



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

“Diagnóstico de Brucelosis Caprina por PCR”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

ESPECIALIDAD EN

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

M.V.Z. CÉSAR CASTRO GARCÍA

ASESOR:

D.C. CARLOS R. SOSA AGUIRRE

COASESOR:

D.C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

MORELIA, MICH. MAYO DEL 2007.

DEDICATORIA:

Julia Ivett Carrillo Zetter (Mi esposa):

Porque fue finalmente con su apoyo, comprensión y paciencia que pude concluir el presente trabajo. Sin ella no hubiera sido posible llegar a la meta.

Paola Yurhixi y José Carlos Castro Carrillo (Mis hijos): Porque por ellos cualquier trabajo es más ligero. Que este esfuerzo sea un ejemplo de la forma de emplear la voluntad en logros positivos.

Ma. Salud García Martínez (Mi madre):

Porque cada día es un ejemplo constante para enfrentar la vida y sus adversidades.

✚ José Castro Torres (Mi padre):

Porque el forjó a su familia con los patrones de trabajo y esfuerzo.

Armando, Alejandro y Norma Angélica Castro García (Mis hermanos):

Porque son un muestra permanente de la constancia requerida para afrontar la vida.

Ivett y José Miguel Mendiola Castro y José Alejandro e Itzia Margarita Castro Soto (Mis sobrinos):

Para que vean en toda su familia un modelo de trabajo, constancia y perseverancia en el logro de sus objetivos.

AGRADECIMIENTOS:

Dr. Carlos Rubén Sosa Aguirre (Asesor).

Dr. Carlos Cortés Penagos (Co-asesor).

Dr. Manuel Sánchez-Yañez (Sinodal)

Dr. Eduardo Cantero Molina (Sinodal)

Dr. Rosalío Huerta Camargo (Sinodal)

Dra. Irma Olivia Martínez Vázquez por el apoyo brindado.

A todos los investigadores del Instituto.

A todos mis compañeros de la Maestría.

Al Subcomité de Productores de Ovicaprinos de Michoacán.

A la Fundación PRODUCE por el financiamiento de parte del proyecto.

INDICE

TEMA	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Definición de brucelosis	4
2.1.1. Contagio o diseminación de la brucelosis	6
2.1.2. Brucelosis caprina	7
2.1.3. <i>Brucella melitensis</i>	9
2.2. Género <i>Brucella</i>	9
2.2.1. Factores de Virulencia	11
2.2.2. Lipopolisacárido de <i>Brucella</i>	15
2.2.3. <i>Brucellas</i> lisas y rugosas	18
2.2.4. Proteínas de Membrana Externa	18
2.3. Control de la brucelosis	20
2.3.1. Vacunación	20
2.4. Diagnóstico	23
2.4.1. Diagnóstico por aislamiento e identificación	23
2.4.2. Diagnóstico serológico	25
2.4.2.1. Prueba Rosa de Bengala	26
2.4.2.2. Prueba Fijación de Complemento	27
2.4.3. Diagnóstico por PCR	28
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVO GENERAL	35
6. MATERIAL Y MÉTODOS	36
6.1. Toma de muestras de sangre y/o suero sanguíneo	36
6.2. Toma de muestras de leche	36
6.3. Prueba Rosa de Bengala	36
6.4. Prueba Fijación de Complemento	37
6.5. Extracción de ADN a partir de suero sanguíneo de cabra	37
6.6. Extracción de ADN a partir de leche de cabra	38
6.7. Testigos de especificidad	38
6.8. Búsqueda de genes	38
6.9. Diseño de oligonucleótidos	38
6.10. Análisis de PCR	39
6.11. Cuantificación de ADN	39
6.12. Electroforesis en gel de agarosa	40
6.13. Análisis estadístico	40

TEMA	PÁGINA
7. RESULTADOS	42
7.1. Localización de Genes Específicos de <i>Brucella</i> spp.	42
7.2. Diseño de Oligonucleótidos para el Gen <i>omp28</i>	44
7.3. Determinación de Cantidad de ADN en la Extracciones	46
7.4. Condiciones de PCR para los Oligonucleótidos <i>omp28f1/omp28r3</i>	47
7.5. Funcionamiento de Oligonucleótidos (B4/B5, JPF/JPR y <i>omp28</i>)	48
7.5.1. Umbral de detección de ADN	51
7.5.2. Comparación de diagnóstico entre los métodos serológicos y PCR en muestras de campo	54
7.5.3. Análisis estadístico de resultados	57
8. DISCUSIÓN	58
9. CONCLUSIONES	61
10. REFERENCIAS	62

1. RESUMEN

La brucelosis es una zoonosis causada por microorganismos del género *Brucella*, produce aborto epizootico en animales domésticos y una enfermedad febril septicémica o infecciones focalizadas en el humano. En México las pérdidas económicas se estiman en más de \$ 2,000 millones al año. Por tanto, el presente trabajo describe el diseño de una técnica de diagnóstico molecular de brucelosis en cabras empleando el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), misma que es compatible con el método de recolección de muestras empleado por el Subcomité de Productores de Ovicaprinos del Estado de Michoacán (SPOEM). Se diseñaron dos oligonucleótidos (omp28f1/omp28r3) que presentaron un umbral de detección de hasta 20 pg de ADN de *Brucella* extraído de muestras de suero sanguíneo. Los resultados obtenidos muestran una sensible disminución en el número de falsos positivos al compararla con la prueba Rosa de Bengala. Se demostró que el presente desarrollo tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97 %, al contrastar el diagnóstico contra una prueba definitiva (Prueba de Fijación de Complemento [PFC], según la NOM-41-ZOO-1995), mientras que la PRB obtuvo un 75%. El análisis estadístico tipo X^2 de las muestras analizadas encontró que los resultados obtenidos por PRB son significativamente diferentes a los obtenidos por PFC, mientras que la comparación de los resultados por PCR contra PFC no mostraron diferencia significativa. Esto supone que el empleo de PCR como prueba tamiz o de escrutinio en el diagnóstico de brucelosis, disminuirá el número de falsos positivos y los inconvenientes que provoca.

2. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es de las cinco zoonosis bacteriales más comunes en el mundo causada por un organismo perteneciente al género *Brucella* (Jinkyung y Splitter, 2003). El agente etiológico es un pequeño cocobacilo, Gram negativo, inmóvil y no esporulado con capacidad para sobrevivir intracelularmente (Gómez-Barreto y Coria-Lorenzo, 2003).

Los miembros de este género producen el aborto epizoótico en muchas especies domésticas de animales y causa una enfermedad febril septicémica o infecciones focalizadas en el hombre (Cloeckaert et al., 2002b), por esto, la *Brucella* tiene importancia en la salud pública y produce pérdidas económicas significativas en los países en desarrollo (Zerva et al., 2001; Ficht, 2002). Por otra parte, la brucelosis humana es una enfermedad severa y debilitante que requiere un tratamiento prolongado con antibióticos y que a menudo deja secuelas permanentes e inhabilitantes (Moriyón et al., 2004).

En América Latina, los tres países en donde se reportan la mayoría de los casos de brucelosis son Argentina, México y Perú, donde las pérdidas económicas causadas por la enfermedad se calculan en unos 600 millones de dólares al año. En México la enfermedad es endémica y existe una campaña oficial de control y/o erradicación que cubre todo el territorio, la dependencia responsable de la campaña es la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA) y la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA). La meta es controlar y erradicar la enfermedad, a través de cuarentena de importaciones, control de la movilización de ganado, muestreos para diagnóstico y vacunación obligatoria (Dájer-Abimerhy et al., 1995). La Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis en México (CONETB) estima pérdidas anuales por más de \$ 2,000 millones de pesos (casi 200 millones de dólares), debido a abortos y reducción en la producción de leche y carne (Luna-Martínez y Mejía-Terán, 2002).

No obstante los resultados obtenidos por la CONETB, la enfermedad sigue en el

ganado bovino (lechero y de engorda), caprino, ovino y probablemente porcino (Luna-Martínez y Mejía-Terán, 2002). En México, la ingestión de lácteos o productos derivados obtenidos de animales infectados es el principal factor infección en humanos (Gómez-Barreto y Coria-Lorenzo, 2003).

El diagnóstico y control de la enfermedad se dificulta, por que la *Brucella* tiene período de incubación variable, es resistente a antibióticos, algunos portadores son asintomáticos, las prácticas de manejo del ganado y la comercialización (Nicoletti, 2002). Sin embargo, el problema más grave es el diagnóstico tardío o equivocado, ya que al no aislar o cuarentenar oportunamente a los animales infectados por la *Brucella* la enfermedad se sigue diseminando.

Así, el control de la brucelosis depende de métodos confiables y rápidos para la detección de la *Brucella* en ganado, animales silvestres y humanos. Varios métodos de diagnóstico han sido desarrollados, que en conjunto, han disminuido la incidencia de la enfermedad (Bricker, 2002b).

En el caso del ganado se debe aplicar una prueba tamiz o de escrutinio con las siguientes características: económica, fácil de realizar, rápida, altamente sensible y bastante específica (Bricker, 2002b). En México por norma oficial (NOM-41-ZOO-1995) se realiza por análisis serológico usando la Prueba Rosa de Bengala (PRB). La cual presenta, en algunos casos, resultados falso positivos por las reacciones cruzadas con anticuerpos de otras bacterias (Zerva et al., 2001), o a tasas elevadas de anticuerpos provocadas por el uso extensivo de vacunas, similar a lo que ocurre en la infección natural (Nielsen, 2002). Por ésta razón, la norma establece una segunda prueba confirmatoria, que es más costosa y complicada, aunque más específica. La prueba de fijación de complemento (PFC) es considerada el diagnóstico definitivo para la brucelosis. Su desarrollo es complejo, utiliza numerosos reactivos, varios controles y diferentes titulaciones de reactivo cada vez que se inicia el análisis. No distingue entre anticuerpos vacunales y de infección, además, ocasionalmente algunas muestras de suero activan el complemento en ausencia del antígeno (Nielsen, 2002).

El Subcomité de Productores de Ovicaprinos del Estado de Michoacán (SPOEM) se encarga del control de la brucelosis caprina mediante la vacunación y diagnóstico. Los análisis serológicos se realizan a partir de suero sanguíneo obtenido de sangre sin anticoagulante, 10% de los cuales están hemolizados por el manejo de las muestras, lo que imposibilita su uso en la prueba confirmatoria (PFC).

Como para otros patógenos, el diagnóstico molecular ofrece una vía alternativa para el control de la brucelosis. La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), método para la amplificación de ácidos nucleicos, tiene alta sensibilidad y especificidad, y tiempo corto de realización, lo que superaría las limitaciones de la metodología convencional (Zerva et al., 2001). Además, se emplean muestras biológicas que no pueden ser aprovechadas en los análisis convencionales (líquido amniótico, exudados vaginales y otros tejidos), así como los sueros sanguíneos hemolizados.

El empleo de suero sanguíneo en la PCR reduce el tiempo de diagnóstico (menos de 4 horas), y simplifica el procedimiento, además la sensibilidad y especificidad son excelentes (Zerva et al., 2001).

2.1. Definición de Brucelosis

La brucelosis es una infección por bacterias del género *Brucella* que afecta a los animales principalmente, sobre todo a los domésticos, las diversas especies de *Brucella* afectan al humano cuando se pone en contacto con animales enfermos o productos infectados derivados de éstos [Figura 1]. La enfermedad se conoce también como fiebre del mediterráneo, fiebre recurrente, ondulante o fiebre del Río Grande (Gómez-Barreto y Coria-Lorenzo, 2003).

a 4 semanas de la infección (Gómez-Barreto y Coria-Lorenzo, 2003).

2.1.1 Contagio o Diseminación de la Brucelosis

La *Brucella* entra por mucosas digestivas, conjuntivas, respiratorias o heridas en la piel (Figura 2). Una vez dentro del organismo llega a ganglios linfáticos regionales proliferando, después pasa a la circulación diseminándose en el organismo y localizándose en órganos ricos en elementos del sistema monocítico-fagocítico; hígado, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea y riñones (Gómez-Barreto y Coria-Lorenzo, 2003) [Figura 3].

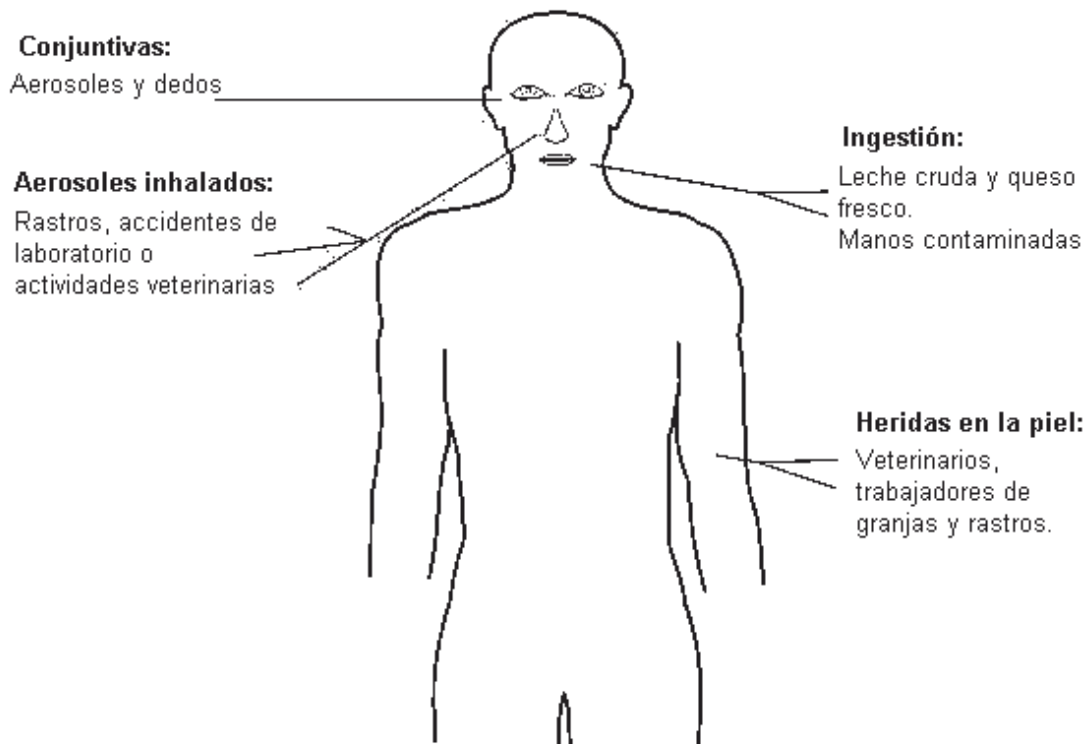


Figura 2. Vías de entrada de *Brucella* (Alton et al., 1975)

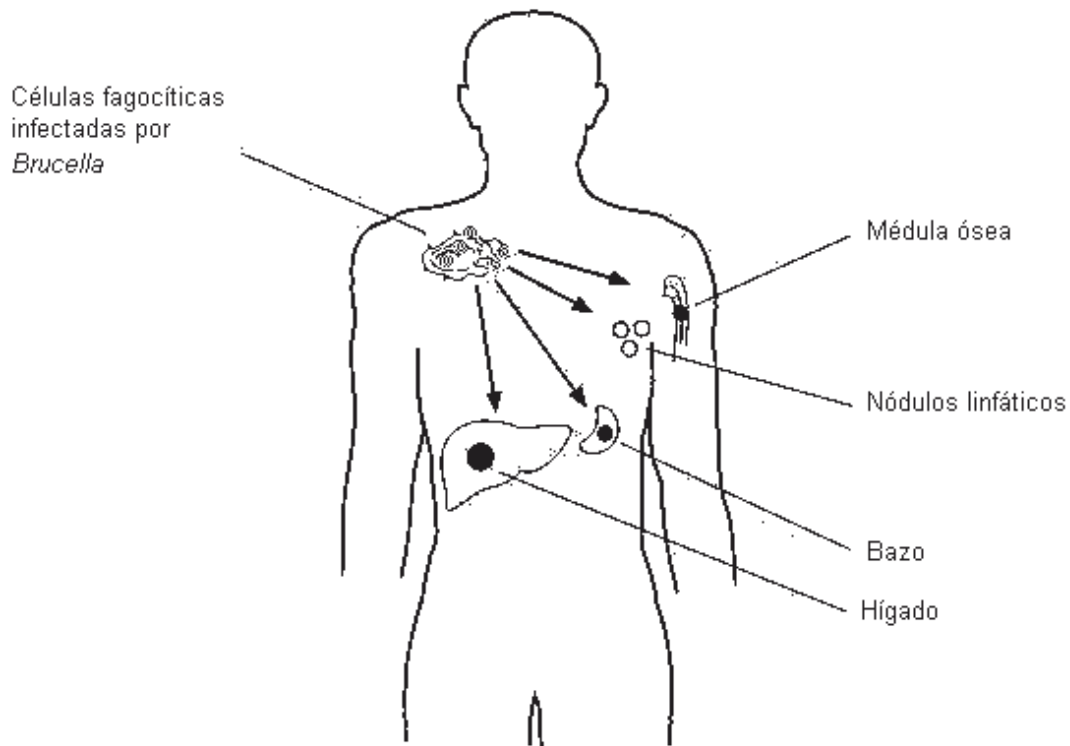


Figura 3. Diagrama de traslado de *Brucella* por los fagocitos (Alton et al., 1975)

La Secretaría de Salud reporta más de 2000 casos de brucelosis humana al año, la mayoría de los mismos no están relacionadas a actividades pecuarias, 20 muertes anuales atañen a la enfermedad (Pacheco y Luna-Martínez, 1999).

2.1.2 Brucelosis caprina

En México se identifican dos áreas endémicas; norte (Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas) y centro (Guanajuato, Jalisco y Michoacán). La ingestión de lácteos o productos derivados de cabras infectadas es el principal factor de riesgo para adquirir la infección (Gómez-Barreto y Coria-Lorenzo, 2003).

El impacto económico de la brucelosis caprina es grande, debido a que mina la salud y productividad lechera y de carne de los animales. Los efectos negativos directos e indirectos de la brucelosis en el ganado caprino, son difíciles de evaluar. La Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis (CONETB) estima

pérdidas anuales de \$ 2,000 millones de pesos, (200 millones de dólares) en el agro mexicano por la brucelosis (Luna-Martínez, 2002).

Existe riesgo económico y de salud pública por contagio de brucelosis, ya que México tiene aproximadamente 28 millones de cabezas de ganado, que incluyen 1 millón de ganado lechero de alto registro, 7 millones de ovejas y 7 millones de cabras, además los animales productivos de traspatio se caracterizan por pobres condiciones tecnológicas y sanitarias, así como zonas de pastoreo con movimiento de ganado, cabras y ovejas (Luna-Martínez y Mejía Terán, 2002), en estas condiciones un brote de brucelosis sería catastrófico.

Los problemas de la brucelosis son abortos en el ganado caprino, disminución en la producción lechera de un 12% de un año al otro, y hasta un 60% en la producción total (Gurría, 1998). Además, la brucelosis es una barrera para la comercialización (Luna-Martínez y Mejía-Terán, 2002), que se traduce en graves pérdidas económicas a los productores, sin considerar los problemas de salud pública en el humano, que se convierten en gastos por tratamiento e incapacidad debida a la enfermedad.

En el humano el riesgo de infección por ingerir alimentos contaminados es alto. La brucelosis es un problema de salud pública en México por ser una zoonosis. Los casos humanos de brucelosis se relacionan al consumo de leche cruda y productos derivados (Luna-Martínez y Mejía-Terán, 2002).

De los 3500 casos reportados al año, el 98% son debidos a la ingestión de derivados lácteos contaminados (principalmente queso de cabra). La enfermedad está presente en áreas rurales y urbanas, el principal factor de riesgo es el consumo de leche cruda y queso fresco (Pacheco y Luna-Martínez, 1999; López-Merino y Contreras, 2001). El 93% de los casos humanos se infecta por *B. melitensis* caprina, 5% con *B. melitensis* bovina, 1.5% con *B. abortus* bovina y 0.5% con *B. suis* de origen bovino (Pacheco y Luna-Martínez, 1999).

2.1.3 *Brucella melitensis*

La *B. melitensis* es el principal agente etiológico de brucelosis ovina y caprina, y la especie más patogénica para los humanos. Es la que más se notifica como causa de enfermedad en humanos y la más virulenta, asociada a una enfermedad aguda severa. La bacteria infecta principalmente a cabras y borregos, pero otras especies no quedan exentas (López-Merino y Contreras, 2001).

Hay una amplia distribución de cabras en México, debido a la adaptabilidad natural de las cabras que les permite vivir casi en cualquier región. La producción de cabras es en áreas donde otros animales productivos no son viables económicamente. Así, en esas condiciones las cabras es la única fuente de ingresos y alimentos para los productores y sus familias. El manejo incluye el movimiento diario del rebaño, algunas veces a distancias de 20 km. Las cabras pernoctan en los patios de las casas con otros animales domésticos y a veces con las personas, aumentando el riesgo de infección. Sólo el 15% de la totalidad de las cabras se mantienen en buenas condiciones de higiene (López-Merino y Contreras, 2001).

México produce entre 9 y 10 mil millones de litros de leche de vaca por año. De este volumen, 35% es consumida en quesos y leche sin pasteurizar. De los 120 millones de litros de leche de cabra producidos, casi 85% es consumida en quesos sin pasteurizar y sin vigilancia sanitaria (Luna-Martínez y Mejía Terán, 2002).

2.2 Género *Brucella*

El género *Brucella* fue descrito en 1920 por Meyer y Shaw, son bacterias parásitas intracelulares facultativas, que producen el aborto epizootico en muchas especies domésticas de animales y una enfermedad febril septicémica o infecciones focalizadas en el humano (Cloeckaert et al., 2002b). El agente etiológico de la brucelosis es un cocobacilo, Gram negativo, inmóvil y no esporulado con una gran capacidad para sobrevivir dentro de los fagocitos (Gómez-Barreto y Coria-Lorenzo, 2003) [Figura 4].

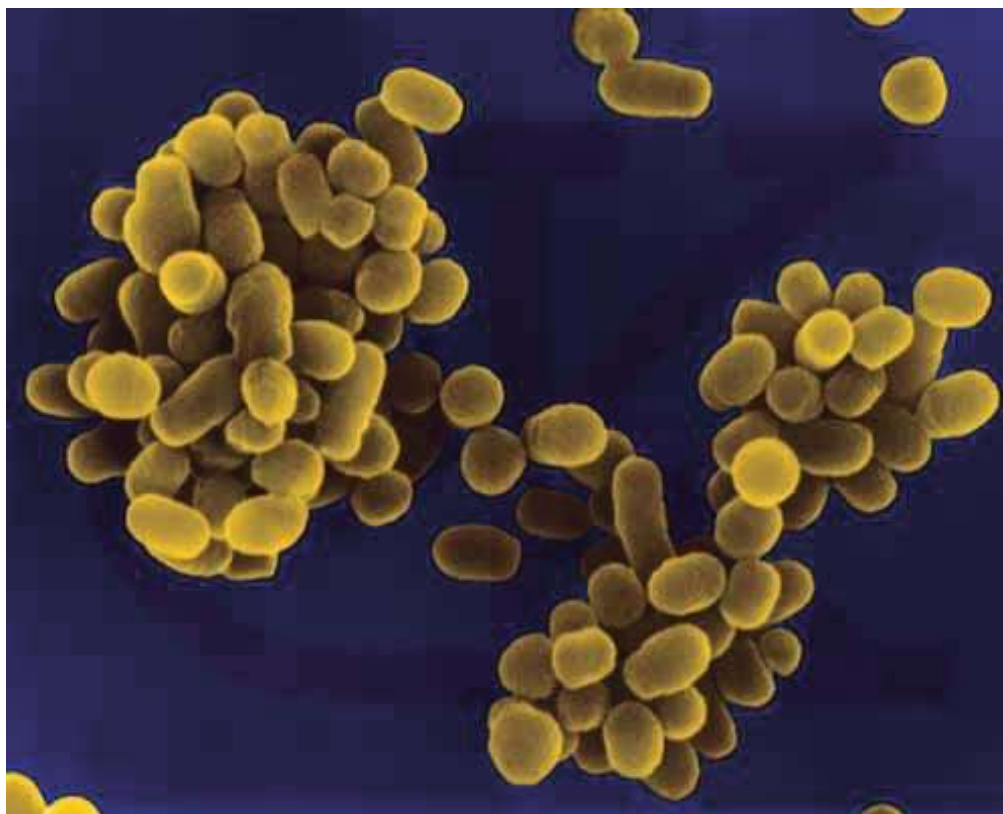


Figura 4. Cocobacilos de *Brucella*. Fotografía de microscopio de barrido electrónico, con un aumento de 3,900 X (Kunkel, 2004).

El género tiene siete especies las que se diferencian por su selectividad al hospedero; *Brucella melitensis* (ovejas, cabras y humanos), *Brucella suis* (cerdos y humanos), *Brucella abortus* (bovinos y humanos), *Brucella ovis* (ovejas y humanos), *Brucella canis* (perros), *Brucella neotomae* (ratas de campo) y *Brucella maris* (mamíferos marinos). Existen diferentes biotipos en las especies de *Brucella*, se identifican en función de los resultados a diversas reacciones bioquímicas, sensibilidad a bacteriófagos, especificidad del huésped y patogenicidad para el hombre (Gómez-Barreto y Coria-Lorenzo, 2003).

Filogenéticamente el género *Brucella* pertenece al grupo de bacterias Rhizobiaceae (Yanagi y Yamasoto, 1993). Análisis de secuencias de los diferentes miembros del género *Brucella* encuentran alto grado de homología (>90%) entre las seis especies

reconocidas de *Brucella* (Hoyer y McCullough, 1968; Verger et al., 1985) y la cepa recientemente aislada de mamíferos marinos (Verger et al., 1985). Así, las especies de *Brucella* constituirían un género monoespecífico, proponiendo a *B. melitensis* como especie representativa, donde las otras especies se considerarían biovariedades de *B. melitensis* (Verger et al., 1985). Sin embargo, la organización clásica en seis especies es preferida, que va de acuerdo a su patogenicidad y preferencia del hospedero característica de cada especie (Corbel y Brinley-Morgan, 1984).

2.2.1 Factores de Virulencia

En contraste con otras bacterias patógenas la *Brucella* no presenta los clásicos factores de virulencia; exotoxinas, citolisinas, fimbria, flagelos, plásmidos, fagos lisogénicos, formas resistentes, variación antigénica o inducción apoptótica (Moreno y Moriyón, 2002). En su lugar, los verdaderos elementos de virulencia de *Brucella* son los determinantes moleculares que le permiten la invasión (Guzmán-Verri et al., 2002), la resistencia a la eliminación intracelular (Moreno y Moriyón, 2002) y que su nicho de replicación sean los fagocitos (Pizarro-Cerdá et al., 1998; Detilleux et al., 1990).

Al contacto con la célula, la bacteria es internalizada vía receptores moleculares que se activan por las GTPasas de la subfamilia Rho y por la interacción con los filamentos de actina de la célula hospedera. En la célula, la *Brucella* localizada en los fagosomas, evita la fusión con los endosomas y lisosomas. Entonces, la bacteria redirecciona el tráfico de los autofagosomas y alcanza el retículo endoplásmico, donde se reproduce extensivamente (Figura 5). Algunos de los determinantes moleculares bacteriales implicados en la internalización y primeros eventos después de la ingestión son controlados por el sistema regulatorio dos componentes BvrS/BvrR, mientras que el tráfico intracelular más allá de los primeros compartimentos está controlado por el sistema de secreción tipo IV (VirB). Una vez dentro del retículo endoplásmico, la *Brucella* se reproduce extensivamente sin restringir las funciones básicas de la célula o inducir daño obvio a la misma. La

integridad del Lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* en la superficie bacterial es un factor para la supervivencia intracelular de la *Brucella*, y por lo tanto para su virulencia (Gorvel y Moreno, 2002).

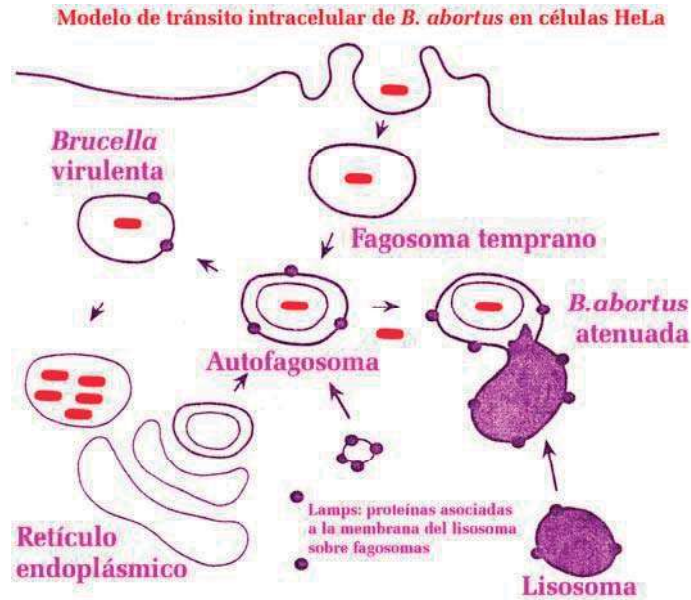


Figura 5. Modelo de tránsito intracelular de *Brucella abortus*. (López-Merino y Contreras, 2001)

En el ambiente intracelular la *Brucella* se replica extensivamente, después la expansión y transmisión a nuevas células hospederas provocan infección y abortos (Gorvel y Moreno, 2002).

La virulencia de la *Brucella* se debe a la homeostasis y propiedades de la membrana externa para invadir, sobrevivir y replicarse dentro de la célula hospedera (Moreno y Moriyón, 2002). La mayoría de las bacterias modulan la expresión de genes específicos en respuesta a cambios en las condiciones ambientales. En la *Brucella* un signo fisiológico de esta propiedad es su resistencia a las sustancias bactericidas de los lisosomas y fluidos del cuerpo y la inhibición de los policones microbicidas (Moreno y Moriyón, 2002).

La *Brucella*, a diferencia de otras bacterias patógenas, tiene capacidad para sobrevivir y persistir en el ambiente exterior bajo condiciones apropiadas, comparable a la de bacterias esporuladas (López-Merino y Contreras, 2001). Las

bacterias intracelulares facultativas como la *Brucella* sobreviven en condiciones cambiantes entre el ambiente abierto y el medio intracelular. Por esto, la bacteria coordina una red de factores para generar una respuesta adaptativa conveniente a varias señales. En este sentido, el sistema regulatorio de dos componentes (BvrR/BvrS) controla la transición de un ambiente a otro, y en consecuencia, alguno de sus componentes estarían implicados en la virulencia (López-Goñi et al., 2002).

Este sistema es una respuesta adaptativa. En *Brucella* el primer componente es un sensor ambiental, localizado en la membrana citoplásmica, que transmite una señal al segundo componente, un regulador de respuesta citoplásmica, que regula cambios en la expresión de los genes (López-Goñi et al., 2002). El sistema responde a una variedad de señales físicas y químicas, que controlan la división celular, fisiología, comunicación, desarrollo y respuesta a estrés (López-Goñi et al., 2002).

El sistema BvrR/BvrS de *Brucella* mantiene la homeostasis de la membrana externa y, por lo tanto incide en la invasión y establecimiento, necesarios para el parasitismo intracelular (López-Goñi et al., 2002). El sistema en la *Brucella* es similar a las proteínas sensora y de regulación de *Sinorhizobium* y *Agrobacterium* precisas para la endosimbiosis y patogenicidad en plantas, e igual a un sistema hipotético en el patógeno animal *Bartonella*. En *B. abortus* el BvrR/BvrS es muy similar al sistema regulatorio de dos componentes ChvG-ChvI de *A. tumefaciens* y ExoS-CvI de *R. melioli*, que son equivalentes al PhoP-PhoQ de *Salmonella* y sistema BvgA-BvgS de *Bordetella bronchiseptica* (López-Goñi et al., 2002).

La secuencia de los genes *bvrS/bvrR* indican que están altamente conservados en el género *Brucella* (López-Goñi et al., datos no publicados). Las proteínas BvrS/BvrR poseen un alto nivel de identidad con otras presentes en células asociadas a α -2 *Proteobacteria* (López-Goñi et al., 2002), requeridas para la endosimbiosis y parasitismo bacteriano. Mutantes BvrR/BvrS no sólo son más susceptibles a las sustancias policatiónicas bactericidas, también su superficie de membrana externa es más hidrofóbica que la de la cepa parenteral *B. abortus* 2308. Probablemente el sistema BvrR/BvrS module la estructura de la membrana externa (López-Goñi et al.,

2002).

La mutación en los genes *bvrR* o *bvrS* atenúa a la *Brucella* al ser deficiente en la adhesión e invasión (Halling, 2002). La mutación obstaculiza la penetración de *B. abortus* en células no fagocíticas y afectan el tráfico intracelular y la virulencia (López-Goñi et al., 2002). Además, se reduce la multiplicación y persistencia en el bazo de ratones en vivo, así como la invasión y replicación en macrófagos y células HeLa *in vitro*, sugiriendo la incapacidad de inhibir la fusión del lisosoma (Jinkyung y Splitter, 2003).

El sistema disfuncional BvrR/BvrS altera la permeabilidad de la membrana externa, al variar la expresión de varias proteínas de membrana externa pertenecientes al grupo 3 y el patrón de acilación del lípido A (López-Goñi et al., 2002).

Otro factor para la sobrevivencia intracelular de la *Brucella* es un sistema de secreción tipo IV, el cual permite a la *Brucella* secretar una proteína (VirB) que ayuda en la sobrevivencia intracelular, y está implicada en la maduración de la *Brucella* dentro de las vacuolas (Jinkyung y Splitter, 2003).

El sistema de secreción tipo IV, conocido como operón *virB*, consta de doce genes y es inducido por la acidificación del fagosoma en las células después de la fagocitosis (Boschiroli et al., 2002). Se piensa que el sistema secreta efectores moleculares desconocidos, permitiendo a la *Brucella* cambiar la vía endosomal de la célula hospedera y crear un nuevo compartimiento intracelular para replicarse (Boschiroli et al., 2002). Éste sistema es un complejo multiproteico que secreta macromoléculas. Posiblemente inyecten efectores moleculares al interior de la célula hospedera, estableciendo el nicho de replicación de la *Brucella* durante la infección, y su expresión, probablemente, esté firmemente regulada. Los fagosomas que contienen *Brucellas* acidifican rápidamente hasta un pH de 4, lo que facilita la multiplicación intracelular (Boschiroli et al., 2002).

La *Brucella* tiene desarrollados otros mecanismos para la sobrevivencia intracelular incluyendo la inhibición de la fusión fagolisosomal y la inhibición del lanzamiento de

los gránulos primarios (Pizarro-Cerda et al., 1998).

La resistencia a la eliminación parece derivarse de la alteración del tráfico intracelular para evitar la fusión lisosomal. Así, en algún grado la *Brucella* tiene la capacidad para manipular la respuesta del hospedero para su beneficio (Pizarro-Cerda et al., 1998).

2.2.2 Lipopolisacárido (LPS) de *Brucella*

Los LPS de los organismos Gram-negativos consisten de tres componentes básicos. Región I, la porción más externa, que contiene repetidas unidades de carbohidratos que forman el antígeno O (Moat y Foster, 1988). Cambios en la composición de los azúcares del oligosacárido varía la especificidad inmunológica del antígeno O. El núcleo o base del polisacárido (Región II) formada por un grupo de compuestos químicos comunes a los miembros cercanos relacionados a estos organismos, el ácido 2-keto-3-deoxioctónico (KDO) parece ser el componente más común del núcleo de la mayoría de bacterias Gram-negativas. El lípido A (Región III) está unido a la membrana externa, el mecanismo de la unión es desconocido, sin embargo, ésta se puede llevar a cabo por interacciones hidrofóbicas entre la lipoproteína y los fosfolípidos de la capa de la membrana externa (Moat y Foster, 1988) [Figura 6 y 7].

La actividad biológica del LPS de *Brucella* difiere de las endotoxinas tradicionales, ya que sus características están ligadas a su estructura química (Rasool et al., 1992). El oligosacárido (O-PS) es un homopolímero de N-formil-perosamina, que reduce la eliminación extracelular (Harmon et al., 1989).

Los LPS aislados de bacterias intracelulares, incluyendo *Brucella*, no usan los receptores clásicos. Los LPS inducen un bajo y diferente perfil de citocininas, se piensa que la baja actividad biológica de esos LPS, los cuales presentan baja activación de los mecanismos microbicidas por la red citosina (por ejemplo explosión respiratoria), constituye un rasgo evolutivo favorable para las bacterias intracelulares que sobreviven por períodos prolongados en la célula hospedera (Gorvel y Moreno, 2002).

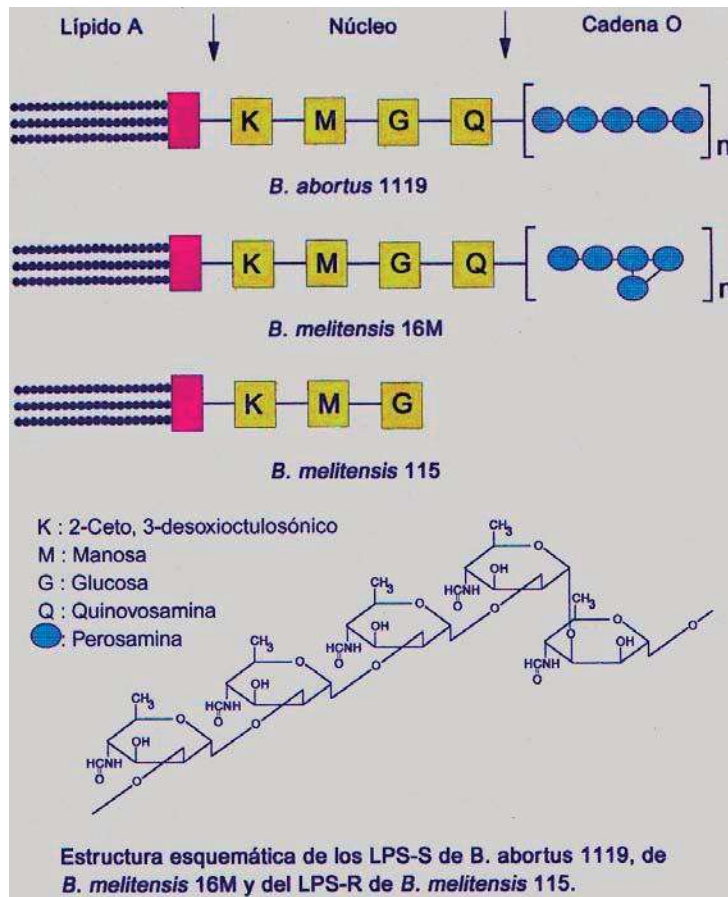


Figura 6. Estructura de los LPS lisos (con las tres regiones) de *Brucella* (López-Merino y Contreras, 2001)

La síntesis de los LPS inicia con la formación del lípido A en la cara interna de la membrana citoplásmica. Después, por acción secuencial de la glicosiltransferasa, los azúcares son adicionados al lípido A hasta que la base del oligosacárido está completa. Mientras tanto el O-PS es sintetizado en una vía independiente y, se acopla al azúcar aceptor de la unión lípido A-base (Moriyón et al., 2004). Después, el O-PS y la unidad de azúcar son insertados sucesivamente por glicotransferasas. Finalmente las proteínas ABC translocan el amino-azúcar-O-PS al lado periplásmico de la membrana donde una ligasa (WaaL) une el amino-azúcar-O-PS al lípido A (Moriyón et al., 2004).

Los LPS lisos (con las tres regiones) son el principal factor de virulencia (Allen et al.,

1998). La molécula de la cadena O es la estructura antigénica más expuesta de la superficie celular de los miembros del género *Brucella* (Cloeckert et al., 1996). La cadena O es también el antígeno inmunodominante en la respuesta por anticuerpos del hospedero infectado y es el determinante antigénico implicado en las reacciones serológicas de las pruebas usadas actualmente para el serodiagnóstico de infecciones causadas por cepas de *Brucella* lisas (Jiménez de Bagués et al., 1995).

Aunque la resistencia a las moléculas bactericidas está relacionada a la base y la estructura del lípido A, hay la contribución del O-polisacárido como lo sugiere la diferencia en la susceptibilidad entre cepas rugosas y lisas de *Brucella* (Martínez-de-Tejada et al., 1995).

La más alta hidrofobicidad de la célula de *Brucella* y la asociación cercana entre las macromoléculas de la membrana externa, son factores implicados en la penetración selectiva de nutrientes al interior de la célula bacterial. La ausencia de una barrera para sustancias hidrofóbicas está unida a la estructura de la base del LPS de *Brucella* y al lípido A (Martínez-de-Tejada et al., 1995). El resultado neto de los cambios en la estructura en el LPS es que los bacteroides intracelulares tienen una membrana externa más hidrofóbica. Ésta condición adaptativa podría promover el intercambio de nutrientes y favorecer la vida intracelular de los bacteroides (Moreno et al., 1990).

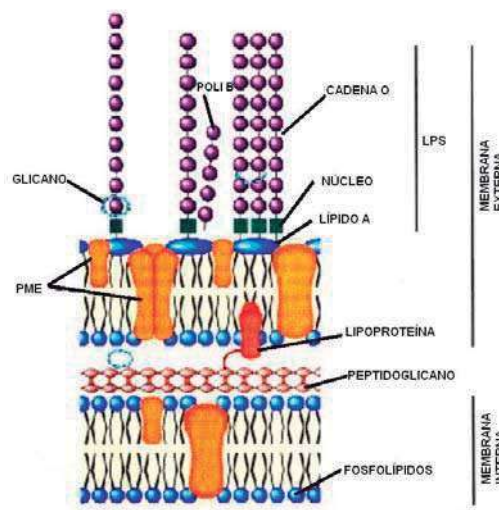


Figura 7. Estructura de la membrana de *Brucella* (López-Merino y Contreras, 2001).

2.2.3 *Brucellas* lisas y rugosas

Las *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* pueden ser cepas lisas (S) o rugosas (R), al expresar lipopolisacárido liso (S-LPS) con cadena O, o lipopolisacárido rugoso (R-LPS) carente de cadena O como principal antígeno de superficie, respectivamente (Jinkyung y Splitter, 2003).

En general, las cepas R de *Brucella*, contienen menos o no contienen O-PS, son poco virulentas y resisten menos al ataque por complemento que las cepas S (Fernández-Prada et al., 2003). Debido a su carencia de antígenos O-PS, las *Brucellas* “R” no inducen anticuerpos anti O-PS ni reacciona con anticuerpos específicos para *Brucella*, y presentan otros cambios topológicos y fisiológicos en la membrana externa asociados con la carencia del O-PS (Moriyón et al., 2004). Las *Brucellas* “R” son atenuadas. La atenuación se atribuye al incremento de anticuerpos y la activación del complemento, además de la sensibilidad a las plicaciones de los péptidos bactericidas (Moriyón et al., 2004).

Son dos los aspectos para la identificación del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* como un factor de virulencia. Primero, la *Brucella* posee poco LPS inmunogénico que induce baja actividad biológica. Segundo el LPS de *Brucella* no activa la vía alterna del complemento, así las mutantes de *Brucella* deficientes en OPS son sensitivas a la lisis mediante el complemento y polimixina B (Jinkyung y Splitter, 2003).

Las mutantes R de *B. melitensis* no son eliminadas extracelular por el complemento. El OPS contribuye a la actividad antiapoptótica de *B. melitensis* y realza la capacidad de la bacteria para sobrevivir en macrófagos (Fernández-Prada et al., 2003).

2.2.4 Proteínas de Membrana Externa

La membrana externa de las bacterias Gram-negativas contiene una variedad de proteínas que tienen un rol fundamental en la estructura y función de estas células (Moat y Foster, 1988). Las OMPs están asociadas con la virulencia (Verstrete y

Winter, 1984; Marquis y Ficht, 1993). Además de los LPS, la membrana externa de *Brucella* esta compuesta de proteínas de membrana externa (OMPs) [Cloeckert et al., 2002b]. Las OMPs están relacionadas con la protección (López-Merino y Contreras, 2001).

Son tres diferentes grupos de OMPs, se clasifican de acuerdo a su peso molecular. En el grupo 1 son proteínas con una masa molecular aproximadamente de 94 kDa, en el grupo 2 están proteínas de 41 a 43 kDa, y en el grupo tres proteínas de aproximadamente 30 kDa (Verstrete y Winter, 1984; Lindler et al., 1996). Las proteínas del grupo 2 fueron identificadas como porinas; a las del grupo 3, se les considera equivalentes a las OmpA de *E. coli*, con base en su similitud en la composición de aminoácidos y a su relación antigénica. Las proteínas del grupo 1 se encuentran en concentración menor a la de los otros grupos (López-Merino y Contreras, 2001)

El grupo 2 tiene dos miembros, Omp2a con una masa molecular de 41 kDa y una Omp2b de 43 kDa (Verstrete y Winter, 1984; Marquis y Ficht, 1993). Las OPMs fueron caracterizadas por su potencial inmunogénico y antigénico. Los genes que codifican el grupo 2 porinas son dos, *omp2a* y *omp2b* y tienen un grado de identidad del 85% (Cloeckert. et al., 2002b).

Hasta 1990 los genes conocidos del grupo 3 fueron nombrados *omp25* y *omp31* y presentan una identidad de 34%. Las OMPs tienen poca relevancia como antígenos en las infecciones de *B. abortus* o *B. melitensis* lisas (S), baja o nula protección en ratones a la infección y baja o nula inmunogenicidad durante la infección al hospedero. El grupo tres, en particular Omp31, aparece como antígeno inmunodominante en el curso de la infección de *B. ovis* rugosa en carneros y como antígeno protector en la infección por *B. ovis* en ratones (Cloeckert et al., 2002b). Las OMP mayores o principales se encuentran en la superficie de la membrana externa, sin embargo, estarían menos accesibles en las cepas S que en las R, debido al impedimento estérico de las largas y abundantes cadenas O del LPS de las cepas S (López-Merino y Contreras, 2001).

2.3 Control de la brucelosis

El control de la infección de *B. melitensis* en cabras y ovejas es mediante análisis diagnósticos serológicos y políticas de eliminación de animales positivos (Blasco, 1997), además de la vacunación (Moriyón et al., 2004)

La secreción de la *Brucella* en la leche es considerada el segundo mecanismo de diseminación en granjas; pero es la principal ruta de infección en humanos. Así, la erradicación de la brucelosis en animales es la principal meta para eliminar los casos en humanos (Banai, 2002)

Como agente abortivo en el animal hospedero, la *Brucella* se disemina en el ambiente a través de las membranas fetales contaminadas y los fluidos. Así que la prevención del aborto se puede establecer con medidas efectivas de higiene, pero la vacuna es más eficaz en este sentido (Banai, 2002). Está aceptado que bajo las más diversas condiciones, la vacunación controla la brucelosis en ovinos y caprinos (Moriyón et al., 2004).

La vacuna viva de *B. melitensis* sirve para el control de brucelosis en pequeños rumiantes en todo el mundo. La aplicación de la vacuna viva de la cepa Rev 1 de *B. melitensis* contribuye al control de la infección por *B. melitensis* en pequeños rumiantes en áreas con una prevalencia elevada de la enfermedad, sistemas extensivos de manejo y bajo nivel socio-económico (Blasco, 1997).

2.3.1 Vacunación

Las vacunas para brucelosis van desde las preparadas con subunidades obtenidas a partir de extractos de *Brucella* spp. hasta las elaboradas con células muertas de *Brucella*. También, se han obtenido con técnicas de biología molecular, clonando diferentes genes (BCSP31 y Cu-ZnSOD), o genes que codifican proteínas de *Brucella* spp. como las antigénicas (HtrA) y las posiblemente esenciales (del sistema de dos componentes) para la virulencia total de *B. abortus*, aunque la antigenicidad

no predice la eficacia de una proteína como una vacuna de subunidad (Halling, 2002).

La meta de los primeros estudios de genética molecular fue desarrollar una vacuna compatible con el diagnóstico, tratando de distinguir la vacunación con los animales infectados en campo, además de una prueba diagnóstica que identifique y distinga cepas de *Brucella* (Moriyón et al., 2004).

La inmunización contra la brucelosis se ha intentado con células muertas de *Brucella* spp. las que logran mejor protección que inmunización, comparadas con cepas vivas a la semana de postinoculación. Después de 4 semanas postvacunación en el ratón inmunizado con cepas vivas de *Brucella* la bacteria sigue viva proveyendo protección, sugiriendo que la vacuna viva es superior a la vacuna muerta. La persistencia en los animales vacunados con cepas de *Brucella* es crítica para la protección. Además, las vacunas atenuadas contienen todos los componentes inmunogénicos implicados en la protección, siendo más eficientes (Jinkyung y Splitter, 2003).

Los estudios de Bang (1906) con inyección de cultivos vivos de *Brucella* protegía mejor al ganado contra la brucelosis que con *Brucellas* muertas. Las vacunas vivas son superiores en protección a las vacunas muertas (Jinkyung y Splitter, 2003).

Las características ideales de una vacuna para *Brucella* son: viva, atenuada y sin OPS, porque: i) la vacuna viva atenuada persiste en el hospedero estimulando la respuesta inmune y proporciona los antígenos para estimular las células B y T; y ii) la ausencia del OPS sirve como marcador de diagnóstico para discernir entre animales infectado y animales vacunados (Jinkyung y Splitter, 2003).

La cepa 19 de *B. abortus* fue derivada de un cepa progenitora virulenta, resultado de un afortunado evento que ocurrió en el laboratorio después de un largo período de almacenamiento (Buck, 1930). La vacuna de la cepa Rev 1 fue desarrollada por Elberg y Faunce (1957), usando el razonamiento científico que la existencia tenue de la cepa en el hospedero se necesita para mejorar la estimulación del sistema

inmune. Desarrollaron una cepa que requería de estreptomicina, asumiendo que controlarían su crecimiento en el hospedero con la administración del antibiótico y la cepa vacunal. La mutante fue atenuada en un modelo de ratón (Elberg y Faunce, 1957).

La vacuna Rev.1 fue obtenida de la cepa virulenta 6056 por selección en dos pasos de estreptomicina, que implicó primeramente la resistencia y dependencia a estreptomicina y segundo la reversión de la dependencia pero conservando la resistencia a estreptomicina. La resistencia a estreptomicina es adquirida cromosomalmente por mutaciones en el gen que codifica para la proteína S12 ribosomal, *rpsL* (Cloeckaert et al., 2002a).

La cepa Rev.1 está atenuada y persiste en el bazo de diferentes cepas de ratones de 6 a 12 semanas. En el cerdo de guinea, a las dos semanas de vacunación, se nota un leve crecimiento del bazo regresando después a su tamaño normal (Banai, 2002).

Las vacunas vivas inducen inmunidad contra *Brucella* y por lo tanto las mutantes R son vacunas potenciales contra brucelosis. Las mutaciones de cepas R naturales o espontáneas sirven para combatir la brucelosis, las más efectivas; S19, Rev-1 y RB51, son usadas como vacunas en animales (Ficht, 2002). La cepa *B. abortus* RB51 se emplea en bovinos y la *B. melitensis* Rev 1 en caprinos y ovinos. Otras vacunas no están disponibles para diversos animales, y en humanos la vacuna contra *Brucella* no existe (Jinkyung y Splitter, 2003).

La vacuna viva atenuada de *B. melitensis* cepa Rev.1 es considerada la mejor vacuna disponible para la profilaxis de la brucelosis en cabras y ovejas. Alton (1996) probó la protección de la vacuna; al vacunar entre 3 y 7 meses de edad la protección permanece por un período de 2.5 años.

Las vacunas Rev-1, S19 y RB51 tienen rasgos indeseables: son infecciosas para el humano, pueden ser abortivas cuando son usadas en animales preñados e induce una respuesta inmune que dificulta la distinción de la resultante por infección, particularmente cuando los animales adultos son revacunados (Moriyón et al., 2004).

La cepa Rev 1 tiene rasgos negativos adicionales; la resistencia a estreptomycin, uno de los antibióticos elegidos en el tratamiento de brucelosis en combinación con tetraciclina, y es relativamente inestable requiriendo estandarización cuidadosa para prevenir la variación en la seguridad y efectividad (Moriyón et al., 2004).

Por tanto los esfuerzos para el control de la brucelosis deben ser dirigidos principalmente a un diagnóstico temprano, eficaz y específico de la infección.

2.4. Diagnóstico

El control de la brucelosis depende de métodos confiables para la identificación de la *Brucella* en el ganado, animales silvestres y humanos. Varios diagnósticos han sido desarrollados, que en conjunto, han disminuido la incidencia de la enfermedad. En el ganado, el diagnóstico debe ser económico, fácil de realizar, rápido, sensitivo y específico. Se emplean varias pruebas serológicas pero no reúnen todos los requisitos. La mayoría se basan en la aglutinación de antígenos por anticuerpos específicos en la sangre de los animales infectados (Bricker, 2002a). Los diagnósticos se dividen en dos grupos: pruebas tamiz y definitivos.

En pro de la sensibilidad en la prueba tamiz, se tolera la aparición de algunos falso positivos para detectar a la totalidad de vectores, una segunda prueba, detecta las reacciones falso positivas (Bricker, 2002a).

El diagnóstico irrefutable de brucelosis es el aislamiento y caracterización del agente causal. Desafortunadamente, a pesar de que esta aproximación es definitiva, tiene varias desventajas (Bricker, 2002a).

2.4.1 Diagnóstico por aislamiento e identificación

En general, los medios para el cultivo de *Brucella* contienen peptonas o triptonas adicionadas con extracto de levadura, suero o sangre para favorecer el crecimiento de éstas bacterias. La formulación de medios comerciales reúne estos requisitos. Las muestras de sangre, médula ósea y de líquido cefalorraquídeo de preferencia se inoculan en botellas con medio doble (Ruiz Castañeda modificado) [López-Merino y

Contreras, 2001]. Al aparecer crecimiento visible en la superficie del agar a las 24 h de incubación, se descarta la botella y se toma otro cultivo. La *Brucella* se desarrolla al entre 4-5 días. Pero, en algunos casos el crecimiento es tardío (6 semanas). Las resiembras se realizan con una jeringa, que evita abrir la botella. Se siembra por duplicado en placas de agar sangre al 10%, en agar soya tripticasa (TSA) con extracto de levaduras al 0.5% y en agar Mac Conkey. Una serie se incuba en atmósfera de CO₂ y la otra en atmósfera normal a 36° C. Después de cuatro días se observa crecimiento en alguna de las series si existen *Brucellas* viables (López-Merino y Contreras, 2001).

La *Brucella* crece lentamente en cultivos primarios y subcultivos. Las condiciones de la enfermedad; localización focal, recaídas o enfermedad crónica o causada por otras especies, provocan un bajo cultivo en sangre. Consecuentemente, la detección e identificación de *Brucella* spp. en cultivo puede ser difícil y a largo plazo (Zerva et al., 2001; Bricker, 2002a). Otras desventajas son; 1) para aislar *Brucella* spp. de sus portadores los tejidos necesarios son los ganglios linfáticos supramamario e ilíaco, y estos se obtienen post-mortem. 2) es posible que la bacteria no sea aislada de animales infectados, lo cual guiaría a la obtención de falsos negativos en animales positivos por serología. 3) en áreas donde la vacunación es práctica común, la *Brucella* aislada debe ser tipificada para asegurar que no es una cepa vacunal (Dájer-Abimerhi et al., 1995).

Por microscopía se verifican los cultivos buscando bacilos cortos, pequeños de 0.5 X 0.5 hasta 1.5 μ m de longitud y Gram negativos. Con tinción de Zielh-Neelsen modificada, las *Brucellas* se tiñen de rojo y se observa la misma morfología (López-Merino y Contreras, 2001).

En medio TSA, las cepas S producen colonias circulares, convexas con bordes regulares, translúcidas y coloración ámbar. A la luz reflejada son brillantes, ligeramente opalescentes y de color gris azulado. Las cepas R, en TSA, producen colonias semejantes en la forma a las cepas S pero varían en tamaño, color, consistencia y textura (Figura 8).



Figura 8. Colonias lisas y rugosas de *Brucella* (López-Merino y Contreras, 2001).

En gelosa sangre no produce hemólisis, y en agar Mac Conkey crecen poco y no fermentan la lactosa. Para una caracterización bioquímica, los cultivos se crecen en cajas de TSA, determinando la producción de catalasa y oxidasa, para las cuales las *Brucelas* son positivas. Inmediatamente se aglutina a las colonias sospechosas con suero polivalente anti *Brucella*. Se recomienda realizar la suspensión de *Brucelas* en solución salina fenolada al 1.0%. Si hay aglutinación, probablemente son bacterias del género *Brucella* (López-Merino y Contreras, 2001).

2.4.2 Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico es una prueba de aglutinación, que sirve como prueba tamiz por su alta sensibilidad, por su baja especificidad debe realizarse un análisis confirmatorio. Es susceptible a resultados falso positivos por reacciones cruzadas con otros microorganismos. El problema del empleo de pruebas serológicas se ha agudizado por el uso extensivo de vacunas que elevan los anticuerpos, como ocurre en la infección natural (Nielsen, 2002).

La respuesta de anticuerpos a *B. abortus* en ganado inicia con el isotipo IgM, dependiendo de ruta de entrada, dosis de la bacteria y estado físico del animal. El IgM es seguido por el isotipo IgG1 y después por pequeñas cantidades de IgG2 e IgA (Corbel, 1997; Nielsen, 2002). La mayoría de las reacciones cruzadas de anticuerpos, como resultado de la exposición de otras especies de *Brucella* o antígenos ambientales, consisten principalmente de IgM (Corbel, 1997). Los análisis

que miden IgM no son deseables por la incidencia de falsos positivos provocados por la poca especificidad. El principal isotipo para el diagnóstico es el IgG1, ya que los anticuerpos IgG2 e IgA se acumulan después de la exposición y en pequeñas e inconsistentes cantidades (Nielsen, 2002).

2.4.2.1 PRUEBA ROSA DE BENGALA (PRB)

La Prueba Rosa de Bengala (PRB) es un análisis serológico por aglutinación de las células (muertas, atenuadas, etc.) del reactivo con los anticuerpos en el suero sanguíneo (Figura 9). La PRB usa células enteras de *B. abortus* S99 o S1119.3, teñidas con Rosa de Bengala. El antígeno es usado a un pH de 3.65. El pH bajo reduce la aglutinación por IgM y facilita la aglutinación por IgG1 disminuyendo las interacciones no específicas (Corbel, 1997).

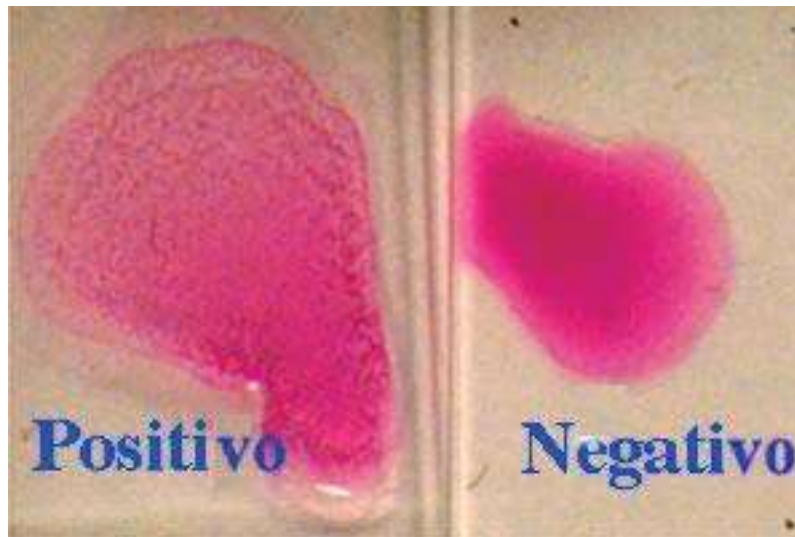


Figura 9. Prueba Rosa de Bengala. Fotografía de resultado positivo y negativo del análisis RB (www.microbes-edu.org/etudiant/brucella.html)

La PRB está estandarizada, es simple de aplicar y barata. Sirve para detectar la enfermedad en un hato, produce reacciones falso positivas, debido a la prozonización. La respuesta inmune por vacunación con *B. abortus* S19 y *B. melitensis* Rev-1, además de reacciones cruzadas con anticuerpos generados por otras bacterias son detectadas por ésta, es necesaria una segunda prueba para

confirmar a los animales infectados (Nielsen, 2002) [Figura 10].

La sensibilidad relativa (SR) y especificidad relativa (ER) de la PRB comparada con la Prueba de Fijación de Complemento (PFC) es de 100% y 38%, respectivamente. Por su SR es buena como prueba tamiz, la baja ER no le otorga valor diagnóstico definitivo (Dájer-Abimerhi et al., 1995).

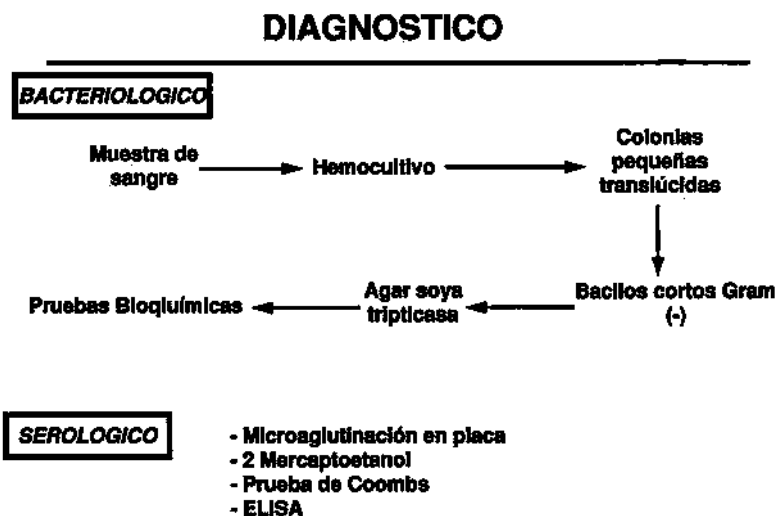


Figura 10. Diagrama del diagnóstico bacteriológico y serológico de brucelosis (López-Merino y Contreras, 2001).

2.4.2.2 PRUEBA FIJACIÓN DE COMPLEMENTO (PFC)

La PFC es un análisis serológico basado en los principios de ELISA, que emplea suero sanguíneo. El reactivo de la prueba consta de un antígeno, células enteras de *Brucella*, y una cantidad predeterminada de complemento. La PFC se realiza con diluciones del suero (vacas, ovejas y cabras), antígeno y una cantidad pretratada de complemento (el suero de cerdo de guinea es la fuente de complemento, el complemento del animal a analizar se inactiva por incubación a 56° C durante 35-60 min). Sí el anticuerpo está en el suero, se une al antígeno y abastece al anticuerpo de isotipo IgG1, sin activar al complemento. El sistema indicador, eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpos de conejo, no se lisan dando positivo el diagnóstico. Por otro lado, sí los anticuerpos no están presentes, el complemento activado por la

interacción con los receptores de la porción Fc de los anticuerpos del conejo lisarán los eritrocitos, visualizando la hemoglobina o por espectrofotómetro, estableciendo un diagnóstico negativo (Nielsen, 2002).

La PFC no distingue entre anticuerpos vacunales y de infección. Además, algunas muestras de suero activan el complemento sin antígeno. No obstante, la PFC es definitiva en los programas de control/erradicación, y la Oficina Internacional de Epidemiología (OIE) la recomienda para el comercio internacional (Nielsen, 2002).

Se considera a la PFC como la más confiable en el diagnóstico de brucelosis por su alta sensibilidad y especificidad, es la que mejor identifica animales infectados, aunque es compleja, cara y difícil de estandarizar por lo que no se realiza en muchos laboratorios. La PFC es el diagnóstico definitivo de brucelosis (Alton et al., 1975). Por tanto, deberá utilizarse para la identificación de reactores positivos después de la prueba tamiz (Dájer-Abimerhi., 1995).

2.4.3 Diagnóstico por PCR

Como para otros patógenos, la metodología molecular es una alternativa para el diagnóstico de la brucelosis. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que amplifica ácidos nucleicos, se caracteriza por su alta sensibilidad y especificidad, se realiza en corto tiempo y supera las limitaciones de la metodología convencional (Zerva et al., 2001).

La amplificación del ADN por PCR está basada en una reacción enzimática cíclica, donde los productos (amplicones) de los primeros ciclos son usados como templates para los siguientes. En teoría, el número de moléculas blanco aumenta exponencialmente (el doble después de cada ciclo). Pero, en la práctica la eficiencia de la reacción no es del 100%, pues la curva real de amplificación tiende a desviarse de la forma exponencial, por tanto, la producción de amplicones a los 30 ciclos es ideal (Sachse y Frey, 2003).

El diseño de los oligonucleótidos los hace específicos (amplificación exclusiva del

ADN blanco) y eficientes (alta producción de ADN amplificado por selección eficiente de la termodinámica de los sitios de unión). La especificidad está determinada por la temperatura de alineamiento (T_{ann}) y, en menor grado, por el tamaño de los oligonucleótidos. La T_{ann} en la PCR se encuentra a pocos grados de las temperaturas de derretimiento de los oligonucleótidos T_m (Sachse y Frey, 2003).

La selección de la región genómica a amplificar determina la especificidad de la detección. Para determinar la especificidad, la selección de un segmento característico de ADN genómico de la *Brucella* y el conocimiento de la secuencia de nucleótidos de la bacteria es indispensable (Sachse y Frey, 2003).

La sensibilidad de la detección se debe a la naturaleza de la región seleccionada y a la unión de los oligonucleótidos, lo que fija la eficiencia de la amplificación (Sachse y Frey, 2003).

El tamaño del producto de la PCR tiene una correlación inversa con la eficiencia de la amplificación, los blancos cortos facilitan la alta sensibilidad de la detección, y son preferibles para los análisis cuantitativos de PCR (Sachse y Frey, 2003).

Cada ciclo de la PCR incluye tres pasos: uno de calentamiento a 91° - 97° C, desnaturalizando el templete dúplex de ADN (separación) a hebras sencillas; uno de alineamiento a 40° - 65° C, ocurre la unión de oligonucleótidos a las hebras sencillas de ADN; y uno de extensión a 68° - 73° C, la polimerasa termoestable cataliza la síntesis de la hebra de ADN. Se necesitan dos oligonucleótidos (primers) que delimiten la región a amplificar (Sachse y Frey, 2003).

Las primeras investigaciones por PCR fueron del grupo de R. K. Saiki y colaboradores en 1985 y K.B. Mullis y F. A. Faloona en 1987. Inicialmente, el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* se adicionó manualmente a la reacción después de cada ciclo cerca de 40 veces (Sachse y Frey, 2003).

Desde 1987 se han desarrollado y publicado trabajos para detectar *Brucella* mediante la PCR. Los primeros se diseñaron sobre regiones genéticas altamente

conservadas en *Brucella* (los genes *BCSP31* o 16S rRNA), solamente detectaron la *Brucella* sin identificar especies o biovares (Cloeckert et al., 2002a).

Los métodos para el análisis de diferentes muestras clínicas; tejidos, semen, leche y sangre entera, tienen la ventaja de obtener resultados inmediatos. La desventaja radica en la preparación y acondicionamiento de las muestras para remover los componentes inhibidores de la PCR (Cloeckert et al., 2002a).

El primer diagnóstico basado en PCR para *Brucella* fue publicado por Fekete y colaboradores (1990). Se basó en la amplificación de una secuencia de 653 pb de un gen que codifica una proteína de membrana externa de 43 kDa de *B. abortus* S19. Es específico para *Brucella* y muy sensible (menos de 100 bacterias), no distingue entre especies y biovares (Fekete et al., 1990).

En 1992 Herman y De Ridder, demostraron que la secuencia de la región 16S ribosomal de *B. abortus* está altamente conservada entre el género *Brucella*, amplificaron una región de 800 pb Herman y De Ridder, 1992). Existió amplificación en *Ochrobactrum anthropi*, bacteria relativamente cercana a *Brucella* (Cloeckert et al., 2002a). Romero y colaboradores (1995) obtuvieron resultados similares con nueve combinaciones diferentes de oligonucleótidos derivados del análisis mencionado.

En 1996, Rijpens y colaboradores analizaron la región espacial intergénica 16S-23S, altamente variable entre bacterias. También amplificó a *O. anthropi*, oportunista de hospederos inmunodeprimidos, circunstancia diferente a brucelosis.

En 1992, Baily y colaboradores se basaron en el gen que codifica la proteína *BCSP31*. El gen *BCSP31* fue el primer loci de *Brucella* publicado para ser clonado y secuenciado, éste gen codifica una proteína antigénica periplásmica de función desconocida. Esta conservado en todas las especies y biovares de *Brucella* examinadas; sin embargo, no se expresa en *B. ovis* (Bricker, 2002b). El trabajo de Baily y colaboradores (1992) amplifica un producto de 193 pb. El análisis es robusto, sensible y específico para *B. abortus* y *B. melitensis*. Al probar las especies y biovars

de *Brucella*, así como 98 bacterias diferentes, Da Costa y colaboradores (1996), además de las *Brucella* spp. amplificaron el fragmento de 193 pb en *Ochrobactrum*. No obstante, el análisis ha seguido fuerte y se considera específico (Da Costa et al., 1996).

Bricker y Halling en 1994 utilizaron un análisis múltiple para amplificar ADN específico de regiones cercanas a secuencias hipervariables. Los oligonucleótidos grandes (20-25 pb) permiten condiciones astringentes que reducen el riesgo reacciones de falsas positivas, aumentando la especificidad. La desventaja es la información sustancial de las secuencias y en caso de *Brucella*, es difícil de encontrar divergencias.

La PCR se ha utilizado para la detección de *Brucella* en alimentos contaminados, normalmente leche y quesos suaves (Leal-Klevezas et al., 2000, 1995b; Romero y López-Goñi, 2002; Romero et al., 1995; Rijpens et al., 1996).

El diagnóstico de brucelosis por PCR en humanos ha empleado sangre entera y los oligonucleótidos desarrollados por Baily (Matar et al., 1996; Queipo-Ortuño et al. 1997; Morata et al., 1998, 1999; Zerva et al., 2001). En este sentido, la detección se interfiere por los inhibidores de la polimerasa, particularmente los compuestos hemo de sangre entera (Cloeckert et al., 2002a).

Para el diagnóstico de brucelosis en cabras por PCR, Leal-Klevezas y colaboradores (1995) utilizaron sangre entera con heparina y citrato de sodio como anticoagulantes, los animales fueron infectados natural y artificialmente. Leal-Klevezas y colaboradores (2000) empleó la PCR en cabras con sangre entera heparinizada y leche, la sensibilidad fue del 86%. Navarro y colaboradores (1999) usando un procedimiento similar no reprodujeron los mismos resultados; la sensibilidad y especificidad fue de 50 y 60% respectivamente. La discrepancia de resultados se debió al tamaño de inóculo y al almacenamiento, es conocido que los resultados de PCR son difíciles de reproducir en laboratorios diferentes (Navarro et al., 1999).

El éxito de la PCR se debe a; 1) su rapidez en comparación a los métodos

convencionales de diagnósticos. La detección e identificación de mycobacterias, chlamydae, mycoplasma, brucellae y otras bacterias de crecimiento lento es en un día, sí las muestras clínicas son examinadas con PCR, 2) la detección de bacterias como el género *Brucella* difíciles de cultivar fuera de su hospedero natural, y a menudo indetectables por cultivo y 3) la alta sensibilidad y especificidad mostrada hasta ahora por la PCR (Sachse y Frey, 2003). La PCR facilita el examen de muestras clínicas sin necesidad de hacer cultivos y permite la diferenciación específica entre especies cercanamente relacionadas o subtipos al mismo tiempo (Sachse y Frey, 2003).

El poco tiempo en el que se realiza la PCR a partir de muestras de suero sanguíneo (menos de 4 horas) no se compara con requerido para el cultivo en sangre y tubo de Wright's o prueba de Wright-Coombs (3 a 7 días, 24 horas y 48 horas, respectivamente). El suero sanguíneo puede ser usado preferentemente sobre las muestras de sangre entera para el diagnóstico molecular de brucelosis. Ya que simplifican el procedimiento y disminuyen el tiempo de realización, sin menos cabo de la sensibilidad y especificidad (Zerva et al., 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

La PRB es usada como prueba tamiz o de escrutinio por su sensibilidad (100%), pero su especificidad suele ser muy baja (hasta 38%), por tanto muchos resultados falso positivos son enviados a una segunda prueba diagnóstica (PFC) con el consiguiente incremento de tiempo, costo y riesgo de contagio de animales sanos, el empleo de suero sanguíneo en el análisis PCR para el diagnóstico de la brucelosis caprina superaría esos inconvenientes. Por lo cual en el presente trabajo establecemos la siguiente hipótesis;

4. HIPÓTESIS

“La amplificación de ADN de Brucella en muestras de suero sanguíneo de cabras infectadas, reduce el número de falso positivos en el diagnóstico de brucelosis caprina”.

5. OBJETIVO GENERAL

Implementar un método para el diagnóstico de *Brucella* en cabras, mediante la amplificación de genes específicos del género.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS;

- Toma de muestras de sangre y/o sangre de cabra.
- Diseño de oligonucleótidos.
- Determinación de parámetros óptimos de operación de oligonucleótidos diseñados.
- Adaptación de protocolos de PCR reportados al método CTAB de extracción de ADN.
- Comparación del umbral de detección.
- Obtención de los índices de sensibilidad y especificidad por tipo de análisis.
- Análisis estadístico de resultados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Toma de muestras de sangre y/o suero sanguíneo

Se obtuvieron 150 muestras de sangre de cabras del Subcomité de Productores de Ovicaprinos de Michoacán (SPOEM). Se extrajeron 15 mL de sangre de la vena yugular, previa desinfección del área de punción con equipo Vacutainer sin anticoagulante. La sangre se coaguló a temperatura ambiente, separando el coágulo por decantación. El suero obtenido fue centrifugado a 10,000 g durante 3 min a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 400 μ L de solución amortiguadora TE (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA) y se almacenó a -20° C para su uso posterior.

6.2 Toma de muestras de leche

Para la obtención de la muestra de leche, la ubre de la cabra fue lavada y se desinfectó el extremo del pezón con una torunda de algodón humedecida en alcohol al 70% (v/v). Una vez seca la ubre, se ordeño la cabra, donde las primeras dos expulsiones de leche fueron eliminadas y, a partir de la tercera se colectaron aproximadamente 10 mL de leche en recipientes de vidrio esterilizados. Las muestras de leche se guardaron a 4° C para su uso posterior.

6.3 Prueba rosa de bengala

Se mezclaron 30 μ L del suero sanguíneo de cabra con 30 μ L del antígeno Rosa de Bengala al 10% (p/v) sobre una placa de vidrio cuadrículada. La mezcla se agitó con un palillo estéril a temperatura ambiente por 3 minutos y se determinó la presencia o ausencia de aglutinación. La macro o microaglutinación se verificó al observar la mezcla a través de una lámpara de luz blanca. Los sueros que presentaron una aglutinación visible fueron considerados positivos.

6.4 Fijación de complemento

Los análisis de Fijación de complemento se realizaron en el Laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, ubicado en Carr. Toluca-Atlacomulco Km. 15.5 en Toluca, Edo. de Mex. Se extrajeron 15 mL de sangre de la vena yugular, previa desinfección del área de punción con equipo Vacutainer sin anticoagulante. La sangre se coaguló a temperatura ambiente, separando el coágulo por decantación. Se almacena el suero a -20° C hasta su utilización.

6.5 Extracción de ADN a partir de suero sanguíneo de cabra

El suero proporcionado por el SPOEM se centrifugó a 12,000 g por 3 min a temperatura ambiente. Se devuelve el sobrenadante al SPOEM, y se guarda el pellet para extracción de ADN a -20° C hasta ser requerido. Se resuspendió el pellet en 400 µl de solución amortiguadora TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA). Se adicionaron 50 µl de lisozima (10 mg/ml) e incubó a 37° C durante 1 h. Posteriormente se adicionaron 70 µl de SDS al 10 % (p/v), y 5 µl proteinasa K (10 mg/ml), e incubó a 65° C por 10 min. Se adicionaron 100 µl de NaCl 5M y 100 µl de CTAB/NaCl al 2% (p/v) (10 mM de Tris (pH 8.0), 20 mM de EDTA pH 8.0, 1.4 g de NaCl) precalentando a 65° C. Agitando en vortex hasta que la solución tome una consistencia lechosa. La solución se incubó a 65° C durante 10 min. Se adicionaron 750 µl de una solución de cloroformo/isoamílico 24:1 y se agitó en vortex para hacer una solución homogénea. Se centrifugó a 12,000 g durante 5 min, transfiriendo el sobrenadante a un tubo nuevo (aproximadamente 600 µl). Se adicionaron 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico o etanol absoluto (360 µl aproximadamente). Preincubando a -20° C durante 30 min o toda la noche. El ADN se centrifugó a 12,000 g durante 15 min. descartando el sobrenadante. El pellet se lavo adicionando 1 ml de etanol al 70% frío, centrifugando a 12,000 g durante 5 min. y se descartó el sobrenadante. Se vuelve a centrifugar a 12,000 g durante 1 min y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. Se dejó secar el ADN a temperatura ambiente, el ADN se resuspendió en 20 µl amortiguador de TE o en agua miliQ. Esta vez se

almaceno a -20° C hasta su uso en el laboratorio.

6.6 Extracción de ADN a partir de leche de cabra

Las muestras de leche se dejaron reposar hasta formar una capa superior de grasa durante toda la noche a 4° C. Se colectaron 400 µL de la capa superior de grasa depositándose en tubos Eppendorf de 1.5 µL. Para la extracción del ADN bacteriano se siguió el protocolo de extracción de ADN a partir de suero sanguíneo mencionado anteriormente. El ADN extraído fue conservado en refrigeración a -20° C para su uso posterior.

6.7 Testigos de especificidad

Como testigos negativos se utilizó ADN extraído de muestras sanguíneas de cabras que dieron resultado negativo a la PFC efectuada por el Laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, ubicado en Carr. Toluca-Atlacomulco Km. 15.5 en Toluca, Edo. de Mex., como controles positivos se utilizó la cepa de referencia de *B. melitensis* Rev-1 (proveniente de la vacuna melirev-R de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios).

6.8 Búsqueda de genes

Se introdujo la oración *Brucella melitensis* Rev1 en la base de datos “nucleotide” del Genbank. Esto con la finalidad de obtener todas aquellas secuencias de ADN presentes en la cepa vacunal de brucela melitensis. Las secuencias obtenidas se salvaron de manera independiente en formato FASTA. Cada una de las secuencias se sometió a una búsqueda de homólogos usando el programa blastn. Se seleccionó en la opción No Redundante (nr) en la sección de base de datos. Se seleccionaron aquellas secuencias que con una tuvieran secuencias homólogas únicamente en miembros del género *brucella* dentro de un $E < 10^{-10}$

6.9 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron seis oligonucleótidos en base a regiones del gen seleccionado que tengan un contenido de G/C mayor del 50%, y que el tamaño del oligonucleótido estuviera entre 12 y 20 bases, con el extremo 3' terminando en G o C. Las regiones seleccionadas se analizaron con el programa Net Primer (Premier Biosoft International) para determinar los que tuvieran un T_m superior a 50° C y que no formaran hairpins ni tuvieran reacciones cruzadas entre ellos. Se verificó el funcionamiento de los oligonucleótidos en una PCR virtual, contra el genoma de *B. melitensis* (www.insilico.ehu.es/PCR/), y se verificó la selectividad de los oligonucleótidos realizando PCR virtuales contra los genomas de *O. anthropi*, *E. coli* O:157, *Escherichia hermanni*, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis* y *Vibrio cholerae* O:1 y *Yersinia enterocolitica* O:9

6. 10 Análisis de PCR

En tubos Eppendorf de 500 μ L de capacidad se depositaron 2.5 μ L de solución amortiguadora Buffer de reacción (5 mM KCl, 1 mM Tris-Hcl (pH 8.4), 0.01 % (p/v) Triton X-100), 1 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 50 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos (dNTPs) (Perkin Elmer Cetus Co., Norwalk, Conn.), 1.5 U de la enzima ADN *Taq* Polimerasa (Perkin Elmer Cetus Co., Norwalk, Conn.) y se completo a un volumen de 25 μ L con agua ultrapura estéril. Se adicionaron a la mezcla 200 pg de ADN molde, 25 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador MyCycler de Bio-Rad, con un paso de desnaturalización inicial de 4 min a 94° C, seguido de 35 ciclos cada uno de los cuales incluyen un paso de desnaturalización de 1 min a 94° C, uno de alineamiento de 1 min a 40.1° C y uno de polimerización de 1 min a 72° C, finalmente se incluye un ciclo de extensión de 10 min a 72° C. Los productos amplificados se verificaron el gel de agarosa al 1.5% (p/v).

6.11 Cuantificación de ADN

Las extracciones de ADN fueron cuantificadas por un método de comparación de

fluorescencia. Se preparó gel de agarosa (Sigma USA) al 0.8% (p/v) en amortiguador TAE 1X (0.045 M Tris-borato, 0.001 M EDTA, 0.001 M Ác. Acético Glacial, pH 8). El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal, con el mismo amortiguador. Se adicionó al gel bromuro de etidio (BrEt) como intercalador de las cadenas de ADN a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En él se descargó una muestra del ADN extraído y diferentes diluciones de una sustancia de la cual se conocía su peso molecular (λ Hind III [0.5mg/ml]). Se sometió a un voltaje constante de 100 V durante 1 min, tiempo suficiente para que el ADN y las diluciones con diferentes pesos moleculares entrarán al gel, finalmente se midió la fluorescencia con los softwares Quantity One y Scion Image. Los softwares antes mencionados comparaban la luminocidad de un punto dado de la imagen, para este caso la luminocidad proporcionada por las diluciones de la sustancia conocida (λ Hind III [0.5mg/ml]), contra la luminocidad de las extracciones del ADN colocadas en el primer carril del mismo gel donde se colocaron las diluciones con el peso molecular conocido.

6.12 Electroforesis en gel de agarosa

El ADN aislado se sometió a un corrimiento electroforético, se preparó gel de agarosa (Sigma USA) al 1.5% (p/v) en amortiguador TAE 1X (0.045 M Tris-borato, 0.001 M EDTA, 0.001 M Ác. Acético Glacial, pH 8). Se adicionó al gel bromuro de etidio (BrEt) como intercalador de las cadenas de ADN a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal, con el mismo amortiguador. De las muestras se tomaron 6 μL y se mezclaron con 2 μL de buffer de carga (azul de bromofenol al 0.05% (p/v), EDTA 0.1 M pH 8.0, SDS 0.5% (p/v), sacarosa 40% (p/v)) y se descargó en los orificios del gel. El gel y las muestras se sometieron a un voltaje constante de 80 V durante 40 min. Las bandas de ADN se observaron en un transiluminador de luz UV de onda corta (UV-Products Inc). Posteriormente los geles fueron fotografiados con una cámara digital Kodak.

6.13 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos con la prueba de X^2 (Chi cuadrada) para determinar si existía una diferencia significativa entre ellos. Para ello fue necesario considerar los resultados positivos y negativos obtenidos en tres tipos de análisis de diagnóstico diferentes; RBT, FC y PCR.

7. RESULTADOS

7.1 Localización de Genes Específicos de *Brucella* Spp.

Mediante la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI), se buscaron genes específicos del género *Brucella*, y que estuvieran presentes en las cepas de infección natural o de campo (M16) y en la cepa vacunal (Rev-1), dos genes cumplieron con esta condición, el gen *rpsL* y el *bp26* (Figura 11).

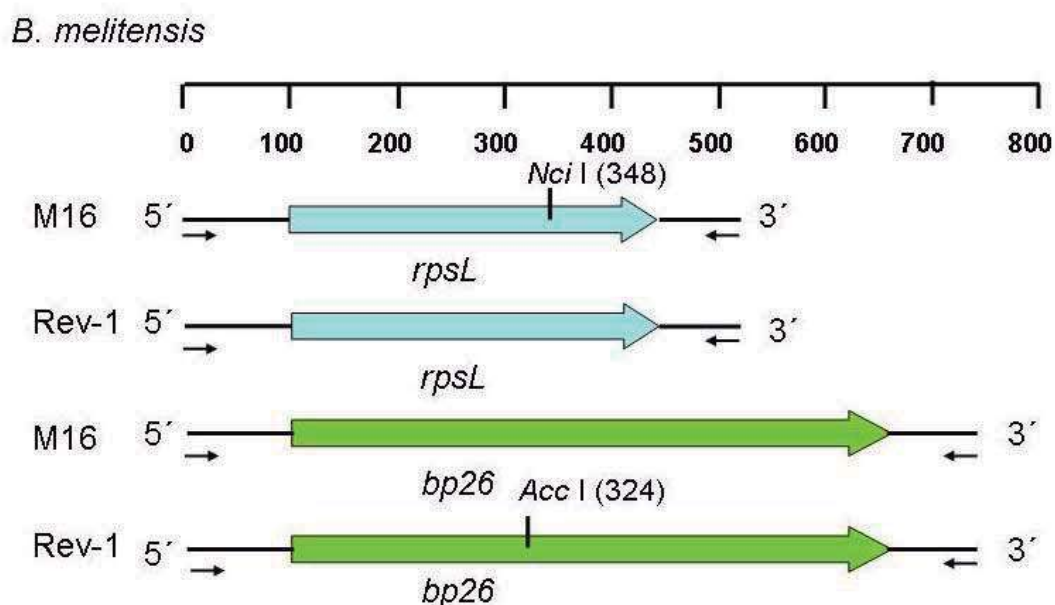


Figura 11. Genes *rpsL* y *bp26* de *B. melitensis*. Representación esquemática a partir de la secuencia de nucleótidos de los genes de *B. melitensis* *rpsL* cepas M16 (No. de acceso AE009518) y Rev-1 (No. de acceso AF448459), y *bp26* cepas M16 (No. de acceso AE009496) y Rev-1 (No. de acceso AY634231). Las flechas indican la localización de oligonucleótidos usados en la PCR. Se indican sitios de restricción con *Nci* I y *Acc* I (modificado de Cloeckeaert et al., 2002a).

La variación en el gen *rpsL* fue reportada por Cloeckeaert y colaboradores en el 2002. La mutación presumiblemente se generó en los múltiples pasos requeridos para obtener la cepa Rev-1, la cual es resistente a estreptomycin (Cloeckeaert et al., 2002a). Este gen consta de 510 pb, y en la cepa Rev-1 presenta una mutación comparada con la cepa de referencia M16 en el codon 91 al cambiar CCG por CTG.

Permitiendo un cambio en el aminoácido Pro a Leu, que provoca la resistencia a estreptomicina, como se ha confirmado en *B. melitensis* y otras bacterias (Toivonen et al., 1999).

La proteína BP26, también llamada CP28 y Omp28, ha sido identificada como un antígeno inmunodominante de *Brucella* en bovinos, ovejas, cabras, y seres humanos infectados (Cloeckert et al., 1996; Lindler et al., 1996; Rossetti et al., 1996). Rossetti y colaboradores (1996) publicaron la secuencia de nucleótidos del gen *bp26*.

La BP26 es una proteína de membrana externa (OMPs) de *Brucella* spp., inmunogenos sin LPS utilizados con propósitos de vacunación y diagnóstico, también conocidos como antígenos (Cloeckert et al., 2002a; Ficht et al., 1996)

En el 2002 Cloeckert y colaboradores reportaron una mutación en el gen *rpsL* de la cepa vacunal Rev-1 en comparación de la cepa de referencia M16, la cual resultaba en la carencia de un sitio de restricción *NciI* solamente en el gene de la cepa Rev-1 (Cloeckert et al., 2002a), por tanto se decidió trabajar sobre el gen *bp26*.

El análisis Blast del gen *bp26* muestra una alta homología con otros genes del género *Brucella* arrojando valores de $E = 0.0$ (Figura 12). Se encontraron similitudes con genes de otros organismos como *Mesohorizobium* y *Burkholderia*, pero con un valor de $E > 0.05$, lo que significa que la homología es muy baja. Por tanto, el diseño de oligonucleótidos basado en este gen permitirá la amplificación exclusiva del mismo, logrando una detección específica del género.

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY634231.1	Brucella melitensis strain Rev1 Omp28 precursor (omp28) gene, complete cds	1493	1493	100%	0.0	100%	
AY166765.1	Brucella melitensis biovar Abortus strain C68 BP26 (bp26) gene, complete cds	1477	1477	100%	0.0	99%	
AY166764.1	Brucella melitensis biovar Abortus strain 870 BP26 (bp26) gene, complete cds	1477	1477	100%	0.0	99%	
AY166763.1	Brucella melitensis biovar Abortus strain B3196 BP26 (bp26) gene, complete cds	1477	1477	100%	0.0	99%	
AY166762.1	Brucella melitensis biovar Abortus strain 292 BP26 (bp26) gene, complete cds	1477	1477	100%	0.0	99%	G
AY166760.1	Brucella melitensis biovar Abortus strain 86/8/59 BP26 (bp26) gene, complete cds	1477	1477	100%	0.0	99%	
AY166759.1	Brucella melitensis biovar Abortus strain 544 BP26 (bp26) gene, complete cds	1477	1477	100%	0.0	99%	
AE009496.1	Brucella melitensis 16M chromosome I, section 53 of 195 of the complete sequence	1477	1477	100%	0.0	99%	G
AF242534.1	Brucella sp. B14/94 Bp26 (bp26) gene, complete cds; and insertion sequence IS711, complete sequence	1477	1477	100%	0.0	99%	
AF242533.1	Brucella sp. B1/94 Bp26 (bp26) gene, complete cds; and insertion sequence IS711, complete sequence	1477	1477	100%	0.0	99%	
AF242532.1	Brucella sp. B2/94 Bp26 (bp26) gene, complete cds; and insertion sequence IS711, complete sequence	1477	1477	100%	0.0	99%	
AB126349.1	Brucella sp. JM13/00 bp26 gene for outer membrane protein Bp26, complete cds	1477	1477	100%	0.0	99%	
AE017223.1	Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 chromosome I, complete sequence	1477	1477	100%	0.0	99%	
U45996.1	Brucella melitensis bp26 gene, complete cds	1477	1477	100%	0.0	99%	
U30815.1	Brucella melitensis outer membrane protein Omp28 precursor (omp28) gene, complete cds	1477	1477	100%	0.0	99%	
AE014291.4	Brucella suis 1330 chromosome I, complete sequence	1469	1469	100%	0.0	99%	
AY166769.1	Brucella melitensis biovar Ovis strain 63/290 BP26 (bp26) gene, complete cds	1469	1469	100%	0.0	99%	
AY166768.1	Brucella melitensis biovar Suis strain 1330 BP26 (bp26) gene, complete cds	1469	1469	100%	0.0	99%	
AY166767.1	Brucella melitensis biovar Abortus strain RB51 BP26 (bp26) gene, complete cds	1469	1469	100%	0.0	99%	
AY166766.1	Brucella melitensis biovar Abortus strain S19 BP26 (bp26) gene, complete cds	1469	1469	100%	0.0	99%	
AY166761.1	Brucella melitensis biovar Abortus strain Tulya BP26 (bp26) gene, complete cds	1469	1469	100%	0.0	99%	
AM040264.1	Brucella melitensis biovar Abortus 2308 chromosome I, complete sequence, strain 2308	1469	1469	100%	0.0	99%	
DQ295027.1	Brucella sp. SSO-1 BP26 gene, partial cds	1378	1378	93%	0.0	99%	
Z54148.1	B.abortus bp26 gene	948	1384	100%	0.0	99%	
BA000012.4	Mesorhizobium loti MAFF303099 DNA, complete genome	48.1	48.1	7%	0.050	85%	
AE014296.4	Drosophila melanogaster chromosome 3L, complete sequence	46.1	46.1	3%	0.20	100%	E
AC010059.6	Drosophila melanogaster 3L BAC RP98-17A14 (Roswell Park Cancer Institute Drosophila BAC Library) complete sequence	46.1	46.1	3%	0.20	100%	
CP000547.1	Burkholderia mallei NCTC 10247 chromosome I, complete sequence	44.1	44.1	2%	0.78	100%	
CP000573.1	Burkholderia pseudomallei 1106a chromosome II, complete sequence	44.1	44.1	2%	0.78	100%	
CP000571.1	Burkholderia pseudomallei 668 chromosome II, complete sequence	44.1	44.1	2%	0.78	100%	
CP000545.1	Burkholderia mallei NCTC 10229 chromosome I, complete sequence	44.1	44.1	2%	0.78	100%	
CP000525.1	Burkholderia mallei SAVP1 chromosome I, complete sequence	44.1	44.1	2%	0.78	100%	
CP000319.1	Nitrobacter hamburgensis X14, complete genome	44.1	44.1	2%	0.78	100%	
CP000125.1	Burkholderia pseudomallei 1710b chromosome II, complete sequence	44.1	44.1	2%	0.78	100%	
AE016818.1	Ashbya gossypii (= Eremothecium gossypii) ATCC 10895 chromosome V, complete sequence	44.1	44.1	2%	0.78	100%	
CP000011.2	Burkholderia mallei ATCC 23344 chromosome 2, complete sequence	44.1	44.1	2%	0.78	100%	

Figura 12. Alineamiento de *B. melitensis* cepa Rev-1. Alineamiento realizado por medio del Blast usando como sonda la secuencia de *B. melitensis* Rev-1 (No. de acceso AY 448459).

7.2 Diseño de Oligonucleótidos para el gen *omp28*

Se seleccionó para amplificar al gen *BP26*, diseñándose seis oligonucleótidos (Tabla 1), tres de ellos en sentido y tres en antisentido.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen *bp26* de *B. melitensis*.

NOMBRE	UBICACIÓN	SECUENCIA	No. BASES	T _m (° C)
Omp28f1	63-77	TTTCAGCCTGCCCCGC	15	55.9
Omp28f2	64-77	TTCAGCCTGCCCCGC	14	53.35
Omp28f3	68-83	GCCTGCCCCGCTTTTCGC	16	63.0
Omp28r3	690-703	CTGCGGCAATCGGC	14	54.0
Omp28r2	644-657	TCTGAACTGTCCGC	14	38.0
Omp28r3	699-714	GCTGTTTCGCCTGCG	16	56.0

La conjugación de los 6 oligonucleótidos resultó en 9 pares, que se analizaron para verificar que no forman estructuras secundarias como pasadores, dímeros, repeticiones, asas etc. Así, el par de oligonucleótidos que presentaron la mayor estabilidad energética con valores que oscilan entre ΔG -30.3 kcal/mol a ΔG -31.06 kcal/mol dependiendo del tipo de prueba a utilizar, fueron omp28f1/omp28r3. Para determinar la especificidad de estos oligonucleótidos, se realizaron múltiples PCR virtuales con éste par de oligonucleótidos contra los genomas de diversos procariontes (*Yersinia enterocolítica*, *Escherichia Coli*, *Salmonella*, *Octrobacter anthropi*, *Mesorhizobium loti*, *Drosophila melanogaster*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Ochrobactrum anthropi*, *Nitrobacter hamburgensis* y *Ashbya gossypii*) y los genomas humano y de ratón. Al no obtener amplificación se confirmó que efectivamente los oligonucleótidos diseñados sobre el gen *omp28* son específicos del género *Brucella*.

7.3 Determinación de la Cantidad de ADN en Muestras de Suero Sanguíneo de Cabras

La exactitud y precisión de las concentraciones estimadas de ADN son factores críticos para la eficiencia de las muestras de ADN en el diagnóstico y análisis de secuencias (Kashif et al., 2003). Para determinar la cantidad de ADN contenida en las extracciones se realizaron mediciones con dos espectrofotómetros diferentes y los resultados fueron distintos aún con las mismas muestras. Las mediciones con espectrofotómetro variaban entre 2.9 y 0.174 mg. Por tal motivo se determinó utilizar un método de cuantificación de ADN fluorométrico.

Para determinar la concentración de ADN por fluorescencia, se utilizó una sustancia de concentración conocida, seleccionándose el marcador de peso molecular λ Hind III (0.5mg/ml], para realizar una curva de calibración. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó por medio del software Scion Image ver Figura 13. Los resultados fueron reproducidos al utilizar tres mediciones independientes con el mismo marcador de peso molecular (Figura 13).

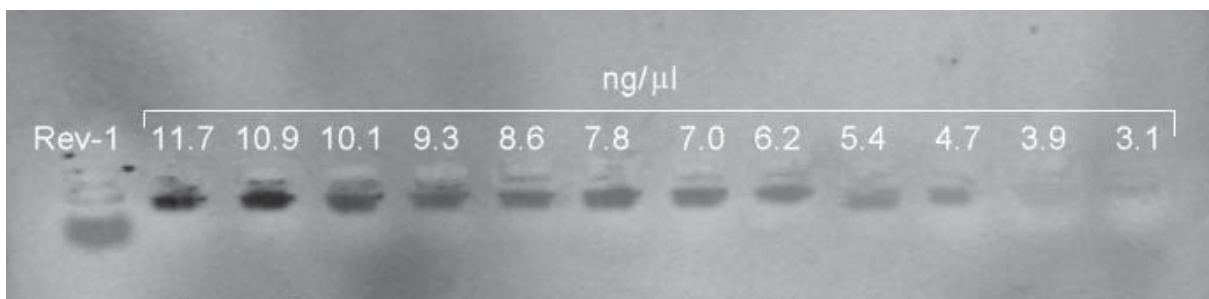


Figura 13. Determinación de concentración de ADN. Fotografía de gel de electroforesis donde se determinó la concentración de ADN. Rev-1 es una muestra de ADN a cuantificar de *B. melitensis* cepa Rev-1. Usando una concentración conocida de λ Hind III se realizó un gradiente de concentración (11.7-3.1 ng/μL). Para este caso, después de análisis fluorométrico con el software Scion Image, se determinó que la fluorescencia de Rev-1 es equivalente a 6.2 ng/μL.

7.4 Establecimiento de Condiciones de PCR para Oligonucléotidos Omp28

Las condiciones óptimas para la amplificación del gen *bp26* se determinaron mediante una PCR en gradiente con temperaturas de 39 a 55° C. Resultó que la mejor amplificación se da entre los 40.1° C y los 42° C (Figura 14), por lo que se repitió el paso anterior usando un gradiente de 38 a 42° C. Volviendo a encontrarse que la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos omp28f1/omp28r3 fue de 40.1° C.

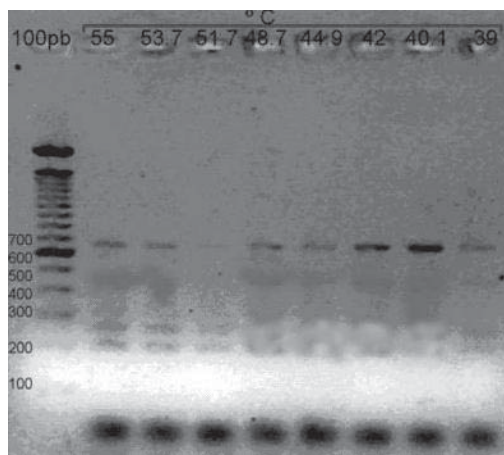


Figura 14. PCR en gradiente de temperatura. En esta PCR se utilizó la misma mezcla de reacción y la misma concentración de ADN de *B. melitensis* Rev-1 en todas las reacciones. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular 100 pb, del carril 2 al 9 lo único que varió fue la temperatura de alineamiento. El carril 8 presenta la mayor amplificación del par de oligonucleótidos omp28f1/omp28r3 (40.1° C).

Para verificar la temperatura de alineamiento en los 40.1° C se realizó la PCR con 200 pg de ADN extraído a dos muestras de suero de cabras infectadas según el resultado de PFC, además se utilizó, por duplicado, el ADN de la cepa Rev-1 como control positivo, y como controles negativos se manejó la mezcla de reacción sin ADN y la extracción de un animal negativo al análisis de PFC (Figura 15).

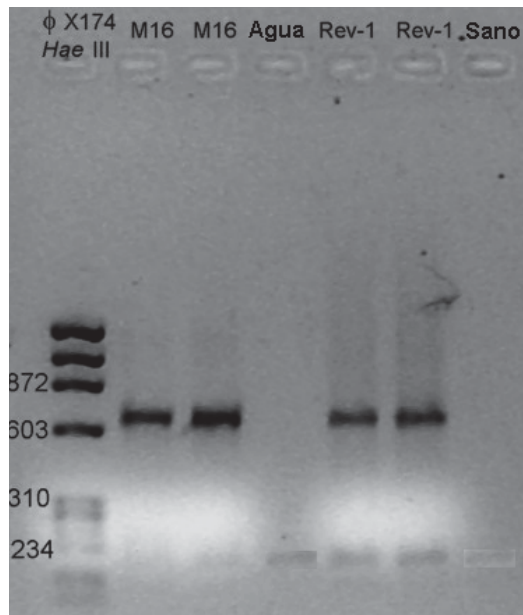


Figura 15. Verificación de temperatura de alineamiento. En la imagen se muestra el producto de amplificación del par de oligonucleótidos omp28f1/omp28r3. En el carril 1 el marcador de peso molecular ϕ X174 *Hae* III, carriles 2 y 3 ADN de *B. melitensis* M16, carril 4 muestra negativa (sin ADN), carriles 5 y 6 muestras de ADN de *B. melitensis* Rev-1, y finalmente carril 7, una muestra de un animal sano.

Con los resultados obtenidos se comprueba que la temperatura óptima de alineamiento para los oligonucleótidos omp28 fue la de 40.1° C. Y que a la temperatura antes mencionada se produce una sola banda, que es la del tamaño esperado de 652 pb aproximadamente (Figura 15).

7.5 Funcionamiento de Oligonucleótidos B4/B5 y JPF/JPR con Extracciones de ADN por CTAB en Muestras de Suero Sanguíneo.

En la reacción de amplificación por PCR es crucial la calidad y cantidad de la muestra a amplificar, el ADN debe ser lo más puro posible. Brusés y colaboradores (2000), compararon diferentes métodos de extracción, encontrando que la extracción de ADN por CTAB es el mejor, ya que obtienen mayores concentraciones de ADN, así como elevados factores de pureza (Brusés et al., 2000).

Para obtener una mayor cantidad de ADN y un contenido mínimo de impurezas (tanto proteínas como lípidos), se realizó una extracción con solventes que purifican el ADN, como es el caso de la utilización del CTAB. Utilizando la Proteinasa K para disgregar las membranas y un detergente con propiedades específicas como el CTAB (Brusés et al., 2000). Se ha observado que con métodos comerciales la banda de ADN no puede ser visualizada o es muy tenue, a diferencia del método CTAB donde se observa más nítidamente (Brusés et al., 2000).

Para simplificar el método de extracción y hacerlo más rápido, ahorrando tiempo, y evitar impurezas que inhiban la PCR tales como la hemoglobina, EDTA, SDS, heparina y grupos heme (Zerva et al., 2001), se realizaron las extracciones de ADN de *Brucella* a partir de sangre de cabra sin anticoagulante. Con esas extracciones se utilizaron los pares de oligonucleótidos Bru1/Bru3 (Leal-Klevezas et al., 2000) y B4/B5 (Baily et al., 1992) y omp28f1/omp28r3.

La PCR fue empleada para el diagnóstico de brucelosis en cabras con muestras de sangre entera utilizando heparina o citrato de sodio como anticoagulante (Leal-Klevezas et al., 2000). Ellos utilizaron el par de oligonucleótidos (Bru 1/Bru3), que amplifican regiones homologas de un gen que codifica a la proteína de membrana externa *omp-2* (Figura 16).

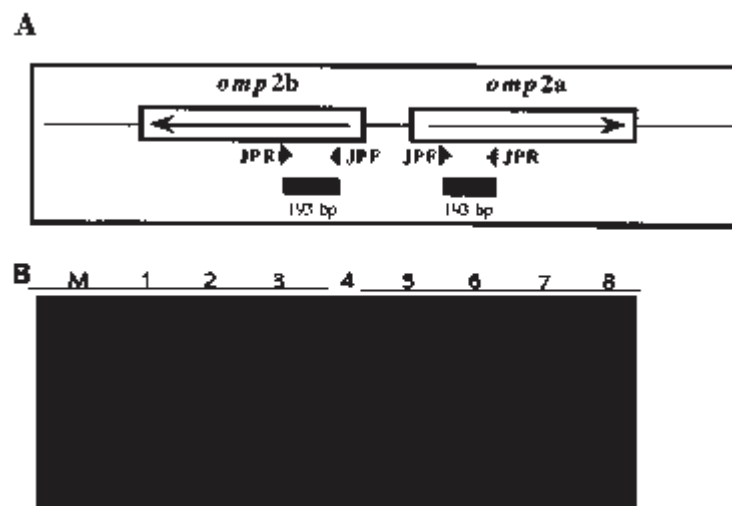


Figura 16. Mapa de amplificación del gen *omp-2* con los primers JPF/JPR y ADN de *Brucella*. (A) Representación

esquemática de las dos copias del gen *omp-2* reportado en *B. abortus*. Las flechas indican la orientación de ambas copias (*omp-2a* y *omp-2b*). Los triángulos representan la posición de los oligonucleótidos JPF/JPR. Los rectángulos oscuros representan los fragmentos amplificados de 193 pb. (B) productos de amplificación de PCR representativos utilizando los oligonucleótidos descritos en el párrafo anterior, ADN de *B. melitensis* Rev-1 (carril 1), *B. melitensis* cepa M16 (carril 2), *B. melitensis* biovar 2 (carril 3), *B. melitensis* biovar 3 (carril 4), *B. abortus* biovar 1 (carril 5), *O. anthropi* (carril 6), leche de cabra infectada naturalmente (carril 7) y sangre de cabra infectada con *B. melitensis* biovar 1 (carril 8). En el carril M pBR322 digerida con *AluI* (Leal-Klevezas et al., 1995).

Debido a que, hasta el momento, no se ha realizado el diagnóstico de brucelosis en cabras con el ADN extraído de suero sanguíneo sin anticoagulante mediante el método de CTAB, se realizó el diagnóstico de cabras que resultaron positivas a la PRB utilizando los oligonucleótidos JPF/JPR o Bru1/Bru3 (Leal-Klevezas et al., 2000). La reacción fue con el perfil de amplificación reportado: 94 °C por 4 min, 35 ciclos a 94 °C por 60 s, 60 °C por 60 s y 72 °C por 60 s (Figura 17).

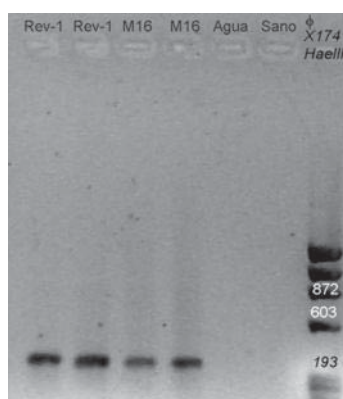


Figura 17. PCR con oligonucleótidos Bru 1/Bru3. En la imagen amplificación con oligonucleótidos JPF/JPR o Bru1/Bru3; carriles 1 y 2 ADN de *B. melitensis* rev-1, carriles 3 y 4 ADN de *B. melitensis* M16, carril 5 mezcla de reacción sin ADN (sólo agua), carril 6 ADN de individuo sano y carril 7 marcador de peso molecular.

Se han desarrollado diagnósticos específicos para brucelosis directamente de sangre entera con EDTA como anticoagulante (Ghassan et al., 1996). Ellos utilizaron un diagnóstico basado en la PCR con los oligonucleótidos que amplifican una región de 223 pb de la secuencia que codifica una proteína inmunogénica de *B. abortus*, la BCSP 31 (Baily et al., 1992).

Utilizando las mismas muestras de suero sanguíneo (sangre sin anticoagulante) de cabras que resultaron positivas a la PRB se utilizaron los oligonucleótidos B4/B5

(Baily et al., 1992). La reacción se desarrolló con el perfil de amplificación reportado: 93 °C por 5 min, 40 ciclos a 90 °C por 60 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 60 s (Figura 18).

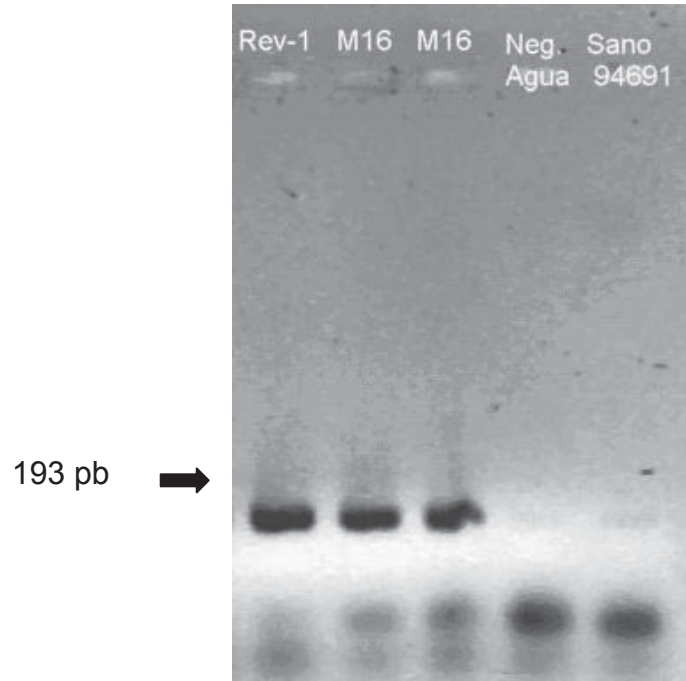


Figura 18. PCR con oligonucleótidos B4/B5. Fotografía de gel con la amplificación con oligonucleótidos B4/B5 (Baily et al., 1992); carril 1 ADN de *B. melitensis* Rev-1, carriles 2 y 3 ADN de *B. melitensis* M16, carril 4 mezcla de reacción sin ADN, carril 5 ADN extraído de un individuo sano. El producto de amplificación es de aproximadamente 223 pb.

Los resultados anteriores (Figura 18) nos demuestran que la extracción de ADN de *Brucella* por el método CTAB en sangre de cabras sin anticoagulante sí es factible, y que efectivamente los protocolos probados si se pueden acoplar a éste tipo de muestras, ya que los dos protocolos utilizados habían sido probados en la PCR con muestras de sangre entera.

7.5.1 Prueba de umbral de detección de ADN

El umbral de detección es la cantidad mínima de ADN que se utiliza en una PCR, en teoría se espera que una sólo molécula blanco aumente exponencialmente. Aunque, debemos recordar que en la práctica la eficiencia de la reacción no es del 100%, por

tanto es importante considerar la cantidad mínima de ADN necesaria para iniciar una PCR (Sachse y Frey, 2003).

Una vez acoplados los protocolos para PCR reportados por Leal-Klevezas y colaboradores (2000) y Baily y colaboradores (1992) a la extracción de ADN a partir de muestras de suero sanguíneo de cabras infectadas del SPOEM, se realizó una prueba de umbral de detección de ADN entre los pares de oligonucleótidos reportados por los investigadores antes citados y el par omp28f1/omp28r3. Además, los resultados de dicha prueba fueron contrastados a otros publicados con anterioridad en donde se utilizó sangre con anticoagulante (Figura 19).

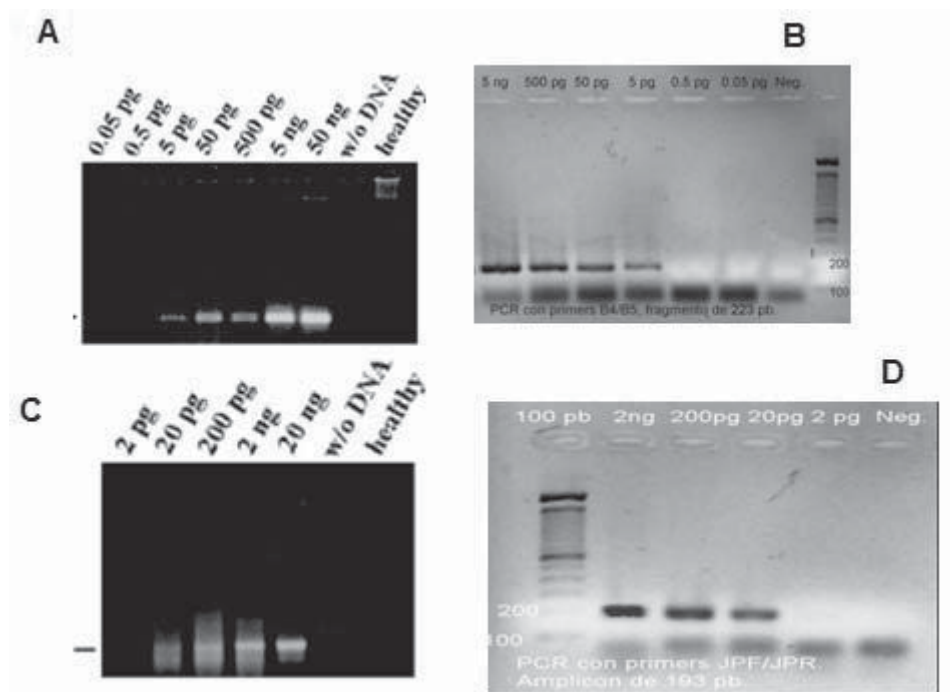


Figura 19. Umbral de detección de ADN de *Brucella* spp. con los pares de oligonucleótidos B4/B5 y JPF/JPR (Bru1/Bru3). (A) Amplificación con oligonucleótidos B4/B5 de un fragmento de 223 pb realizada por Navarro et al (2002). (B) Amplificación obtenida con el par de oligonucleótidos B4/B5. (C) Resultados de Navarro et al. (2002), con oligonucleótidos JPF/JPR que amplifican un fragmento de 193 pb. (D). Amplificación con oligonucleótidos JPF/JPR. El negativo es un control con agua en las imágenes B y D, además el marcador de peso molecular utilizado fue el 100 pb.

Como resultado de las PCR con los diferentes pares de oligonucleótidos se

determinó que el par B4/B5 (Baily et al., 1992) tuvo el umbral de detección más alto al detectar 5 pg de ADN. Este resultado es concomitante con lo reportado por Navarro y colaboradores (2002) [Figura 19 A]. El par JPF/JPR (Bru1/Bru3) detectó hasta 20 pg de ADN en concordancia a lo reportado por los mismos autores (Figura 19 C). El par omp28f1/omp28r3 presentó un umbral de detección de 20 pg de ADN, similar a lo desplegado por el JPF/JPR (Figura 20).

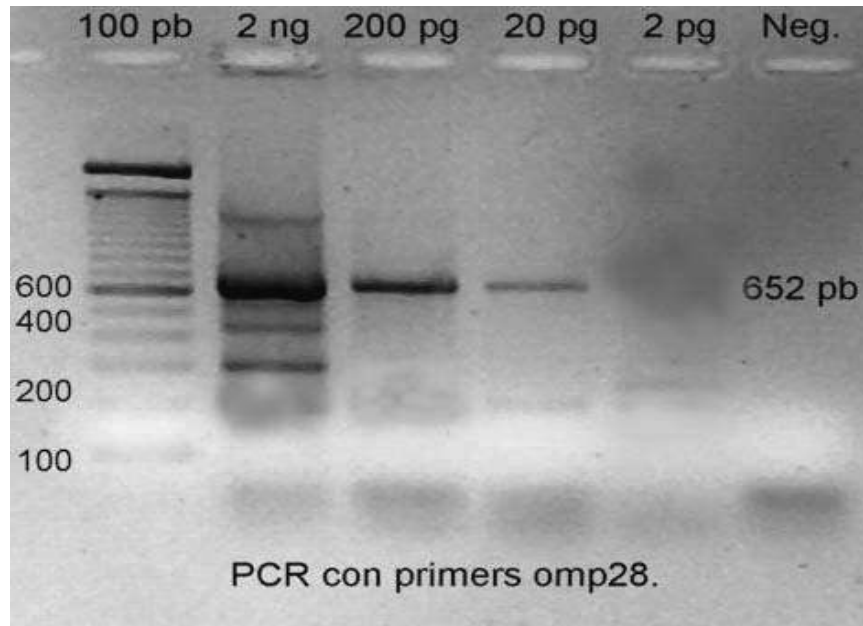


Figura 20. Umbral de detección del par de oligonucleótidos omp28f1/omp28r3. La imagen anterior muestra la sensibilidad obtenida por el par de oligonucleótidos omp28f1/omp28r3.

Además existen otros reportes del umbral de detección para los oligonucleótidos B4/B5, los que mencionan que la detección se da por debajo de los 80 pg (Fekete et al., 1990).

Para entender la cantidad de ADN detectada en cuanto al número de células, se calcula que 20 células contienen entre 60-100 fg de ADN (Fekete et al., 1990). La sangre de animales con aborto espontáneo presenta aproximadamente 2.1×10^4 UFC/ml (Newby et al., 2003), lo que equivaldría a 105 pg de ADN bacterial, y sí los oligonucleótidos omp28f1/omp28r3 detectan 20 pg de ADN (el equivalente a 4,000 células) significa que las extracciones por CTAB tiene 5 veces mayor cantidad de

DNA que la necesaria para el diagnóstico.

7.5.2 Comparación de la eficiencia en el diagnóstico entre los métodos serológicos y PCR en Muestras de Campo.

Se analizaron 150 muestras de suero sanguíneo de cabras que fueron positivas a la PRB, las que a su vez se sometieron a las PFC y PCR (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidad de casos positivos y negativos por tipo de análisis diagnóstico.

ANÁLISIS	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
RB	150	0	150
FC	113	37	150
PCR	108	42	150

Si entendemos como sensibilidad el porcentaje de animales positivos a PFC y positivos en otra prueba diagnóstica. Y por especificidad el porcentaje de animales negativos a PFC y negativos en otra prueba diagnóstica (Ferreira et al., 2003), entonces para nuestro ensayo tenemos los siguientes valores (Tabla 3).

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad obtenidas después del análisis de 150 muestras de suero sanguíneo de cabra.

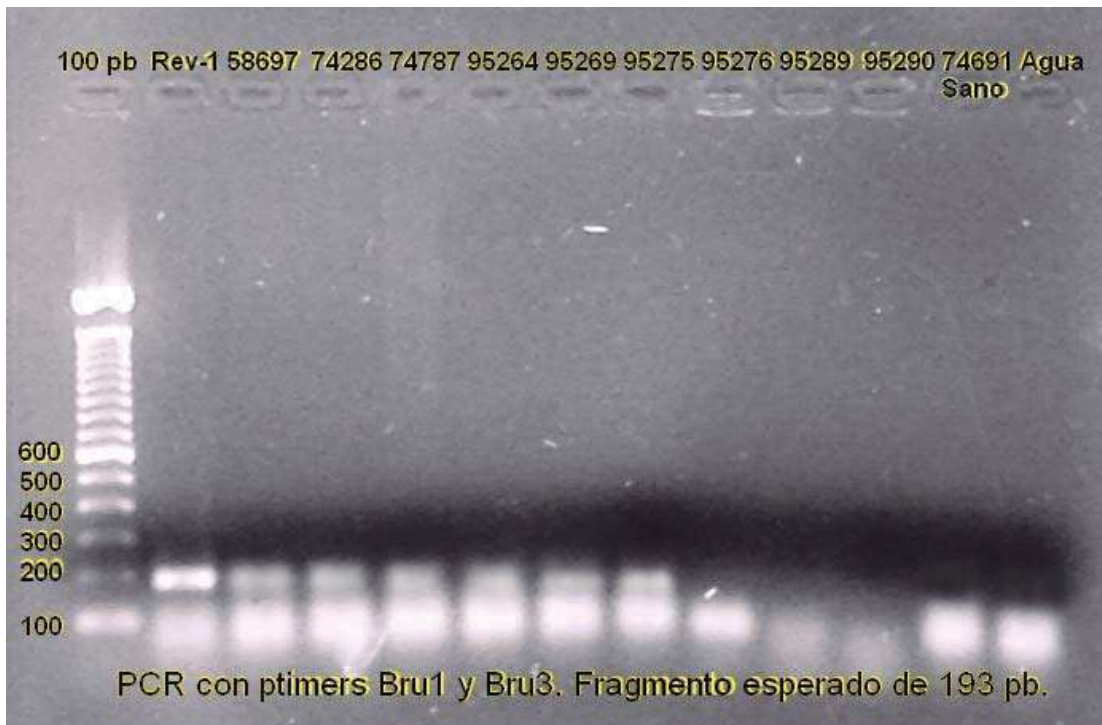
ÍNDICES	RB	FC	PCR
SENSIBILIDAD⁽¹⁾	100 %	100 %	97 %
ESPECIFICIDAD⁽²⁾	75 %	100 %	100 %

- (1) la sensibilidad fue calculada como el porcentaje de animales positivos a FC y positivos en otra prueba diagnóstica.
- (2) la especificidad fue calculada como el porcentaje de animales negativos a FC y negativos en otra prueba diagnóstica. (Ferreira et al., 2003)

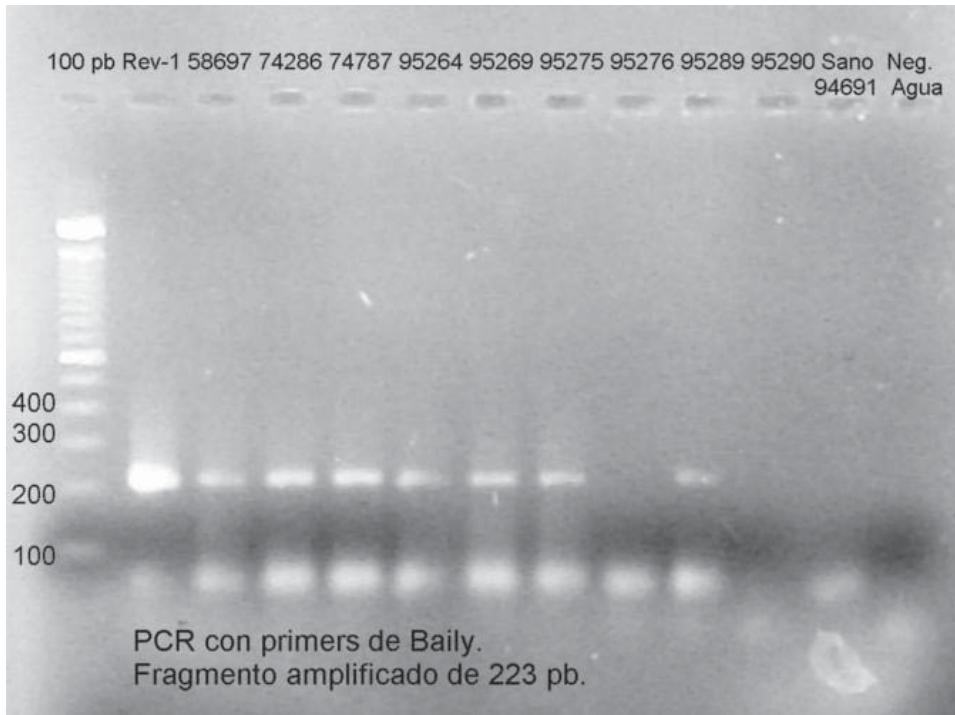
Los porcentajes de sensibilidad utilizando PCR para el diagnóstico de brucelosis obtenidos por otros investigadores han sido variados, en sangre con anticoagulantes se ha reportado un índice de 87% de detección (Leal-Klevezas et al., 2000), en sangre entera de humanos se reportado una sensibilidad del 94 % (Zerva et al., 2001), en ambos casos las especificidad fue del 100%.

Los análisis de PCR efectuados fueron en total 450; ya que de las 150 muestras positivas a RB se efectuaron tres análisis con diferentes pares de oligonucleótidos; B4/B5 (Baily et al., 1992), JPF/JPR (Leal-Klevezas et al., 2000) y omp28f1/omp28r3, para verificar si variaba la sensibilidad de la prueba (Figura 21).

A



B



C

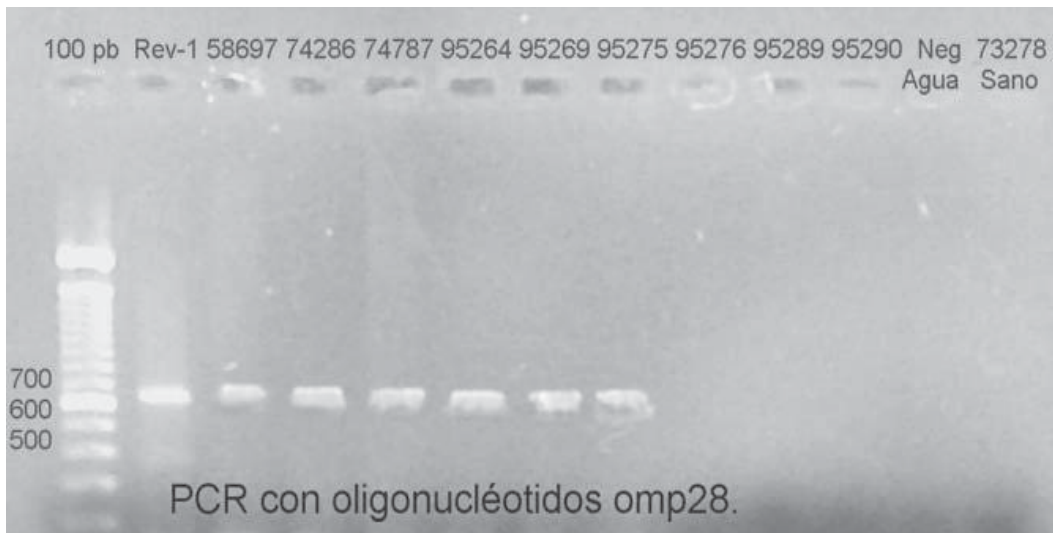


Figura 21. Muestra representativa de los 450 análisis de PCR. A) Resultados obtenidos con los oligonucleótidos JPF/JPR (Leal-Klevezas et al., 2000). B) Resultados obtenidos con los oligonucleótidos B4/B5 (Baily. et al, 1992). C) Resultados de PCR con los oligonucleótidos omp28f1/omp28r3. En los geles A, B y C en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (100 pb), en el carril 2 el control positivo (*B. melitensis* Rev-1), en los carriles 3 al 11 las muestras de los mismos animales, en el carril 12 ADN extraído de un animal sano, y en el carril 13 sin₅₆

ADN (controles negativos).

Los resultados positivos con los pares de oligonucleótidos omp28f1/omp28r3 fueron 108, mismos resultados obtenidos con los pares JPF/JPR (Figura 21 C y A). Los casos positivos con el par B4/B5 fueron en total 110. El resultado no es sorprendente, ya que como vimos en la prueba de umbral de detección de ADN, y según otros reportes, los oligonucleótidos B4/B5 son más sensibles (Figura 21 B).

7.5.3 Análisis estadístico de resultados

Para verificar la confiabilidad de los resultados se aplicó un análisis estadístico por medio de la prueba de Chi cuadrada (X^2). El valor de X^2 expresa las diferencias entre las frecuencias esperadas y observadas de positivos y negativos, siempre y cuando los métodos dieran resultados estadísticamente similares. Ésta prueba estadística inicia con la obtención del valor de Chi cuadrada de tablas previamente calculadas, en este caso para dos grados de libertad es igual a 13.815 y un índice de confianza de 99.999% ($p < 0.001$) [Toma et al., 1999], para el valor máximo de X^2 permisible sin aceptar diferencias entre métodos. El valor de X^2 obtenido para la comparación de los tres métodos fue de: 48.48. Lo que significa, una vez analizada la frecuencia de las observaciones, que los casos positivos vistos para cada análisis es completamente al azar, sin que existan otro tipo de factores en su distribución ($48.49 > 13.815$, $p < 0.001$).

Para comparar los positivos observados en las pruebas de PFC y PCR, se obtiene una Chi cuadrada de tablas con un grado de libertad igual a 10.827 con una confianza de 99.999 % ($p < 0.001$).

Para este caso se consideran dos hipótesis; 1) La hipótesis nula (H_0); “Los casos positivos obtenidos por FC son iguales a los observados por PCR”. 2) La hipótesis alterna (H_a); “El número de casos positivos presentados no son similares a los presentados por PCR”. Puesto que la Chi cuadrada calculada es 0.43 se acepta la hipótesis nula con una probabilidad del 99.99%. Por lo que la diferencia de positivos observados entre FC y PCR no es estadísticamente significativa (X^2 calculada =

0.43 < 10.827 [$p < 0.001$]). Lo que nos da la certeza que la frecuencia de positivos observados para FC es igual estadísticamente a la frecuencia de positivos obtenidos por PCR.

El mismo análisis estadístico para PRB y PFC, obtiene que la diferencia de positivos observados 150 y 113, respectivamente, sí es estadísticamente significativa, con una certeza del 99.99%, ya que la X^2 calculada es mayor (42.20) que la de tablas (10.82).

8. DISCUSIÓN

La brucelosis es una enfermedad de importancia en la salud pública, además de causar pérdidas económicas en la producción pecuaria en el mundo entero (Srinand et al., 2000), en México la enfermedad es endémica (Luna-Martínez y Mejía-Terán, 2002). Su control depende de un método confiable, rápido y económico para la identificación de la *Brucella* en ganado, animales salvajes y humanos (Bricker, 2002a).

En México el diagnóstico obliga dos pruebas (Norma Oficial Mexicana, 1994); una tamiz o de escrutinio, en la cual la sensibilidad es crucial y por tanto se permiten algunos falsos positivos, con la finalidad de detectar a todos los animales enfermos. El segundo diagnóstico identifica los casos falsos positivos, que se deben al principio serológico del diagnóstico, y que son por reacciones cruzadas con otros patógenos y por la presencia de anticuerpos vacunales (Bricker 2002a). La mayoría de la información disponible para el diagnóstico y control de la brucelosis es sobre *B. abortus* en ganado bovino. En contraste, la información en pequeños rumiantes y *B. melitensis* no es abundante (Refai, 2003).

El diagnóstico por métodos moleculares requiere de muestras que aporten la cantidad adecuada de ADN del agente causal, aunque la naturaleza parasitaria de la *Brucella* y la focalización de la enfermedad, pueden dificultar la obtención del ADN (Ruiz-Mesa et al., 2005). Como se demostró en el presente trabajo, el método CTAB de extracción de ADN fue adecuado para el diagnóstico de brucelosis por PCR. Permitiendo que el análisis de PCR sea tan sensible y específica que la PFC y

PRB, pero mucho más específica que la PRB. Además, se demostró que para conseguir esto último es necesario utilizar sangre sin anticoagulante (suero sanguíneo) para la obtención del ADN de *Brucella*, y así lograr los mejores resultados, ya que según algunos reportes el suero sanguíneo es la mejor muestra para el diagnóstico por PCR, simplificando el procedimiento de la extracción, y acortando el tiempo del mismo (Zerva et al., 2001). En 2001, Zerva y colaboradores obtuvieron índices de sensibilidad del 94% con suero sanguíneo y del 61% con sangre entera, en ambas muestras la especificidad fue excelente.

De gran importancia fue encontrar que el diagnóstico molecular se puede desarrollar sin que la toma de muestras requiera de anticoagulante. Esto facilita la implementación de esta técnica en los organismos gubernamentales encargados del control de la brucelosis al reducir los costos de operación. Los resultados obtenidos durante el presente trabajo muestran una eficiencia superior a los estudios realizados por Zerva y colaboradores (2001).

En cuanto al par de oligonucleótidos a utilizar en la amplificación existen dos que han sido reportados y ampliamente utilizados para la identificación de *Brucella* spp.: B4/B5 (Baily et al., 1992) y JPF/JPR (Leal-Klevezas et al., 2000). Ambos pares de oligonucleótidos han demostrado ser muy robustos y confiables en el diagnóstico. Como vimos en el presente trabajo el par omp28f1/omp28r3 logró igualar el desempeño de los oligonucleótidos reportados por Leal-Klevezas y colaboradores (2000), esto se debió al tipo de muestras empleadas (sangre sin anticoagulante) y al método de extracción CTAB para el ADN, ya que los trabajos citados utilizaron sangre con anticoagulante y otros métodos de extracción de ADN.

Se pudiera señalar que los trabajos de los grupos de Baily (1992) y Leal-Klevezas (2000) tienen la desventaja del tamaño de su producto de amplificación, 193 pb y 223 pb, respectivamente. En la práctica la visualización de la amplificación omp28f1/omp28r3 es óptima y sin riesgo de confundirla con los oligonucleótidos y otras partículas pequeñas que puedan ser arrastradas en los geles. Y además, implicar un ahorro sustantivo en su aplicación a gran escala, ya que se utilizarían

geles con una concentración menor de agarosa (0.8 %), que los utilizados de 1.5 a 2% para visualizar fragmentos pequeños. Otra posible ventaja, que debe estudiarse en futuros trabajos, es el sitio de corte que se encuentra en el amplicon de 652 pb producido por el par omp28f1/omp28r3. Este es un sitio de restricción, que según los reportes publicados de la secuencia del gen (Rossetti et al., 1996) se encuentra exclusivamente en la base 324 de la *B. melitensis* cepa Rev-1, y puede darse la restricción con la enzima Accl. Esto, permitiría de ser cierto, la distinción entre animales vacunados y los infectados por otras cepas de *Brucella*. Es necesario que se realicen trabajos futuros para secuenciar los fragmentos obtenidos de las muestras de campo y así poder determinar si es factible la diferenciación en campo entre cepas de infección natural y la vacunal Rev-1.

Del análisis estadístico se concluye que no existe diferencia significativa entre los positivos observados entre PCR y PFC. De ahí se deduce que es factible sustituir la PRB por la PCR en el diagnóstico tamiz o de escrutinio, ya que el total de las muestras analizadas (150) fueron positivas con la primera prueba. Al realizarse una prueba confirmatoria con PFC se obtuvieron 113 positivas a brucelosis, lo que significa que PRB arrojó 37 diagnósticos falso positivos. La PCR obtuvo 108 diagnóstico positivos una diferencia de 5 casos menos que PFC, que la prueba Chi cuadrada no encontró estadísticamente significativo. Si consideramos que se logró una sensibilidad de 100% en las tres pruebas (RBT, PFC y PCR) y que la especificidad de PFC y PCR fue de 100% contra un 75 % de RBT, esto significaría que con RBT se mandaron 37 análisis a la PFC y que con PCR sólo se abrían mandado 5. Lo que conlleva un gran ahorro en las campañas masivas de erradicación y control de la enfermedad. La explicación a estos 5 casos negativos obtenidos de más por la PCR se puede dar si pensamos que ésta prueba diagnóstica no detecta los anticuerpos presentes en los animales, sino la presencia del patógeno, y que los títulos de anticuerpos varían por la vacunación, el estado de la enfermedad (recaídas, recuperación o crónica) y el tiempo de incubación de la enfermedad.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados presentados sugieren que la PCR puede sustituir a la PRB en el análisis de escrutinio o tamiz para detectar a la brucelosis caprina, sin menos cabo de la sensibilidad, pero con mayor especificidad. El diagnóstico de brucelosis por PCR permitiría un ahorro sustancial en el número de resultados falso positivos que son enviados a una segunda prueba confirmatoria.

La utilización de un método eficaz de extracción de ADN como el CTAB, del ADN de procedente de células de *Brucella* en el suero sanguíneo, disminuye el tiempo de realización del análisis y aumenta la eficacia en el diagnóstico.

Por último, la utilización de los oligonucleótidos omp28f1/omp28r3 abren la posibilidad de efectuar un diagnóstico que diferencie entre las cepas de infección natural (M16) y vacunal (Rev-1), esto último con base a futuras investigaciones.

10. REFERENCIAS

Allen CA, Adams LG y Ficht TA (1998) Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infective Immunology*. **66**: 1008-1016.

Alton GG (1996) Duration of the immunity produced in goats by the Rev1 *Brucella melitensis* vaccine. *Journal of Comparative Pathology*. **76**: 241-253.

Alton GG, Jones ZM y Pietz DE (1975) Laboratory techniques in brucellosis. World Health organization, Geneva.

Baily GG, Krahn JB, Drasar S y Stoker NG (1992) Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **95**: 271-275.

Banai M (2002) Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine: laboratory aspects and field observation. *Veterinary Microbiology*. **90**: 497-519.

Blasco JM (1997) A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult a sheep and goats. *Preventive Veterinary Medicine*. **3**: 275-283.

Boschioli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieille C, Lavigne JP, Liaurtard JP, Ramuz M, y O'Callaghan D (2002) Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Veterinary Microbiology*. **90**: 341-348.

Bricker BJ (2002a) Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Veterinary Microbiology*. **90**: 433-434.

Bricker BJ (2002b) PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*. **90**: 435-446.

Bricker BJ y Halling SM (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4,

Brucella melitensis, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal Clinical Microbiology*. **32**:2660–2666.

Brusés BL, Lucero H, Aguirre MV y Gorodner JO. (2000) Comparación de técnicas de extracción de DNA para la detección de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de PCR. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* 2000.

Buck JM, (1930) Studies of vaccination during calthood to prevent bovine infectious abortion. *Journal of Agricultural Research* **41**: 667–689.

Campbell GA, Adams LG, Sowa BA (1994) Mechanism of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **41**: 295-306.

Cloeckaert A, Grayon M y Grépinet O. (2002a) Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsI* gene. *Vaccine*. **20**: 2546-2550.

Cloeckaert A, Vizcaíno N, Yves-Paquet J, Bowdwin RA y Elzer PH (2002b) Major outer membrane proteins of *Brucella* spp. past, present and future. *Veterinary Microbiology*. **90**: 229-247.

Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Zygmunt MS y Grépinet O. (1996) Nucleotide Sequence and Expression of the Gene Encoding the Major 25-Kilodalton Outer Membrane Protein of *Brucella ovis*; Evidence for Antigenic Shift, Compared with Other *Brucella* Species, due to a Deletion in the Gene. *Infection and Immunity*. **64**: 2047-2055.

Corbel MJ (1997) Brucellosis: an overview. *Emergency Infectious Disease*. **3**: 213-221.

Corbel MJ y Brinley-Morgan W (1984). Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173 AL. In: Holt JG, editor. *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 1. Baltimore

(MD) Williams and Wilkins, 377-388.

Da Costa M, Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiebaud M y Dubray G. (1996) Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *Journal Applied Bacteriology*. **81**:267–275.

Dájer-Abimerhi A, Gutiérrez-Ruiz EJ, Zapata-Villalobos D, Honhold N y Villegas-Pérez SL (1995) Comparación de cinco pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* y reporte preliminar del porcentaje de reactores positivos en hatos bovinos en Yucatán, México. *Revista Biomédica*. **6**: 84-90.

Detilleux PG, Deyoe BL y Cheville NF. (1990) Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infectology and Immunology*. **58**: 2320–2328.

Elberg SS y Faunce KJR (1957) Immunization against *Brucella* infection. VI. immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. *Journal Bacteriology*. **73**:211–7.

Fekete A, Bantle JA, Halling SM y Sanborn MR. (1990) Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*. **69**: 216-227.

Fernández-Prada CM, Zelazowska E, Nikolich M, Hadfield TL, Roop RM, Robertson GL y Hoover D (2003) Interactions between *Brucella melitensis* and Human Phagocytes: Bacterial Surface O-Polysaccharide Inhibits Phagocytosis, Bacterial Killing, and Subsequent Host Cell Apoptosis. *Infection and Immunity*. **7**: 2110-2119.

Ferreira AC, Cardoso R, Travassos-Dias I, Mariano I, Belo A, Rolão-Reto I, Manteigas A, Pina-Fonseca A y Corrêa MI. (2003) Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Veterinary Research*. **34**: 297–305.

Ficht TA (2002) Discovery of *Brucella* virulence mechanisms using mutational

analysis. *Veterinary Microbiology*. **90**: 311-315.

Ficht TA, Hussein HS, Derr J y Bearden SW. (1996) Species-Specific Sequences at the *omp2* Locus of *Brucella* Type Strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **46**: 329-331.

Ghassan MM, Khneisser IA y Abdelnoor AM. (1996) Rapid Laboratory Confirmation of Human Brucellosis by PCR Analysis of a Target Sequence on the 31-Kilodalton *Brucella* Antigen DNA. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**: 477-478.

Gómez-Barreto D y Coria-Lorenzo JJ (2003) Brucellosis. Infectología práctica en el paciente pediátrico. Corporativo intermédica. pág. 34-37.

Gorvel JP y Moreno E (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*. **90**: 281-297.

Gurría TFJ (1998) Importancia de la erradicación de la Brucelosis en México. Conferencia Magistral. En: Luna-Martínez, J. E., Suárez, G. F. (Eds.), III Foro Nacional de Brucelosis. Memorias. SAGAR, CONASAG, FMVZ, UNAM, OPS, México.

Guzmán-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckert A, Garin J, Gorvel J, Moriyon I, Moreno E y Lopez-Goni I (2002) 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. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. **99**: 12375-12380.

Halling SM (2002) Paradigm shifts in vaccine development; lessons learned about antigenicity, pathogenicity and virulence of Brucellae. *Veterinary Microbiology*. **90**: 545-552.

Harmon BC, Adams LG, Templeton JW y Smith R (1989) Macrophage function in mammary glands of *Brucella abortus*-infected cows and cows that resisted infection after of *Brucella abortus*. *American Journal of Veterinary Research*. **50**: 459-465

Herman L y De Ridder H (1992) Identification of *Brucella* spp. Using the Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**: 2099-2101.

Hoyer BH y McCullough NB (1968) Polynucleotide homologies of *Brucella* DNA. *Journal of Bacteriology*. **95**: 444-448.

Jiménez de Bagues MP, Barberan M, Marin CM y Blasco JM (1995) The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*. **13**: 301-304

Jinkyung K y Splitter GA (2003) Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clinical Microbiology Reviews*. **16**: 65-78.

Kashif AH, Pfeiffer RM, Beerman MB, Struewing JP, Chanock SJ y Bergen AW (2003) Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC Biotechnology*. **3**: 4-10. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/20>.

Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, García-Cantú J, López-Merino A y Martínez-Soriano JP (2000) Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. *Veterinary Microbiology*. **75**: 91-97.

Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-Merino A y Martínez-Soriano JP (1995) Single-Step PCR for Detection of *Brucella* spp. from Blood and Milk of Infected Animals. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**: 3087-3090.

Lindler LE, Hadfield TL, Tall BD, Snellings NJ, Rubin FA, Van de Verg LL, Hoover D y Warren RL (1996) Cloning of a *Brucella melitensis* Group 3 Antigen Gene Encoding Omp28, a Protein Recognized by the Humoral Immune Response during Human Brucellosis. *Infection and Immunity*. **6**: 2490-2499.

López-Goñi I, Guzmán-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Moriyón I y Moreno E (2002) Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Veterinary Microbiology*. **90**: 329-339.

López-Merino A y Contreras Rodríguez A. (2001) *Brucella*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. www.microbiología.org.mx/microbiosonline/capitulo10.02/09/06.

Luna-Martínez JE y Mejía-Terán C (2002) Brucellosis in México: current status and trends. *Veterinary Microbiology*. **90**: 19-30.

Martínez-de-Tejada G, Pizarro J, Moreno E, y Morrión I (1995) The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infective Immunology*. **63**: 3054-3061.

Marquis H y Ficht TA (1993) The *omp2* locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. *Infective Immunology*. **61**: 3785-3790.

Matar GM, Khneisser IS y Abdelnoor AM (1996) Rapid Laboratory Confirmation of Human Brucellosis by PCR Analysis of a Target Sequence on the 31-Kilodalton *Brucella* Antigen DNA. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**: 477-478.

Moat AG y Foster JW (1988) *Microbial Physiology*. 2nd. ed. Wiley-Interscience Publication. Canada.

Morata P, Quipo-Ortuño M, y Colmenero JD (1998) Strategy for Optimizing DNA Amplification in a Peripheral Blood PCR Assay Used for Diagnosis of Human Brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**: 24443-2446.

Moreno E y Moriyón I (2002) *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proceedings of the National Academy Science USA*. **99**: 1–3.

Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M y Mayer H (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *proteobacteria*. *Journal of Bacteriology*. **172**: 3569-3576.

Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D y González D (2004) Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. *Veterinary Research*. **35**: 1-38.

Navarro E, Fernández JA y Solera J (1999) PCR Assay for Diagnosis of Human Brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**: 1654-1655.

Navarro E, Escribano J, Fernández JA y Solera J (2002) Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **34**: 147-151.

Newby DT, Hadfield TL y Roberto FF (2003) Real-Time PCR Detection of *Brucella abortus*: a Comparative Study of SYBR Green I, 5'-Exonuclease, and Hybridization Probe Assays. *Applied And Environmental Microbiology*. **69**: 4753-4759.

Nicoletti P (2002) A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology*. **90**: 5-9.

Nielsen K (2002) Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*. **90**: 447-459.

Pacheco HA y Luna-Martínez JE (1999) Identificación de factores de riesgo de Brucelosis como zoonosis en la República Mexicana. LIII Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Salud pública. Monterrey, p. 41.

Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton GR, Van der Goot G, Sola-Landa A, López-Goñi I, Moreno E y Gorvel JP (1998) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of non professional phagocytes. *Infective Immunology*. **66**: 5711-5724

Queipo-Ortuño MI, Morata P, Ocón P, Manchado P y Colmenero JD (1997) Rapid Diagnosis of Human Brucellosis by Peripheral-Blood PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**: 2927-2930.

Rasool O, Freer E, Moreno E, y Jarstrans C (1992) Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human

neutrophils. *Infective Immunology*. **60**: 1699-1702.

Refai M. (2003) Application of biotechnology in the diagnosis and control of brucellosis in the Near East Region. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **19**: 443–449.

Rijpens NP, Jannes G, Van Asabroeck M, Rossau R y Herman L. (1996) Direct Detection of *Brucella* spp. in Raw Milk by PCR and Reverse Hybridization with 16S-23S rRNA Spacer Probes. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 1683- 1688.

Romero C, Gamaz C, Pardo M y López-Goñi I (1995) Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**: 615-617.

Romero C y López-Goñi I (1999) Improved Method for Purification of Bacterial DNA from Bovine Milk for Detection of *Brucella* spp. by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 3735-3737.

Rossetti OL, Arese AI, Boschioli ML y Cravero SL (1996) Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**:165–169.

Ruiz-Mesa JD, Sánchez-Gonzalez J, Reguera JM, Martínez L, Lopez-Palmero S y Colmenero JD (2005) Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. *Clinical Microbiology and Infection*. **11**: 221-225.

Sachse, K. y J. Frey. (2003) PCR Detection of Microbial Pathogens. Humana Press. 216: pp. 334.

Srinand S, Bookout JB, Ringpis F, Perumaalla VS, Ficht TA, Adams LG, Hagius SD, Elzer PH, Bricker BJ, Kumar GK, Rajasekhar M, Isloor S y Barathur RR (2000) A Multiplex Approach to Molecular Detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**: 2602–2610.

Toivonen JM, Boocock MR y Jacobs HT (1999). Modelling in *Escherichia coli* of mutations in mitoribosomal protein S12: novel mutant phenotypes of *rpsL*. *Molecular Microbiology*. **31**:1735–46.

Toma B, Dufour B, Sanna M, Benet JJ Moutou F, Louza A y Ellis P (1999) Applied Veterinary Epidemiology and Control of Disease in Populations. AEEMA, France.

Verger JM, Grimont F, Grimont PDA y Grayon M (1985) *Brucella* a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal Systems Bacteriology*. **35**: 292-295

Verstrete DR y Winter AJ (1984) Comparison of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains. *Infective Immunology*. **46**: 182-187.

Yanagi M y Yamasoto K. (1993) Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiology Letters* **107**:115–120.

Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A y Legakis NJ (2001) Serum Is the Preferred Clinical Specimen for Diagnosis of Human Brucellosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **39**: 1661-1664.