



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DIVERSIDAD Y COFILOGENIA DEL GÉNERO  
BRUCELLA Y SUS HOSPEDEROS MAMÍFEROS**

**TESIS**

Que para obtener el título de

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A**

**JULIÁN VAILLARD CERDIO**

**ASESORES**

MVZ. Dr. Oscar Rico Chávez

MVZ. Dr. Rafael Ojeda Flores



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

A quien me enseñó un pedacito del cielo aquí en la tierra.

*Mischa*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia que nunca dejó de creer en mí y que a través de su dedicación y sacrificio me dieron la oportunidad de perseguir mis sueños más locos, de seguir aprendiendo de mis fracasos y más importante, de mis éxitos.

A mis asesores Óscar y Rafa por estar siempre en cada etapa de este proyecto en un territorio desconocido y que gracias a sus esfuerzos y conocimientos pude superar todos los retos y metas propuestas.

A mis profesores que han tenido un papel indispensable en mi formación como persona y como profesionalista, que tuvieron la paciencia y la pasión para motivarme a cumplir mis proyectos y aspiraciones.

A mis amigos (mi segunda familia) que han sido parte fundamental de este camino recorrido, por los buenos momentos que hemos vivido juntos y todo el apoyo incondicional que me ofrecieron.

# CONTENIDO

	<b>PÁGINA</b>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	7
<b>RESULTADOS</b>	12
<b>DISCUSIÓN</b>	22
<b>CONCLUSIONES</b>	33
<b>REFERENCIAS</b>	34

## RESUMEN

VAILLARD CERDIO JULIÁN. Diversidad y cofilogenia del género *Brucella* y sus hospederos mamíferos (bajo la dirección de: MVZ, Dr. Oscar Rico Chávez y MVZ, Dr. Rafael Ojeda Flores)

La brucelosis es una enfermedad infecciosa reemergente de alto impacto económico causada por bacterias Gram negativas del género *Brucella*, es considerada una de las zoonosis más importantes a nivel mundial sin embargo se desconoce su impacto en fauna silvestre. El objetivo del presente trabajo fue investigar los patrones de asociación del género *Brucella* con sus hospederos mamíferos; bajo la hipótesis de que estos patrones varían a diferentes niveles taxonómicos. A partir de la generación de una base de datos de aislamientos de *Brucella*, se construyeron árboles filogenéticos utilizando secuencias genéticas de mamíferos (citocromo b) y de *Brucella* (gen 16S y el genoma). Se calculó la especificidad de hospedero y se realizaron pruebas globales de coespeciación a diferentes escalas taxonómicas y a nivel de hospederos preferenciales. Los resultados muestran que *Brucella suis* es la especie con mayor distribución entre órdenes y *Brucella abortus* con mayor número de hospederos, también se identificó que tanto carnívoros como primates son los órdenes de mamíferos que están asociados al mayor número de especies de *Brucella*. Se identificó a *Brucella ceti* y *Brucella pinnipedialis* (SES.MPD -4.04, -3.49,  $P \leq 0.05$ , respectivamente) como especies altamente especializadas y a *Brucella melitensis* biovariedad 1, 2 y 3 mayormente asociada a sus hospederos preferenciales (SES.MPD -1.51, -1.46, -1.53,  $P \leq 0.05$ , respectivamente). Se detectó congruencia estadísticamente significativa entre las filogenias de *Brucella* y mamíferos a nivel especie (ParaFitGlobal= 21556.22) y de hospederos preferenciales (ParaFitGlobal= 4929.289), esta congruencia confirma un grado de preferencia de *Brucella* por sus hospederos sin embargo sólo es aplicable a bovinos domésticos. El implementar estudios posteriores a nivel de genotipos podrían resultar clave para la identificación de patrones en el establecimiento de relaciones de este patógeno con sus hospederos.

## INTRODUCCIÓN

La especificidad hacia un grupo más o menos restringido de hospederos es una de las características fundamentales de la mayoría de los parásitos. Este rasgo ha sido considerado como “altamente conservado” desde un punto de vista filogenético. Esta hipótesis ha conducido al desarrollo y establecimiento de una variedad de conceptos y métodos para el estudio de la coevolución/coespeciación entre los parásitos y sus hospederos (Kvičerová y Hypša, 2013).

Entre los diversos métodos para el estudio de las diferentes asociaciones parásito-hospedero destacan los análisis cofilogenéticos enfocados en explorar la relación entre filogenias, este tipo de análisis se usa principalmente para evaluar la relación y el grado de congruencia entre topologías de parásitos y hospederos asociados (Banks y Paterson, 2005). Como la relación existente entre piojos del género *Mallophaga* y tuzas (Hafner *et al.*, 1994) y el parasitismo por copépodos en peces teleósteos (Paterson y Poulin, 1999).

El incremento en el número de estudios ecológicos y evolutivos enfocados en analizar estas asociaciones parásito-hospedero obedece a la necesidad de entender la dinámica de enfermedades importantes, identificar agentes que puedan usarse como control biológico de plagas y para mejorar la producción agrícola (Poulin y Morand, 2004). Investigaciones anteriores han demostrado la utilidad de estos análisis en situaciones específicas como las relacionadas a cambios de hospedero, saltos taxonómicos, extinción de reservorios, entre otras (Cui *et al.* 2007).

Entre los diferentes estudios basados en esta aproximación, destacan aquellos relacionados con agentes zoonóticos y hospederos silvestres. Ojeda-Flores en 2015 analizó la diversidad y las relaciones filogenéticas existentes entre coronavirus y murciélagos neotropicales. Asimismo, Lei y Olival en 2014 estudiaron patrones coevolutivos entre bacterias del género *Leptospira* y *Bartonella* asociadas a murciélagos y roedores.

Este tipo de enfoque permite cuantificar la frecuencia de saltos taxonómicos dentro y entre hospederos, paso imprescindible para el desarrollo de modelos predictivos de enfermedades epidemiológicas emergentes de gran trascendencia como la rabia, leptospirosis, y brucelosis (Shaw, 2005); siendo la brucelosis una de las de mayor importancia mundial.

La brucelosis es una de las zoonosis más comunes a nivel mundial, con más de 500,000 casos anuales (Corbel, 2006) y está considerada como una enfermedad reemergente (Pappas *et al.*, 2006). Es causada por bacterias Gram negativas, intracelulares facultativas pertenecientes a la familia Brucellaceae del género *Brucella* establecido por Meyer y Shaw en 1920. Hace 50 años, solamente tres especies estaban consideradas dentro del género *Brucella*; hoy en día se han identificado al menos siete nuevas especies y varios aislamientos están bajo consideración para su inclusión como nuevas especies (Olsen y Palmer, 2014).

La brucelosis tiene un enorme impacto económico (pérdidas reproductivas en animales de producción), en el abastecimiento de alimento y en salud pública (exposición ocupacional o por consumo de productos lácteos y derivados). La



transmisión de brucelosis entre animales de producción y humanos bajo condiciones de campo destaca la importancia epidemiológica de esta enfermedad (Olsen y Palmer 2014) ya que al no existir una vacuna disponible para el hombre, la prevención de brucelosis depende en su totalidad del control de los reservorios (Godfroid *et al.*, 2011), generando en consecuencia dificultades para su control en fauna silvestre de vida libre (Olsen y Palmer, 2014).

Por ejemplo, en Wyoming, EUA en 2004 se presentaron altas tasas de mortalidad en un rebaño de borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) tras el contacto con ciervos rojos (*Cervus elaphus*) infectados con *Brucella abortus* (Kreeger *et al.* 2004). Asimismo, se ha descrito que zorros rojos (*Vulpes vulpes*) de vida libre actúan como reservorios para *Brucella suis* biovariedad 2 y *Brucella microti*, probablemente debido a que se alimentan de sus reservorios (liebres y ratones), por lo tanto cazadores europeos expuestos a los restos de zorros rojos se encuentran en mayor riesgo de infectarse (Hofer *et al.* 2012).

Además, recientemente han sido reportados como reservorios para la enfermedad animales de vida libre que se encuentran en contacto con animales domésticos y el hombre, como jabalíes (*Sus scrofa*), bisontes americanos (*Bison bison*) y liebres (*Lepus europaeus*) (Godfroid, 2009), lo que remarca la necesidad de generar información a través de la incorporación de análisis ecológico-evolutivos como en el presente estudio.

El impacto que representa dicha enfermedad en especies de vida silvestre se encuentra pobremente estudiado, Olsen y Palmer (2014) señalan que los saltos taxonómicos que se presentan asociados a esta enfermedad dentro de una gran diversidad de especies no deberían de catalogarse como insignificantes ya que a pesar de los avances en el conocimiento y control de la brucelosis en vida libre, esta se ha convertido en un problema para la salud pública.

Debido a esta situación los análisis ecológicos y filogenéticos representan una valiosa herramienta para el estudio y comprensión de las asociaciones del agente causal con sus hospederos, por ejemplo Guzmán-Verri y colaboradores (2012) reportan la relación existente entre especies de *Brucella* y sus hospederos preferenciales al confrontar la filogenia del patógeno con la de sus hospederos demostrando la existencia de una asociación parásito/hospedero importante.

A pesar de este reporte, el estudio se encuentra enfocado en especies asociadas a mamíferos marinos (*Brucella ceti* y *Brucella pinnipedialis*) por lo que aún se desconoce la relación a una escala mayor con el resto de los hospederos mamíferos tanto preferenciales como accidentales.

Debido a la escasa información de análisis cofilogenéticos aplicados a *Brucella*, se analizó la relación filogenética de las especies de *Brucella* y la de sus hospederos mamíferos utilizando herramientas filogenéticas con la finalidad de identificar los patrones de asociación parásito-hospedero, los cuales nos aportan valiosa información para comprender la relación evolutiva entre este agente patógeno y el amplio rango de hospederos mamíferos asociados a esta enfermedad.

## **HIPÓTESIS**

Los análisis filogenéticos de las diferentes especies de *Brucella* y sus hospederos mamíferos evidenciarán variaciones en los patrones de asociación parásito-hospedero a diferentes niveles taxonómicos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Investigar los patrones de asociación parásito-hospedero entre el género *Brucella* y sus hospederos mamíferos a diferentes niveles taxonómicos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Conocer la riqueza y similitud de especies de *Brucella* asociadas a mamíferos.
2. Medir la especificidad de hospedero de las diferentes especies de *Brucella* asociadas con hospederos mamíferos.
3. Realizar un análisis cofilogenético entre las especies de *Brucella* y sus hospederos mamíferos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Diversidad de especies de *Brucella* asociadas a mamíferos

Se realizó una revisión bibliográfica de artículos indexados desde 1970 hasta mayo del 2015 consultando la base de datos ISI WEB OF KNOWLEDGE (Science Citation Index), utilizando combinaciones de palabras clave. Posteriormente, se creó una base de datos (cuadro 1) con los artículos que reportaron el diagnóstico (utilizando técnicas bacteriológicas y moleculares) de *Brucella* spp.

**Cuadro 1.** Clasificación de la información para la construcción de la base de datos.

<b><i>Brucella</i> spp.</b>	<b>Biovariedad</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Región</b>	<b>Muestras</b>
<b>Técnica de diagnóstico</b>	<b>Gen</b>	<b>Año</b>	<b>Palabras Clave</b>	<b>Datos del Artículo</b>

La base de datos se organizó en dos diferentes niveles, en el primero se utilizaron los reportes de aislamiento de *Brucella* a nivel de especie y en el segundo las especies de *Brucella* a nivel de biovariedades, de aquellas especies que cuentan con ellas (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*).

Posteriormente se obtuvo la diversidad de especies de *Brucella* asociadas a sus hospederos mamíferos y se empleó el índice de Jaccard (Krebs, 2014) para el análisis de similitud de las especies de *Brucella* y sus hospederos a través de una matriz de incidencia (presencia/ausencia) utilizada para la creación de dendrogramas de similitud.

## Construcción de filogenias

Las secuencias de nucleótidos utilizadas corresponden a 11 especies de *Brucella* (cuadro 2) obtenidas de la base de datos: GenBank del NIH (National Institutes of Health). Para la base de datos de hospederos, se utilizó el gen del citocromo-b mitocondrial, utilizando las secuencias del GenBank (cuadro 3). Las especies de hospedero sin secuencias disponibles fueron sustituidas por la especie taxonómicamente más cercana: *Chaetophractus villosus* por *Dasyopus novemcinctus* y *Sylvilagus bachmani* por *Sylvilagus audobonii*.

**Cuadro 2.** Secuencias del gen 16S RNA para las especies de *Brucella*

<i>Brucella</i> spp.	Código de Acceso – GenBank
<i>Brucella abortus</i>	NR_114469.1
<i>Brucella canis</i>	AY513514.1
<i>Brucella ceti</i>	NR_121762.1
<i>Brucella inopinata</i>	NR_116161.1
<i>Brucella melitensis</i>	JF939188.1
<i>Brucella microti</i>	NR_074336.1
<i>Brucella neotomae</i>	L26167.1
<i>Brucella ovis</i>	L26168.1
<i>Brucella papionis</i>	HG932316.1
<i>Brucella pinnipedialis</i>	NR_074332.1
<i>Brucella suis</i>	L26169.1
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	U70978.1

Las secuencias se analizaron utilizando el programa de alineamiento múltiple para secuencias de aminoácidos o nucleótidos “MAFFT” v.7 (Kato, 2013) ejecutado a través del programa Geneious® v.8 y editadas manualmente. Se utilizó como grupo externo para la filogenia de *Brucella* a *Ochrobactrum intermedium* y como grupo externo para la filogenia de los hospederos a *Ornitorhynchus anatinus*.

**Cuadro 3.** Secuencias del gen citocromo b para las especies de hospedero

Nombre Científico	GenBank	Nombre Científico	GenBank
<i>Aepyceros melampus</i>	AF022056.1	<i>Leopardus pardalis</i>	FJ490207.1
<i>Alces alces</i>	JF489131.1	<i>Lepus californicus</i>	HQ596466.1
<i>Apodemus agrarius</i>	AB032851.1	<i>Lepus capensis</i>	AY292732.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	AB033695.1	<i>Lepus europaeus</i>	HQ596473.1
<i>Axis axis</i>	AY607040.1	<i>Lepus tolai</i>	AY649598.1
<i>Balaena mysticetus</i>	X75588.1	<i>Lutra lutra</i>	AF057124.1
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	X75753.1	<i>Megaptera novaeangliae</i>	X75584.1
<i>Bison bison</i>	AF036273.1	<i>Microtus arvalis</i>	GU187363.1
<i>Bos grunniens</i>	AY374124.1	<i>Mus musculus</i>	EU349766.1
<i>Bos taurus</i>	D34635.1	<i>Mustela erminea</i>	AB026101.1
<i>Bubalus bubalis</i>	D88637.1	<i>Neotoma lepida</i>	DQ781256.1
<i>Callorhinus ursinus</i>	AY424647.1	<i>Neovison vison</i>	AB026109.1
<i>Camelus dromedarius</i>	U06426.1	<i>Odocoileus virginianus</i>	DQ379370.1
<i>Camelus ferus</i>	AY126625.1	<i>Orcinus orca</i>	AF084061.1
<i>Canis aureus</i>	AY291433.1	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	NC_000891.1
<i>Canis latrans</i>	NC_008093.1	<i>Oryx leucoryx</i>	AF036286.1
<i>Canis lupus</i>	AY598499.1	<i>Ovibos moschatus</i>	U17862.1
<i>Canis lupus familiaris</i>	JF489119.1	<i>Ovis aries</i>	D84205.1
<i>Capra hircus</i>	D84201.1	<i>Ovis canadensis</i>	HM222706.1
<i>Capra ibex</i>	AB743826.1	<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	DQ789199.2
<i>Capra pyrenaica</i>	AJ010056.1	<i>Panthera onca</i>	HM107682.1
<i>Capreolus capreolus</i>	Y14951.1	<i>Papio hamadryas</i>	EU885446.1
<i>Cervus elaphus</i>	AB001612.1	<i>Pecari tajacu</i>	JF489135.1
<i>Cricetulus migratorius</i>	AY288508.1	<i>Phoca hispida</i>	X82304.1
<i>Cystophora cristata</i>	AY140981.1	<i>Phoca vitulina</i>	X82306.1
<i>Dasybus novemcinctus</i>	AF493839.1	<i>Phocoena phocoena</i>	U72039.1
<i>Delphinus delphis</i>	AF084084.1	<i>Procyon lotor</i>	GU175439.1
<i>Didelphis marsupialis</i>	KJ129895.1	<i>Pseudalopex griseus</i>	AF028152.1
<i>Didelphis virginiana</i>	HM222715.1	<i>Pseudalopex gymnocercus</i>	AF028153.1
<i>Equus asinus</i>	FJ428527.1	<i>Pseudois nayaur</i>	AF034732.1
<i>Equus caballus</i>	D82932.1	<i>Puma concolor</i>	AY598487.1
<i>Eschrichtius robustus</i>	X75585.1	<i>Rangifer tarandus</i>	AJ000029.1
<i>Felis catus</i>	AB004238.1	<i>Rattus norvegicus</i>	FR775890.1
<i>Galictis cuja</i>	EF987754.1	<i>Rupicapra rupicapra</i>	AF034725.1
<i>Gazella dorcas</i>	JN410257.1	<i>Saiga tatarica</i>	JX177502.1
<i>Grampus griseus</i>	AF084059.1	<i>Spermophilus brevicauda</i>	AF157875.1
<i>Gulo gulo</i>	DQ206375.1	<i>Spermophilus pygmaeus</i>	AF157910.1
<i>Halichoerus grypus</i>	GU167293.1	<i>Spermophilus undulatus</i>	AF157912.1
<i>Hippotragus niger</i>	JF728770.1	<i>Stenella coeruleoalba</i>	AF084082.1
<i>Homo sapiens</i>	U09500.1	<i>Sus scrofa</i>	AB015083.1
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	GU136721.1	<i>Sus scrofa domesticus</i>	AB015079.1
<i>Hydropotes inermis</i>	AJ000028.1	<i>Sylvilagus audubonii</i>	HQ596488.1
<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	JF728771.1	<i>Syncerus caffer</i>	D82888.1
<i>Lagenorhynchus acutus</i>	AF084075.1	<i>Tragelaphus oryx</i>	AF022057.1
<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	AF084074.1	<i>Tursiops truncatus</i>	AF084095.1
<i>Lama glama</i>	AY535253.1	<i>Vulpes lagopus</i>	AY598511.1
<i>Lama pacos</i>	AY535249.1	<i>Vulpes vulpes</i>	AY928669.1

Posteriormente se generaron árboles filogenéticos mediante el método de máxima verosimilitud utilizando los programas RaxML (Stamatakis, Ludwig y Meier, 2005), raxmlGUI (Silvestro y Michalak, 2012) y BioEdit (Hall, 1999) bajo el modelo de sustitución GTR+gamma con una frecuencia de remuestreo con 1000 réplicas.

Para profundizar en el análisis de la filogenia de *Brucella* se obtuvo un grupo de secuencias de los genomas de las diferentes biovariedades de *Brucella* (cuadro 4) de la base de datos PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center) (Wattam *et al.*, 2014).

**Cuadro 4.** Secuencias del genoma completo de las especies y biovariedades de *Brucella*

<i>Brucella</i> spp.	Nombre de la secuencia
<i>Brucella abortus</i> bv. 1	Brucella_abortus_bv._1_str._NI010
<i>Brucella abortus</i> bv. 2	Brucella_abortus_bv._2_str._02-0120
<i>Brucella abortus</i> bv. 3	Brucella_abortus_bv._3_str._Tulya
<i>Brucella abortus</i> bv. 4	Brucella_abortus_bv._4_str._292
<i>Brucella abortus</i> bv. 6	Brucella_abortus_bv._6_str._870
<i>Brucella abortus</i> bv. 9	Brucella_abortus_bv._9_str._C68
<i>Brucella canis</i>	Brucella_canis_ATCC_25840
<i>Brucella ceti</i>	Brucella_ceti_B1/94
<i>Brucella melitensis</i> bv. 1	Brucella_melitensis_bv._1_str._Rev.1
<i>Brucella melitensis</i> bv. 2	Brucella_melitensis_ATCC_23457
<i>Brucella melitensis</i> bv. 3	Brucella_melitensis_bv._3_str._Ether
<i>Brucella microti</i>	Brucella_microti_CCM_4915
<i>Brucella neotomae</i>	Brucella_neotomae_5K33
<i>Brucella ovis</i>	Brucella_ovis_ATCC_23445
<i>Brucella papionis</i>	Brucella_sp._NVSL_07_0026
<i>Brucella pinnipedialis</i>	Brucella_pinnipedialis_B2/94
<i>Brucella suis</i> bv. 1	Brucella_suis_bv._1_str._B10_1082
<i>Brucella suis</i> bv. 2	Brucella_suis_ATCC_23365
<i>Brucella suis</i> bv. 3	Brucella_suis_bv._3_str._686
<i>Brucella suis</i> bv. 4	Brucella_suis_bv._4_str._40
<i>Brucella suis</i> bv. 5	Brucella_suis_bv._5_str._513
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	Ochrobactrum_intermedium_LMG_3301

## **Análisis de especificidad de hospedero**

Se empleó el índice de especificidad de hospedero ( $S_{TD}$ ) propuesto por Poulin, Krasnov y Mouillot, 2011 para medir la diversidad filogenética existente entre los hospederos mamíferos y las diferentes especies de *Brucella* asociadas. Los análisis se realizaron a diferentes niveles taxonómicos de los hospederos (especie, género, familia y orden), de la misma manera se estudió la relación existente con los hospederos preferenciales propuestos por Godfroid, Nielsen y Saegerman en 2010 modificado con la anexión de la nueva especie de *Brucella* (*Brucella papionis*) propuesta por Schlabritz-Loutsevitch (2009).

## **Análisis de relaciones Cofilogenéticas**

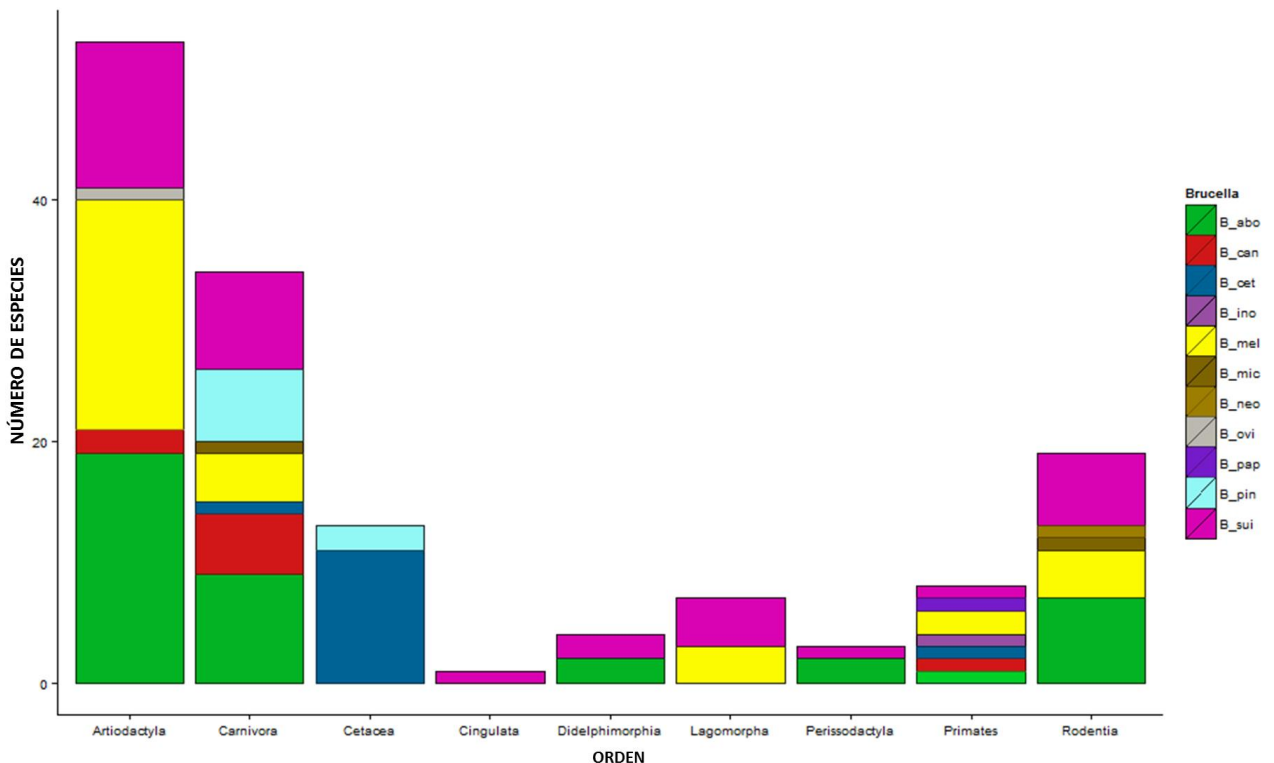
La congruencia filogenética entre *Brucella* y sus hospederos mamíferos fue analizada utilizando métodos topológicos globales de coespeciación basados en pruebas estadísticas para medir matemáticamente la congruencia entre filogenias. Se utilizó el método de PARAFIT (Legendre, Desdevises y Bazin, 2002) para evaluar estadísticamente las relaciones filogenéticas entre las topologías.



## RESULTADOS

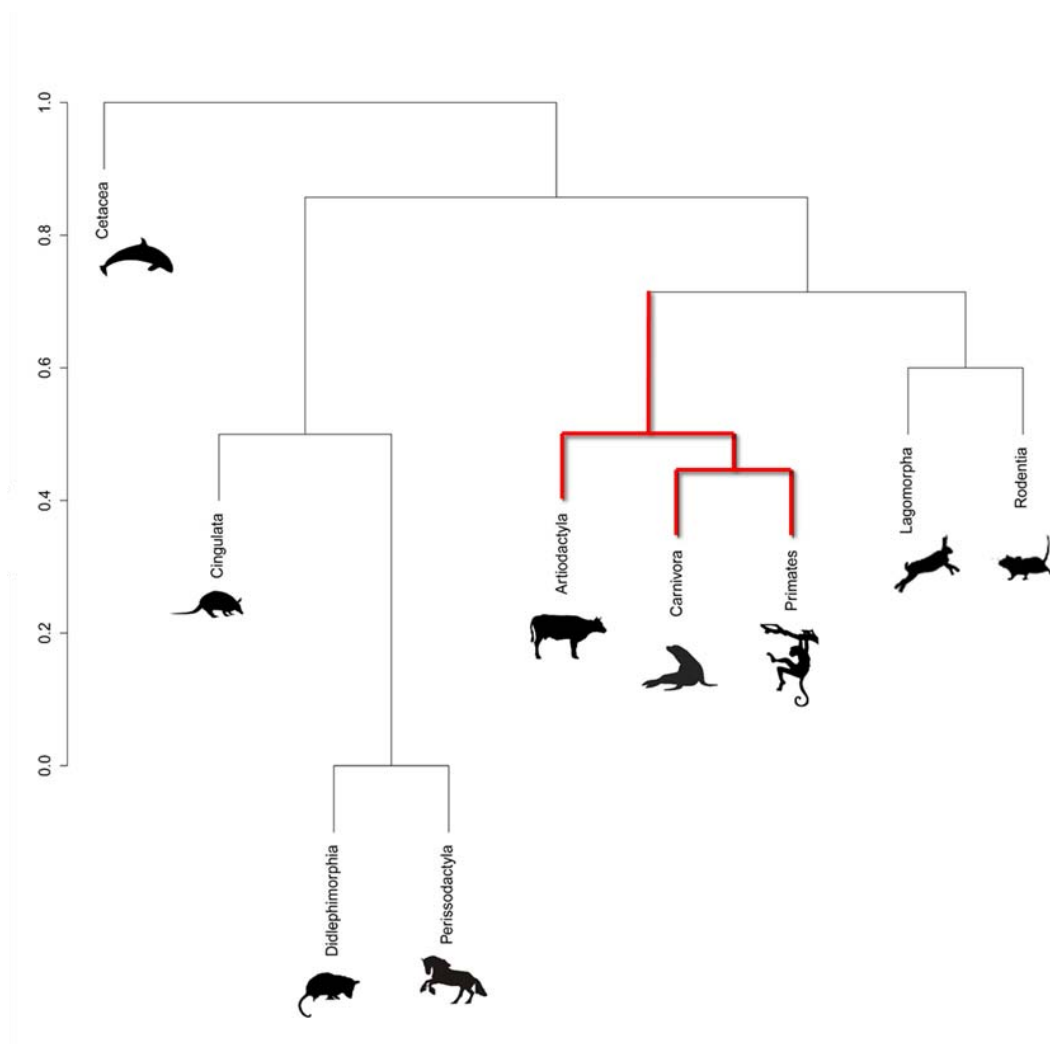
### Riqueza y similitud a nivel de especie

Se encontraron un total de 93 especies de mamíferos asociadas a 11 especies de *Brucella* distribuidos en nueve órdenes (figura 1). Los órdenes Carnívora y Primates presentaron el mayor número de especies de *Brucella* asociadas con 7/11, seguidos por los artiodáctilos y roedores con 6/11 especies asociadas. Los órdenes de Cetacea, Didelphimorphia, Lagomorpha y Perissodactyla están asociados a 2/11 especies de *Brucella* mientras que el orden Cingulata sólo a una especie.



**Figura 1.** Representación gráfica de la diversidad de las especies de *Brucella* asociadas a sus hospederos mamíferos a nivel de orden.

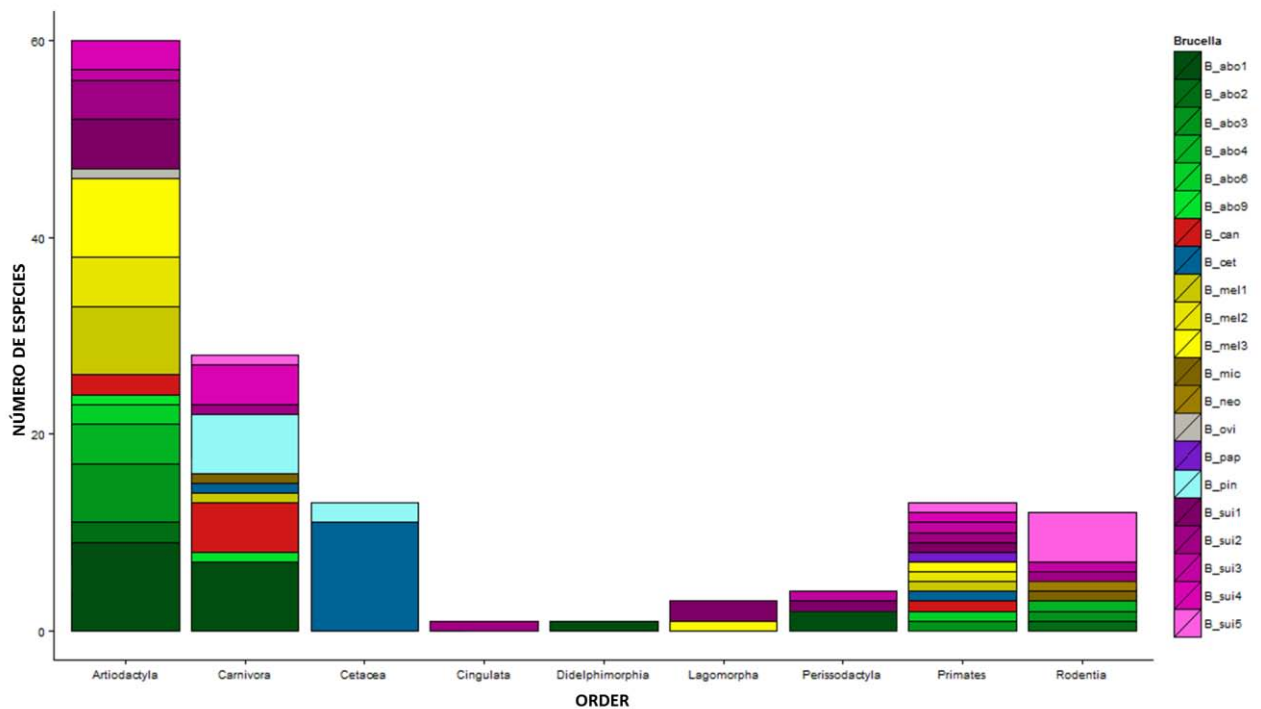
Asimismo, se observó que *Brucella abortus* es la especie de *Brucella* con el mayor número de especies de hospederos asociados (n=42), seguido por *Brucella suis* (n=34) y *Brucella melitensis* (n=32). En el análisis de similitud, sólo se obtuvieron resultados significativos a nivel de orden, mediante el cual se lograron identificar 3 grupos principales (figura 2). El primero formado por los órdenes Perissodactyla y Didelphimorphia, el segundo conformado por los órdenes Artiodactyla, Carnivora y Primates y el último con los órdenes Lagomorpha y Rodentia.



**Figura 2.** Dendrograma de similitud de especies de *Brucella* asociadas a sus hospederos mamíferos a nivel de orden.

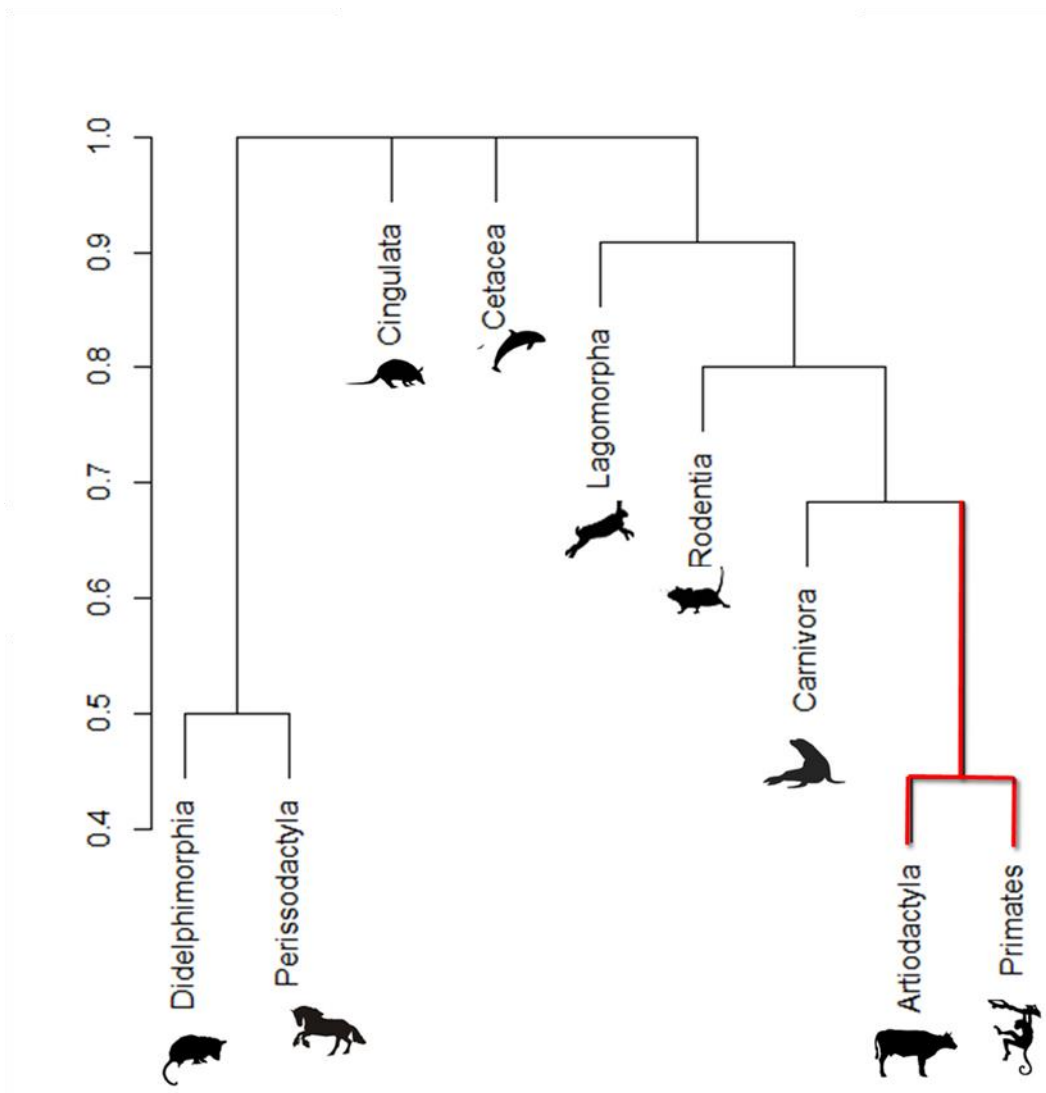
## Riqueza y similitud a nivel de biovariedad

Se encontraron un total de 73 especies de mamíferos asociadas a 21 especies de *Brucella* distribuidos en nueve órdenes (figura 3). El orden con el mayor número de especies de *Brucella* asociadas es el de los Artiodactyla con 15/21 especies, seguido por el orden Primates con 13/21, Carnivora con 10/21 y Rodentia con 8/21. Los órdenes con menor número de especies de *Brucella* asociadas son Perissodactyla con 3/21, Cetacea y Didelphimorphia con 2/21 y Lagomorpha y Cingulata sólo se encuentran asociadas a una especie.



**Figura 3.** Representación gráfica de la diversidad de las especies de *Brucella* y sus biovariedades asociadas a sus hospederos mamíferos a nivel de orden.

Asimismo, se observó que *Brucella abortus* biovariedad 1 es la especie de *Brucella* con el mayor número de especies de hospederos asociados (n=19), seguido por *Brucella ceti* (n=13) y *Brucella melitensis* biovariedad 1 (n=10). En el análisis de similitud, sólo a nivel de orden se lograron identificar dos grupos principales (figura 4). El primero formado por los órdenes Primates y Artiodactyla y el segundo por los órdenes Perissodactyla y Didelphimorphia



**Figura 4.** Dendrograma de similitud de especies de *Brucella* y sus biovariedades asociadas a sus hospederos mamíferos a nivel de orden.

## Especificidad de hospedero a nivel de especie

Se identificó a *B. ceti* y a *B. pinnipedialis* como especies de altamente especializadas en los niveles: de especie (cuadro 5) *B. ceti* ( $SES_{MPD} = -4.64$ ,  $P = 0.001$ ) y *B. pinnipedialis* ( $SES_{MPD} = -3.49$ ,  $P = 0.002$ ), nivel de género (cuadro 6): *B. ceti* ( $SES_{MPD} = -4.04$ ,  $P = 0.001$ ) y *B. pinnipedialis* ( $SES_{MPD} = -3.45$ ,  $P = 0.002$ ) y a nivel familia (cuadro 7): *B. ceti* ( $SES_{MPD} = -3.22$ ,  $P = 0.002$ ) y *B. pinnipedialis* ( $SES_{MPD} = -2.73$ ,  $P = 0.003$ ). Igualmente se identificó a *B. melitensis* como una especie altamente especializada ( $SES_{MPD} = -2.07$ ,  $P = 0.015$ ) a nivel de hospederos preferenciales (cuadro 8). No se obtuvieron resultados estadísticamente significativos ( $P \leq 0.05$ ) a nivel de órdenes.

**Cuadro 5.** Especificidad de hospedero de especies de *Brucella* y sus hospederos mamíferos a nivel de especie.

	ntaxa	mpd.obs	mpd.rand.mean	mpd.rand.sd	mpd.obs.rank	mpd.obs.z	mpd.obs.p	runs
B_pin	8	0.34	0.60	0.08	2	-3.49	0.002	999
B_cet	13	0.34	0.58	0.05	1	-4.64	0.001	999
Och_int	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	999

**Cuadro 6.** Especificidad de hospedero de especies de *Brucella* y sus hospederos mamíferos a nivel de género.

	ntaxa	mpd.obs	mpd.rand.mean	mpd.rand.sd	mpd.obs.rank	mpd.obs.z	mpd.obs.p	runs
B_pin	8	0.34	0.60	0.08	2	-3.45	0.002	999
B_cet	12	0.36	0.58	0.06	1	-4.04	0.001	999
Och_int	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	999

**Cuadro 7.** Especificidad de hospedero de especies de *Brucella* y sus hospederos mamíferos a nivel de familia.

	ntaxa	mpd.obs	mpd.rand.mean	mpd.rand.sd	mpd.obs.rank	mpd.obs.z	mpd.obs.p	runs
B_pin	5	0.45	0.68	0.08	3	-2.73	0.003	999
B_cet	7	0.46	0.67	0.06	2	-3.22	0.002	999
Och_int	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	999

**Cuadro 8.** Especificidad de hospedero de especies de *Brucella* y sus hospederos mamíferos a nivel de hospederos preferenciales.

	ntaxa	mpd.obs	mpd.rand.mean	mpd.rand.sd	mpd.obs.rank	mpd.obs.z	mpd.obs.p	runs
B_mel	2	0.15	0.61	0.22	15.5	-2.07	0.0155	999
Och_int	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	999

### Especificidad de hospedero a nivel de biovariedad

A nivel de especie se identificó a *B. melitensis* biovariedad (biovar) 1 ( $SES_{MPD} = -2.02$ ,  $P = 0.032$ ), *B. abortus* biovar 1 ( $SES_{MPD} = -2.10$ ,  $P = 0.017$ ), *B. pinnipedialis* ( $SES_{MPD} = -3.03$ ,  $P = 0.001$ ) y *B. ceti* ( $SES_{MPD} = -4.20$ ,  $P = 0.001$ ) como especies especializadas (cuadro 9). Asimismo a nivel de género; *B. abortus* biovar 1 ( $SES_{MPD} = -1.92$ ,  $P = 0.031$ ), *B. pinnipedialis* ( $SES_{MPD} = -3.27$ ,  $P = 0.001$ ) y *B. ceti* ( $SES_{MPD} = -3.95$ ,  $P = 0.001$ ) resultaron ser especies especializadas (cuadro 10), a nivel de familia sólo *B. pinnipedialis* ( $SES_{MPD} = -2.41$ ,  $P = 0.02$ ) y *B. ceti* ( $SES_{MPD} = -2.57$ ,  $P = 0.01$ ) ser especies altamente especializadas (cuadro 11).

A nivel de hospederos preferenciales se identificó a *B. melitensis* biovar 1 ( $SES_{MPD} = -1.51$ ,  $P = 0.025$ ), biovar 2 ( $SES_{MPD} = -1.46$ ,  $P = 0.034$ ) y biovar 3 ( $SES_{MPD} = -1.533$ ,  $P = 0.025$ ) como especies altamente especializadas (cuadro 12).

No se obtuvieron resultados significativos ( $P \leq 0.05$ ) para el nivel de orden.

**Cuadro 9.** Especificidad de hospedero de especies de *Brucella* y sus biovariedades asociadas a sus hospederos mamíferos a nivel de especies.

	ntaxa	mpd.obs	mpd.rand.mean	mpd.rand.sd	mpd.obs.rank	mpd.obs.z	mpd.obs.p	runs
B_mel1	9	0.40	0.54	0.07	32	-2.02	0.032	999
B_abo1	19	0.45	0.53	0.04	17	-2.10	0.017	999
B_pin	7	0.30	0.55	0.08	1	-3.03	0.001	999
B_cet	14	0.33	0.53	0.05	1	-4.20	0.001	999
Och_int	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	999

**Cuadro 10** Especificidad de hospedero de especies de *Brucella* y sus biovariedades asociadas a sus hospederos mamíferos a nivel de género.

	ntaxa	mpd.obs	mpd.rand.mean	mpd.rand.sd	mpd.obs.rank	mpd.obs.z	mpd.obs.p	runs
B_abo1	16	0.45	0.54	0.04	31	-1.92	0.031	999
B_pin	7	0.30	0.55	0.08	1	-3.27	0.001	999
B_cet	13	0.34	0.54	0.05	1	-3.95	0.001	999
Och_int	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	999

**Cuadro 11.** Especificidad de hospedero de especies de *Brucella* y sus biovariedades asociadas a sus hospederos mamíferos a nivel de familia.

	ntaxa	mpd.obs	mpd.rand.mean	mpd.rand.sd	mpd.obs.rank	mpd.obs.z	mpd.obs.p	runs
B_pin	5	0.45	0.64	0.08	20	-2.41	0.02	999
B_cet	7	0.46	0.63	0.07	10	-2.57	0.01	999
Och_int	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	999

**Cuadro 12.** Especificidad de hospedero de especies de *Brucella* y sus biovariedades asociadas a sus hospederos mamíferos a nivel de hospederos preferenciales.

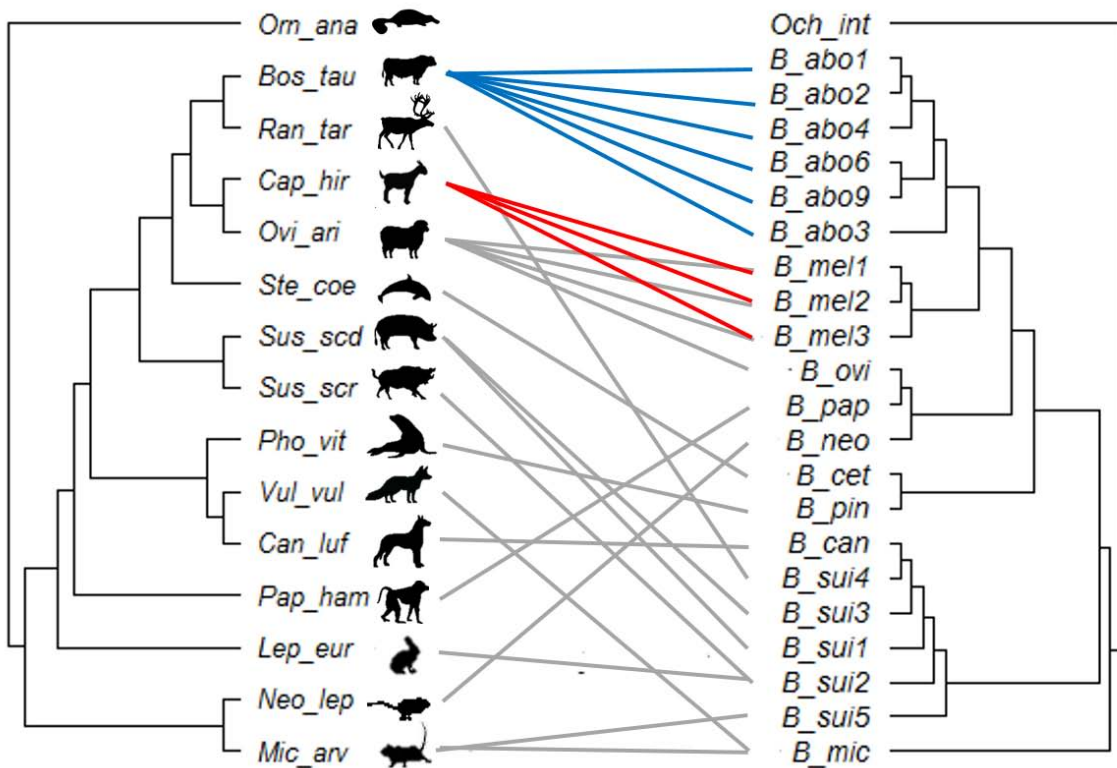
	ntaxa	mpd.obs	mpd.rand.mean	mpd.rand.sd	mpd.obs.rank	mpd.obs.z	mpd.obs.p	runs
B_mel2	2	0.15	0.47	0.22	34.5	-1.46	0.0345	999
B_mel1	2	0.15	0.47	0.21	25	-1.51	0.025	999
B_mel3	2	0.15	0.47	0.21	25	-1.53	0.025	999
Och_int	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	999

## Coespeciación a nivel de especie

No se obtuvieron resultados estadísticamente significativos ( $P \leq 0.05$ ) en los siguientes niveles: especie, género, familia, orden y hospederos preferenciales.

## Coespeciación a nivel de biovariedad

Se encontró una congruencia significativa entre las filogenias de *Brucella* spp. y sus hospederos a nivel de hospederos preferenciales (ParaFitGlobal= 4929.289,  $P = 0.016$ ) como puede observarse en la figura 5; de los cuales 14 de 135 (10.44%) asociaciones individuales tienen un soporte de los valores de ParaFit1 o Parafit2 con una  $P \leq 0.05$  (cuadro 13).



**Figura 5.** Tanglegrama comparativo entre la filogenia de hospederos a nivel de hospedero preferencial y la filogenia de las biovariedades de *Brucella*.



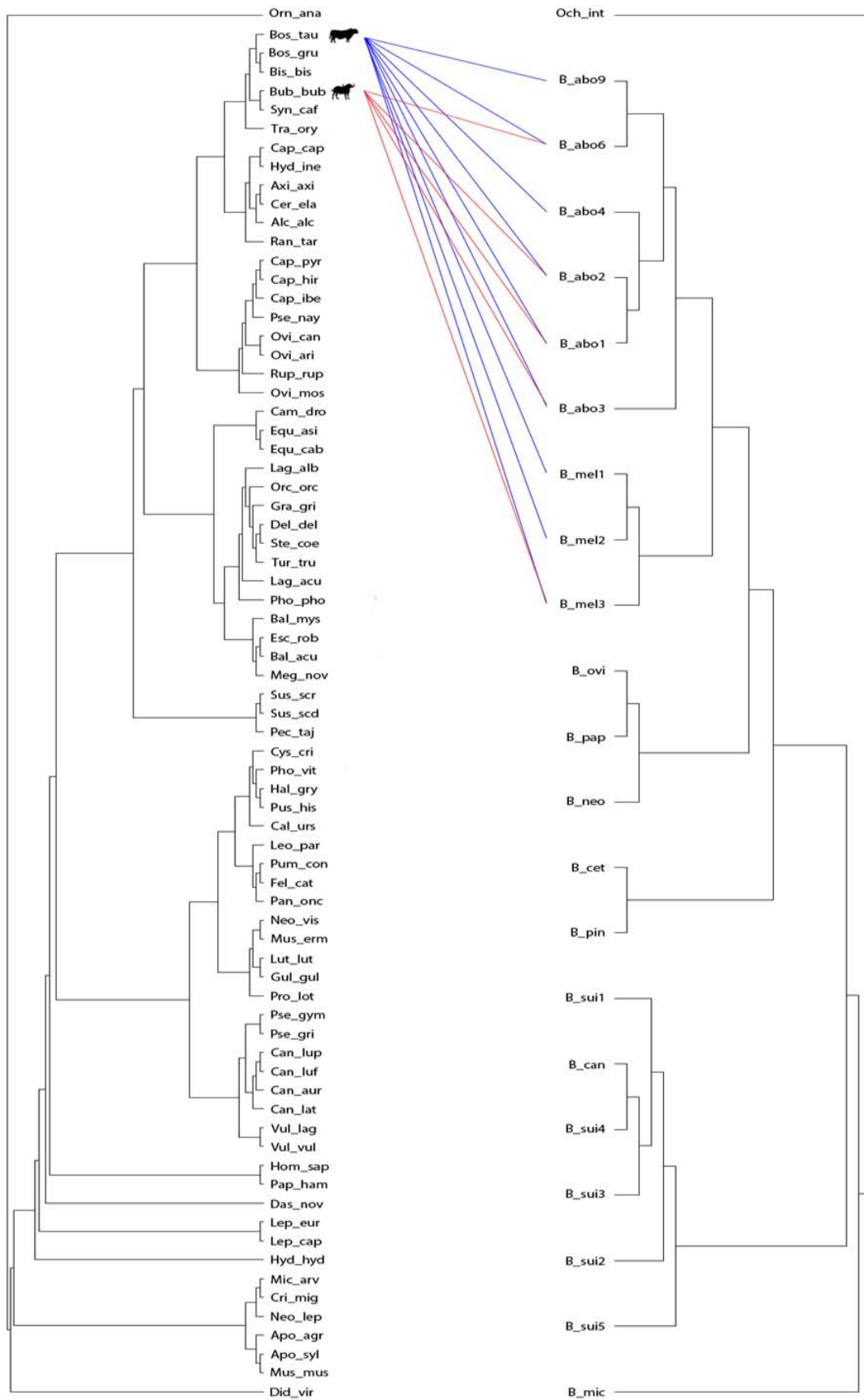
**Cuadro 13.** Valores de PARAFIT para las biovariedades de *Brucella* y sus hospederos mamíferos a nivel de hospederos preferenciales.

Global test: ParaFitGlobal = 4929.289, p-value = 0.016 (1000 permutations)					
Host	Parasite	F1.stat	p.F1	F2.stat	p.F2
Bos_tau	B_abo1	463.43	0.028	1.40E-05	0.028
Bos_tau	B_abo2	463.43	0.027	1.40E-05	0.027
Bos_tau	B_abo3	418.81	0.036	1.26E-05	0.036
Bos_tau	B_abo4	461.31	0.026	1.39E-05	0.026
Bos_tau	B_abo6	454.93	0.028	1.37E-05	0.028
Bos_tau	B_abo9	454.93	0.022	1.37E-05	0.022
Cap_hir	B_mel1	1089.81	0.002	3.29E-05	0.002
Cap_hir	B_mel2	1089.81	0.002	3.29E-05	0.002
Cap_hir	B_mel3	1081.32	0.003	3.26E-05	0.003

De igual manera se encontró una congruencia significativa a nivel de especie (ParaFitGlobal= 21556.22, P= 0.005) como puede observarse en la figura 6; de los cuales 9 de 25 (36%) asociaciones individuales tienen un significancia estadística en los valores de ParaFit1 o Parafit2 (cuadro 14). No se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en los niveles de género, familia y orden.

**Cuadro 14.** Valores de PARAFIT para las biovariedades de *Brucella* y sus hospederos mamíferos a nivel de especie.

Global Test: ParaFitGlobal = 21556.22, p = 0.005 (1000 permutaciones)					
Hospedero	Parásito	F1	p.F1	F2	p.F2
Bos_tau	B_abo1	2645.201	0.001	7.98E-05	0.001
Bos_tau	B_abo2	2646.953	0.001	7.98E-05	0.001
Bos_tau	B_abo3	2487.811	0.001	7.50E-05	0.001
Bos_tau	B_abo4	2629.212	0.001	7.93E-05	0.001
Bos_tau	B_abo6	2614.625	0.001	7.89E-05	0.001
Bos_tau	B_abo9	2611.996	0.001	7.88E-05	0.001
Bos_tau	B_mel1	2069.193	0.001	6.24E-05	0.001
Bos_tau	B_mel2	2069.613	0.001	6.24E-05	0.001
Bos_tau	B_mel3	2074.748	0.001	6.26E-05	0.001
Bub_bub	B_abo1	2183.130	0.001	6.58E-05	0.001
Bub_bub	B_abo2	2184.601	0.001	6.59E-05	0.001
Bub_bub	B_abo3	2059.658	0.001	6.21E-05	0.001
Bub_bub	B_abo6	2152.492	0.002	6.49E-05	0.002
Bub_bub	B_mel3	1663.318	0.001	5.02E-05	0.001



**Figura 6.** Tanglegrama comparativo entre la filogenia de hospederos a nivel de especie y la filogenia de las biovariedades de *Brucella*.

## DISCUSIÓN

### Riqueza y similitud

De los órdenes de los hospederos estudiados tanto los carnívoros como los primates presentan asociaciones con 7 de las 11 diferentes especies de *Brucella*; esta relación existente en los primates puede deberse al estrecho contacto que tiene el ser humano con animales tanto de producción como de vida silvestre que se encuentran asociados a *Brucella*.

Cabe destacar que dentro de los primates sólo dos de las especies están asociadas exclusivamente a este orden *Brucella papionis* propuesta por Schlabritz-Loutsevitch *et al.* en 2009 la cual se aisló de abortos en babuinos y *Brucella inopinata* aislada de un implante mamario en Italia (Scholz *et al.*, 2010). De igual manera, los carnívoros al ser depredadores y pertenecer a un nivel trófico superior tienen una mayor exposición a especies infectadas con esta bacteria, lo que puede explicar la fuerte relación detectada.

Se encontró que los roedores así como los artiodáctilos están asociados a 6 de las 11 especies de *Brucella* estudiadas. El orden Rodentia es el orden con mayor número de especies de mamíferos pero los estudios realizados en roedores buscando las asociaciones con *Brucella*, en su mayoría, no están dirigidos al aislamiento e identificación de esta bacteria o en su defecto, son muy escasos (Hubálek *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008 y Zheludkov y Tsirelson, 2010).

La identificación de la asociación de estas especies de *Brucella* con roedores podría sugerir que se están ignorando relaciones parásito-hospedero de suma importancia, teniendo en cuenta el nicho ecológico que ocupan estas especies y su característica distribución cosmopolita. Igualmente, se han descubierto nuevas especies de *Brucella* aun sin clasificar en diferentes especies de roedores australianos “*large climbing rat*” (*Melomys cervinipes*), “*small climbing rat*” (*Melomys lutillus*) y “*allied rat*” (*Rattus assimilis*) (Tiller *et al.*, 2010) lo que podría estar asociado a una adaptación entre esta bacteria y el orden Rodentia en particular.

Se detectó a los artiodáctilos como el orden con el mayor número de especies asociadas a *Brucella*, con un total de 53/93 (56.9%). Esta tendencia era la que se esperaba antes de realizar el análisis, ya que estas son las especies hospederas en las que se ha estudiado con mayor detalle la enfermedad (Olsen y Palmer, 2014; CFSPH, 2015a; CFSPH, 2015c). Dicho conocimiento alrededor de esta enfermedad en artiodáctilos está asociado a la importancia económica que representa este grupo de animales (bovinos, caprinos y ovinos), desde el punto de vista pecuario y al impacto zoonosológico en dicha producción.

El orden Cetacea sólo está asociado a 2 de las 11 especies de *Brucella*, debido a que al tratarse de animales marinos, únicamente se han logrado aislar las especies adaptadas a ambientes acuáticos (Guzmán-Verri *et al.*, 2012). De igual manera, los órdenes Didelphimorphia, Lagomorpha y Perissodactyla resultaron estar asociados a dos especies de *Brucella*, y sólo el orden Cingulata a una especie.

La escasa información existente en estos órdenes nos hace pensar que, aunque hasta el momento no se han encontrado otras especies de *Brucella* asociadas a los mismos, la realización de estudios dirigidos al aislamiento e identificación de este parásito nos proveerá de nueva información útil para entender las dinámicas de asociación.

Entre las especies de *Brucella* con un mayor número de hospederos asociados a ellas encontramos a *Brucella abortus* (42/93), *Brucella suis* (34/93) y *Brucella melitensis* (32/93), que representan las tres especies con mayor impacto zoonótico registrado (Shaw, 2005; Pappas *et al.* 2006 y Olsen y Palmer, 2014)

Los resultados obtenidos en los análisis de similitud resaltan la importancia de la realización de este tipo de estudios. Obtuvimos un grupo conformado por los órdenes Artiodactyla, Carnivora y Primates, con un grado de similitud cercano al 50% para los primates. Estos fueron los órdenes con mayor número de especies de *Brucella* asociadas, destacando que aquí se agrupan las especies con mayor potencial zoonótico reconocido (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*).

Al profundizar en la revisión bibliográfica y tras la inclusión de las biovariedades de cada especie de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) en el análisis, encontramos que el orden de los artiodáctilos resultó asociado a una mayor cantidad de especies de *Brucella* (15/21). Esto se debe seguramente a que la principal especie asociada a artiodáctilos es *Brucella abortus* y se incluyeron 7 biovariedades de la misma, lo cual nos genera un mayor número de parásitos asociados a estos hospederos en el análisis.

Sucede casi lo mismo para los primates (13/21), carnívoros (10/21) y roedores (8/21). A pesar de agregar otro nivel de clasificación, estos permanecieron como los órdenes relacionados con el mayor número de especies de *Brucella*, ya que están fuertemente asociados a las especies de *Brucella* con biovariedades. De los órdenes restantes previamente mencionados sólo en los perisodáctilos se detectó un aumento en el número de especies asociadas (3/21); los otros órdenes (Cetacea, Didelphimorphia, Lagomorpha y Cingulata) permanecieron igual que en el análisis a nivel de especie.

Otro hallazgo importante detectado en el análisis a nivel de biovariedad se relacionó con aquellas especies con más hospederos asociados, siendo *Brucella abortus* biovariedad 1 (19/73), *Brucella ceti* (13/73) y *Brucella melitensis* biovariedad 1 (10/73) las más representativas.

La diferencia entre biovariedades está basada en las especies a las que están mayormente asociadas; por ejemplo; dentro de las biovariedades de *Brucella suis*, la biovariedad 2 está asociada principalmente a jabalíes y liebres (Abril, 2011), la biovariedad 4 se ha aislado de artiodáctilos y carnívoros del círculo polar (Forbes, 1991), mientras que la biovariedad 5 está asociada a roedores (Hubálek *et al.*, 2007). Esta selectividad por hospederos reduce el número de mamíferos asociados a cada una de las especies de *Brucella* pero revela información más detallada de las asociaciones parásito-hospedero.

En los resultados de similitud se identificó un grupo principal formado por los órdenes de Primates y Artiodactyla. Es un resultado similar al encontrado a nivel de especies; en el grupo se comparte cerca del 50% de especies de *Brucella* entre estos dos órdenes; estos resultados resaltan nuevamente, la estrecha relación existente entre el ser humano y los artiodáctilos, así como el concomitante riesgo zoonótico (Shaw, 2005; Pappas *et al.* 2006 y Olsen y Palmer, 2014).

### **Especificidad de hospedero**

Las especies de *Brucella* asociadas a mamíferos marinos (Foster *et al.*, 2007) resultaron ser las especies con el mayor grado de especialización de hospederos detectado en los niveles taxonómicos de especie, género y familia; esto se relaciona a que la distancia filogenética existente entre las especies de cetáceos asociadas a *Brucella ceti*, así como entre las especies de pinnípedos asociadas a *Brucella pinnipedialis* es estrecha (Berta, Sumich y Kovacs, 2006).

El alto grado de especialización entre *Brucella* y los mamíferos marinos estudiados se debe, muy probablemente a que estos animales habitan en ambientes acuáticos y las interacciones que presentan en vida libre pueden explicar los reportes positivos a *Brucella ceti* en pinnípedos así como algunos cetáceos positivos a *Brucella pinnipedialis* (Hernández-Mora, Palacios-Alfaro y González-Barrientos, 2013). Aunque las especies de *Brucella* asociadas a mamíferos marinos presentan una elevada especificidad de hospedero, también exhiben un potencial zoonótico y existen casos aislados de infección en humanos por ambas especies (Brew *et al.*, 1999; Sohn *et al.*, 2003 y McDonald *et al.*, 2006).

A pesar de presentar alta especificidad, no se ha logrado identificar entre las especies de *Brucella* aisladas de mamíferos marinos, especies específicas asociadas a hospederos como la foca arpa (*Pagophilus groenlandicus*) (Forbes et al., 2000), narval (*Monodon monoceros*) (Raverty, Nielsen y Ling, 2006), lobo marino de california (*Zalophus californianus*) (Goldstein et al., 2009), ballena franca austral (*Eubalena australis*), delfín tornillo (*Stenella longirostris*) (Guzmán-Verri et al., 2012), delfín de Héctor (*Cephalorhynchus hectori*) (Hernández-Mora, Palacios-Alfaro y González-Barrientos, 2013) y cachalote (*Physeter macrocephalus*) (West et al., 2014).

Por otro lado *Brucella melitensis* resultó ser un parásito especializado asociado a las cabras domésticas en el nivel de hospederos preferenciales, en 2010 Godfroid, Nielsen y Saegerman describen las diferentes especies de *Brucella* y sus hospederos preferenciales, coincidiendo parcialmente con los resultados previamente obtenidos en este estudio a diferentes niveles taxonómicos para cabras domésticas.

Las especies de parásitos que se encuentran asociadas a un solo hospedero se clasifican como altamente específicas, por lo que Poulin y Mouillot en 2003 proponen no incluirlas en este tipo de estudios. Teóricamente aquellas especies de *Brucella* asociadas a sólo una especie de están consideradas como altamente específicas ya que hasta el momento no se han aislado de otro hospedero. Lo mismo ocurre con especies de *Brucella* descubiertas recientemente: *Brucella inopinata* y *Brucella papionis*; para fines de los análisis realizados en el presente trabajo no fueron tomadas en cuenta estas especies.



El no haber obtenido resultados significativos para *Brucella canis*, *Brucella microti*, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* y *Brucella suis*, se debe seguramente a que los hospederos afectados por estas especies se encuentran asociados a una alta diversidad de hospederos (Moreno, Cloeckert y Moriyó, 2002).

En los análisis realizados a nivel de biovariedad, tanto *Brucella ceti* como *Brucella pinnipedialis* resultaron ser especies con alta especialización a nivel de especie, género y familia. De igual manera, *Brucella melitensis*, en sus diferentes biovariedades (1, 2 y 3) están altamente relacionadas con las cabras en el nivel de hospederos preferenciales; así como la biovariedad 1 de *Brucella abortus*, principalmente asociada a mamíferos ungulados a nivel de género y especie.

Los resultados obtenidos son muy similares al análisis de especificidad de hospedero a nivel de especies de *Brucella*, esto se debe probablemente a que no hay una diferencia entre las especies de hospederos a las cuales se encuentran asociadas las biovariedades de *Brucella* en los diferentes niveles taxonómicos analizados. Al profundizar el estudio utilizando las biovariedades ampliamos el rango de asociación a los hospederos y cabe resaltar que las especies de *Brucella* con biovariedades son las que están distribuidas entre la mayoría de los órdenes de mamíferos estudiados, si se le agrega la gran variabilidad genética entre los hospederos (Berta, Sumich y Kovacs, 2006) los valores de especificidad para este tipo de análisis se ven disminuidos.

Los valores negativos o menores de especificidad de hospedero nos indican que tanto *Brucella ceti*, *Brucella pinnipedialis*, *Brucella melitensis* biovariedad 1, 2 y 3

así como *Brucella abortus* biovariedad 1 cuentan con un grado de plasticidad disminuido, por lo que se encuentran asociadas a hospederos genéticamente cercanos. Por el contrario, las biovariedades de *Brucella suis* y *Brucella abortus*, así como *Brucella canis* y *Brucella microti* cuentan con valores positivos o elevados en el índice de especificidad de hospedero, lo cual demuestra un alto grado de plasticidad, el cual les permite infectar a un amplio rango de hospederos, tal como reportan Poulin, Krasnov y Mouillot (2011).

### **Análisis de coespeciación**

Los análisis filogenéticos realizados en este estudio generaron información sobre la variación existente entre los patrones de asociación parásito-hospedero a diferentes niveles taxonómicos, estos resultados son un primer acercamiento al estudio e interpretación de la relación evolutiva, así como del comportamiento de esta enfermedad en los mamíferos.

En los análisis a nivel de especie, no se encontró congruencia significativa entre la filogenia de las especies de *Brucella* y la de sus hospederos mamíferos en los diferentes niveles taxonómicos analizados, así como en el grupo de hospederos preferenciales. Este resultado se debe a que tres de las especies de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) se encuentran asociadas a una extensa variedad de hospederos (CFSPH, 2015a; CFSPH, 2015b; CFSPH, 2015c y CFSPH, 2015d). Esta amplia gama de hospederos se encuentra distribuida en nueve órdenes, los cuales muestran una marcada distancia filogenética (Bininda-Emonds *et al.*, 2007).

La falta de congruencia entre las filogenias de *Brucella* y sus hospederos mamíferos puede ser el resultado de varios eventos de saltos taxonómicos en la historia evolutiva de la asociación entre dicha bacteria y sus hospederos, este tipo de patrones sin congruencia filogenética son conocidos como eventos de colonización; en los cuales un parásito es capaz de cambiar de un hospedero original a otro hospedero con un linaje genético diferente, incrementando en consecuencia, su rango de hospederos.

El cambio de hospedero es el evento que caracteriza a la mayoría de los procesos de emergencia de enfermedades. A pesar de que es el evento más conocido, Banks y Paterson en 2005 describen otros eventos que pueden dar lugar a una incongruencia entre las filogenias. Estos eventos son la extinción de algún hospedero (“*sorting*”) o que dicho parásito haya atravesado por una especiación “intra-hospedero (duplicación), además de fallas del muestreo.

Al realizar la prueba global de coespeciación integrando las diferentes biovariedades de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* se obtuvieron resultados similares a los observados para los niveles de género, familia y orden.

A nivel de especie se encontró una congruencia parcial entre las filogenias. Las asociaciones significativas fueron bovino doméstico (*Bos taurus*) asociado a *Brucella abortus* biovariedad 1, 2, 3, 4, 6 y 9, así como a *Brucella melitensis* biovariedad 1, 2 y 3. De igual manera, el búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) resultó congruente a la filogenia de *Brucella abortus* biovariedad 1, 2, 3 y 6, así como a *Brucella melitensis* biovariedad 1.

Estas asociaciones están fuertemente relacionadas con una asociación por descendencia, en la que dichas relaciones parásito-hospedero presentes han surgido debido a que cada especie de hospedero la ha heredado a través de especies ancestrales (Banks y Paterson, 2005). Se puede observar la cercanía filogenética (figura 6) entre las dos especies de hospederos así como en las especies del parásito, lo cual nos genera bases para relacionarlo con este tipo de asociación.

Asimismo, se detectó congruencia significativa a nivel de hospederos preferenciales, dichas asociaciones se presentaron entre bovino doméstico (*Bos taurus*) relacionada con *Brucella abortus* biovariedad 1, 2, 3, 4, 6 y 9 y la cabra doméstica (*Capra hircus*) asociada a *Brucella melitensis* biovariedad 1, 2 y 3. Esta congruencia también parece entrar dentro del patrón de asociación por descendencia, tras analizar las distancias filogenéticas entre los hospederos y los parásitos (figura 5). Esta congruencia al menos afirma lo establecido Godfroid, Nielsen y Saegerman, 2010, respecto a la preferencia de ciertas especies de *Brucella* por sus hospederos, sin embargo sólo aplicaría para cabras y bovinos domésticos.

El hecho de que exista una congruencia positiva no nos permite asegurar que se deba a un proceso de coespeciación. Aunque parece serlo, existe la posibilidad de que estos patrones representen falsos positivos o “falsas congruencias”, las cuales pueden deberse a saltos taxonómicos consecutivos en los cuales *Brucella* ha sido capaz de colonizar a los hospederos cercanos al original para después especiar (De Vienne *et al.*, 2013)

La importancia de conocer cómo se comporta esta bacteria en relación a sus hospederos (historia natural) nos permitirá predecir que especie tiene mayor posibilidad de cambiar de hospedero; así mismo que grupos taxonómicos son más vulnerables ante un salto taxonómico. Esta información es indispensable para la predicción de riesgos tanto económico como productivo, y para especies de elevado valor genético debido a su estado de conservación (Banks y Paterson, 2005).

Por ejemplo, El-Tras *et al.* en 2010 identificó que *Brucella melitensis* es capaz de inducir la infección natural en el pez gato del Nilo (*Clarias gariepinus*), lo que representa el primer caso de infección de esta bacteria en peces, que a su vez establece nuevos riesgos de infección para las personas de esta región al entrar en contacto con estos ejemplares ya que se trata de una especie altamente zoonótica. Igualmente, en 2012 Eisenberg *et al.* reportaron una nueva especie potencial de *Brucella* asociada a ranas toro (*Lithobates catesbeianus*) de Tanzania, lo que representaría el primer caso de brucelosis en anfibios. Igualmente, se desconoce el impacto y la severidad de la enfermedad en estos animales.

La presencia de este agente patógeno en otras clases de animales previamente no registradas como anfibios y peces genera la necesidad y demuestra la importancia de realizar estudios ecológicos-evolutivos a profundidad debido a que se desconoce el impacto de esta enfermedad emergente en la interfaz humano-animal-ecosistema asociada a las nuevas dinámicas parásito/hospedero.

## CONCLUSIONES

Este estudio es la primera aproximación a los patrones de asociación parásito-hospedero de *Brucella* spp. asociada a mamíferos utilizando análisis de coespeciación y de especificidad de hospedero. La ausencia de un patrón en este estudio, indica que existe una gran variabilidad en las relaciones de *Brucella* spp. con sus hospederos, lo que genera la necesidad de realizar estudios posteriores a nivel de genotipos. De esta manera, quizá podrían hallarse patrones comprensibles del establecimiento de relaciones de este patógeno con sus hospederos.

El estudio de los factores que determinan las relaciones de *Brucella* con sus hospederos, así como su adaptación a los cambios de estos, podría generar información valiosa sobre la dinámica de este género bacteriano. De hallarse los patrones de interacción parásito-hospedero y de entenderse las variables que median este proceso, podrían predecirse posibles saltos de especie o bien, la aparición de nuevos agentes con potencial zoonótico.

## REFERENCIAS

- Abril C, Thomann A, Brodard I, Wu N, Ryser-Degiorgis M-P, Frey J, et al. A novel isolation method of *Brucella* species and molecular tracking of *Brucella suis* biovar 2 in domestic and wild animals. *Vet Microbiol.* 2011; 150(3–4):405–10.
- Banks JC, Paterson AM. Multi-host parasite species in cophylogenetic studies. *Int J Parasitol.* 2005; 35(7):741–6.
- Berta A, Sumich J, Kovacs K. *Marine Mammals Evolutionary Biology.* 2a ed. Estados Unidos: Elsevier; 2006.
- Bininda-Emonds ORP, Cardillo M, Jones KE, Macphee RDE, Beck RMD, Grenyer R, et al. The delayed rise of present-day mammals. *Nature.* 2007; 446:507–12.
- Brew SD, Perrett LL, Stack JA, Macmillan AP, Staunton NJ. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet Rec.* 1999; 144:483
- [CFSPH] The Center for Food Security & Public Health. Brucelosis. Iowa, Estados Unidos. 2015a. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucelosis.pdf> [Consulta: 04 feb 2015]
- [CFSPH] The Center for Food Security & Public Health. Brucelosis porcina y rangiferina: *Brucella suis*. Iowa, Estados Unidos. 2015b. [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis\\_suis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_suis.pdf) [Consulta: 04 feb 2015]
- [CFSPH] The Center for Food Security & Public Health. Brucelosis bovina: *Brucella abortus*. Iowa, Estados Unidos. 2015c. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucella-abortus.pdf> [Consulta: 04 feb 2015]
- [CFSPH] The Center for Food Security & Public Health. Brucelosis ovina y caprina: *Brucella melitensis*. Iowa, Estados Unidos. 2015d [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis\\_melitensis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_melitensis.pdf) [Consulta: 04 feb 2015]
- Corbel MJ. Brucellosis: An Overview. *Emerg Infect Dis.* 1997; 3(2):213–21.
- Cui J, Han N, Streicker D, Li G, Tang X, Shi Z, et al. Evolutionary Relationships between Bat Coronaviruses and Their Hosts. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(10).

- De Vienne DM, Refrégier G, López-Villavicencio M, Tellier a., Hood ME, Giraud T. Cospeciation vs host-shift speciation: Methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. *New Phytol.* 2013; 198(2):347–85.
- Eisenberg T, Hamann H-P, Kaim U, Schlez K, Seeger H, Schauerte N, et al. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(10):3753–5.
- El-Tras WF, Tayel A a, Eltholth MM, Guitian J. *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol-* 2010; 141(3–4):321–5.
- Forbes LB. Isolates of *Brucella suis* biovar 4 from animals and humans in Canada , 1982-1990. *Can J Vet Res.* 1991; 32.
- Forbes LB, Nielsen O, Measures L, Ewalt DR, Parasitology A. Brucellosis in Ringed Seals and Harp Seals from Canada. *J Wildl Dis.* 2000;36:595–8.
- Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckert A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; 57(11):2688–93.
- Godfroid J. Brucellosis in wildlife. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2002; 21(2):277–86.
- Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croat Med J.* 2010; 51(4):296–305.
- Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, et al. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev Vet Med.* 2011; 102(2):118–31.
- Goldstein T, Zabka TS, DeLong RL, Wheeler EA, Ylitalo G, Bargu S, et al. The role of domoic acid in abortion and premature parturition of California sea lions (*Zalophus californianus*) on San Miguel Island, California. *J Wildl Dis.* 2009;45(1):91–108.
- Guzmán-Verri C, González-Barrientos R, Hernández-Mora G, Morales J-A, Baquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, et al. *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2:3.
- Hafner MS, Demastes JW, Spradling TA, Reed DL. Cophylogeny between pocket gophers and chewing lice. En Page, R. (ed.) *Tangled trees: Phylogeny,*



*Coespeciation and Coevolution*. Chicago, EUA: The University of Chicago Press. 1994.

- Hall T. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/96/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999; 41:95-8.
- Hernández-Mora G, Palacios-Alfaro J., González-Barrientos R. Wildlife reservoirs of brucellosis : *Brucella* in aquatic environments. *Rev Sci Tech*. 2013; 32(1):89–103.
- Hofer E, Revilla-Fernández S, Al Dahouk S, Riehm JM, Nöckler K, Zygmunt MS, et al. A potential novel *Brucella* species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes in Austria. *Vet Microbiol*. 2012; 155(1):93–9.
- Hubálek Z, Scholz HC, Sedláček I, Melzer F, Sanogo YO, Nesvadbová J. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007; 7(4):679–87
- Katoh S. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013; 30, 772-780.
- Krebs CJ. *Ecological Methodology*. Nueva York, EUA: Adisson-Wesley Educational Publishers, Inc; 1999.
- Kreeger TJ, Cook WE, Edwards WH, Cornish T. Brucellosis in captive Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis*) caused by *Brucella abortus* biovar 4. *J Wildl Dis*. 2004;40(2):311–5.
- Kvičerová J, Hypša V. Host-Parasite Incongruences in Rodent *Eimeria* Suggest Significant Role of Adaptation Rather than Cophylogeny in Maintenance of Host Specificity. *PLoS One*. 2013; 8(7).
- Legendre P, Desdevises Y, Bazin E. A statistical test for host-parasite coevolution. *Syst Biol*. 2002; 51: 217-234.
- Lei BR, Olival KJ. Contrasting patterns in mammal-bacteria coevolution: *bartonella* and *leptospira* in bats and rodents. *Neglected Trop Dis*. 2014; 8(3).
- McDonald WL, Jamaludin R, Mackereth G, Hansen M, Humphrey S, Short P, et al. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(12):4363–70.
- Meyer KF, Shaw EB. A comparison of the morphologic, cultural, and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*. *J Infect Dis*. 1920; 27(13): 173-184.

- Moreno E, Cloeckert A, Moriyo I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol.* 2002; 90:209–27.
- Ojeda R. Coronavirus en murciélagos neotropicales en México: Prevalencia, filogenia y coevolución. Tesis de doctorado. Ciudad de México, Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
- Olsen SC, Palmer M V. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years. *Vet Pathol.* 2014; 51(6):1076–89.
- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos E V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6(February):91–9.
- Paterson AM, Poulin R. Have chondracanthid copepods co-specified with their teleost hosts? *Syst. Parasitol.* 1999; 4:79–85.
- Poulin R, Krasnov BR, Mouillot D. Host specificity in phylogenetic and geographic space. *Trends Parasitol.* 2011; 27(8):355–61.
- Poulin R., Morand S. *Parasite biodiversity.* Washington, USA: Smithsonian Institution Scholarly Press. 2004.
- Poulin R, Mouillot D. Parasite specialization from a phylogenetic perspective: a new index of host specificity. *Parasitology.* 2003; 126(5):473–80.
- Raverty SA, Nielsen O. Ling YW. Subcutaneous steatitis due to *Brucella pinnipedia* in a hunter harvested narwhal. In Proc. 37th Conference of the International Association for Aquatic Animal Medicine, 6–10 May, Nassau, the Bahamas. 2006; 81–82.
- Schlabritz-Loutsevitch NE, Whatmore AM, Quance CR, Koylass MS, Cummins LB, Dick EJ, et al. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. *J Med Primatol.* 2009; 38(1):70–3.
- Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008; 58(Pt 2):375–82.
- Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010; 60(Pt 4):801–8.
- Shaw A. Zoonoses control: a cost-effective opportunity for poverty alleviation. In: *The control of neglected zoonotic diseases: a route to poverty alleviation.* Report of

a Joint World Health Organization (WHO)/United Kingdom Department for International Development (DFID)-Animal health programme (AHP) meeting; Ginebra, Suiza; 2005.

- Silvestro D, Michalak I. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Org Divers Evol.* 2012; 12: 335-337.
- Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:485–8.
- Stamatakis A, Ludwig T, Meier H. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2005; 21: 456-463.
- Tiller R V, Gee JE, Frace M a, Taylor TK, Setubal JC, Hoffmaster AR, et al. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. 2010; 76(17):5837–45.
- Wattam AR, Abraham D, Dalay O, Disz TL, Driscoll T, Gabbard JL, et al. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(D1):1–11.
- West KL, Levine G, Jacob J, Jensen B, Sanchez S, Colegrove K, et al. Coinfection and Vertical Transmission of *Brucella* and Morbillivirus in a Neonatal Sperm Whale (*Physeter macrocephalus*) in Hawaii, USA. *J Wildl Dis.* 2014; 51(1).
- Zheludkov MM, Tsirelson LE. Reservoirs of *Brucella* infection in nature. *Biol Bull.* 2010; 37(7):709–15.