B. abortus* se encuentra interrumpido por una secuencia de inserción de 842 pb conocida como elemento IS711, a partir de lo cual el presente trabajo estandarizó una PCR que puede distinguir a la cepa RB51 de otras especies y cepas de *Brucella*, incluyendo a su cepa parental, la 2308. El fragmento amplificado para la cepa RB51 fue de 1298 pb, mientras que el producto de amplificación para las demás especies y cepas fue de 456 pb.

Vemulapalli et al.,¹⁰⁰ realizaron esta PCR empleando un oligonucleótido que amplifica la unión entre el gen *wboA* y el extremo 5' del elemento IS711, además de los oligonucleótidos empleados en este trabajo, denominados oligonucleótido 1 y 3, respectivamente. (Fig. 1)

Cuando usaron los tres oligonucleótidos para realizar el PCR, se obtuvo un producto de ~400 pb para la cepa 2308 y tres fragmentos para la cepa RB51, de ~900, ~1300 y ~2300 pb. Las bandas de los fragmentos de 900 y 2300 pb fueron de baja intensidad, sugiriendo inhibición en la amplificación, probablemente debida a la actividad de la Taq polimerasa, que al extender a uno de los oligonucleótidos, podría haber degradado el fragmento de ADN que estaba siendo extendido en otro de los oligonucleótidos.

Con los resultados obtenidos se corroboró la eficiencia de la técnica estandarizada en el presente trabajo, ya que el uso de los dos oligonucleótidos empleados fue suficiente para realizar exitosamente la identificación de la cepa RB51.

En los últimos años, diversos ensayos de PCR han sido desarrollados para detectar o diferenciar a varias cepas de *Brucella*. Sin embargo, ninguno de ellos podría distinguir a la cepa RB51 de su cepa parental, la cepa virulenta 2308.^{63,64,65,106,107,108} La PCR estandarizada en este trabajo puede ser utilizado para identificar de una manera más rápida

y precisa a la cepa RB51; y es útil en aquellos estudios en los que se requiera detectar la presencia de la cepa, como aquellos en los que existe el riesgo potencial de aborto, mismos que pueden ocurrir en animales gestantes que son vacunados con la cepa RB51. Además podría ayudar en el control de calidad de la producción de vacunas, así como a resolver algunos de los problemas que representa el uso de esta vacuna viva para el control de la brucelosis bovina.

Con respecto a la cepa S19 de *B. abortus*, Sangari et al.⁹¹ estudiaron la región cromosomal en la que se encuentran los genes que participan en el catabolismo del eritritol, y revelaron la presencia de una deleción de 702 pb en la cepa S19. De igual manera secuenciaron un fragmento del genoma de *B. abortus* e identificaron 4 genes (*eryA*, *eryB*, *eryC* y *eryD*) responsables del catabolismo del eritritol, que se encuentran organizados como un operón inducible al que llamaron operón *ery*.⁹⁰ Los resultados de ese trabajo revelaron que aquella deleción descrita previamente se encuentra localizada afectando dos genes, *eryC* y *eryD*. Además de esclarecer la causa de la sensibilidad al eritritol por parte de la cepa S19, este conocimiento proporcionó bases para diferenciar a la cepa S19 del resto de los miembros del género *Brucella* por medio de la amplificación de esta región mediante PCR.

En este trabajo se estandarizó la PCR utilizando los oligonucleótidos descritos previamente por Sangari et al.⁹¹ Los oligonucleótidos amplifican la secuencia del locus *ery* en la que se encuentra la deleción en la cepa S19; dicha secuencia abarca un fragmento del gen *eryC* y un fragmento del gen *eryD*. Como resultado, se obtuvo un producto de amplificación de 361 pb para la cepa S19, mientras que para las demás especies y cepas se obtuvo un fragmento de 1063 pb, comprobando que estas últimas no presentan la deleción de 702 pb en el locus *ery*.

Lo anterior fundamenta un método diagnóstico rápido y confiable para diferenciar a la cepa S19 de los demás miembros del género *Brucella*. Este método de identificación y diferenciación de la cepa es importante ya que aunque esta cepa ya no es empleada en México para la preparación de vacunas para el ganado bovino debido a la persistencia de anticuerpos que produce, es la cepa oficial para la preparación de todos los antígenos empleados en las pruebas serológicas oficiales para el diagnóstico de la enfermedad.¹⁰⁹

Como se mencionó previamente, una de las principales desventajas de la cepa vacunal S19 de *B. abortus* es el desarrollo de anticuerpos postvacunales que interfieren con la interpretación de las pruebas serológicas, hecho que hizo incompatible el uso de la vacuna con la aplicación simultánea de los procedimientos para el control de la brucelosis. Desde que la cepa RB51 de *Brucella abortus* fue aprobada oficialmente en 1997 como cepa vacunal para el ganado bovino, la producción de vacunas contra la brucelosis bovina a partir de la cepa S19 de *B. abortus* llegó a ser innecesaria, por lo que las empresas dedicadas a la elaboración de biológicos veterinarios en México y Estados Unidos dejaron de producirla.

Las cepas de campo que se utilizaron en este trabajo procedían de aislamientos de campo procedentes de leche bovina que fueron realizados a finales del año 2000, esta situación plantea la siguiente pregunta. ¿Porqué encontramos aún la cepa S19 entre estos aislamientos, si desde 1997 no se vacuna con esta cepa?

Nicoletti et al.¹¹⁰ realizaron una comparación entre las vías subcutánea y conjuntival para la vacunación con la cepa S19 de *B. abortus* en el ganado bovino adulto. Entre los aspectos que evaluaron estuvieron los aislamientos bacterianos obtenidos de muestreos de la leche realizados cada dos meses a partir de la vacunación. Tanto los animales vacunados por la vía conjuntival como los vacunados por la

vía subcutánea, eliminaron a la cepa S19 durante los 13 meses posteriores a la vacunación. El número de aislamientos obtenidos fue mayor en los primeros dos meses (7 en la vía subcutánea y 5 en la vía conjuntival), y disminuyó a partir del cuarto mes, encontrándose al final de los trece meses posvacunales, sólo un aislamiento relacionado con cada vía de administración.

Por otro lado, Alton et al.¹¹¹ realizaron un trabajo en el que evalúan la vacunación de vacas gestantes con dosis reducidas de la cepa S19 de *B. abortus*. Los 2 grupos de animales con los que trabajaron fueron inoculados con 5.6×10^9 y 2.8×10^8 organismos viables, respectivamente. La cepa S19 fue aislada de 4 de las 9 vacas del grupo 1, y fue aislada únicamente de una de las 9 vacas del grupo 2; ésta última fue muestreada semanalmente después del parto durante toda su vida y no se volvió a obtener aislamiento alguno.

Por su parte, Nicoletti reportó que de 700 vacas lactantes que fueron vacunadas 2 ó 3 meses antes con la dosis normal, menos del 2% excretó a la cepa S19 en la leche.¹¹¹

Todos estos trabajos comprueban no sólo que la cepa vacunal S19 puede ser eliminada en la leche de las vacas vacunadas, sino la frecuencia tan baja con la que esto se presenta. Pero lo más importante es que cuando la excreción de la cepa vacunal S19 se presenta, lo hace por un tiempo máximo de un año. Por tal motivo, aún cuando las vacas de las que se realizaron los aislamientos analizados en este trabajo hubieran sido vacunadas en 1997, año en el que suponemos todavía existían lotes de vacunas con la cepa S19, sería casi imposible que estuvieran excretando a la bacteria por tres años. Esto sugiere que la vacunación debió darse máximo un año antes de que dichos aislamientos fueran obtenidos (1999). Lo que queda en duda, es de dónde provenía la vacuna si en nuestro país se dejó de producir dos años antes.

Otro aspecto relevante al que conlleva el hecho de que se hayan encontrado en este trabajo dos cepas vacunales S19 dentro de los aislamientos de campo, es la salud pública. Se sabe que la brucelosis es una de las más importantes zoonosis bacterianas en nuestro país. La Organización Mundial de la Salud señala que cada año son reportados 5000 casos de brucelosis en el mundo. La incidencia y prevalencia de la enfermedad varía ampliamente de un país a otro. Mientras que *B. abortus* es más frecuente en Estados Unidos y Europa, *B. melitensis* es la especie más común en América latina y los países del Mediterráneo.²² Las principales fuentes de *Brucella* son los animales infectados o sus productos, tales como la leche, crema, mantequilla, queso fresco, helado, orina, sangre, cadáveres y productos abortados. Las vías de transmisión para la infección en el humano incluyen el contacto directo con los animales infectados y sus secreciones a través de piel, por aerosoles, vía conjuntival o por la ingestión de productos lácteos no pasteurizados.²³

En el presente trabajo se detectó la presencia de dos cepas S19 de *B. abortus* en aislamientos procedentes de leche de vaca. Cabe resaltar que aunque se trata de una cepa vacunal, la cepa S19 es una cepa viva atenuada de *B. abortus*, capaz de causar enfermedad; existen reportes de la infección en humanos con la cepa S19 de *B. abortus*.¹¹²

El objetivo principal de la ganadería bovina lechera es comercializar la leche, ya sea para el consumo directo o para la elaboración de productos lácteos que son consumidos por la población humana. Como se mencionó anteriormente, de los 10,000 millones de litros de leche de vaca producidos al año, el 35% es consumido como quesos y leche sin pasteurizar. El hecho de que *B. abortus* cepa S19 pueda ser excretada en la leche implica un riesgo muy grande para la población humana que consumirá esa leche o los productos elaborados con ella, y que es susceptible de adquirir la enfermedad, la que además presenta varias

dificultades diagnósticas debido a que sus signos son variados e inespecíficos, confundiéndose algunas veces con otras patologías.

En este sentido las medidas sanitarias en el manejo de la leche en los establos, así como las pruebas andén y de laboratorio deben realizarse de manera obligatoria y rutinaria; posteriormente el uso de leche pasteurizada y productos derivados son importantes para la prevención de la brucelosis humana.

El control de la brucelosis animal juega un papel fundamental en la prevención de la infección humana y uno de los caminos para llevarlo a cabo es mediante el estricto y cuidadoso control de calidad de los productos biológicos empleados para la prevención de la enfermedad en los animales.

Se requiere de futuros trabajos que estén enfocados a muestrear al resto de los animales que integran el hato del que se obtuvieron los aislamientos, así como aquellas explotaciones cercanas a él. Aunado a esto se podrían realizar las pruebas serológicas correspondientes y cultivos bacterianos de los órganos de aquellos animales que sean sacrificados.

Estudios epidemiológicos posteriores podrán ayudar a encontrar el origen de los aislamientos de *B. abortus* S19 identificados en este trabajo.

5. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo se corrobora que la presencia de una delección en el locus *ery* de *Brucella abortus* cepa S19, así como una secuencia de inserción en el gen *wboA* de la cepa RB51, son evidenciables fácilmente mediante la técnica de PCR.

La PCR estandarizada en este trabajo permitió la caracterización de cepas de campo de *Brucella abortus* aisladas en leche de vacas.

De acuerdo al año en que se realizaron los aislamientos de cepas vacunales S19, es muy probable que dichas vacunas no fueran elaboradas en México.

6. LITERATURA CITADA

1. Corbel M J. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 1997;3:213-221.
2. Díaz E, Hernández G, Valero G, Arellano B. Diagnóstico de brucelosis animal. México D.F.: INIFAP, 2001.
3. OIE. Manual of Standards diagnostic tests and vaccines, 4th ed, 2000
4. Nicoletti P. A short history of brucellosis. *Vet Microbiol* 2002;90:5-9.
5. Corbel MJ, Brinley Morgan WJ. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173. In: Krieg NR, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1. Williams and Wilkins, Baltimore 377-390.
6. NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales. 20-Agosto-1996.
7. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. *J Bacteriol* 1990;172:3569-76
8. Moreno E, Cloeckaert A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* 2002;90:209-227
9. Moreno E. Genoma evolution within the alpha-Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev* 1998;22:255-275
10. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:20:12503-5.
11. Foster G, Jahans KL, Reid RJ, Ross HM. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an LITERATURA CITADA 1996;138:583-586
12. Jahans KL, Foster G, Broughton ES. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol* 1997;57:373-382

13. Ross HM, Jahans KL, MacMillan AP, Reid RJ, Thompson PM, Foster G. *Brucella* species infection in sea mammals. *Vet Rec* 1994;138:359
14. Foster G, MacMillan AP, Godfroid J, Howie F, Ross HM, Cloeckaert A, Reid RJ, Brew S, Patterson IAP. A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet Microbiol* 2002;90:563-580
15. Bricker BJ, Ewalt DR, Alastair PM, Foster G, Brew S. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J Clin Microbiol* 2000;38:1258-1262
16. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin.Bastuji B, Foster G, Godfroid J. Classification of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect* 2001;3:729-738
17. Cloeckaert A, Grayon M, Grépinet O, Boumedine KS. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes Infect* 2003;5:593-602
18. Verger JM, Grayon M, Cloeckaert A, Lefevre M, Ageron E, Grimont F. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals using DNA-DNA hybridization and ribotyping. *Res Microbiol* 2000;151:797:799
19. Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M, *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:292-295
20. Allardet-Servent A, Boung G, Ramuz M, Pages M, Bellis M, Roizes G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J Bacteriol* 1988;170:4603-7
21. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* 1998;27:99-106
22. Luna-Martínez JE, Mejía-Terán C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet Microbiol* 2002;90:19-30.
23. Doganay M, Aygen B. Human brucellosis: an overview. *Int J Infect Dis* 2003;7:173-186
24. Sauret J, Vilissova N. Human brucellosis. *JABFP* 2002 ;15 : 401-406

25. Pacheco HA, Luna-Martínez JE. Identificación de factores de riesgo de brucelosis como zoonosis en la República Mexicana. LIII Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Salud Pública, 1999. Monterrey, 41.
26. Jubb KVF, Kennedy P, Nigal P. Pathology of domestic animals. 3a ed. USA: Academic Press, 1991.
27. Rebhuh W. Enfermedades del Ganado vacuno lechero. España: Acribia, 1995.
28. Samartino LE, Enright FM. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immun Microbiol* 1993;16:95-101
29. Gorvel JP, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 2002;90:281-297
30. Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, Eichel-Streiber V, López-Goñi I, Thelestam M, Arvidson S, Gorvel JP, Moreno E. GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in non-professional phagocytes: direct activation of CDC42. *J Biol Chem* 2001;276:44435-44443
31. Guzmán-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckert A, Garín J, Gorvel JP, Moriyón I, Moreno E, López-Goñi I. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:12375-12380
32. Sola-Landa A, Pizarro-Cerda J, Grilló JM, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, Gorvel JP, López-Goñi I. A two component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* 1998;29:5265-5273
33. Boschioli M L, Foulogne V, O'Callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 2001;4:58-64.
34. López Goñi I, Guzmán-Verri C, Manterola L, Moriyón I, Moreno E. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system, BvrR/BvrS. *Vet Microbiol* 2002;90:329-339
35. Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, Van der Goot G, Sola-Landa A, López-Goñi I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 1998;66:5711-5724

36. Porte F, Liautard JP, Kohler S. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* 1999;67:4041-4047
37. Comerci DJ, Martínez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol* 1991;3:159-168
38. Delrue RM, Martínez-Lorenzo M, Lestrade P, Danese I, Bielarz V, Mertens P, DeBolle X, Tibor A, Gorvel JP, Letesson JJ. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 2001;3:487-497
39. Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieille C, Lavigne JP, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol* 2002;2393:1-8.
40. Köhler S, Michaux-Charachon S, Porte F, Ramuz M, Liautard JP. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? *TRENDS Microbiol* 2003;11:5:215-219
41. Sangari F J, Agüero J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. *Microbiología Sem* 1996;12:207-218.
42. Leong D, Díaz R, Milner K, Rudbach J, Wilson JB. Some structural and biological properties of *Brucella* endotoxin. *Infect Immun* 1970;1:174-182
43. Moreno E, Berman DT, Boettcher LA. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect Immun* 1981;31:362-370
44. Baker PJ, Wilson JB. Chemical composition and biological properties of the endotoxin of *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 1965;90:895-902
45. Rasool O, Freer E, Moreno E, Jarstrand C. Effect of *Brucella abortus* LPS on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils 1992;60:1699-1702.
46. Cloeckaert A, Vizcaino N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol* 2002;90:229-247
47. Verstrete DR, Creasy MT, Caveney NT, Baldwin CL, Blab MW, Winter MJ. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. *Infect Immun* 1982;35:979-989

48. Cloeckaert A, Jacques I, Bosseray N, Limet JN, Bowden R, Dubray G, Plommet M. Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer membrane protein antigens of *Brucella*. *J Med Microbiol* 1991;34:175-180
49. Beaman L, Beaman BL. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Annu Rev Microbiol* 1984;38:127-148
50. Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG, Misra H. Superoxidedismutase of virulent and avirulent strains of *Brucella abortus*. *Vet microbial* 1991;26:359-366
51. Sha Z, Stabel TJ, Mayfield JE. *Brucella abortus* catalase is a periplasmic protein lacking a standard signal sequence. *J Bacteriol* 1994;176:7375-7377
52. Jiang X, Leonard B, Benson R, Baldwin CL. Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol* 1993;151:309-319
53. Canning PC, Roth JA, Deyoe BL. Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. *J Infect Dis* 1986;154:464-470
54. Roop RM, Fletcher TW, Sriranganathan NM, Boyle SM, Schurig GG. Identification of an immunoreactive *Brucella abortus* HtrA stress response protein homolog. *Infect Immun* 1994;62:1000-1007
55. Elzer PH, Phillips RW, Kovach ME, Petersoon KM, Roop MR. Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (htrA) deletion mutant. *Infect Immun* 1994;62:4135-4139
56. Keppie J, Witt K, Smith H. The effect of erythritol on the growth of S19 and other attenuated strains of *Brucella abortus*. *Res Vet Sci* 1967;8:294-296
57. Smith H, Williams AE, Pearce JH, Keppie J, Harris-Smith PW, Fitzgeorge RB, Witt K. Foetal erythritol: a cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion. *Nature* 1962;193:47-49
58. Bricker B J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol* 2002;2402:1-12.
59. Thomas EL, Bracewell CD, Corbel MJ. Characterisation of *Brucella abortus* strain 19 cultures isolated from vaccinated cattle. *Vet Rec* 1981;108:90-93

60. Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol* 2002;90:447-459
61. Metzker M, Caskey T. Polymerase Chain Reaction (PCR) Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group, 2001
62. Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella* spp by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ microbiol* 1992;58:2099-2101
63. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop ed Hyg* 1992;95:271-275
64. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:2660-2666
65. Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR Assay for Differentiation of *Brucella abortus* Vaccine Strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 1995;33:1640-1642
66. Ewalt DR, Bricker BJ. Validation of the Abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a Rapid Screening Method for Differentiation of *Brucella abortus* Field Strain Isolates and the Vaccine Strains, 19 and RB51. *J Clin Microbiol* 2000;38:3085-3086
67. Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, Jensen AE. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest* 2003;15:374-378
68. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Stich RW. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary oligonucleótidos *J Bacteriol* 1992b;174:7778-7783
69. Cetinkaya B, Ongor H, Muz A, Ertas HB, Kalender H, Erdogan HM. Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. *Vet Rec* 1999;144:239-240
70. Cortez A, Scarcelli E, Soares RM, Heinemann MB, Sakamoto SM, Genovez ME, Ferreira F, Richtzenhain LJ. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polynmerase chain reaction. *Aust Vet J* 2001;79:500-501
71. Fekete A, Bantle JA, Halling SM. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J Vet Diagn Invest* 1992a;4:79-83

72. Gallien P, Dorn C, Alban G, Staak C, Protz D. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet Rec* 1998;142:512-514
73. Amin AS, Hamdy ME, Ibrahim AK. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol* 2001;83:37-44
74. Guarino A, Serpe L, Fusco G, Scaramuzza A, Gallo P. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. *Vet Rec* 2000;147:634-636
75. Romero C, López-Goni I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3735-3737
76. Serpe L, Gallo P, Fidanza N, Scaramuzza A, Fenizia D. Single step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. *J Dairy Res* 1999;66:313-317
77. Tantillo G, Di Pinto A, Vergara A, Buonavoglia C. Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. *J Food Prot* 2001;64:164-167
78. Morata P, Queipo-Ortuno MI, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2443-2446
79. Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:2927-2930
80. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:1661-1664
81. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 2002;90:479-496.
82. Beckett FW, McDiarmid SC. The effect of reduced-dose *Brucella abortus* strain 19 vaccination in accredited dairy herds. *Br Vet J* 1985;141:157
83. Corbel MJ, Stuart FA, Brewer RA, Jeffrey M, Bradley R. Arthropathy associated with *Brucella abortus* strain 19 vaccination in cattle. I. Examination of field cases. *Br Vet J* 1989a;145:337-346

84. Corbel MJ, Stuart FA, Brewer RA, Jeffrey M, Bradley R. Arthropathy associated with *Brucella abortus* strain 19 vaccination in cattle. II. Experimental studies. *Br Vet J* 1989b;145:347-356
85. Nicoletti P, Crowley AM, Richardson JA, Farrar JA. Suspected *Brucella abortus* strain 19-induced arthritis in a dairy cow. *Agri-Practice* 1986;7:5
86. Essenberg RC, Seshadri R, Nelson K, Paulsen I. Sugar metabolism by *Brucella*. *Vet Microbiol* 2002;90:249-261
87. Sperry JF, Robertson DC. Inhibition of growth by erythritol catabolism in *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 1975b;124:391-397
88. Anderson JD, Smith H. The metabolism of erythritol by *Brucella abortus*. *J Gen Microbiol* 1965;38:109-124
89. Sperry JF, Robertson DC. Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 1975a;121:619-630
90. Sangari F J, Agüero J, García-Lobo J M. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operón in *Brucella abortus*. *Microbiol* 2000;146:487-495.
91. Sangari F J, García-Lobo J M, Agüero J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett* 1994;121:337-342.
92. Sangari FJ, Agüero J. Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the ery locus. *Vaccine* 1994;12:435-438
93. Schurig G G, Roop R M, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 1991;28:171-188.
94. Clockaert A, Zygmunt MS, Guilloteau LA. *Brucella abortus* vaccine strain PB51 produces low levels of M-like O antigen. *Vaccine* 2002;20:1820-1822
95. Stevens MG, Hennager SG, Olsen SC, Cheville NF. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *J Clin Microbiol* 1994;32:1065-1066
96. Elzer P H, Enright F M, Colby L, Hagius S D, Walker J V, Fatemi M B, Kopec J D, Beal Jr V C, Schurig G G. Protection against infection and abortion induced by virulent challenge exposure after oral vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. *Am J Vet Res* 1998;59:1575-1578.

97. Lord V R, Schurig G G, Cherwonogrodzky J W, Marcano M J, Melendez G E. Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. *Am. J. Vet Res* 1998a;59:1016-1020.
98. Palmer MV, Cheville NF, Jensen AE. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. *Vet Pathol* 1996;33:682-691
99. Palmer MV, Olsen SC, Cheville NF. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am J Vet Res* 1997;58:472-477
100. Vemulapalli R, McQuiston J R, Schurig G G, Sriranganathan N, Halling S M, Boyle S M. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:760-764.
101. Halling SM, Tatum FM, Bricker BJ. Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. *Gene* 1993;133:123-127
102. Vemulapalli R, He Y, Buccolo L S, Boyle S M, Sriranganathan N, Schurig G G. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. *Infect Immun* 2000:3927-3932.
103. Alton G G, Jones L M, Angus R D, Verger J M. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, París 1988
104. Pitcher D G, Saunders N A, Owen R J. Rapid extraction of genomic DNA with guanidinium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 1989;8:151-156.
105. McQuiston JR, Vemulapalli TJ, Inzana TJ, Schurig GG, Sriranganathan N, Fritzinger D, Hadfield L, Warren RA, Snellings N, Hoover D, Halling SM, Boyle SM. Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infect Immun* 1999;67:3830-3835
106. Ouahrani-Bettache S, Soubrier P, Liautard JP. IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. *J Appl Bacteriol* 1996;81:154-160

107. Romero C, Gamazo C, Pardo M, López-Goñi I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:515-617
108. Sifuentes-Rincón AM, Revol A, Barrera-Saldana BA. Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. *Mol Med* 1997;3:734-739
109. Norma Oficial Mexicana NOM-053-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la brucelosis en los animales. 28- Octubre-1997
110. Nicoletti P, Jones LM, Berman DT. Comparison of the subcutaneous and conjunctival route of vaccination with *Brucella abortus* strain 19 vaccine in adult cattle. *JAVMA* 1978;173:1450-1456
111. Alton GG, Corner LA, Plackett P. Vaccination of pregnant cows with low doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *Aust Vet J* 1980;56:369-372
112. Revich S, Walder A, Pivnick H. Human infection by *Brucella abortus* strain 19. *Can J Public health* 1961;52:285

