

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA



DETECCION MOLECULAR Y AISLAMIENTO  
DE *Brucella canis* EN PERROS DEL AREA  
METROPOLITANA DE MONTERREY, N. L.

Por

Q.B.P. ARNOLDO AGUIRRE RAMOS

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

DICIEMBRE 2006

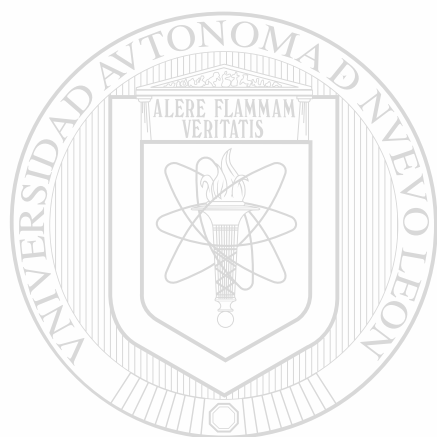
TM

SF991

.A3

2006

c.1



# UANL

---

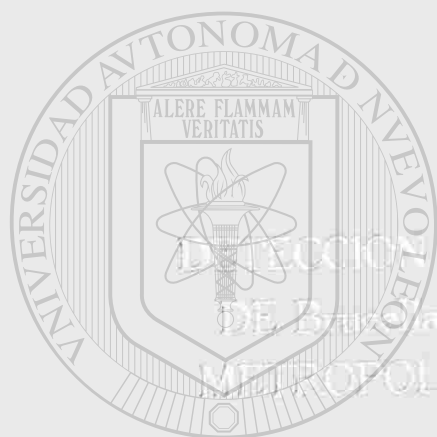
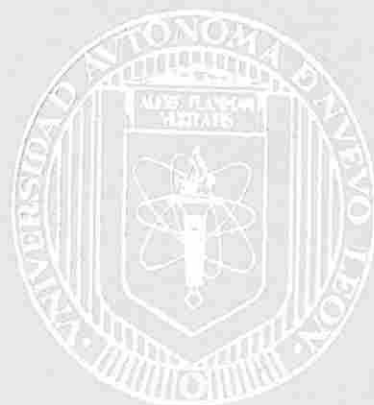
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA



DETECCIÓN MOLECULAR Y AISLAMIENTO  
DE *Brucella canis* EN PERROS DEL ÁREA  
METROPOLITANA DE MONTERREY, N. L.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

®

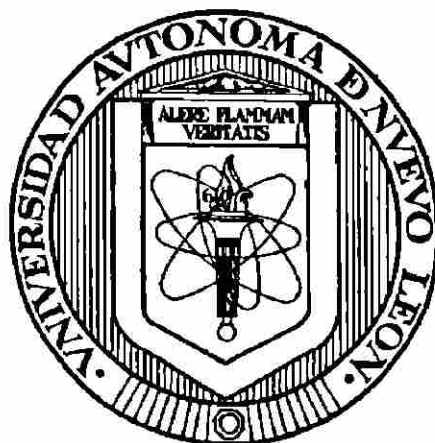
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
Q.B.P. ARNOLDO AGUIRRE RAMOS

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

DICIEMBRE 2006

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**DETECCIÓN MOLECULAR Y AISLAMIENTO DE *Brucella canis* EN  
PERROS DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L.**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

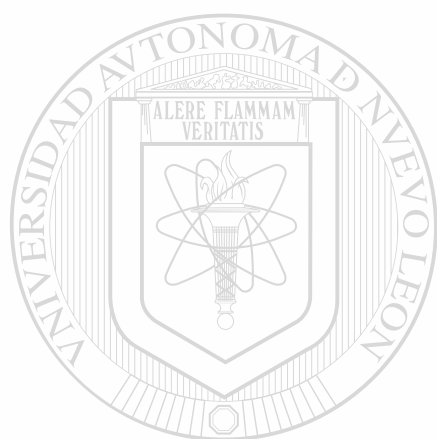
Por

**Q. B. P. ARNOLDO AGUIRRE RAMOS**

**TESIS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**DICIEMBRE 2006**



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



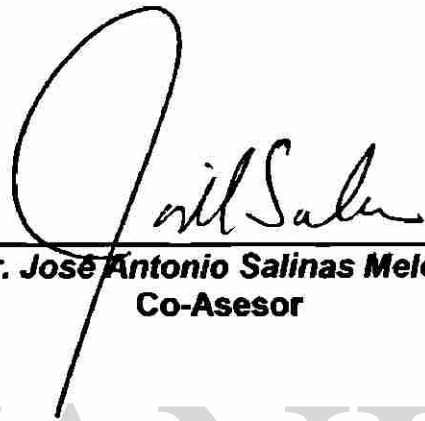
**DETECCIÓN MOLECULAR Y AISLAMIENTO DE *Brucella canis* EN PERROS  
DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L.**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**Dr. Ramiro Avalos Ramirez**  
Asesor Principal



---

**Dr. José Antonio Salinas Meléndez**  
Co-Asesor



---

**Dr. Victor Riojas Valdés**  
Co-Asesor



---

**Dr. Jaime Hernández Escareño**  
Co-Asesor



---

**Dr. Guillermo Dávalos Aránda**  
Co-Asesor

---

**Dr. José C. Segura Correa**  
Co-Asesor externo



---

**Dr. Rafael Ramirez Romero**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**DETECCIÓN MOLECULAR Y AISLAMIENTO DE *Brucella canis* EN PERROS  
DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L.**

**Aprobación de la Tesis:**

**Dr. Ramiro Avalos Ramírez**  
**Asesor Principal**

**Dr. José Antonio Salinas Meléndez**  
**Co-Asesor**

**Dr. Víctor Riojas Valdes**  
**Co-Asesor**

**Dr. Jaime Hernández Escareño**  
**Co-Asesor**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

  
**Dr. Guillermo Dávalos Aránda**  
**Co-Asesor**

**Dr. José Candelaria Segura Correa**  
**Co-Asesor externo**

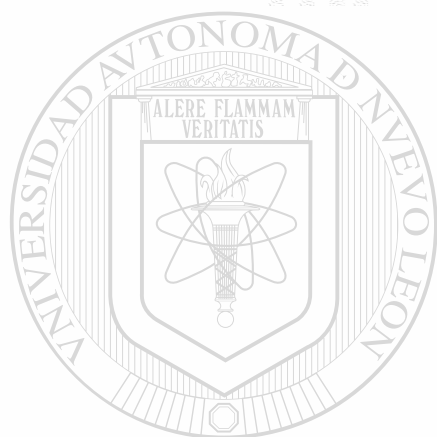
**Dr. Rafael Ramírez Romero**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**



## DEDICATORIA

**A la memoria de:**

**Dr. José Eleuterio González Mendoza**  
**“Gonzalitos”**  
**(1813-1888)**



**U**  
**y** **UANL**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Dr. Eduardo Aguirre Pequeño**  
**(1904-1988)**

**Pilares de la Educación e Investigación**  
**en Nuevo León**

## DEDICATORIA

A la memoria de un buen amigo...

Un excelente padre...

Un buen esposo...

Un buen hijo...

Un hombre trabajador...

Un gran charro...

Así fue...



UANL

---

**Sergio Garza Mier**  
**(26 Febrero 1963-10 Septiembre del 2006)** ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Nos vemos luego Checo...

## DEDICATORIA

*Son malos descubridores los que creen  
que ya no hay tierra  
cuando lo único que ven es mar...*

*Francis Bacon  
(1561-1626)*

Myrna Cecilia, cuando inicié esta empresa tu estabas en los planes de Dios, en mis más inalcanzables deseos y en mis repetidos sueños. Ahora que termino, tu ya estas con nosotros y de una manera muy especial y con un gran e infinito amor, te dedico este escrito...algún día lo entenderás; te amo hijita!!

A mis hijos mayores Arnoldo Valentín y Saúl Eduardo Aguirre Marroquín en quien tengo depositadas todas mis esperanzas de triunfo y éxito en la vida...gracias por sus continuas manifestaciones de apoyo y ánimo que siempre me dieron y por las constantes preguntas de ¿Para cuándo? ¿Ya mero Papá? Mil Gracias hijos !!

Mirna, el sueño de tantas noches y el deseo de mucho tiempo llegó; gracias por ese regalo tan maravilloso que concebiste, gestaste y trajiste al mundo en un momento tan especial y que nos viene a recordar otros tiempos.

Con todo mi amor dedico este trabajo por el cual tu ya pasaste, y gracias por tu amor, paciencia y comprensión de estos veinticinco años.

Con un especial cariño y una profunda admiración, a mis primeros maestros que me condujeron por el camino de la educación y luego del aprendizaje; a mi padre Sr. Arnoldo Aguirre Ramos que me llevó a mi primer día de clases y me enseñó abrocharme los zapatos en el patio de la escuela y a mi madre Sra. María Guadalupe Ramos Salinas de Aguirre que me enseñó a leer y escribir, sumar y restar tiempo antes de entrar a la escuela y de quien todavía ayer aprendí algo nuevo de la vida.

Con un profundo respeto y una gran admiración por ser un ejemplo de personas, maestro, investigador, padres ejemplares y románticos abuelos, al Dr. Jorge Saúl Marroquín de la Fuente que en su período de Director y con la colaboración del Dr. Eduardo Aguirre Pequeño fundara la carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en la Facultad de Ciencias Biológicas, ese fue el primer paso en el destino de nuestras vidas. A Doña Graciela Benita Narvárez Gonzáles de Marroquín, madre de mi esposa y abuela de mis hijos por esa fortaleza inquebrantable y por esa tranquilidad tan envidiable...Gracias por todo!!

Al Lic. Francisco Javier Ramos Salinas, quien me condujo a las puertas de nuestra Alma Matter, la UANL, y muy especialmente a la Facultad de Ciencias Biológicas donde curse la carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. En ocasiones un cambio a tiempo modifica el destino...en Biología encontré el mío.

A mis hermanos Olivia, Daniel, Maximino y Edna y sus respectivas familias por todas las manifestaciones de ánimo expresadas durante este periodo de trabajo.

A mis cuñados Elba, Jorge, Verónica y Sergio Marroquín Narvárez y sus respectivas familias por la gran relación que nos une.

Dedico este escrito a mis amigos y compañeros de laboratorio Alicia Marroquín, Rocío, José Luis, David Domínguez, David Sánchez, Benito, Mariela, Samara, Priscila, Rubén, Jorge, de Tellitu por los momentos compartidos durante los períodos prácticos y por todo el apoyo directo y por las enseñanzas aportadas por ellos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al creador, por haberme permitido poner los pies sobre la tierra y haber mantenido mi cabeza en las estrellas, cambiar a tiempo o a destiempo es mejor que nunca cambiar.

Durante la realización de ésta investigación y la preparación del presente escrito, el tesista recibió innumerables muestras de apoyo y ayuda. Particularmente deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes Instituciones y personas que en una forma desinteresada contribuyeron con asesorías, con equipo y reactivos de laboratorio y económicamente con proyectos especiales.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por su generosidad y la oportunidad recibida a través de la beca otorgada para los estudios de posgrado, gracias por el apoyo brindado durante el presente estudio.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL por haberme dado la oportunidad de superación al permitirme inscribirme como alumno de posgrado en el programa de la Maestría en Ciencias Veterinarias con especialidad en Salud Animal, gracias por todo el apoyo y paciencia que me brindaron.

A la subdirección de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Veterinaria; a todos los Doctores y Maestros que participaron en mi formación durante los estudios de posgrado. Sus clases y conocimientos quedan en un lugar muy especial y sus tutorías y asesorías siempre serán recordadas, gracias maestros por compartir su conocimiento.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL, un agradecimiento muy especial a la Dra. Ana María Rivas por haber compartido parte de sus reactivos y proporcionar las Enzimas de restricción *Ava II* y *Sal I* para los primeros ensayos de la presente investigación.

Al CONACyT por los programas de fortalecimiento y apoyo al posgrado y a la investigación, sus apoyos económicos se transforman en resoluciones a problemas de salud animal y salud pública, gracias por todos los proyectos evaluados y aceptados.

Al Dr. Ramiro Avalos Ramírez, asesor principal, por haber creído en mi y en apostar cuando daban tronchados, Gracias Doc por tu tiempo, por tu enseñanza, dedicación y correcciones tanto prácticas como escritas en el presente trabajo, se que hay más por hacer y espero lo podamos hacer en un buen equipo, por un buen equipo y para un buen equipo.

Al Dr. José Antonio Salinas Meléndez, maestro de la Maestría en Ciencias Veterinarias de la FMVZ-UANL, por haber accedido a ser asesor de éste trabajo y por haber dirigido los primeros anteproyectos de investigación, por su colaboración en este tema, su insistencia y la forma tan usual de invitarnos a investigar y trabajar sin complicaciones, Gracias por eso Toño.

Al Dr. Guillermo Dávalos Aranda, Director de la Facultad de Veterinaria y asesor del presente trabajo, por la confianza y todo el apoyo brindado en los tiempos de realización y terminación de esta investigación y de la que viene en camino, Gracias por tu insistencia y preocupación. A veces iniciar algo no cuesta mucho...terminarlo y proyectarlo es lo difícil.

Al Dr. J Jaime Hernández Escareño por aceptar dirigir esta investigación desde el diseño y métodos, hasta el análisis de los tan esperados resultados,

Gracias Jimy por todos los consejos, escritos y “tips” de trabajo que ofreciste para corregir algunas técnicas y fortalecer otras tantas.

Al Dr. Víctor M. Riojas Valdés, maestro de la Maestría en Ciencias Veterinaria de la FMVZ-UANL, coordinador del Laboratorio de Genética, donde se realizó este trabajo y asesor de ésta investigación, por haberme apoyado desde el inicio del trabajo en la revisión de artículos e interpretación de técnicas de laboratorio hasta los últimos detalles de las tablas del escrito.

Al Dr. José C. Segura Correa asesor externo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán por aceptar dirigir este trabajo y apoyarme incondicionalmente en el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la presente investigación.

Alicia...amiga incansable de todos los que trabajamos en éste laboratorio; como agradecer a quien me enseñó a trabajar la Biología Molecular más de cerca y dedicó parte de su tiempo y sus espacios, material y reactivos, conocimientos y consejos...muy especialmente a mi compañera de maestría MVZ. MC. Alicia Guadalupe Marroquín Cardona a quien le deseo un éxito total en sus estudios de Doctorado...Gracias Chapis !!

Alfredo...la investigación sin literatura no es investigación; de una manera muy especial agradezco al Dr. Alfredo Wong González su desinteresada colaboración directa en este trabajo desde la recopilación de artículos, hasta los correos electrónicos con los protocolos y “tips” necesarios para el desarrollo de algunas técnicas de laboratorio...por todo eso, muchas Gracias !! y deseo todo el éxito para tus estudios de Post Doctorado que ahora realizas en USA. y en la espera que pronto recuperes totalmente tu salud.

Al MVZ. MCV. José Nicolás de Tellitu Schutz, amigo, compañero de maestría y del Laboratorio de Genética que desinteresadamente compartió parte de su material y reactivos. Éxito en la empresa que paralelamente hemos llevado durante los últimos meses.

Al MVZ. David Domínguez Díaz, mi exalumno y ahora compañero del Posgrado de nuestra Facultad de Veterinaria y del Laboratorio de Genética, por todo el apoyo brindado en la elaboración práctica y técnica del presente estudio, gracias por todos esos consejos de trabajo que has compartido.

Quiero agradecer a la compañera pasante de MVZ, Mariela Alejandra Guzmán Méndez por su desinteresada ayuda directa e indirecta que me brindó durante la estancia y parte práctica de esta investigación al compartir espacios, material y reactivos, muchas gracias Mariela, éxito en tu investigación y en tu vida profesional y felicidades por los primeros resultados.

A los evaluadores del Comité de Maestría...

---

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Sibilina Cedillo Rosales por todo su tiempo y paciencia para la lectura, revisión y corrección del presente escrito. Tus comentarios fueron de mucho valor para mejorar el trabajo tanto de contenido como de estructura, tus observaciones sobre los artículos base de esta investigación enriquecieron y abrieron otras puertas para investigaciones futuras... Muchas Gracias Sibi!!

Estoy muy agradecido con el Dr. Francisco Santoyo de Estefano por haberse dado el tiempo de leer minuciosamente el presente escrito, haber enlistado los errores página por página y renglón por renglón, desde la tabla de contenido hasta la última cita bibliográfica y el último apéndice... muchas Gracias Santoyo!!... fueron muy valiosas tus observaciones y correcciones.



## AGRADECIMIENTOS

*...Si el hombre comienza con certidumbres,  
terminará con dudas;  
pero si se contentara en empezar con dudas,  
terminaría con certezas.*

*Francis Bacon*

*(1561-1626)*

Muy especialmente un profundo agradecimiento...

A la familia Aguirre-Marroquín, mi familia, por haber soportado algunos sinsabores, enojos y tristezas cuando las cosas no salían bien; gracias por haber compartido también los buenos momentos que ustedes adivinaban con solo ver mi cara al llegar a casa preguntando luego ¿Ahora si tuviste resultados buenos, verdad papá?

Gracias por ayudarme a cosechar los primeros frutos...valió la pena el cambio de semilla y la buena siembra. Muchas gracias Myrnita, Saúl, Valentín y Mirna por toda su paciencia, comprensión y apoyo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

***“Hice un ramo con las flores***

***de los jardines de otras***

***personas...nada es mío,***

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

***excepto el lazo que las une”***

***Montaigne***

## TABLA DE CONTENIDO

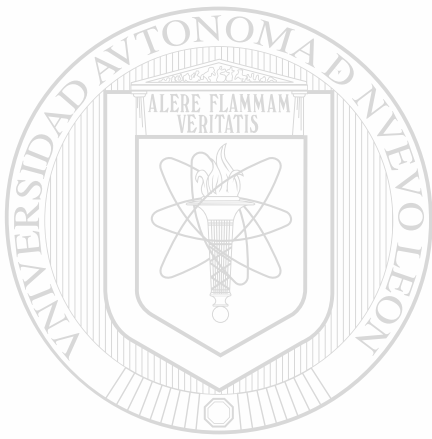
Capítulo		Página
1.	<b>INTRODUCCION.</b> . . . . .	1
1.1	<b>Antecedentes.</b> . . . . .	3
1.1.1	<b>Historia de la Brucelosis.</b> . . . . .	3
1.1.2	<b>Sinonimias de la infección por miembros del género <i>Brucella</i></b> . . . . .	6
1.1.3	<b>Descripción y taxonomía del género <i>Brucella</i></b> . . . . .	6
1.1.4	<b>Agente Etiológico.</b> . . . . .	8
1.1.5	<b>Genética molecular del género <i>Brucella spp.</i></b> . . . . .	9
1.2	<b>Epizootiología.</b> . . . . .	10
1.2.1	<b>Resistencia y sobrevivencia.</b> . . . . .	10
1.2.2	<b>Distribución geográfica.</b> . . . . .	11
1.2.3	<b>Brucelosis canina.</b> . . . . .	13
1.2.3.1	<b>Brucelosis canina en perros causada por <i>Brucella canis.</i></b> . . . . .	13
1.2.3.2	<b>Brucelosis en humanos causada por <i>Brucella canis.</i></b> . . . . .	14
1.2.4	<b>Sensibilidad a la infección por <i>Brucella canis</i> de acuerdo a la raza.</b> . . . . .	15
1.2.5	<b>Transmisión de la <i>Brucella canis</i></b> . . . . .	17
1.2.5.1	<b>Transmisión en el perro.</b> . . . . .	18
1.2.5.2	<b>Transmisión en animales silvestres.</b> . . . . .	19
1.2.5.3	<b>Transmisión al humano.</b> . . . . .	19
1.2.6	<b>Patogenia.</b> . . . . .	20
1.2.7	<b>Diagnóstico.</b> . . . . .	21

Capítulo	Página
1.3 Hipótesis. ....	26
1.4 Objetivos. ....	26
1.5 Metas. ....	26
<b>2. MATERIAL Y METODOS. ....</b>	<b>27</b>
2.1 Lugar de realización de la investigación . . . . .	27
2.2 Muestreo. ....	27
2.2.1 Número de muestras. ....	27
2.2.2. Obtención de la muestra. ....	28
2.3 Serología. ....	28
2.3.1 Calidad y conservación de los sueros . . . . .	28
2.3.2 Estuche diagnóstico para <i>B. canis</i> . . . . .	29
2.3.2.1 Prueba directa. ....	30
2.3.1.2 Prueba del 2- $\beta$ -Mercaptoetanol . . . . .	31
2.3.1.3 Control positivo . . . . .	32
2.4 Microbiología . . . . .	33 <sup>®</sup>
2.4.1 Aislamiento e identificación de <i>Brucella canis</i> . . .	33
2.4.2 Incubación. ....	34
2.4.3 Identificación bacteriana. . . . .	34
2.4.3.1 Morfología colonial y microscópica . . . . .	34
2.4.3.2 Pruebas bioquímicas. . . . .	34
2.4.3.3 Pruebas de sensibilidad a los antibióticos. ....	35

Capítulo	Página
2.4.4.1 Cultivos jóvenes de cepas de campo de <i>B. canis</i> . . . . .	36
2.4.4.2 Cepas control negativo para PCR de <i>Brucella sp.</i> . . . . .	36
2.4.5 Cuenta viable . . . . .	36
2.4.5.1 Preparación del cultivo joven. . . . .	36
2.4.5.2 Diluciones . . . . .	37
2.4.5.3 Cuenta viable por difusión en placa para <i>B. canis</i> . . . . .	37
2.4.5.4 Obtención de las UFC por ml. de cultivo de <i>B. canis</i> . . . . .	37
2.4.5.5 Cultivos de <i>B. canis</i> para pruebas de sensibilidad con la PCR. . . . .	37
2.5 Biología Molecular. . . . .	38
2.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) . . . . .	38
2.5.2 Preparación de las muestras para la extracción de ADN . . . . .	38
2.5.2.1 Cultivos bacterianos jóvenes . . . . .	38
2.5.2.2 Preparación de los antígenos vacunales y serológicos . . . . .	38
2.5.2.3 Preparación del ADN . . . . .	39
2.5.3 Extracción de ADN de antígenos y muestras Clínicas. . . . .	39
2.5.3.1 Extracción de ADN de cultivos bacterianos por la técnica de Puregene® . . . . .	39
2.5.3.2 Extracción de ADN de muestras de sangre, coágulos, sueros y cultivos jóvenes por la técnica de Fenol-Cloroformo (Birboim and Doly, 1979) . . . . .	40
2.5.4 Iniciadores y condiciones de amplificación. . . . .	41
2.5.5 PCR . . . . .	41

Capítulo	Página
2.5.5.1 Condiciones de amplificación . . . . .	42
2.5.6 Electroforesis de productos amplificados . . . . .	43
2.5.7 Productos amplificados por PCR . . . . .	44
2.5.8 Digestión con las enzimas de restricción . . . . .	45
2.5.9 Productos de digestión enzimática . . . . .	46
2.6 Análisis Estadístico . . . . .	47
3. RESULTADOS. . . . .	48
3.1 Análisis serológicos. . . . .	48
3.1.1 Resultados de la prueba de aglutinación rápida en tarjeta y de la reacción con 2-β mercapto etanol . . . . .	48
3.2 Aislamiento e identificación bioquímica de <i>B. canis</i> . . .	54
3.2.1 Cultivo y aislamiento. . . . .	54
3.2.2. Morfología colonial y microscópica . . . . .	58
3.2.3. Identificación bioquímica . . . . .	59
3.2.4 Cuenta viable por difusión en placa . . . . .	62
3.2.5 Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos . . .	63 <sup>®</sup>
3.2.6 Preparación de cultivos microbianos para la obtención de ADN genómico . . . . .	65
3.3 Biología molecular . . . . .	65
3.3.1 Resultados de la PCR. Amplificación del gen <i>omp-31</i> del género <i>Brucella</i> a partir de cultivos bacterianos, antígenos vacunales y serológicos. . . . .	65
3.3.2 Resultados de RFLP, Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción, del gen <i>omp-31</i> del género <i>Brucella</i> . . . . .	67

Capítulo	Página
4. DISCUSION.....	71
5. CONCLUSIONES.....	80
LITERATURA CITADA.....	82
APENDICE A.....	97
APENDICE B.....	101
RESUMEN AUTOBIOGRAFICO.....	107



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

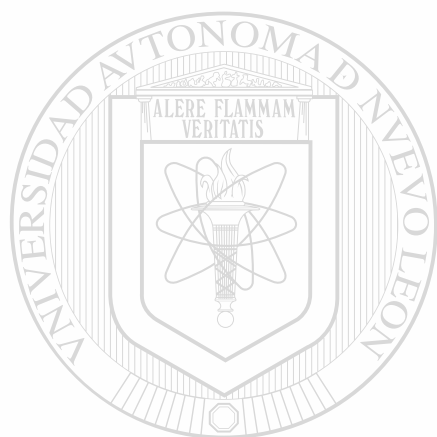
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estuche diagnóstico para detectar anticuerpos contra <i>Brucella canis</i> por la prueba de aglutinación rápida de tarjeta. ....	30
2	Reactantes de la prueba de aglutinación .....	31
3	Prueba confirmatoria del 2-β-mercaptoetanol. ....	32
4	Medio bifásico de Ruiz-Castañeda .....	33
5	Vaciado de los productos de amplificación en el gel de agarosa. ....	44
6	Prueba rápida de aglutinación en tarjeta .....	49
7	Reacción de seroaglutinación con y sin tratamiento con 2-β-mercaptoetanol .....	49
8	Caso seronegativo en un paciente canideo .....	52
9	Características coloniales de <i>Brucella canis</i> en Agar Soya Trypticasa. ....	55
10	Dinámica de eventos de la serología y aislamiento de <i>Brucella canis</i> en tres ejemplares canideos, hembras infectadas naturalmente. ....	57
11	Pruebas de Oxidasa (A) y Catalasa (B) positivas de colonias bacterianas aisladas de muestras clínicas de perros seropositivos. ....	59
12	Prueba de la Ureasa .....	60
13	Reacciones bioquímicas de <i>Brucella</i> . ....	61
14	Cuenta viable en placa de <i>B. canis</i> . ....	63
15	Patrón de susceptibilidad obtenido para una de cepas de <i>B. canis</i> (Cepa C-4) aisladas a partir de un perro seropositivo .....	64



Figura		Página
16	Amplificación del gen de la OMP 31 del género <i>Brucella</i> . . .	67
17	Resultados de los cortes de restricción con las enzimas <i>Ava II</i> y <i>Sal I</i> en productos de PCR de controles positivos y negativos y cepas de campo de <i>B. canis</i> . . . . .	69
18	Electroforesis en geles de poliacrilamida 9% de productos de PCR y RFLP de controles positivos y negativos y de cepas de campo de <i>B. canis</i> digeridos con las enzimas <i>Ava II</i> y <i>Sal I</i> . . . . .	70



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE TABLAS

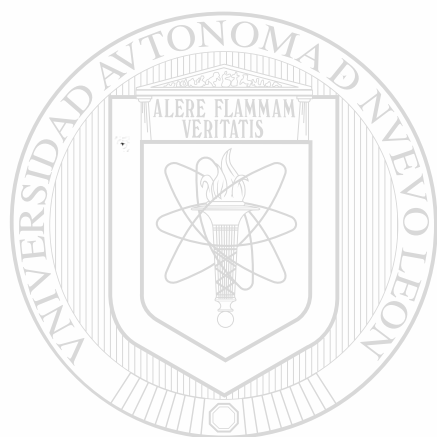
Tabla		Página
I	Medios de cultivo para pruebas bioquímicas. ....	35
II	Reactantes de la mezcla de PCR utilizadas para los análisis de identificación molecular de las colonias bacterianas de <i>B. canis</i> . ....	43
III	Condiciones de amplificación (*) y programa para Termociclador Programmable Thermal Controller (PTC-100) MJ Research, Inc.. ....	43
IV	Frecuencia de caninos seropositivos a <i>Brucella canis</i> en Monterrey y su área metropolitana en el período del 2000 al 2005, distribuidas acorde al sexo de los ejemplares. ....	50
V	Relación entre la seropositividad a <i>B. canis</i> y la procedencia de los animales analizados. ....	50
VI	Relación entre la seropositividad a <i>Brucella canis</i> con diversas condiciones de riesgo de enfermedad en perros ubicados en el área metropolitana de Monterrey, N.L., en el período del 2000 al 2005. ....	49
VII	Relación de razas muestreadas en el estudio y su reacción de seropositividad a Brucelosis canina determinada con la prueba rápida de aglutinación en tarjeta. ....	53
VIII	Relación entre la seropositividad a brucelosis canina y el tamaño de la raza de los animales estudiados. ....	54
IX	Reacciones a las diversas pruebas bioquímicas de las cepas de <i>B. canis</i> aisladas de muestras clínicas de perros seropositivos. ....	62
X	Relación de la cuenta viable en placa por el método de extensión en superficie de dos de las cepas de <i>Brucella canis</i> aisladas a partir de perros seropositivos. ....	62
XI	Susceptibilidad de <i>B. canis</i> a diferentes antibióticos recomendados para bacterias Gram negativas. ....	64

## ABREVIATURAS

16S ARNr	Gen codificante para fracción de ARNr 16S
2 ME	Prueba en tarjeta modificada con 2 mercaptoetanol
[ ]	Concentración
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
ABIO	Agar Biotriptasa
ABU	Agar Base Urea
Abs	Absorbancia
Ava II	Enzima de restricción obtenida de <i>Anabaena variabilis</i>
ADN	Acido desoxiribonucleico
ADNc	Copia del Acido desoxiribonucleico (cDNA)
ARN	Acido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
AST	Agar Soya Trypticasa
ATCC	American Type Culture Collection
BCNN	<i>Brucella</i> Culture Collection Nouzilly, France
BE	Bromuro de etidio
CDC	Centro de Control de Enfermedades
D	Día
DNTPs	Dinucleotidos trifosfatados
EDTA	Acido Etilen Diamino Tetracético
ELISA	Inmunoensayo Ligado a Enzima (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
g	Gramos
H <sub>2</sub> O UPE	Agua electro pura estéril
h	Hora
HC	Hemocultivo

ICC	Infusión Cerebro Corazón
Kb	Kilobase
LCDV	Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario
LIA	Agar Hierro Lisina (Lysin Iron Agar)
M	Concentración molar
mg	Miligramo
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MIO	Agar Motilidad Indol Omitina (Motility Indol Omitin)
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
ng	Nanogramos
nM	Nanomolar
omp	Proteína de Membrana Externa (outer membrana protein)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
pH	Potencial de iones de hidrógeno
pmol	Picomoles
rpm	Revoluciones por minuto
RFLP's	Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism)
s	Segundos
SAC	Sacrificio
SAT	Prueba rápida de aglutinación en tarjeta (RSAT)
Sal I	Enzima de restricción obtenida de <i>Streptomyces albus</i>
SIM	Sulfhídrico Indol Motilidad (Sulfhidric Indol Motility)
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris EDTA

<b>TSI</b>	<b>Agar Hierro Triple Azucar (Triple Sugar Iron)</b>
<b>UANL</b>	<b>Universidad Autónoma de Nuevo León</b>
<b>UCC</b>	<b>Unidades cambiadoras de color</b>
<b>UFC</b>	<b>Unidades Formadoras de Colonias</b>
<b>UnIVElGen</b>	<b>Unidad de Investigación Veterinaria en Enfermedades Infecciosas y Genética</b>
<b>UV</b>	<b>Ultravioleta</b>



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN

Arnoldo Aguirre Ramos

Fecha de titulación: Diciembre 2006

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Unidad de Investigación Veterinaria en Enfermedades Infecciosas y Genética

Título del estudio: **Detección molecular y aislamiento de *Brucella canis* en perros del área metropolitana de Monterrey, N.L.**

Número de páginas: 108

Candidato para el grado de Maestría  
en Ciencias Veterinarias con  
especialidad en Salud Animal

Área de estudio: Enfermedades Infecciosas

**Propósito y Método de Estudio:** La Brucelosis canina causada por *Brucella canis* es una enfermedad infecto contagiosa de creciente aumento tanto en salud pública como veterinaria.

Se obtuvo una prevalencia de 43.3% (71/164) y la frecuencia por sexo fue de 47.1% para machos (27/51) y 38.9% en hembras (44/113), mientras que para perros de criadero fue de 50.5% (51/101) y para perros que cohabitan en casas particulares fue de 31.7 % (20/63). En el grupo de perros cuyos propietarios solicitaron la prueba como un requisito de cruce, tuvimos 20.5 % (8/39) seropositivos. El resultado obtenido revela que la bacteria circula aún en perros clínicamente sanos, datos que se ven incrementados de 1992 a la fecha, cuando Ramírez reportaba 11.9% (11/92) en perros destinados a cruce, (Ramírez, 1992). Otras condiciones de riesgo fue la de estar en contacto con perros seropositivos y monitoreo sanitario en los que se obtuvo un 50% (12/24) y 50.5% (51/101) respectivamente. De 22 razas muestreadas, 14 resultaron positivas de las cuales resultaron 16 (22.5%) ejemplares de talla grande y 55 perros de razas pequeñas (77.46%). De 71 casos seropositivos, solo se lograron recolectar muestras para bacteriología de cinco de los casos de los cuales se aisló e identificó bioquímica y molecularmente la *B. canis*. Los aislamientos se lograron en el medio bifásico de Ruiz-Castañeda y en el Agar Biotriptasa (DIBICO).

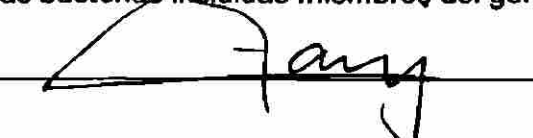
Las técnicas moleculares fueron la PCR-RFLP en donde se emplearon los iniciadores 31SD y 31TER y las enzimas de restricción empleadas fueron la *Ava II* y la *Sal I*.

Como control positivo se utilizó el antígeno del estuche diagnóstico para detectar anticuerpos contra *Brucella canis* por serología de Synbiotics, Co. que utiliza el antígeno de *B. ovis* cepa Reo 198 (BCNN R22) USA; así mismo, se utilizó el antígeno vacunal de *B. melitensis* cepa REV de la vacuna melirev-N. Como control negativo para la PCR se utilizó el antígeno vacunal de *B. abortus* cepa RB51<sup>®</sup> de la vacuna Bruces RB51<sup>®</sup> Plus. Además, varias bacterias de diversas familias, géneros y especies y una levadura (*Malassezia spp.*) de la colección del LCDV-FMVZ-UANL.

### Contribuciones y conclusiones:

El presente estudio fue llevado a cabo con el propósito de valorar el uso de la PCR acoplada al RFLP para identificar la presencia de *B. canis* en diversas muestras biológicas y cepas aisladas a partir de perros seropositivos a *B. canis*, basados en el uso de oligonucleótidos que amplifican el gen *omp-31* (Vizcaíno *et al.*, 1997) del género *Brucella* con posterior corte con enzimas de restricción de los productos de PCR de esta región y ligeras modificaciones a la técnica previamente reportada, se logró amplificar y posteriormente diferenciar molecularmente cepas de *B. canis* de otras bacterias incluidas miembros del género *Brucella*.

Firma del asesor:



## CAPITULO 1

### INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de carácter zoonótico con amplia distribución mundial (López-Merino, 2000; Corbel, 1997; Shon *et al.*, 2003). Esta es provocada por bacterias miembros del género *Brucella* de la familia *Brucellaceae* en el orden Rhizobiales (Corbel, 1997; Cutler *et al.*, 2005) y afecta a mamíferos terrestres y marinos (Clavareau, 1998; Miller *et al.*, 1999; Bricker *et al.*, 2000; Forbes *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001). Las especies reconocidas en este género incluyen a *Brucella abortus* (*B. abortus*), *Brucella melitensis* (*B. melitensis*), *Brucella suis* (*B. suis*), *Brucella neotomae* (*B. neotomae*), *Brucella ovis* (*B. ovis*) y *Brucella canis* (*B. canis*) (Corbel, 1997; López-Merino, 2000; Gándara *et al.*, 2001; Cutler *et al.*, 2005). Otras cepas con características metabólicas y antigénicas, fuertemente similares a este género, han sido aisladas recientemente de mamíferos marinos, empero aún no han sido aceptadas oficialmente (Corbel, 1997; Nielsen *et al.*, 2001; Cutler *et al.*, 2005; Godfroid *et al.*, 2005). Cada una de las especies del género *Brucella spp.* han mostrado una relativa especificidad de especie animal a la cuál infecta; mismas que desarrollan una infección generalizada crónica pero con importantes consecuencias a nivel reproductivo (Shin and Carmichael, 1999; Méndez-Nárez *et al.*, 1998).

La presencia de brucelosis tiene fuertes repercusiones económicas y de salud pública (Ruiz, 1945; Carmichael, 1968; Flores-Castro and Charmichael, 1984, López-Merino, 2000). En perros, la brucelosis es causada específicamente por *Brucella canis*, aún y cuando este animal puede infectarse esporádicamente por *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* (Carmichael and Green, 1990; Carmichael and Greene, 1993). *B. canis* tiene un rango de hospederos aparentemente limitado a canideos (Flores-Castro and Charmichael, 1984; Méndez-Nárez *et*

*al.*, 1998). No obstante, se han reportado casos de infecciones naturales en otras especies (Hoff *et al.*, 1974; Randhawa *et al.*, 1977) dentro de las cuales destacan infecciones en humanos (Lewis and Anderson, 1973; Fredrickson and Barton, 1974; Cozar *et al.*, 2002; Lucero *et al.*, 1999, 2002 y 2005 A).

Desde el aislamiento de *B. canis* en 1966 como causa de abortos e infertilidad en criaderos caninos de los Estados Unidos (Carmichael, 1966), estudios serológicos y bacteriológicos realizados en diversas partes del mundo han demostrado la gran distribución e importancia que tiene este patógeno en la población canina (Corbel, 1997; Méndez-Nárez *et al.*, 1998; Ortega, 2001; Arredondo, 2003). En México, se ha reportado en diversas zonas tanto en perros con signología reproductiva como carente de ésta (Flores-Castro *et al.*, 1977; Alonso, 1989; Ramírez, 1992; Méndez-Nárez *et al.*, 1998; Arredondo, 2003). En la zona metropolitana de Monterrey N. L., fue detectada mediante análisis serológicos en los años 1989, 1992 y 2003, observándose seroprevalencias de 18.3%, 17.3%, 22.5%, respectivamente (Alonso, 1989; Ramírez, 1992; Arredondo, 2003). Además fue aislada la bacteria a partir de muestras clínicas de perros seropositivos de esta área (Alonso, 1989). Estos datos indican que la *B. canis* circula en diferentes poblaciones de caninos de esta zona, independientemente de su propósito zootécnico y estatus clínico.

Dado la actividad zoonótica de *B. canis*, su distribución relativamente moderada en perros de la zona estudiada y al probable impacto económico negativo en la producción canina, el presente trabajo se realizó con el propósito de aislar y diferenciar molecularmente *B. canis* en perros del área metropolitana de Monterrey N.L. La detección y diferenciación molecular de los aislados de *B. canis* fueron basados en la combinación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el análisis del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) del gen *omp - 31* del género *Brucella spp.*



## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Historia de la Brucelosis

La brucelosis en el mundo tiene una relevante historia por los mecanismos de resistencia, su patogenia, la dificultad en su diagnóstico y en su tratamiento. Desde hace tiempo, cerca del año 400 A. C., en la antigua Grecia, se suponía que la brucelosis era ya conocida por Hipócrates (Ruiz, 1945; Cutler *et al.*, 2005).

Tiempo después surgen las primeras descripciones científicas realizadas por Cleghorn cerca del año 1751, y se intensifican los estudios sobre la brucelosis a raíz de la guerra de Crimea de los años 1854 a 1856, misma en la que fue observada una alta incidencia de enfermos con fiebres prolongadas, sin sintomatología aparente y de aspecto clínico desconocido para aquella época (Ruiz, 1945). En la Isla de Malta, Marston durante 1859 realizó estudios y autopsias de casos de militares con un padecimiento conocido como "Fiebre Gástrica Remitente del Mediterráneo" (Memish and Balkhy, 2004).

El descubrimiento del agente etiológico de la enfermedad, se realizó a finales del siglo XIX, por un grupo de investigadores encabezados por David Bruce, médico militar que en 1886, cultiva, aísla e identifica al agente causal de muestras de bazo de soldados británicos reclutados en la isla de Malta, de allí su sinonimia de "Fiebre de Malta". Bruce demostró los factores de virulencia en un modelo animal practicado en monos y la primera clasificación de la bacteria la ubicó con el nombre de *Micrococcus melitensis* (Ruiz, 1945; López-Merino, 2000).

Hughes, en 1897, presenta la mejor revisión sobre brucelosis y en paralelo Wright y Semple desarrollan la prueba diagnóstica de aglutinación (Ruiz, 1945). Meyer y Shaw describieron el género en 1920 y las clasifican como bacterias intracelulares facultativas que causan aborto epizootico en animales domésticos y producen una enfermedad febril septicémica o infecciones localizadas en el hombre (Al-Eissa, 1999; López-Merino, 2000).

Para el caso de la brucelosis canina, causada por *B. canis*, es hasta 1966 cuando Leland E. Carmichael, en distintos criaderos de perros en varios Estados de la Unión Americana, describe más de 200 casos de abortos en perros en ese año. Sin signos precedentes, las perras gestantes abortaban entre los días 40 y 55 de gestación. Se presentaron signos clínicos tales como fetos abortados y problemas de infertilidad, falsa preñez y en machos orquitis, epididimitis, dermatitis escrotal húmeda y fallas en la reproducción aisló una bacteria cocobacilar en forma pura de fetos y placentas abortados. Tales aislados mostraban características de cultivo, bioquímicas y serológicas compatibles con los miembros de la familia *Brucellae* (Carmichael, 1966). En los siguientes meses fueron reportados 13 Estados de la Unión Americana involucrados en estos problemas y para junio de 1967 se reportaban más de 800 casos en 38 Estados, resultando criaderos de la raza beagle aparentemente como los más afectados (Carmichael and Kenney, 1968; Moore, 1969). En base a un cuestionario realizado a criadores de perros y veterinarios desde 1962 una frecuencia inusualmente alta de abortos comenzó a observarse en los Estados del Sureste y Este de los Estados Unidos. Las características distintivas de la brucelosis canina descritas por Carmichael y Kenney fueron linfadenopatía generalizada y esplenitis, muerte temprana del embrión no detectable ó abortos (50 días de gestación) y prolongada descarga vaginal enseguida del aborto, en machos esterilidad, epididimitis, dermatitis del escroto y atrofia testicular (normalmente unilateral). En la mayoría de los animales no se apreciaban signos clínicos pero presentaban bacteremia persistente (Carmichael and Kenney, 1968). La bacteria aislada de estos casos en 1967 fue identificada, y más tarde reportada como una nueva especie, a la que denominaron *Brucella canis* (Carmichael and Bruner, 1968). En este mismo año, se reporta el primer caso de brucelosis canina causada por *Brucella canis* en el humano (Currier *et al.*, 1982).

Se inició el diagnóstico por pruebas de aglutinación en suero al mismo tiempo que se hacían estudios epidemiológicos y se trabajaba a la vez en tres criaderos comerciales con problemas reproductivos a través del laboratorio de diagnóstico

del Colegio de Veterinarios del estado de New York en Ithaca, N. Y. USA (Carmichael and Kenney, 1968).

En septiembre de 1968, se publican los primeros reportes sobre la erradicación de *B. canis* de una colonia de perros Beagle (Moore and Gupta, 1968).

Para 1969, Wesley reportaba 101 casos seropositivos de Beagles de los cuales se aisló la bacteria de 39 de ellos (Wesley, 1969).

Al principio de los setentas, se inician investigaciones sobre estudios epizootiológicos, diagnóstico y control de la brucelosis canina intentando establecer técnicas de laboratorio rápidas y confiables (Moore and Gupta, 1970) y al mismo tiempo se estudia la enfermedad clínica así como su patogénesis y la respuesta inmunológica de la brucelosis canina (Carmichael and Kenney, 1970).

En 1972 se reportaban estudios realizados en el estado de Pensilvania, USA durante 1966 y 1967 en donde se realizaron análisis serológicos y bacteriológicos en dos criaderos obteniendo prevalencias de 16.5% (105/637) y de 18.6% (21/113) respectivamente (Pickerill and Carmichael, 1972).

No es hasta 1973 en que se ven los resultados de los investigadores al establecer una prueba serológica de aglutinación en tubo (TAT) usando la cepa de *Brucella canis* cepa RM-6-66 y para la prueba en tarjeta para detectar anticuerpos contra *Brucella canis* a partir de un estuche diagnóstico que utiliza como antígeno a *Brucella ovis*, cepa Reo 1182 (George and Carmichael, 1974) y logrando el registro de patente (US. Patent N°. 3,962, 413).

Tres años más tarde, en 1977, se reporta uno de los primeros casos de brucelosis canina en México detectándose 11.8% (7/59) de seroprevalencia de *B. canis* en perros callejeros (Flores-Castro *et al.*, 1977).

### 1.1.2 Sinonimias de la infección por miembros del género *Brucella*

La infección por miembros del género *Brucella* ha adquirido diversas sinonimias según las diversas fuentes de información disponibles. En el caso de la infección causada por *B. melitensis* ha recibido las sinonimias de fiebre de Malta, fiebre del mediterráneo, fiebre de Gibraltar, fiebre de Barcelona, fiebre ondulante, fiebre recurrente, septicemia de Bruce (*Micrococcus melitensis* ahora *Brucella melitensis*). La infección causada por *Brucella abortus* ha sido denominada como fiebre del Río Grande, enfermedad de Bang, aborto contagioso y aborto infeccioso (*B. abortus*) (Díaz, 2001; López-Merino, 2000). Así mismo, la infección ya sea por *Brucella abortus*, *Brucella suis* ó *Brucella melitensis* en el equino desarrolla un síndrome clínico llamado Mal de la Cruz, Mal de la Nuca ó de Talpa (Rufino, 2003). Por otra parte, la infección por *Brucella ovis* ha sido reconocida como brucelosis ovina, epididimitis infecciosa ovina o del carnero, así como Epididimitis de los carneros ó Epididimitis ovina (Bagley et al., 1985; Blasco et al., 1993; Brown et al., 1976; Arsenault et al., 2004).

### 1.1.3 Descripción y taxonomía del género *Brucella* spp.

Los miembros del género *Brucella* son bacterias "Gram" negativas clasificadas dentro del reino *Proteobacteria* (Mac Faddin, 2003), perteneciente a la sección XV de las alfa-proteobacterias (López-Merino 2000; Gándara et al., 2001; Mac Faddin, 2003), de la Clase I *Rhodospirilli*, del orden VI *Rhizobiales* y de la familia IV, *Brucellaceae* (Mac Faddin, 2003; Cutler et al., 2005). En la actualidad, existe el debate sobre la posibilidad de considerar la existencia de una sola especie del género *Brucella*, en tal caso se propone a *Brucella melitensis* como especie única, mientras que las otras brucelas serían consideradas como variedades de ésta (Mac Faddin, 2003; Cutler et al., 2005). Otro grupo de investigadores reportan y proponen el establecimiento de siete especies en el género *Brucella*, en el cual se incluiría una bacteria aislada de

mamíferos marinos denominada *Brucella maris*, misma que incluiría dos subdivisiones, cepas aisladas de cetáceos y de focas (Corbel, 1997; López-Merino, 2000; Ko and Splitter, 2003; Sohn *et al.*, 2003). En adición, han sido reportados los aislamientos de bacterias con características bioquímicas, morfológicas, y genéticas similares al género *Brucella* igualmente a partir de animales marinos designándose como *Brucella pinnipediae* y *B. cetaceae* (Sohn *et al.*, 2003; Godfroid *et al.*, 2005). Estas observaciones, toman mayor relevancia en salud pública dado que ha sido relacionado el aislamiento de éstas bacterias en casos tanto de granuloma intracerebral como en neurobrucelosis humana. Estos hallazgos representan los primeros reportes de afección humana por brucelas marinas (Sohn *et al.*, 2003).

No obstante, las discrepancias sobre la filiación genética de las especies del género, continúan sin llegar actualmente a un acuerdo definitivo (Corbel, 1997; Mac Fadin, 2003; Ko and Splitter, 2003; Cutler *et al.*, 2005).

Tradicionalmente las bacterias del género *Brucella* han sido divididas en cepas lisas y rugosas basados en sus características coloniales. Esta diferenciación reside en la estructura del Lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa. En el grupo de las "cepas lisas", se incluye a *Brucella abortus*, *B. mellitensis*, *B. suis* y *B. neotomae*, mientras que *Brucella canis* y *B. ovis* se consideran "cepas rugosas" (López-Merino, 2000).

Todos los miembros del género *Brucella* son microorganismos intracelulares facultativos, capaces de evadir los mecanismos defensivos del huésped y sobrevivir en el interior de las células fagocíticas por períodos prolongados (Cózar *et al.*, 2002).

Las primeras descripciones de una enfermedad atribuida a un miembro del actual género *Brucella* fue realizada a finales del siglo XIX por David Bruce. Bruce y su grupo aislaron la bacteria por vez primera (denominándola *Micrococcus melitensis*) en 1887 a partir de un grupo de soldados británicos reclutados en la Isla de Malta, afectados por la "fiebre de Malta".

Posteriormente, Meyer y Shaw describieron el género *Brucella* en 1920 y las clasifican como bacterias intracelulares facultativas causantes de “aborto epizoótico” en animales domésticos y de enfermedad febril septicémica o infecciones localizadas en el hombre (López-Merino *et al.*, 1992; Gándara *et al.*, 2001).

En 1966 Carmichael y Kenney aislaron *Brucella canis* de un criadero de perros de la raza Beagle con problemas reproductivos en los Estados Unidos (Carmichael and Kenney, 1968).

#### 1.1.4 Agente Etiológico

*Brucella canis* es una bacteria Gram negativa, de forma cocobacilar que mide de 0.5-0.7  $\mu\text{m}$  x 0.6-1.5  $\mu\text{m}$ . Se multiplica bajo condiciones aerobias, el  $\text{CO}_2$  inhibe su crecimiento (Greene and George, 1990), carece de cápsula, y no produce esporas. Es un microorganismo intracelular facultativo (Cozar *et al.*, 2002) y parásito obligado (Quin *et al.*, 1994), motilidad negativa, catalasa y oxidasa positiva (Quin *et al.*, 1994; Díaz *et al.*, 2001; Cozar *et al.*, 2002; Mac Fadin, 2003).

La temperatura de crecimiento óptimo para *B. canis* es de 37°C y a un pH entre 6 y 7, puede crecer en medios como agar Biotriptasa<sup>®</sup>, en agar sangre sin producir hemólisis y en agar Mac Conkey no se desarrolla (Quinn *et al.*, 1994), o el crecimiento es pobre sin fermentar la lactosa (López-Merino, 2000). En agar soya tripticasa y Thayer-Martin modificado crece muy bien (Quinn *et al.*, 1994) y en el medio bifásico Ruiz Castañeda para hemocultivo el único que soporta prolongados períodos de incubación para el primo-aislamiento (Ruiz, 1945; Quinn *et al.*, 1994).

Es fuerte productora de ureasa detectándose desde los primeros 15 a 20 minutos, hasta las dos o tres horas de haber inoculado el tubo, no produce  $\text{H}_2\text{S}$ , es Citrato de Simons negativo, Indol negativo, Rojo de Metilo- Vogues

Proskawer (MR-VP) negativo (Carmichael and Kenney, 1970, Carmichael and Joubert, 1988; González, 1983; Méndez-Nárez *et al.*, 1998).

*Brucella canis* y las brucellas en general, se apegan a la clásica anatomía manifestada por las bacterias Gram negativas. Estas bacterias presentan una envoltura celular formada por la membrana externa, el espacio periplásmico y la membrana citoplasmática que circunda el citoplasma (López-Merino, 2000). De los componentes de la membrana externa, el LPS es el más estudiado por estar más expuesto, ser abundante y antigénico. El LPS, es el responsable de las propiedades endotóxicas de *B. canis* y las propiedades fisicoquímicas y biológicas de la endotoxina del LPS son muy diferentes a las observadas en otras bacterias Gram negativas. En el género *Brucella* la actividad endotóxica es muy limitada, no obstante conserva sus propiedades inmunogénicas (Quinn *et al.*, 1994; López-Merino, 2000).

#### 1.1.5 Genética molecular del género *Brucella spp.*

La secuencia genética de tres miembros de género *Brucella* ha sido obtenida recientemente (DelVecchio *et al.*, 2002; Paulsen *et al.*, 2002; Chain *et al.*, 2005; Halling *et al.*, 2005; Malfatti *et al.*, 2005). Tales análisis han aportado información valiosa para entender los mecanismos de patogenicidad, así como de virulencia y tropismo por hospedadores entre otros.

Acorde a estos estudios, el genoma del género *Brucella spp.* muestra una alta similitud nucleotídica de más del 94% y consiste de 2 cromosomas circulares de entre 2,107,792 a 2,121,359 pb para el cromosoma I (ChrI) y 1,156,950 a 1,207,381 pb para el cromosoma II (ChrII) (Chain *et al.*, 2005). El contenido de Guanina y Citocina (%G+C) es alrededor de 57 %. Esta carga genética está distribuida en un número variable de marcas de lectura abierta (ORF) de 2,186 ChrI y 1,164 ChrII en *Brucella abortus*, 2,185 y 1,203 para ChrI y II, respectivamente de *B. suis* y 2,059 ChrI y 1,138 ChrII para *B. melitensis* (Chain *et al.*, 2005, DelVecchio *et al.*, 2002, Halling *et al.*, 2005).

Aunado a lo anterior, presenta otras características diferenciales y a pesar del alto nivel de conservación genómica ocurren diferencias importantes específicas de especie (Chain *et al.*, 2005).

Al igual que en otras *alfa-Proteobacteria* existen genes asociados con la replicación del ADN, transcripción, traducción y biosíntesis de pared y membrana celular y están presentes en ambos cromosomas (Ko and Splitter, 2003).

Los miembros del género *Brucella* secuenciados hasta la fecha muestran grupos de genes relacionados con la síntesis de flagelos e inactivadores del gen flagelar específico de especie, lo cual aparentemente produce diferentes versiones de estructuras flagelares que puede contribuir a diferencias en la especificidad de huésped y su virulencia (Chain *et al.*, 2005).



## 1.2 Epizootiología

### 1.2.1 Resistencia y sobrevivencia

Las bacterias de este género, *Brucella spp.*, tienen gran capacidad de resistir en el medio ambiente cuando las condiciones son apropiadas a diferencia de otros microorganismos no esporulados. Sobreviven largos períodos de tiempo bajo ciertas condiciones de humedad, temperatura y poca exposición solar. En tejidos y órganos preservados en congelación sobreviven por varios años, al igual que si son desecadas en presencia de altas concentraciones de proteína, no perdiendo su infectividad (López-Merino, 2000); además, esta resistencia a la desecación le permite sobrevivir hasta diez semanas viables en paja y polvo de los establos o en leche, queso y mantequilla pudiéndose aislar *B. mellitensis* y *B. suis* de éste último, hasta después de cuatro meses (Blasco and Gamazo, 1994). Su capacidad intracelular facultativa la dota de una resistencia natural a la destrucción fagocítica evadiendo los mecanismos inmunológicos del



huésped, sobreviviendo por mucho tiempo dentro de las células fagocíticas (Cozar *et al.*, 2002). Son muy sensibles al calor dado que no resisten las temperaturas de pasteurización lográndose la inactivación a 60°C por 30 minutos. Las radiaciones ionizantes y la luz ultravioleta son muy efectivas matándolas rápidamente al igual que los desinfectantes de uso común en las concentraciones recomendadas. Alcoholes, etanol o isopropanol, iodóforos, hipoclorito y fenoles sustituidos diluidos a concentraciones adecuadas son efectivos contra las brucelas usados como desinfectantes de piel.

Es sensible a la mayoría de los antibióticos en pruebas *in vitro* sobresaliendo las tetraciclinas, la rifampicina y la eritromicina siendo los beta lactámicos los menos eficaces con excepción de la ampicilina; *in vivo*, la sensibilidad es distinta por su localización intracelular que las protege de los antibióticos (López-Merino, 2000).

### 1.2.2 Distribución geográfica

*Brucella canis* causa la brucelosis canina en perros y puede causar esporádicamente la enfermedad en humanos (Lovejoy *et al.*, 1976; Polt *et al.*, 1982; Méndez-Nárez *et al.*, 1998; López-Merino, 2000; Shin and Carmichael, 2002; Lucero *et al.*, 2005 A).

La brucelosis canina se ha reportado en Argentina, España, China, Túnez y otros países (Corbel, 1997). Además ha sido reconocida en Centro y Sudamérica, así como en Asia (Japón y China) y esporádicamente en Europa. Los datos de prevalencia son escasos, pero los índices de seroprevalencia en México y en Centro y Sudamérica son relativamente elevados (20-30 %). En el sur de USA y Japón se detectó una prevalencia de 7-8% en perros callejeros, lo cual se ha reportado que juega un papel importante en la diseminación de la enfermedad (Ortega-Pacheco, 2001; Shin and Carmichael 2002).

En México, varios autores han realizado estudios serológicos y han encontrado diferentes resultados sobre *B. canis*. Flores-Castro y Segura en 1976 reportaron 28% (140/500) en perros callejeros recogidos por el Centro Antirrábico (Flores-Castro y Segura, 1976). Flores Castro en 1977 en la ciudad de México, reportaron 11.8 % (7/59) en perros callejeros (Flores-Castro *et al.*, 1977). En 1980, Gutiérrez reportó 11.21 %, Nava y Vázquez en 1992 encontraron 17.4 % y Velázquez en 1997 obtuvo un porcentaje de 45.4 % (Méndez- Nárez *et al.*, 1998).

En 1998, en la ciudad de México, se reportó un brote de brucelosis canina en un criadero con una seroprevalencia del 45.4 % por pruebas de aglutinación y 2-Mercaptoetanol. Las conclusiones derivadas de este y otros estudios fueron de que la función reproductiva de machos y hembras es un factor de riesgo en el contagio de la enfermedad y que el contacto sexual es la principal vía de infección. Esto se acentúa cuando se solicita el servicio de monta de sementales extraños al criadero sin haber realizado las pruebas correspondientes de aglutinación para *Brucella canis*. Tal situación refleja el desconocimiento de la prevalencia e importancia de la brucelosis canina en la población (Méndez-Nárez *et al.*, 1998).

En la ciudad de Monterrey, N. L., Alonso en 1989 reportó 18.32 % de reactores positivos (24/131) tomadas de animales con y sin signos de problemas reproductivos (Alonso, 1989; Alonso y Flores, 1995); 3 años después, en 1992, Ramírez encontró 17.39 % seropositivos (16/92) en muestras remitidas de perros clínicamente sanos solicitados para cruce y cuyos propietarios pertenecen a un estatus social medio alto (Ramírez, 1992); recientemente en el 2003 Arredondo obtuvo resultados de 22.53 % de casos seropositivos (16/71) en perros de un criadero de perros de razas puras (38 perros) y perros callejeros (33 perros) con un total de 71 ejemplares (Arredondo, 2003).

En dos provincias de Turquía, se muestrearon 362 perros de los que resultaron 46 casos positivos (12.7%) por la técnica de aglutinación en tubo (TAT), 28

casos positivos (7.73%) por la técnica de aglutinación en tubo con la modificación del 2-mercaptoetanol y 27 casos positivos (7.45%) por el método de ELISA (Akan *et al.*, 2005).

Existe el dato de 44 % de casos seropositivos humanos asociados a perros seropositivos a *B. canis*, y otro tanto a circunstancias laboral tales como laboratoristas (Noviello, 2004), veterinarios, entrenadores y manejadores de perros que por contacto directo con los animales o por falta de precaución al manejar muestras biológicas, se han contaminado (Currier *et al.*, 1982).

En 1976, Flores Castro y Segura reportaron 13.3% (27/203) en sueros humanos realizando la prueba de aglutinación en tarjeta (Flores-Castro y Segura, 1976).

Cuatro años después, en Sao Paulo, Brazil, Larsson reporta 1.21% (4/330) de personas seropositivas por la técnica de aglutinación en tubo (Larsson, 1980).

### 1.2.3 Brucelosis canina

La brucelosis en el perro puede ser causada por cuatro de las seis especies del género *Brucella spp.*, las cuales incluyen *Brucella melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* (cepas lisas) y *Brucella canis* (cepas rugosas) que es la especie de importancia epidemiológica del perro (Wanke, 2004).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### 1.2.3.1 Brucelosis canina en perros causada por *Brucella canis*

La enfermedad presenta signos no apreciables en las primeras fases de la infección. Cuando ocurre signología, en el macho se puede presentar orquítis, epididimítis, dermatitis escrotal húmeda, dermatitis piogranulomatosa (Dawkins *et al.*, 1982) y atrofia testicular en infecciones crónicas. Como consecuencia al daño testicular, entre la segunda y quinta semana posterior a la infección, se observan espermatozoides anormales (30 al 80 %) con colas dobladas y gotitas protoplásmicas distales; a la semana 20 siguen las anomalías y hay una severa disminución en la motilidad hasta un 90 % (George and Carmichael, 1984 ).

Se han encontrado espermioaglutininas tanto en las muestras de suero como en el líquido seminal de machos infectados (George and Carmichael, 1984).

En los machos infectados la orina y el semen son fuentes de contagio, alojándose el agente en las vías genitales y excretándose en forma intermitente (Méndez-Nárez *et al.*, 1998).

En la hembra se presenta el aborto en el último tercio de la gestación entre los 45 y 59 días de gestación, no habiendo respuesta febril. La bacteria es eliminada durante el aborto, así como en subsecuentes descargas vaginales persistiendo de cuatro a seis semanas después del aborto. Puede presentar infertilidad, falsa preñez o si llega a parir, disminuye el número de crías, nacen muy débiles o mueren a los pocos días (Díaz *et al.*, 2001).

En ambos sexos hay lesiones en articulaciones, inflamación de nódulos linfáticos, retrofaríngeos e inguinales, pudiendo llegar a producir infertilidad en etapas reproductivas (Carmichael and Kenney, 1970; Shin and Carmichael, 1999; Méndez-Nárez *et al.*, 1998; Wanke, 2004).

Se ha reportado empiema habiéndose logrado el aislamiento de *B. canis* del ojo del perro (Thompson, 1975), esplenomegalia, discospondilitis (Henderson *et al.*, 1974) y absceso uterino (Dillon and Henderson, 1981).

### 1.2.3.2 Brucelosis en humanos causada por *Brucella canis*

El ser humano es relativamente resistente a la enfermedad por *B. canis*, sin embargo, se puede contagiar por contacto directo con animales infectados o accidentalmente en el trabajo del laboratorio (Moore, 1969; Polt *et al.*, 1982; Shin and Carmichael, 1999; Wanke, 2004), a través de secreciones vaginales o prepuciales, restos placentarios y fetos (Monroe *et al.*, 1975; Alton and Forsyth, 1998; Shin and Carmichael, 1999; Wanke, 2004). Aunque hay autores que refieren que las especies menores (*Brucella canis*, *B. ovis* y *B. neotomae*) carecen de importancia en patología humana (Montes *et al.*, 1997), existen varios reportes de casos clásicos y otros muy severos de complicaciones patológicas humanas por *Brucella canis* (Polt *et al.*, 1982; Flores and Carmichael, 1984; Ying *et al.*, 1999; McKee and Ballard, 1999; Piampiano *et al.*,

2000; Cozar *et al.*, 2002), así como de casos de infección poco común en humanos por *B. canis* (Lovejoy *et al.*, 1976).

Desde 1967, año en que se reportara el primer caso de brucelosis canina en humanos, el índice de infecciones ha aumentado y para 1978 el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta reportaba 17 casos más, de los cuales ocho (44%) fueron asociados a perros y los ocho restantes a factores laborales, seis empleados de laboratorios, un veterinario y un entrenador de perros; en dos casos la fuente de infección fue desconocida (Currier *et al.*, 1982).

En el hombre, la enfermedad se manifiesta como un cuadro gripal común con signos típicos de un resfriado tales como, cefalea, atriagia, mialgia, hipotermia y eventualmente náuseas y vómitos (Flores y Carmichael, 1984). La fiebre prolongada y el crecimiento de nódulos linfáticos, faringitis, escalofríos y pérdida de peso también son signos de la brucelosis canina en el hombre (Wanke, 2004). La fatiga moderada o severa así como el crecimiento de las vértebras cervicales (discospondilitis) y del bazo están presentes en la enfermedad (Lewis and Anderson; 1973), coincidiendo con los reportes de formación de absceso esplénico por *Brucella*, siendo más frecuente en infecciones causadas por *B. suis* y poco común en infecciones por *B. melitensis* (Cozar *et al.*, 2002).

En casos más graves se ha reportado endocarditis (Ying *et al.*, 1999) y aneurisma tibial por *Brucella canis* (McKee and Ballard, 1999; Piampiano *et al.*, 2000) así como osteomielitis, absceso epidural, nódulos pulmonares y efusión pleural (Polt *et al.*, 1982; Piampiano *et al.*, 2000; Ates *et al.*, 2005).

#### 1.2.4 Sensibilidad a la infección por *Brucella canis* de acuerdo a la raza

Aun que no hay reportes de sensibilidad por raza que relacionen la brucelosis canina causada por *Brucella canis*, hay trabajos que refieren a perros de algunas razas puras y criollos, que han sido reportados como positivos. En

Georgia, USA, fueron reportadas las siguientes razas como seropositivas; Golden Retriever, Boston Terrier, Lhasa Apso, Dachshund, Chihuahua, Pinscher Miniatura, Yorkshire Terrier, Poodle, Shih-tzu, Australian Shepherd, Pomerania y Criollos, (Hollet, 2006).

En la ciudad de México se reportaron 15 caninos positivos de un total de 33 ejemplares (46.1 %), todos de raza Schnauzer miniatura siendo un criadero establecido sin antecedentes de problemas reproductivos hasta que solicitaron el servicio de cruce de un macho sin hacer prueba serológica (Méndez-Nárez *et al.*, 1998).

En estudios realizados en Monterrey, N. L., se ha reportado solamente la prevalencia por sexo y edad, pero no por raza; solo describen perros de criadero y "callejeros", término que no denota raza definida, pero tampoco confirma que sean criollos (Arredondo, 2003).

En estudios anteriores en perros clínicamente sanos destinados a la cruce, se refieren datos generales de residencia, edad, sexo y el estatus social de los propietarios, pero no así de alguna raza definida, aunque se hace suponer que son de raza pura ya que acudían al Hospital Veterinario requiriendo la prueba rápida de tarjeta para *Brucella canis* como requisito de cruce (Ramírez, 1992).

Otro estudio realizado en 1989, reporta la prevalencia en perros con problemas reproductivos y asintomáticos, señalando que los datos generales de edad, sexo, raza y origen se omitieron por discreción a los criaderos y propietarios (Alonso, 1989). Recientemente en la ciudad de México, se estudiaron perros machos con problemas reproductivos y con signos clínicos, habiendo obtenido 24 casos positivos (42.8 %) más no remiten más datos de edad y raza (Briceño *et al.*, 2004).

En 1966, Carmichael estudió problemas de aborto en un criadero de 200 perros de la raza Beagle, encontrándolo relacionado con el aislamiento de una nueva especie de *Brucella spp.* que más tarde sería identificada y denominada como la especie *B. canis* (Carmichael, 1966).

Aunque la raza Beagle está muy involucrada en brotes de brucelosis canina, fueron reportados como seropositivos ejemplares canideos en 38 estados de la unión americana de las razas Weimaraner, Foxhound, Antiguo Pastor Inglés, Pointer y Grayhound (Moore, 1969).

Flores Castro y Segura en 1976, refieren estudios de brucelosis canina causada por *Brucella canis* en Alemania y Japón en los que especifican perros de la raza Beagle (Flores-Castro and Segura, 1976) y en Estados Unidos de Norteamérica también refiere a la raza Beagle en un brote de brucelosis canina por *B. canis* en USA (Wooley et al., 1978).

En otras investigaciones de brucelosis canina en humanos en los que los casos se han relacionado con la transmisión a través de sus mascotas, se ha mencionado la raza Pastor Alemán (Swenson et al., 1972; Lewis and Anderson, 1973), perros de la raza Beagle (Carmichael, 1968; Spink, 1969) y perros callejeros (Fredrickson and Barton, 1974; Munford et al., 1975).

#### 1.2.5 Transmisión de la *Brucella canis*

La transmisión de la bacteria puede ser de tipo vertical (transplacentaria o lactancia) y horizontal por medio de secreciones vaginales, seminales, orina y fomites. La transmisión de la brucelosis canina ocurre de perro a perro, del perro al hombre e indirectamente, por medio de fomites, del perro al medio ambiente y de este al hombre (Alton and Forsyth, 1998; Méndez- Nárez et al., 1998; Díaz et al., 2001; Wanke, 2004).

Es conocido el problema de la sobrepoblación canina teniendo un efecto directo en la salud humana ya que existen más de 65 enfermedades zoonóticas dentro de las cuales está la brucelosis, que los perros pueden transmitir a otros animales de la misma especie y al humano (Tan, 1997; Ortega-Pacheco, 2001). Esto tiene mayor impacto cuando los perros tienen acceso a la calle para defecar y orinar, puesto que los niños al jugar en jardines y parques públicos

están a mayor riesgo de contagiarse con alguna de estas enfermedades (Ortega-Pacheco, 2001).

Al mismo tiempo, el perro callejero es un factor de riesgo de contagio para perros de casas habitación que están resguardados en patios y el acceso a la calle se ve restringido por el uso de bardas y barandales, ya que al acercarse el perro callejero orina cerca o dentro de la casa y quedan expuestos al perro del interior de la casa (Corbel, 1997; Ortega-Pacheco, 2001; Arredondo, 2003).

#### 1.2.5.1 Transmisión en el perro

La principal vía de contagio en el perro es la venérea y por tanto afecta principalmente a los animales sexualmente activos (Méndez-Nárez *et al.*, 1998), aunque no se descartan otras posibles vías de contagio, tales como el contacto con restos de placenta, fetos abortados, donde la bacteria alcanza concentraciones de  $10^{10}$  UFC por mililitro (Carmichael and Green, 1990; Wanke, 2004).

La concentración de la bacteria en orina puede alcanzar hasta de  $10^3$  - $10^6$  UFC por mililitro empezando a eliminarla de 4 a 8 semanas después de la infección.

La presencia de leucocitos en la leche pueda favorecer la transmisión durante la lactancia. La concentración de bacterias en la leche es alta pero la diseminación de la *Brucella* está en duda.

La saliva, secreciones nasales y oculares tienen bajas concentraciones de la bacteria (Wanke, 2004).

La capacidad intracelular y la resistencia a la destrucción lisosomal de la bacteria dentro de los leucocitos (Cozar-Olmo *et al.*, 2002), la hace más resistente y de más fácil transmisión.

Los monocitos y neutrofilos son comunes en el semen, por lo tanto, es una fuente de transmisión al momento de la monta. (Flores-Castro *et al.*, 1977; Wanke, 2004).



### 1.2.5.2 Transmisión en animales silvestres

Otra fuente de infección puede ser a través de animales silvestres ya que se tienen reportes de *Brucella canis* en mapaches (*Porción lotor*), zarigüeya (*Didelphys marsupiales virginiana*), lince (*Lynx rufus*), zorra roja (*Culpes fulva*), zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*), coyote (*Canis latrans*) y lobos (*Canis lupus*) en varios estados de USA, habiendo encontrado dos de 75 (2.7 %) coyotes positivos con títulos arriba de 1:200 y otros 16 (21.3 %) con títulos bajos. Además un mapache, una zorra roja y un lince resultaron positivos (Hoff *et al.*, 1974).

En otro estudio en Texas, la prevalencia por la prueba de aglutinación en tubo con el 2-β-mercaptoetanol en títulos de 1:50 fue de 8.1 % en coyotes, 3 % en tejones y 9.1 % en mapaches, mientras que en títulos arriba de 1:200 la prevalencia fue de 5.1 % solo en coyotes; por la prueba de aglutinación rápida en placa la prevalencia fue de 6.6 % (13 de 198 coyotes), 21.2% en tejones y 27.3% en mapaches y un perro feral (Randhawa *et al.*, 1977).

### 1.2.5.3 Transmisión al humano

La forma más común de transmisión de *Brucella canis* al hombre es por contacto con perros infectados (Wallach *et al.*, 2004). El hombre en la necesidad de asistir el parto y la lactancia de los cachorros que llegan a nacer, pudiera infectarse con las secreciones (Méndez-Nárez *et al.*, 1998).

La infección en el hombre probablemente sea más frecuente que lo reportado (Castillo *et al.*, 2003; Wanke, 2004; Lucero *et al.*, 2005 A), aunque algunos autores describen la brucelosis como una enfermedad ocupacional (Currier *et al.*, 1982; Méndez-Nárez *et al.*, 1998; Noviello *et al.*, 2004).

La brucelosis en humanos causada por *Brucella canis* es conocida la transmisión directa en entrenadores, manejadores de perros y médicos veterinarios (Currier *et al.*, 1982). El contacto directo con restos placentarios,

fetos abortados o descargas vaginales durante el aborto o durante el parto si este llegase a final término (Díaz *et al.*, 2001) es otra fuente de contaminación para el ser humano, agregando a esto la falta de protección y medidas de seguridad tales como guantes, filtros naso-bucal (tapabocas), lentes y bata (Méndez-Nárez *et al.*, 1998).

El manejo de muestras clínicas o la obtención de éstas, son una fuente de contaminación humana al no usar las medidas de seguridad antes mencionadas (Greene and George, 1990) lo que provoca que gran parte de los casos de brucelosis canina causada por *Brucella canis* en humanos sean trabajadores de laboratorio que se contaminan durante la obtención de la muestra o en el proceso clínico de la misma (Noviello *et al.*, 2004; Wallach *et al.*, 2004).

### 1.2.6 Patogenia

Cuando el microorganismo penetra en el huésped se aloja principalmente en los nódulos linfáticos, bazo, pulmón, hígado, útero, glándula mamaria, testículos, próstata, vesículas seminales y médula ósea (Carmichael and Kenney, 1970; Méndez-Nárez *et al.*, 1998; Wanke 2004).

Después, éstos son fagocitados por los macrófagos y luego pasan a los ganglios linfáticos regionales; se manifiesta después una linfadenopatía que es seguida de una bacteremia detectable entre la segunda a cuarta semana después de la infección, la bacteremia dura de 6 a 64 meses, razón por la cual es relativamente fácil el aislamiento de muestras de sangre. Posteriormente la división bacteriana dentro de los linfocitos y células linforeticulares provocando hiperplasia y granulomas localizados en órganos como bazo, hígado, útero, glándula mamaria, testículos, próstata, vesículas seminales, médula ósea y en ganglios linfáticos. En hembras gestantes se presenta la infección transplacentaria afectando al feto y produciendo aborto en el último tercio de la gestación, entre los días 30 al 57, promedio 45 días (Cottrino y Segura, 2004).

En machos la epididimitis es lo más común, seguido de orquitis, dermatitis escrotal húmeda, oligospermia y atrofia testicular (Cottrino *et al.*, 2004).

### 1.2.7 Diagnóstico

En 1897 Wright y Semple, describieron la técnica de aglutinación para el diagnóstico de la brucelosis (Ruiz, 1945), el suero ha sido la muestra ideal para esta técnica, los métodos más comunes para el diagnóstico de la brucelosis en los animales domésticos y en el hombre han sido los serológicos, donde las pruebas de aglutinación en placa o en tarjeta con antígenos teñidos con el colorante Rosa de Bengala o Azul de Bromocresol y la reacción de Huddleson, son los primeros que se realizan como parte del tamiz en el diagnóstico de la brucelosis tanto para cepas lisas, como rugosas (Gaultney *et al.*, 1971; George and Carmichael, 1973; Brown *et al.*, 1976; López-Merino *et al.*, 1992; Shin and Carmichael, 1999). Sin embargo, el suero también es una muestra que en la actualidad se prefiere para el diagnóstico de brucelosis humana por Biología Molecular, especialmente por la PCR (Zerva *et al.*, 2001; Elfaki *et al.*, 2005).

El diagnóstico de fiebre de Malta o fiebre ondulante en humanos se continúa realizando por la técnica de reacciones febriles para la determinación de anticuerpos contra *B. abortus* y *B. melitensis* (Gaultney *et al.*, 1971; Serra and Viñas, 2004). Lo anterior ha provocado falsos negativos en perros, cuando las personas solicitan una prueba de *Brucella canis* y ésta se realiza en laboratorios de diagnóstico humano y hacen la reacción con el antígeno de *B. abortus* para reacciones febriles humanas, sin tomar en cuenta que estas dos especies de brucelas no dan reacción cruzada con *B. canis* (Greene and George, 1990; López-Merino, 2000).

En 1973 fue presentada la propuesta diagnóstica por George y Carmichael, y que se patentó (US Patent N°. 3, 962, 413) el estuche diagnóstico de Pitman-Moore, Inc., Washington Crossing, NJ 08560. Las pruebas de aglutinación en tarjeta ha sido el método más usado para el diagnóstico de la brucelosis canina causada por *Brucella canis* en base a las características de su fácil ejecución, interpretación y relativamente bajo costo (George and Carmichael, 1974).

Se han realizado investigaciones de seroprevalencia de *B. canis* en diferentes años y en diferentes poblaciones de perros siguiendo este método diagnóstico llamado prueba de aglutinación rápida en tarjeta para detectar anticuerpos contra *Brucella canis* con el estuche diagnóstico de Pitman Moore, Inc. (actualmente fabricado por Synbiotics, Corporation), (Brown *et al.*, 1976; Flores-Castro and Segura, 1976; Flores-Castro *et al.*, 1977; Gutiérrez, 1983; Alonso, 1989; Ramírez, 1992; Méndez-Nárez *et al.*, 1998; Arredondo, 2003).

Éstos estuches diagnósticos utilizan para la prueba de aglutinación directa en tarjeta, el antígeno de *B. ovis* de la cepa Reo 198 (BCNN R22) USA., y la prueba confirmatoria con el 2-β-mercaptoetanol (George and Carmichael, 1974, Díaz *et al.*, 2001) sin embargo, para la prueba de aglutinación en tubo (TAT) para detectar títulos de anticuerpos contra *B. canis*, originalmente se utiliza *B. canis* cepa RM-6-66 que fue aislada de un cachorro producto de un aborto (Carmichael and Bruner, 1968; Carmichael and Kenney, 1968; George and Carmichael, 1974).

El diagnóstico serológico por aglutinación de la brucelosis canina requiere de la confirmación del laboratorio de microbiología (Carmichael and Kenney, 1968; Moore and Gupta, 1970; Pickerill and Carmichael, 1972; George and Carmichael, 1974; Wanke, 2004).

El hemocultivo en medio de Ruiz Castañeda, el Agar Biotriptasa para *Brucella* son los medios de cultivo especiales y es el método recomendado antes de declarar a un animal como infectado, siendo el diagnóstico final, el aislamiento e identificación de la *Brucella canis* a partir de muestras del animal (George and Carmichael, 1974; Flores-Castro *et al.*, 1977).

No obstante, un hemocultivo negativo, no es contundente para descartar la brucelosis canina causada por *B. canis* sobre todo en perros con enfermedad crónica donde la bacteriemia puede ser intermitente (Leonard, 1983).

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de *B. canis* que están disponibles hoy en día, son imprecisas y ocasionalmente dan resultados falsos positivos (Quinn *et al.*, 1994) debido a que los antígenos de superficie de las brucelas rugosas tales como *B. canis*, reaccionan en forma cruzada con los anticuerpos inducidos por otras especies de bacterias no patógenas y del mismo género como *B. ovis* y *B. melitensis* cepa 115(R) (Flores-Castro *et al.*, 1977). Ha sido reportada cierta reactividad cruzada de las cepas de brucellas con otras bacterias tales como *Yersinia enterocolitica*, *Francisella tularensis* y *Vibrio cholerae* (Joklik *et al.*, 1983; Alton *et al.*, 1988). La estrecha similitud de la cadena lateral "O" del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella spp.* (Cutler *et al.*, 2005) y la presencia de moléculas de perosamina en el LPS (López-Merino, 2000) de algunas bacterias Gram negativas entre otras *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia hermanni*, *E. coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* O:1, *Actinobacillus equuli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas spp.* y *Moraxella spp.* son las causas de las reacciones cruzadas por las pruebas de aglutinación y esto dificulta el diagnóstico y reduce la especificidad de este tipo de pruebas, lo cual provoca la posibilidad de obtener falsos positivos. (Flores-Castro *et al.*, 1977; Alton *et al.*, 1988; Greene and George, 1990; Quinn *et al.*, 1994; López-Merino, 2000).

Por tal motivo, se han estandarizado y utilizado otras técnicas como inmunofluorescencia indirecta, inmunodifusión, fijación del complemento, ELISA (Wanke, 2004; Godfroid *et al.*, 2005; Lucero *et al.*, 2005-A).

Las técnicas de ELISA tienen muy buena sensibilidad y son más confiables para etapas tempranas de la enfermedad incluyendo el diagnóstico de brucelosis canina en humanos (Lucero *et al.*, 2002; Wanke, 2004).

Existe una amplia gama de estudios e investigaciones basadas en el diagnóstico molecular sobre el género *Brucella spp.* y en los últimos años se ha reportado el diagnóstico molecular por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando iniciadores específicos del género (Baily *et al.*, 1992; Romero *et al.*, 1995; Bogdanovich *et al.*, 2004) para diferenciar algunas

especies de muestras clínicas de sangre humana (Leal-Klevezas *et al.*, 1995; Morata *et al.*, 1998) de muestras de sueros humanos sospechosos de brucelosis (Zerva *et al.*, 2001; Elfaki *et al.*, 2005) de productos y subproductos de origen animal (Leal-Klevezas *et al.*, 1995).

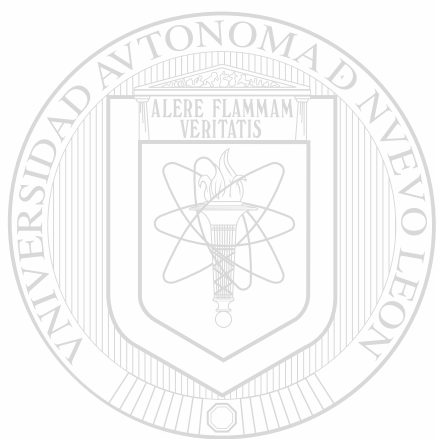
Además, se ha utilizado la PCR para confirmar la identificación bioquímica de colonias aisladas de muestras clínicas, es decir, de cepas de campo y también de cepas de referencia (Romero *et al.*, 1995; Vizcaíno *et al.*, 1997; Whatmore *et al.*, 2005).

Inclusive, las nuevas brucelas aisladas de mamíferos marinos y que están en proceso de reconocimiento taxonómico han sido ampliamente comparadas molecularmente mediante la PCR, con otras seis especies del género *Brucella* y con otros géneros de la misma familia que las brucelas, tal es el caso de *Ochrobactrum spp.* (*O. intermedium* y *O. anthropi*) y con otras bacterias del orden Rhizobiales, *Agrobacterium spp.*, con la que está filogenéticamente relacionada (Claverau *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1999; Forbes *et al.*, 2000; Bricker *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001; Whatmore *et al.*, 2005).

Los intentos por diferenciar molecularmente las especies del género *Brucella* por la técnica de la PCR son muchos (Baily *et al.*, 1992; Leal-Klevezas *et al.*, 1995; Romero *et al.*, 1995; Morata *et al.*, 1998; Bricker *et al.*, 2000; Bogdanovich *et al.*, 2004), no así los estudios realizados con objetivos de identificación, diferenciación y filogenia por la técnica de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) usando enzimas de restricción específicas de sitio de corte (Vizcaíno *et al.*, 1996, 1997; Whatmore *et al.*, 2005).

Además, las investigaciones centradas en la diferenciación molecular de *Brucella canis* de otras especies, son pocas, distinguiéndose los trabajos de Vizcaíno en Francia, los de Lucero en Argentina y Whatmore en Reino Unido que usan enzimas de restricción y proponen patrones de diferenciación específica de las especies *B. canis* y *B. melitensis* de *B. abortus* y otras

(Vizcaíno *et al.*, 1996, 1997; Lucero *et al.*, 2005 B; Whatmore *et al.*, 2005). Por otro lado, Fox en EEUU, reporta un trabajo que especifica la diferenciación de *Brucella canis* de otras brucelas patógenas para el ser humano por PCR y perfil de carbohidratos del LPS que enfoca el estudio a un carbohidrato llamado quinovosamina presente en el LPS de las especies *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* y que está ausente en *B. canis* (Fox *et al.*, 1998).



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 1.3 HIPÓTESIS

Muestras clínicas y cepas de *Brucella spp.* aisladas a partir de perros seropositivos a brucelosis canina pueden detectarse, identificarse y diferenciarse de otras bacterias mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplado al análisis del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción del gen *omp-31* del género *Brucella spp.*

### 1.4 OBJETIVOS

#### Objetivo general

Detectar y diferenciar mediante métodos moleculares y bioquímicos la presencia de *Brucella canis* en perros del área metropolitana de Monterrey, N.L.

#### Objetivos específicos

1.- Realizar el diagnóstico de la infección por *Brucella canis* mediante:

a).- Cultivo, aislamiento e identificación bioquímica bacteriana

b).- PCR-RFLP

2.- Determinar la prevalencia de anticuerpos contra *Brucella canis* en perros Monterrey N.L. y su área metropolitana durante los años del 2000 al 2005.

### 1.5 METAS

1.- Contar con un método de diferenciación molecular de cepas de *Brucella canis* de otras bacterias incluídas miembros del género *Brucella*.

2.- Aislar *Brucella canis* a partir de perros seropositivos.

3.- Obtener la prevalencia de anticuerpos contra *Brucella canis* en perros de Monterrey, N.L. y su área metropolitana durante los años del 2000 al 2005.



## CAPITULO 2

### MATERIAL Y METODOS

#### 2.1 Lugar de realización de la investigación

Esta investigación se realizó en la ciudad de Monterrey, N. L., México y su zona metropolitana. Monterrey es una ciudad localizada a 537 metros sobre el nivel del mar y se encuentra geográficamente ubicada a los 25 grados y 40 minutos de latitud norte y a los 100 grados 18 minutos de latitud oeste.

Los análisis serológicos y moleculares se llevaron a cabo en la Unidad de Investigación Veterinaria en Enfermedades Infecciosas y el Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

#### 2.2 Muestreo

##### 2.2.1 Número de muestras

Se tomaron 164 muestras de sangre de perros tanto de criaderos como de propietarios particulares, con o sin síntomas de la enfermedad. Además, se analizaron los sueros de ejemplares caninos que acudieron al monitoreo serológico por motivo de requisito de cruce.

Este requisito es una prueba que es exigida por los propietarios de los ejemplares que van a aparearse para descartar la posibilidad de una eventual infección por *B.canis*.

## 2.2.2 Obtención de la muestra

Las muestras de sangre se tomaron a partir de la vena radial. En el caso de perros de razas pequeñas de la vena yugular. Se obtuvo un total de 6 a 8 ml de sangre que se repartieron en dos tipos de muestras una con anticoagulante (EDTA) y otra sin anticoagulante en tubos de ensayo (13 X100mm) al vacío. En algunos casos, se extrajo la sangre directamente de la vena mediante agujas de doble filo y aditamentos para el vaciado directo sobre el tubo, mientras que en otros se emplearon jeringas de 3-5ml con agujas de 21G y posterior vaciado hacia los respectivos tubos.

Las muestras obtenidas en tubos sin anticoagulante se dejaron reposar por 30 minutos o una hora a temperatura ambiente y posteriormente fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos para obtener el suero.

Este último fluido fue extraído con pipetas tipo Pasteur estériles y depositados en tubos ependorf.

En cada tubo se almacenó entre 1 y 1.5ml de suero y mantenidas en refrigeración (4°C) para su uso inmediato o en congelación a - 20°C para su uso posterior a 24 horas.

Las muestras de sangre con EDTA (Figura 1B), se conservaron en refrigeración para su posterior uso en el aislamiento bacteriano, así como en detección molecular (Méndez-Nárez *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 2003).

## 2.3 Serología

### 2.3.1 Calidad y conservación de los sueros

Los sueros obtenidos y procesados fueron claros y libres de turbidez y de contaminación visible (Flores and Carmichael, 1984), ni presentaron hemólisis. Estas condiciones pueden interferir en los resultados provocando falsos

positivos debido a aglutinación no específica (Moore and Gupta, 1968; Carmichael, 1968; Greene and George, 1990).

La prueba se nulifica (no es válida) también en aquellos casos, y por lo tanto no se pueden interpretar resultados, en los cuales los ejemplares bajo estudio hayan sido sometidos a antibioticoterapia debido a la probabilidad de arrojar falsos negativos.

Todo esto, a reserva de que se haya suspendido el tratamiento mínimo cuatro semanas previas (Flores-Castro and Carmichael, 1984; Greene and George, 1990).

### 2.3.2 Estuche diagnóstico para *B. canis*

La detección de anticuerpos contra *Brucella canis* fue realizada con la ayuda del estuche diagnóstico "Canine Brucellosis Antibody Test Kit" D-Tec® CB de Synbiotics, Corporation (San Diego, CA U.S.A). Para el manejo del estuche diagnóstico, de las muestras así como la interpretación de los resultados, se realizaron basados en las recomendaciones descritas por el fabricante.

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El estuche contiene 3 viales con los siguientes reactivos:

Reactivo A como control positivo, reactivo B con el antígeno y reactivo C con la solución de 2-β-Mercaptoetanol al 0.2M (Figura 1).

El fundamento de la prueba se basa en la aglutinación directa de bacterias (*Brucella ovis*, cepa Reo 198) muertas y teñidas con el colorante rosa de bengala por parte de anticuerpos anti-*B. canis* (George and Carmichael, 1973).

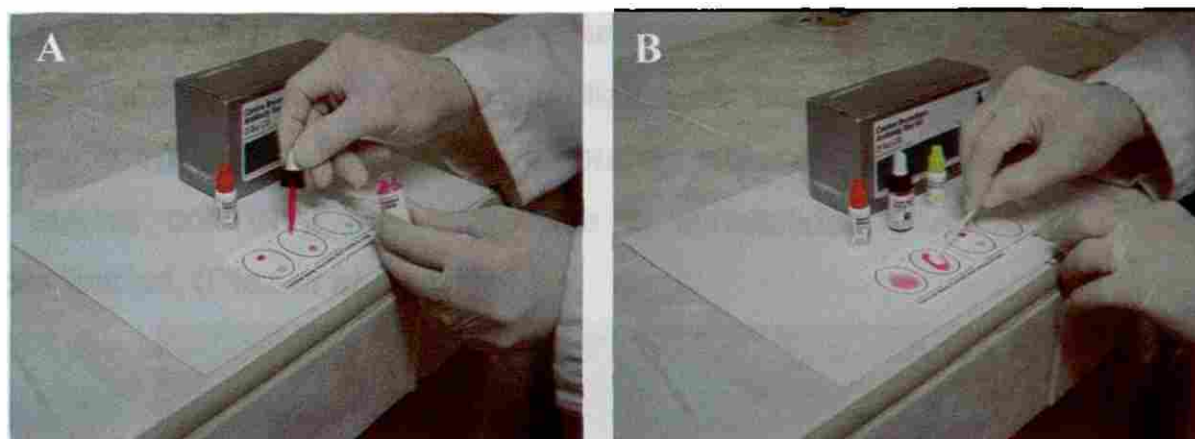


**Figura 1.** Estuche diagnóstico para detectar anticuerpos contra *Brucella canis* por la prueba de aglutinación rápida de tarjeta. Reactivo A, como suero control positivo, reactivo B, con el antígeno para detectar anticuerpos contra *B. canis* y reactivo C, con la solución de 2-β-Mercaptoetanol al 0.2M para la prueba confirmatoria.

#### 2.3.1.1 Prueba directa

Según el protocolo recomendado para la determinación de anticuerpos contra *Brucella canis*, se requirieron de 40 microlitros (μl) de suero, (aproximadamente una gota), la que se colocó en un extremo del ovalo de la tarjeta y en el extremo opuesto, se colocaron 40 μl del antígeno teñido del estuche diagnóstico (Figura 2-A). Con aplicadores plásticos o de madera se homogenizaron suavemente el antígeno con el suero (Figura 2-B) y posteriormente se agitó la tarjeta durante 20 segundos. Finalmente se dejó reposar la tarjeta en posición horizontal durante dos minutos. Al cabo de este tiempo la prueba se interpreta como positiva si se forma la clásica aglutinación (Figura 6 y 7 en resultados) y la prueba se interpreta como negativa en caso de ausencia de grumos y homogeneidad en los reactantes (Figura 8 en resultados). Si se observa una aglutinación incompleta o moderada, el ejemplar se reporta como sospechoso y se somete a la prueba del 2-β-mercaptoetanol (2 ME). Si esta última resulta negativa se recomienda realizar una segunda prueba 21 días posteriores.

Siguiendo el protocolo del estuche, sólo se tomaron en cuenta aquellas reacciones que ocurrieron dentro de los dos minutos de mezclado del suero con el antígeno (George and Carmichael, 1973).



**Figura 2.** Reactantes de la prueba de aglutinación. En la fotografía 4-A, observámos el momento en que se colocan los reactantes, el suero del paciente y el antígeno de *B. ovis* cepa Reo 198 (BCNN R22) USA. La figura 4-B corresponde a la homogenización de los reactantes incluyendo un suero positivo (gotero tapón rojo) como control.

### 2.3.1.2 Prueba del 2- $\beta$ -Mercaptoetanol

El protocolo de la prueba rápida de aglutinación en tarjeta que patentara George y Carmichael, establece que se realice la prueba del 2- $\beta$ -Mercaptoetanol (2 ME) como parte del diagnóstico serológico confirmatorio en perros. No debe emitirse un diagnóstico serológico sin haber realizado la prueba del 2 ME (George and Carmichael, 1973).

De los sueros de ejemplares positivos a la prueba directa, se tomaron 80  $\mu$ l de suero, se depositaron en un tubo de ensaye limpio y se le añaden 80  $\mu$ l del reactivo 2- $\beta$ -mercaptoetanol del estuche diagnóstico de Synbiotics, Co. etiquetado como "Reactivo C" (Figura 3). Se dejaron reaccionar por un minuto agitando suavemente para permitir la reacción. De la mezcla se tomaron 40  $\mu$ l (una gota) y se colocó en el extremo del ovalo de la tarjeta, en el lado opuesto se colocaron 40  $\mu$ l del antígeno para *B. canis* homogenizándose suavemente con aplicadores plásticos o de madera; se agitó la tarjeta por 20 segundos dejándose reposar horizontalmente durante dos minutos de reacción tomándose la lectura después de tiempo indicado, observando la presencia o ausencia de grumos así como de partículas aglutinantes. La razón de someter el suero seropositivo al 2 ME, es romper los enlaces disulfuro que unen la

el suero seropositivo al 2 ME, es romper los enlaces disulfuro que unen la Inmunoglobulina M (IgM) que tiene una estructura pentamérica y siendo la primera inmunoglobulina que se sintetiza en la respuesta inmune primaria; su presencia en el suero indica una respuesta inmune temprana. La reacción de los sueros con el 2 ME no reduce la sensibilidad y aumenta mucho la especificidad, (Díaz *et al.*, 2001).



**Figura 3.** Prueba confirmatoria del 2- $\beta$ -mercaptoetanol. Para la prueba de aglutinación rápida de tarjeta del estuche diagnóstico para detectar anticuerpos contra *Brucella canis* de Synbiotics, Co.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 2.3.1.3 Control positivo

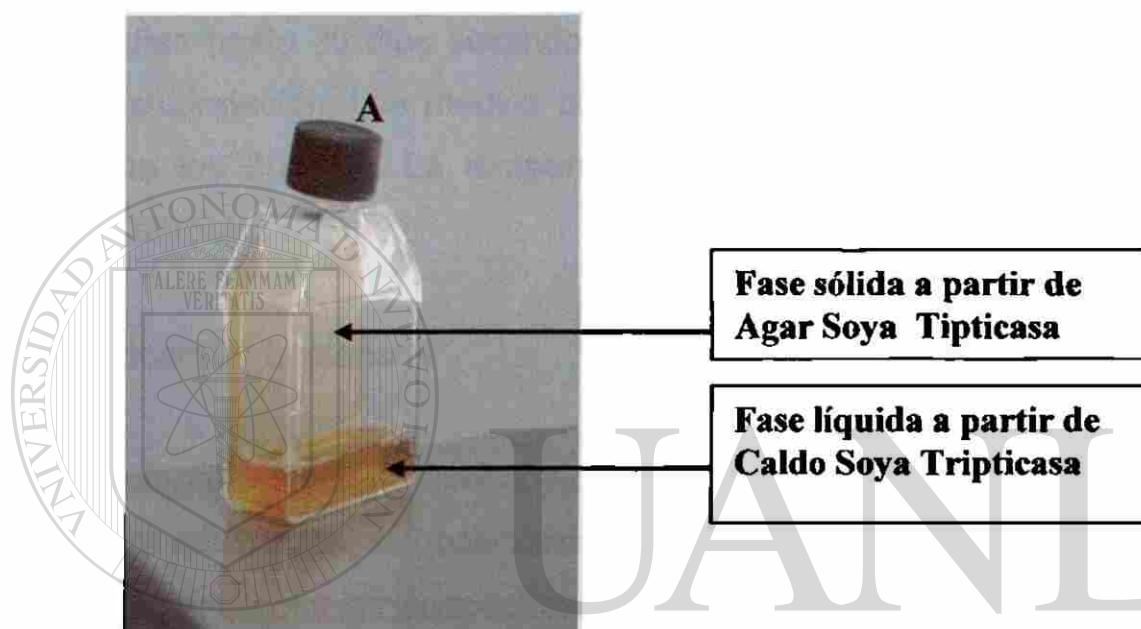
Las muestras se corrieron con un control positivo del estuche diagnóstico de Synbiotics, Co. (Figura 1 y 2 B). La prueba se realizó colocando 40  $\mu$ l del suero control positivo en un extremo del ovalo y en el lado contrario se colocó 40  $\mu$ l del antígeno específico de *B. canis*.

Se homogenizaron suavemente los reactantes con un aplicador de plástico o madera y se agitó la tarjeta por 20 segundos, dejándose reposar el resto del tiempo de reacción de dos minutos y esperando observar una aglutinación franca y total (Figura 6-1) del control positivo (George and Carmichael, 1973).

## 2.4 Microbiología

### 2.4.1 Aislamiento e identificación de *Brucella canis*

Las muestras de sangre se sembraron en medio de Ruíz Castañeda (Figura 4-A) y en Medio de Cultivo Agar Biotriptasa (DIBICO™) especial para el aislamiento y cultivo de *Brucella*. Se incubaron a 37° C por cinco a 21 días en condiciones de aerobiosis.



**Figura 4.** Medio de Ruíz-Castañeda y Biotriptasa. En la fotografía 4-A se muestra el medio de cultivo bifásico de Ruíz Castañeda para la realización de los hemocultivos. Obsérvese por una parte la fase sólida y por otra la fase líquida.

Las muestras obtenidas para bacteriología a partir de una hembra seropositiva fueron ovarios, útero, oviductos, bazo, hígado, pulmón, corazón y ganglios. En el caso de aborto, se tomaron muestras de placenta, cotiledones, líquido amniótico y en caso de productos abortados, se obtuvieron muestras de contenido estomacal y muestras de los órganos antes mencionados.

Las muestras se conservaron en bolsas estériles, jeringas (fluidos) o cajas de petri en refrigeración para su inmediato proceso.

Las muestras de órganos y tejidos para aislamiento de *Brucella canis* se sembraron en Medio de Cultivo Agar Biotriptasa (DIBICO™) especial para el aislamiento y cultivo de *Brucella*.

## 2.4.2 Incubación

Los cultivos se incubaron a 37° C por cinco a 21 días en condiciones de aerobiosis. Al momento de procesar las muestras para biología molecular, al resuspender el coagulo en la solución TE pH 8 (Tris base EDTA), se tomó una muestra y se inoculó el medio Biotriptasa incubándose en aerobiosis a 37° C. Se sometió directamente a la extracción de ADN y se corrió la PCR.

Los cultivos se revisaron periódicamente cada 24 horas dejándolos incubar durante 21 días hasta 30 días sellándose con parafilm las cajas de petri para evitar su deshidratación. Los medios bifásicos de Ruiz Castañeda se dejaron incubar hasta los 30 días. La temperatura de incubación fue de 37° C en condiciones aerobiosis.

## 2.4.3 Identificación bacteriana

### 2.4.3.1 Morfología colonial y microscópica

Después de la incubación, se observaron las características coloniales de las bacterias y de las colonias sospechosas del género, se hicieron frotis y se tiñeron por la técnica de Gram para su observación microscópica.

### 2.4.3.2 Pruebas bioquímicas

Las colonias sospechosas de *Brucella canis* se identificaron con las pruebas bioquímicas convencionales para bacterias Gram negativas y aquellas básicas para el género *Brucella* (ver tabla N° I).

En primera instancia se realizaron las pruebas de catalasa y de la oxidasa. Posteriormente, se llevo a cabo la batería completa de pruebas bioquímicas que fueron: Agar Hierro Triple Azucar (TSI), Agar Hierro Lisina (LIA), Agar urea de Christensen, Agar Citrato de Simons, Agar Motilidad Indol Ornitina (MIO), Agar Sulfhídrico Indol Motilidad (SIM), Caldo MR-VP.



**Tabla I**

Medios de cultivos para pruebas bioquímicas. Identificación bacteriana de cepas de *Brucella canis*.

Medio Cultivo	Modo de Inoculación	Incubación		Reactivos añadidos
		Tiempo (h)	Temperatura(°C)	
TSI	Punción y estría	48	36	No
LIA	Punción y estría	48	36	No
MIO	Punción	48	36	Reactivo Kovack
FENILALANINA	Estría	48	36	No
SIM	Punción	48	36	Reactivo Kovack
UREA *	Estría	48	36	Urea 40 %
CITRATO	Estría	48	36	No
MR-VP	Suspensión	48	36	No
Rojo Metilo	Suspensión	48	36	Rojo de metilo
Voges Proskauer	Suspensión	48	36°	$\alpha$ -naftol

\* Se le añade urea estéril al 40% en proporción de 5 ml por cada 95 ml de medio agar base urea. TSI= Agar Hierro Triple Azucar, LIA=Agar Hierro Lisina, MIO= Motilidad Indol Omitina, SIM= Sulfhídrico Indol Motilidad, MR-VP=Rojo de Metilo Voges Proskauer.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### 2.4.3.3 Pruebas de sensibilidad a los antibióticos

La detección de resistencia/susceptibilidad de *B. canis* a los antibióticos fue determinada bajo procedimientos convencionales del antibiograma, empleando los sensidiscos múltiples de 12 antibióticos. A partir de un cultivo joven (48 hs de incubación) de las cepas de campo de *B. canis* inoculadas en Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC), se obtuvo una muestra con un hisopo estéril.

Esta muestra fue inoculada en una placa de Agar Soya Trypticasa (AST) mediante esparcimiento del cultivo en toda la superficie. En seguida y con la

ayuda de pinzas metálicas estériles se colocó un “multidisco” que contenía 12 antibióticos seleccionados para bacterias Gram negativas.

Las placas se incubaron a 37° C por 48-72 hs en condiciones de aerobiosis. Al cabo de este tiempo, se observaron las cajas con los antibiogramas y se midieron los halos de inhibición y se compararon con los estándares establecidos para determinar así la sensibilidad o resistencia a los antibióticos.

#### 2.4.4. Preparación de los cultivos bacterianos para la PCR

##### 2.4.4.1 Cultivos jóvenes de cepas de campo de *B. canis*

Los cultivos de las bacterias de campo de *B. canis* aisladas se inocularon en caldo ICC y se incubaron por 24 a 72 hs a 37° C para obtener un cultivo joven.

##### 2.4.4.2 Cepas control negativo para PCR de *Brucella* spp.

Las bacterias que se usaron en este estudio para demostrar la especificidad de la PCR para *Brucella* spp., fueron *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira canicola*, *Bordetella bronchiseptica* y se utilizó una levadura como control que en este caso fue *Malassezia* spp.

Éstas se inocularon en tubos de ensayo con caldo ICC y se incubaron durante 18 horas a 37° C, obteniendo así, un cultivo del cual partimos para la extracción de ADN (Romero *et al.*, 1995).

#### 2.4.5 Cuenta viable

##### 2.4.5.1 Preparación del cultivo joven

Las bacterias previamente identificadas como *Brucella canis*, se sembraron en Agar Soya Trypticase y se incubaron a 36° C durante tres a cinco días en condiciones de aerobiosis hasta observar el desarrollo de colonias características del género *Brucella* spp. De éstas, se tomó una colonia del

cultivo en placa y se sembró en un tubo de ICC y se incubó en las mismas condiciones obteniendo un cultivo joven para la cuenta viable en placa.

#### 2.4.5.2 Diluciones

El cultivo joven se homogenizó con el vortex, se tomó 1 ml y se vertió en un tubo de ensayo con nueve ml de solución salina fisiológica estéril, obteniendo así, la dilución  $10^{-1}$  o 1:10. De la dilución 1:10, se agitó en el vortex, se tomó un ml, se vertió en otro tubo con nueve ml de solución salina fisiológica obteniendo así la dilución  $10^{-2}$ . Se procedió de la misma manera hasta obtener 12 diluciones logrando así una máxima dilución de  $10^{-12}$ .

#### 2.4.5.3 Cuenta viable por difusión en placa para *B. canis*.

De cada una de las diluciones, se tomó una alícuota de un ml y se depositaron en una caja de petri estéril a la cual después se vertieron 20 ml de Agar Soya Tripticasa templado a 45-50° C. En movimientos de rotación en forma de “ocho” se homogenizó la alícuota del cultivo joven con el medio de cultivo, se dejaron solidificar las placas y se incubaron a 36° C por tres a cinco días en condiciones de aerobiosis.

#### 2.4.5.4 Obtención de las UFC por ml. de cultivo de *B. canis*

Al tiempo de incubación, se observaron las placas y se contaron las colonias presentes en cada una de ellas y el número de colonias se multiplicó por el factor de dilución para así tener el total de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

#### 2.4.5.5 Cultivos de *B. canis* para pruebas de sensibilidad con la PCR

Para poder calcular la cantidad mínima de bacterias presentes en un cultivo que puede ser detectado por la técnica de PCR, se procedió a la extracción de ADN por el método de Baily (Baily *et al.*, 1992).

De las diluciones realizadas para la cuenta viable, se tomó un ml para la extracción del ADN. Esta se realizó por el método de Puregene® (Gentra System) y por el método de fenol cloroformo (Birnboim and Doly, 1979).

## 2.5 Biología Molecular

### 2.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se realizó en muestras sanguíneas, coágulos, sueros y colonias bacterianas sospechosas a *B. canis*.

### 2.5.2 Preparación de las muestras para la extracción de ADN

#### 2.5.2.1 Cultivos bacterianos juvenes

Las cepas de campo de *B. canis* y las bacterias de géneros y especies diferentes para pruebas de especificidad de la PCR para el género *Brucella spp.* fueron mantenidos en tubos con ICC.

#### 2.5.2.2 Preparación de los antígenos vacunales y serológicos

Los antígenos usados como controles positivos y negativos fueron los siguientes.

Como control positivo se utilizó el antígeno del estuche diagnóstico para detectar anticuerpos contra *Brucella canis* por serología de Synbiotics que utiliza el antígeno de *B. ovis* cepa Reo 198 (BCNN R22) USA; así mismo, se utilizó el antígeno vacunal de *B. melitensis* cepa REV de la vacuna melirev-N.

Como control negativo para la PCR se utilizó el antígeno vacunal de *B. abortus* cepa RB51<sup>MR</sup> de la vacuna Bruces RB51<sup>MR</sup> Plus.

### 2.5.2.3 Preparación del ADN

Se tomaron 500 µl a partir de los cultivos bacterianos aislados e identificados como *B. canis* y de las cepas control negativo, de los antígenos del estuche diagnóstico de serología de Synbiotics, Co., y de los antígenos vacunales.

### 2.5.3 Extracción de ADN de antígenos y muestras clínicas

La extracción de ADN se realizó mediante el sistema de purificación de ADN de Puregene® especialmente con la técnica de purificación de ADN de cultivos bacterianos de gram negativos y además se utilizó la técnica de Fenol-Cloroformo (Birboim and Doly, 1979).

#### 2.5.3.1 Extracción de ADN de cultivos bacterianos por la técnica de Puregene®

La extracción de ADN se realizó del antígeno comercial del estuche diagnóstico para la prueba de aglutinación rápida en tarjeta para *Brucella canis* de Synbiotics, Co.

Se tomaron 500 µl del antígeno colocándolos en un tubo eppendorf el cual se sometió a centrifugación a 14, 000 rpm por cinco segundos obteniendo una pastilla y removiendo el sobrenadante con una pipeta y colocándolo en otro tubo eppendorf estéril. Al sobrenadante, se le adicionó 300 µl de la solución de lisis celular resuspendiendo la pastilla accionado la micropipeta repetidas veces hasta completa resuspensión.

Se incubaron las muestras a 80° C por cinco minutos para la lisis celular.

Después del tratamiento térmico se dejaron templar las muestras a temperatura ambiente y se le adicionaron 100 µl de la solución de precipitación de proteínas (SPP) para el lisado celular. Se sometieron a fuerte agitación en el Vortex por 20 segundos hasta la completa y uniforme mezcla de la SPP con el lisado celular. Posterior a esto, se centrifugó el homogenizado a 14, 000 rpm por tres minutos.

Se obtuvo el sobrenadante cuidando de no remover la pastilla formada y se colocó en otro tubo limpio y estéril adicionándole 300 µl de isopropanol al 100

%). Los componentes se mezclaron en el tubo por agitación suave con movimientos de inversión con un mínimo de 50 veces.

Se centrifugó a 14, 000 rpm por un minuto y se observó el contenido de ADN como una pequeña pastilla blanca en el fondo. Se decantó el sobrenadante, se dejó secar el tubo en papel absorbente. Se agregaron 300 µl de etanol al 70 % y se homogenizó la pastilla con el etanol por inversión suave del tubo para lavar el ADN. Después de una centrifugación a 14, 000 rpm por un minuto y posteriormente a esto, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla invirtiendo el tubo sobre papel absorbente limpio por unos 15 minutos.

A la pastilla obtenida se le adicionaron 50 µl de la solución hidratadora de ADN y se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

2.5.3.2 Extracción de ADN de muestras de sangre, coágulos, sueros y cultivos jóvenes por la técnica de Fenol-Cloroformo (Birboim and Doly, 1979).

En tubos tipo eppendorf se colocaron 300 µl de los cultivos jóvenes de cada una de las cepas de *B.canis* y se les añadió 600 µl de amortiguador TE pH 8.0 (Tris base EDTA). Los tubos fueron agitados moderadamente y posteriormente fueron centrifugados durante por un minuto a 12, 000 rpm. Se repitieron los lavados hasta obtener un pellet blanco. Posteriormente se les agregó 100 µl de amortiguador K y 2 µl de proteinasa K, ésta mezcla se incubó por 4 horas a 56°C revisando cada hora, posteriormente se agregaron 200 µl fenol y 200 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Esta mezcla se homogenizó en el vortex y posteriormente fue centrifugada durante 10 minutos a 14 000 rpm. La fase superior acuosa fue transferida a un nuevo tubo eppendorf y a esta se le agregaron 200 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Esta mezcla se agitó moderadamente y enseguida fue centrifugada a 14 000 rpm durante 10 minutos.

Posteriormente se volvió a transferir la fase acuosa resultante a un nuevo tubo eppendorf. A esta fase se le agregó 35.5 µl NaCl 2.25 M y 1000 µl etanol puro frío. Después de 30 minutos o hasta observar la precipitación del ADN los tubos fueron centrifugados a 14 000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla resultante se agregaron 1000 µl de etanol al 70%.

Después el tubo fue agitado levemente y vuelto a centrifugar 5 min a 14 000 rpm. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla se dejó secar para finalmente agregar 100 µl de amortiguador TE pH 8 para almacenarse a - 20°C hasta su uso.

#### 2.5.4 Iniciadores y condiciones de amplificación

Para las pruebas de PCR se seleccionaron dos iniciadores de acuerdo con lo reportado por Vizcaíno con las siguientes secuencias de nucleótidos que amplifican un segmento de la proteína externa de membrana OMP-31 (Vizcaíno et al., 1996, 1997).

Las secuencias son:

31 SD (5'-TGACAGACTTTTTTCGCCGAA-3')

31TER (5'CATTCAGGACAATTCCCGCC-3')

#### 2.5.5 PCR

Para realizar la PCR se colocó en un tubo eppendorf 40.75 µl de agua UPE, 5 µl del Buffer 10 X, 1.5 µl de Cloruro de Magnesio, 1 µl de los dNTPs, 0.5 µl del ADN templado y 0.25 µl de Taq polimerasa (ver tabla II y Apéndice A).

Para la técnica de PCR se emplearon los iniciadores 31SBr y el 31TERBr a una concentración del stock de 100 pmol/µl habiéndose colocado 0.5 µl de cada uno de los iniciadores en un tubo eppendorf. Todo esto llevado a un volumen final de 50 µl.

Las condiciones de PCR estandarizado y el programa de amplificación se detallan en las tablas II y III.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Programmable Thermal Controller (PTC-100)<sup>TM</sup> MJ Research, Inc.

#### 2.5.5.1 Condiciones de amplificación

Las condiciones de amplificación para realizar la PCR de las colonias bacterianas aisladas en el laboratorio a partir de diversas muestras clínicas de cinco perros diferentes, se tomaron las condiciones reportadas por Vizcaíno y colaboradores las cuales fueron modificadas para el presente estudio (Vizcaíno *et al.*, 1997).

El primer ciclo de desnaturalización se llevó a cabo a 94 ° C por 5 minutos; posteriormente se sometieron las muestras a 30 ciclos (alineamiento a 58 ° C por 30 segundos y extensión a 70° C por 30 segundos y 94° C por 30 segundos para la desnaturalización); el último ciclo fue de 58° C por 30 segundos para la fase final de alineamiento y 70° C por 10 minutos de extensión.

En la tabla número tres se observan las condiciones de amplificación utilizadas en esta investigación y al mismo tiempo, el programa de la PCR.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**TABLA II**

Reactantes de la mezcla de PCR<sup>(\*)</sup> utilizadas para los análisis de identificación molecular de las colonias bacterianas de *B. canis*.

REACTIVO	CONCENTRACION	VOLUMEN AÑADIDO	CONCENTRACION FINAL
Primer 31 SDBr	693 pmol	0.5 µl	1 pmol/µl
Primer 31 TERBr	704 pmol	0.5 µl	1 pmol/µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 µl	1.5 mM
Buffer 10 X	10 X	5.00 µl	1X
DNTPs	10mM c/u	1.00 µl	200 µM
H <sub>2</sub> O – UPE	—	40.75 µl	—
Taq polimerasa	5u/µl	0.25 µl	1.25 U
ADN Molde		0.5 µl	ND
Volumen final		50 µl	

(\*) Vizcaino et al., 1997; con algunas modificaciones

**TABLA III**

Condiciones de amplificación (\*) y programa para el Termociclador Programmable Thermal Controller (PTC-100)<sup>TM</sup> MJ Research, Inc.

CICLOS	FASE	TIEMPO	TEMPERATURA
1 CICLO	Desnaturalización inicial	5 minutos	94° C
30 CICLOS	Desnaturalización	30 s	94° C
	Alineación	30 s	58° C
	Extensión	30 s	70° C
1 CICLO	Alineación	30 s	58° C
	Extensión final	10 minutos	70° C
1 CICLO	Conservación	24 horas	4° C

(\*) Vizcaíno, 1997 con algunas modificaciones

### 2.5.6 Electroforesis de productos amplificados

Para realizar la electroforesis de las muestras amplificadas se procedió a descongelar las muestras manteniéndolas siempre sobre hielo y se preparó una

tira de "parafilm" que se puso sobre una gradilla pequeña para tubos ependorf en la cual se colocaron 2  $\mu$ l de amortiguador de carga (colorante azul de bromofenol-Sigma®) por 8  $\mu$ l del producto de PCR. Una vez mezclados se tomaron con una micropipeta y se colocaron las muestras en cada uno de los pozos del gel de agarosa (Figura 5).

Para confirmar la amplificación del ADN de las muestras, se corrieron los productos obtenidos en gel de agarosa al 1.8 % en una cámara de electroforesis BIO RAD Mini Sub Cell GT con TAE 1 X como buffer de corrimiento, utilizando una fuente de poder BIO RAD Power Pac 3000 a 85 V, 60 mA y 5 W por 30 minutos. Al mismo tiempo, se corrieron geles de poliacrilamida al 9% en una cámara de electroforesis C. B. S. Scientific Co. modelo MGV-102 y otra de la marca Zigma, modelo Z 35, 280-2 usando la misma fuente de poder y las mismas condiciones mencionadas.

#### 2.5.7 Productos amplificados por PCR



**Figura 5.** Vaciado de los productos de amplificación en el gel de agarosa. En esta figura se observa la colocación de los productos amplificados de PCR en el gel de agarosa.

Además de los productos amplificados, se agregó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen) para la comprobación del peso de

las bandas obtenidas. La electroforesis se realizó a 85 V y al cabo de 30 minutos, se tiñó el gel con Bromuro de Etidio (BE) al 0.1 % exponiendo el gel al reactivo durante 15 minutos.

Se colocó el gel en el transiluminador UV - BIORAD 2000 para visualizarlo con luz Ultra Violeta (UV) y posteriormente se llevó el gel al fotodocumentador para fotografiarlo con luz UV en un rango de 290-365 nm con el equipo MultiDoc-It Digital Imaging System UVP. Se tomaron las fotos y se archivaron en una computadora.

### 2.5.8 Digestión con las enzimas de restricción

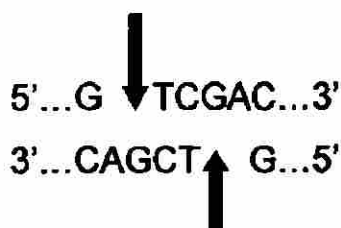
Para las pruebas de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, (RFLP) (Giffith *et al.*, 2000), se usaron las enzimas ***Ava II*** (***Appligene***) y ***Sal I*** (***Gibco BRL***) (Vizcaíno *et al.*, 1997).

Estas enzimas tienen la capacidad de cortar en sitios específicos del ADNc; la ***Ava II***, corta en el siguiente sitio:



Donde "W" puede ser Adenina (A) o Timina (T).

La otra enzima ***Sal I*** corta en este otro sitio:



Del producto amplificado (ADNc) a través de la PCR, se tomaron 5 µl para realizar la digestión con la ayuda de las enzimas de restricción *Ava II* y *Sal I*. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante de las enzimas para llevar a cabo los procesos de digestión.

El corte enzimático con la enzima *Ava II*, (fuente *Anabaena variabilis*, ATCC 27892), consistió en mezclar 2 µl del buffer (50 mM de acetato de potasio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio, 1 mM DTT, pH 7.9 a 25°C), 0.5 µl (10U/µl) de la enzima, 12.5 µl de agua ultra pura estéril (UPE) y 5 µl de producto de PCR, para un volumen final de 20 µl.

Para el caso de la enzima *Sal I*, (fuente *Streptomyces albus*, (ATCC 49789), se mezclaron 2 µl de buffer (100 mM Tris-HCl [pH 7.6], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, a 37°C), 0.25µl (10U/µl) de la enzima, 12.55 µl de agua UPE y 5 µl del producto de ADN amplificado por la PCR, para un volumen total de 20 µl.

Para ambas enzimas las condiciones de incubación consistieron en una temperatura de 37° C durante una hora con agitación leve cada 15 minutos.

#### 2.5.9 Productos de digestión enzimática

Los productos del corte con enzimas de restricción fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 9% teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el fotodocumentador.

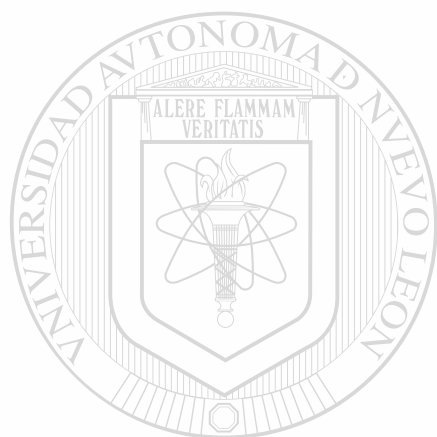
Se mezclaron 2 µl de amortiguador de carga (colorante azul de bromofenol-Sigma®) y 8 µl del producto digerido. Ya homogenizada la mezcla se tomaron con la micropipeta y se colocaron en cada uno de los pozos del gel y se inicio el programa a 85 V y 60 mA y al cabo de 30 minutos se llevó el gel a teñir en BE por 15 minutos. Posteriormente se observó en el transiluminador se tomaron las fotografías en el fotodocumentador y se archivaron en la computadora.

## 2.6 Análisis estadísticos

El porcentaje de seroprevalencia (%SP) fue estimada mediante la siguiente fórmula:

$\%SP = \text{número de seropositivos} / \text{total analizado} \times 100$  (Thrusfield, M., 1995).

La asociación entre la raza, procedencia (criadero, casa) o el sexo de los animales estudiados con la seropositividad a brucelosis canina fue determinada mediante Chi-cuadrada en tablas de contingencia según los datos de cada variable (Olivares, E. 1995, Petrie and Watson, 1999).



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPITULO 3

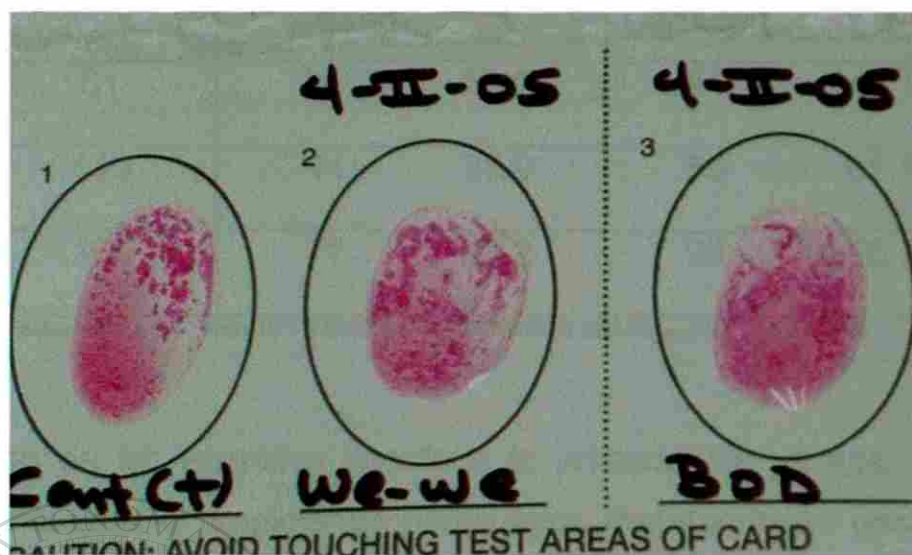
### RESULTADOS

#### 3.1. Análisis serológicos

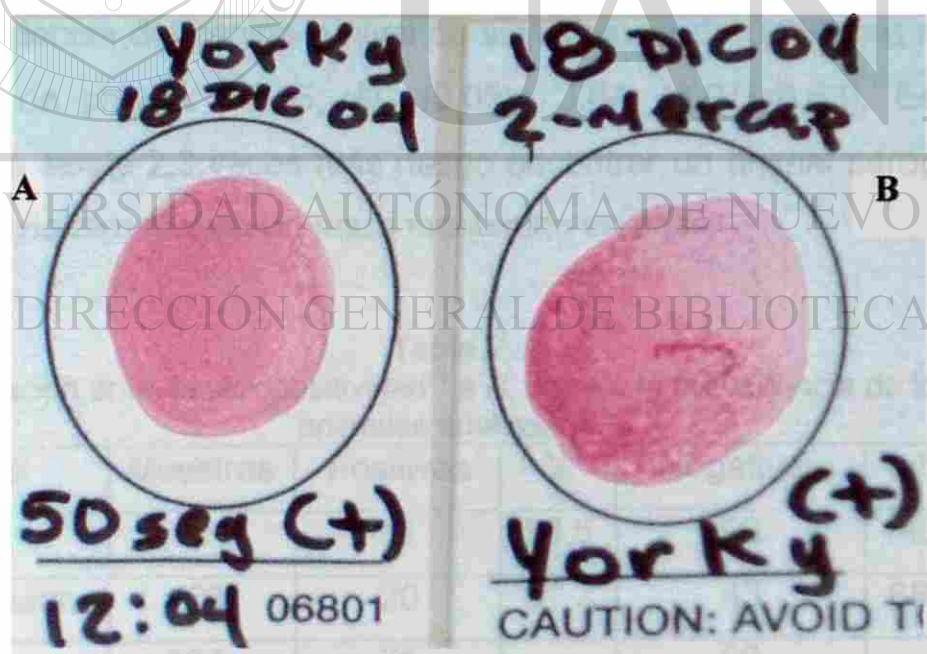
##### 3.1.1 Resultados de la prueba de aglutinación rápida en tarjeta y de la reacción con 2-β-mercaptoetanol.

Se analizó un total de 164 muestras de suero obtenidas desde el año 2000. Las muestras fueron enviadas para su análisis a la Unidad de Investigación Veterinaria en Enfermedades Infecciosas ya sea por motivo de requisito de cruce o por monitoreo debido a sospecha clínica (aborto, dermatitis escrotal, falla para preñar, bajo libido, o antecedentes de convivencia con animales seropositivos). Con excepción de dos cachorros, todos los animales estudiados fueron mayores de 18 meses. 101 de los animales pertenecían a algún criadero mientras que el resto procedían de propietarios particulares a los cuales se les solicitaba el análisis serológico contra *B. canis* como requisito para cruce. Todos los sueros fueron analizados con la ayuda y recomendaciones de un estuche diagnóstico, distribuido comercialmente para determinar la presencia de anticuerpos contra *B. canis* (ver Material y Métodos). En primera instancia los sueros fueron sometidos a la aglutinación directa con el antígeno (bacterias muertas teñidas) y si se observaba evidencia de aglutinación fueron subsecuentemente sometidos a reacción con 2-β-Mercaptoetanol. Del total analizado, 71 sueros resultaron positivos tanto a la aglutinación directa como después del tratamiento con 2-β-Mercaptoetanol. En las figuras 6 y 7 se muestra un patrón típico de seroaglutinación observado en algunos de los ejemplares bajo estudio. Del total analizado 51 fueron machos y 113 hembras. La distribución de la seropositividad acorde al sexo del animal fue de 52.9 % y 38.9 % para machos y hembras, respectivamente. No obstante, esta diferencia

no fue estadísticamente significativa ( $P > 0.01$ ; Ji-cuadrada: 2.807). En la tabla IV se muestra la relación entre la seropositividad y el sexo de los animales estudiados.



**Figura 6.** Prueba rápida de aglutinación en tarjeta. Muestras típicas de seroaglutinación de moderada a intensa. En el ovalo N° 1 se muestra la reacción de aglutinación del control positivo. En el ovalo N° 2 y 3 se exhibe reacciones positivas de dos caninos muestreados en el presente estudio.



**Figura 7.** Reacción de seroaglutinación con y sin tratamiento con 2-β-mercaptoetanol. El suero es de un canino hembra con antecedentes de aborto y sospechoso de brucelosis canina. En 7-A, se muestra la reacción de la prueba rápida de aglutinación en tarjeta directa, mientras que en 7-B, se muestra la reacción del mismo suero tratado con 2-β-mercaptoetanol. Ésta última confirma la especificidad del suero contra el antígeno usado. Éste ejemplar también resultó positivo al aislamiento de *B. canis*.

**Tabla IV**

Frecuencia de caninos seropositivos a *Brucella canis*<sup>(\*)</sup> en Monterrey y su área metropolitana en el período del 2000 al 2005, distribuidas acorde al sexo de los ejemplares.

Sexo	Analizados	Positivos		Negativos	
		Cantidad	%	Cantidad	%
Machos	51	27	52.9	24	47.1
Hembras	113	44	38.9	69	61.1
Total	164	71	43.3	93	56.7

(\*) Canine Brucellosis Antibody test kit, D-Tec® CB; SYNBIOTICS CORPORATION, San Diego, C.A. 92127, USA.

La distribución de los animales acorde a la procedencia ya sea a partir de criaderos establecidos o propietarios particulares (habitando en casas) mostró que el 50.5% y 31.7% de los ejemplares del primer y segundo, respectivamente, resultaron seropositivos. En la tabla V se muestra la relación observada de la distribución de los animales seropositivos acorde a la procedencia. Acorde a los análisis de Ji-cuadrada se encontró asociación ( $P < 0.05$ ) entre la seropositividad con la procedencia del canino a nivel de significancia de 0.05 pero no en 0.01 (Estadístico de prueba: 5.555,  $JiC [0.05] = 3.84$ ,  $[0.01] = 6.63$ ). Estos datos arrojaron que existe 2.3 veces más riesgo encontrar un animal seropositivo en un perro de criadero que en un perro mantenido en casa.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Tabla V**

Relación entre la seropositividad<sup>(\*)</sup> a *B. canis* y la procedencia de los animales analizados.

Procedencia	Muestras	Positivos	%	Negativos	%
Criadero	101	51	50.5	50	49.5
Casa particular	63	20	31.7	43	68.25
Total	164	71		93	

(\*) Determinada mediante aglutinación rápida en tarjeta con el estuche Canine Brucellosis Antibody test kit, D-Tec® CB; de SYNBIOTICS CORPORATION, San Diego, C.A. 92127, USA.

24 de las 164 muestras analizadas provenían de perros que contaban con antecedentes de contacto directo ó indirecto con otros perros sospechosos o seropositivos, o que mostraban síntomas de la enfermedad. De estos 24



ejemplares analizados, 12 (50%) resultaron positivos a la prueba directa de aglutinación rápida en tarjeta, así como a la del 2-β-mercaptoetanol.

De las muestras obtenidas, 101 fueron ejemplares pertenecientes a criaderos. Los encargados solicitaron la prueba para efecto al monitoreo general. 50 muestras de ese grupo resultaron positivas (49.5%) a la prueba directa y a la reacción con el 2-β-mercaptoetanol.

De aquellos perros que se remitieron al análisis por motivo de requisito de cruce, 39 muestras fueron estudiadas, y los resultados arrojaron 8 muestras positivas (20.5%) a las dos pruebas de aglutinación, ver tabla VI.

**Tabla VI**

Relación entre la seropositividad a *Brucella canis* con diversas condiciones de riesgo de enfermedad en perros ubicados en el área metropolitana de Monterrey, N.L., en el período del 2000 al 2005.

Riesgo	Muestras	Positivas	%	Negativas	%
Contacto con perro seropositivo <sup>(1)</sup>	24	12	50	12	50
Requisito para cruce <sup>(2)</sup>	39	8	20.5	31	79.5
Monitoreo sanitario <sup>(3)</sup>	101	51	50.5	50	49.5
Total	164	71	43.3	93	56.7

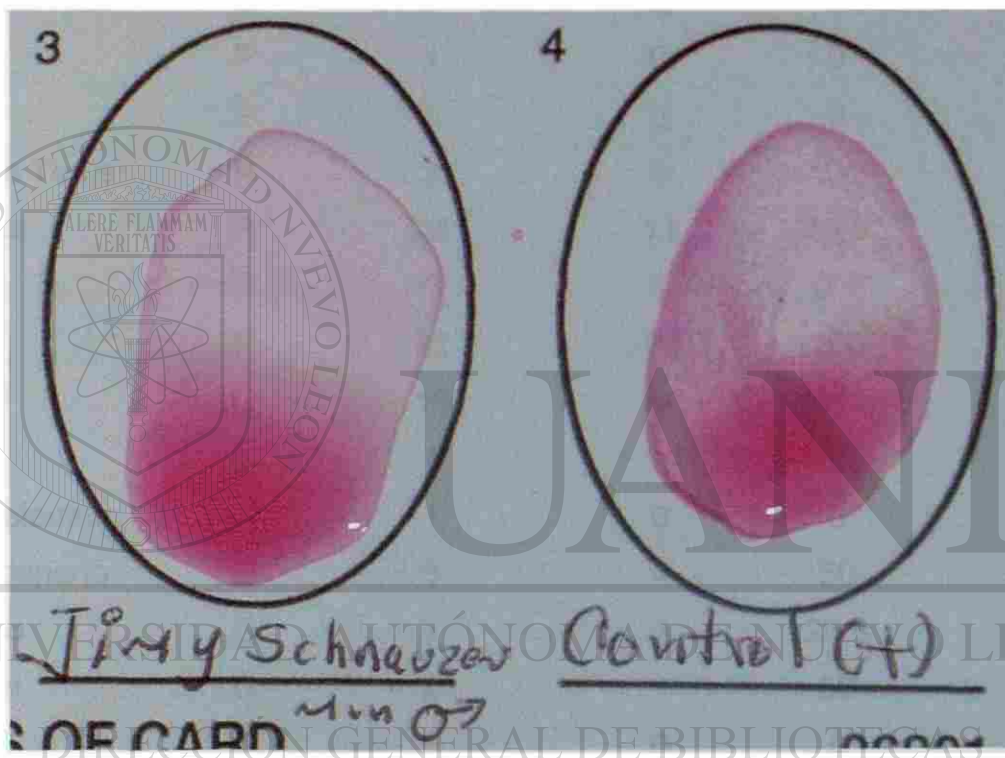
<sup>(1)</sup> los animales de este grupo fueron aquellos que convivieron con perros que resultaron seropositivos a la prueba de aglutinación en placa con 2-β-mercaptoetanol.

<sup>(2)</sup> Estos animales fueron referidos para su análisis serológico debido a que el dueño del semental/hembra solicitaron un resultado serológico negativo previo a permitir el apareamiento de su ejemplar.

<sup>(3)</sup> El 100% de estas muestras correspondieron a ejemplares cuyos propietarios o dueños tienen criaderos de perros y referían realizar el análisis para sondear su situación con respecto a *Brucella canis*.

Los animales del estudio fueron analizados de acuerdo a la raza. De un total de 22 razas estudiadas 14 resultaron positivas a la prueba de aglutinación empleada. En la tabla VII se muestra la relación entre la seropositividad a *B. canis* de acuerdo a la raza. Destacablemente, para algunas razas prácticamente el total de analizados resultaron seropositivos. No obstante, el

tamaño de muestra no fue uniforme y además varios de ellos fueron analizados después de encontrar algún ejemplar seropositivos con el subsecuente monitoreo a los ejemplares que establecieron contacto con estos. En el presente estudio, obtuvimos 56.7% (93/164) de casos seronegativos, interpretándose cuando al cabo de dos minutos de reacción entre los reactantes de la prueba de aglutinación, no se observaron grumos que indicaran aglutinación y la mezcla se mantuvo homogénea (Figura 8, ovalo 3).



**Figura 8.** Caso seronegativo en un paciente canideo. En el ovalo de la izquierda se observa una reacción negativa resaltando la homogeneidad entre los reactantes, mientras que en el ovalo de la derecha, el control negativo del estuche diagnóstico muestra una reacción de aglutinación en tarjeta positiva.

**Tabla VII**

Relación de razas muestreadas en el estudio y su reacción de seropositividad a Brucelosis canina determinada con la prueba rápida de aglutinación en tarjeta<sup>(a)</sup>.

Raza	T/raza	Muestreados	Positivos	%(b)	Negativos
Chow-Chow	G	2	2	100	0
Pastor Alemán	G	19	4	21	15
Pomerania	P	4	4	100	0
Cobrador Dorado	G	1	1	100	0
Schnauzer Min.	P	32	21	65.6	11
Schnauzer gigante	G	3	0	0	3
P Belga Malinois	G	3	0	0	3
Beagle	P	1	0	0	1
Bulldog	P	5	0	0	5
York Shire Terrier	P	2	2	100	0
Chihuahua	P	24	11	45.8	13
Poodle	P	11	1	9.1	10
Pug	P	12	12	100	0
Rottweiler	G	16	0	0	16
Akita Inu	G	1	0	0	1
Alaska Malamute	G	1	0	0	1
Husky Siberiano	G	8	4	50	4
Samoyedo	G	7	2	28.5	5
Doberman	G	2	1	50	1
Boxer	G	4	0	0	4
Labrador retriever	G	2	2	100	0
Cocker Spaniel	P	4	4	100	0
<b>TOTAL</b>		<b>164</b>	<b>71</b>	<b>43.3%</b>	<b>93</b>

(a) Canine Brucellosis Antibody test kit, D-Tec® C8; SYMBIOTICS CORPORATION, San Diego, C.A. 92127, USA.

(b) Porcentaje de positivos del total analizados por raza. T/raza= Tamaño de raza

(G) Perro de raza grande (P) Perro de raza pequeña

Los animales fueron divididos arbitrariamente en "razas pequeñas" y "razas grandes". Esta separación arrojó que un total de 55 animales de razas pequeñas resultaron seropositivos mientras que solo 16 ejemplares de razas grandes manifestaron esta condición (Ver tablas N° VII y VIII). El análisis de Ji-

cuadrada reveló que existe una fuerte asociación ( $P < 0.01$ ) entre la seropositividad con el tamaño del animal (Estadístico de prueba: 19.611,  $JiC [0.01] = 6.63$ ). En la tabla 8 se muestra la relación entre la seropositividad a brucelosis canina y el tamaño de la raza de los animales estudiados.

**Tabla VIII**

Relación entre la seropositividad a brucelosis canina y el tamaño de la raza de los animales estudiados.

Tamaño de raza	Animales	
	Positivos	Negativos
Grande	16*	53
Pequeña	55**	40
Total	71	93

\*Razas Grandes: Chow Chow, P. Alemán, Cobrador Dorado, Husky Siberiano, Samoyedo, Doberman, Cobrador de Labrador.

\*\*Razas Pequeñas: Pomerania, Schnauzer miniatura, York Shire Terrier, Chihuahua, Poodle, Pug, Cocker Spaniel.

### **3.2. Aislamiento e identificación bioquímica de *Brucella canis***

#### **3.2.1. Cultivo y aislamiento**

Solamente en cuatro casos se logró disponer de muestras clínicas, consistentes de órganos, tejidos, y fluidos corporales de animales adultos o fetos, lográndose el procesamiento y aislamiento de la bacteria a partir de tales muestras. Todos los animales resultaron positivos a la prueba de aglutinación, tanto de forma directa como con el suero tratado con mercaptoetanol, distribuyéndolos como a continuación se describe.

El primero de los casos fue de un criador particular con dos ejemplares de la raza Pug. A partir de una hembra seropositiva, se logró el aislamiento de *Brucella canis* de restos placentarios y del contenido estomacal de uno de los fetos, producto de un aborto en el tercer tercio de la gestación.

El segundo aislamiento se logró de un macho seropositivo de raza Pug, importado de Panamá sin pruebas serológicas anti-*B.canis*. Este ejemplar fué muestreado debido a que estuvo en contacto con algunas hembras de su misma raza que mostraron infertilidad, falsa preñez y aborto en el último tercio de la gestación. La bacteria se aisló de una muestra de sangre para hemocultivo en medio de Ruiz-Castañeda, en Agar Biotriptasa y Agar Soya Tripticasa. Interessantemente, en este último medio fueron observadas dos colonias de distinto tamaño (Figura 9).



**Figura 9.** Características coloniales de *Brucella canis* en Agar Soya Tripticasa (AST). La muestra corresponde al caso dos de un perro macho raza Pug procedente de Panamá y con antecedentes de cruce con hembras seropositivas. En la fotografía se muestran colonias de dos tamaños (fenotipos) diferentes, uno de tamaño relativamente mediana y otra de tamaño menor (flecha). Ambos tipos de colonias de este caso fueron subcultivadas (manteniendo la característica del tamaño) y caracterizadas bioquímicamente arrojando un perfil compatible con *Brucella canis*. Igualmente, en ambos casos, el análisis de PCR-RFLP arrojó compatibilidad con *Brucella canis*.

Ambas colonias fueron sujetas a diferenciación bioquímica y molecular, en ambos casos se determinó que colonias con características fenotípicas distintas

corresponden a un microorganismo compatible con *B. canis* (ver adelante). Ambas cepas fueron resembradas de forma independiente y en ambos casos se mantuvo la característica del tamaño (datos no mostrados).

El tercero de los casos correspondió a otro propietario privado, quien solicitó la prueba de aglutinación rápida de tarjeta por motivo de requisito de cruce de una hembra de la raza Pastor Alemán. Este ejemplar resultó positivo en primera instancia a la prueba de aglutinación directa, pero negativa al uso de 2- $\beta$ -mercaptoetanol.

Según el protocolo seguido al ejemplar no se le permitió su apareamiento y fue de nuevo muestreado a los 14 días de la prueba inicial. En este segundo muestreo el animal resultó positivo tanto a aglutinación directa como al mercaptoetanol. En adición, el propietario remitió, una semana antes de éste examen, para su análisis, muestras de otros ejemplares hembras de la raza York Shire Terrier y Poodle que cohabitaban con la hembra Pastor Alemán.

La primera resultó positiva a las pruebas de aglutinación pero la segunda arrojó resultados negativos. La hembra York Shire Terrier mostró una intensa reacción<sup>®</sup> de aglutinación (dentro de los primeros 50 segundos de mezclados los reactivos) con formación franca de grumos, a ambas pruebas serológicas.

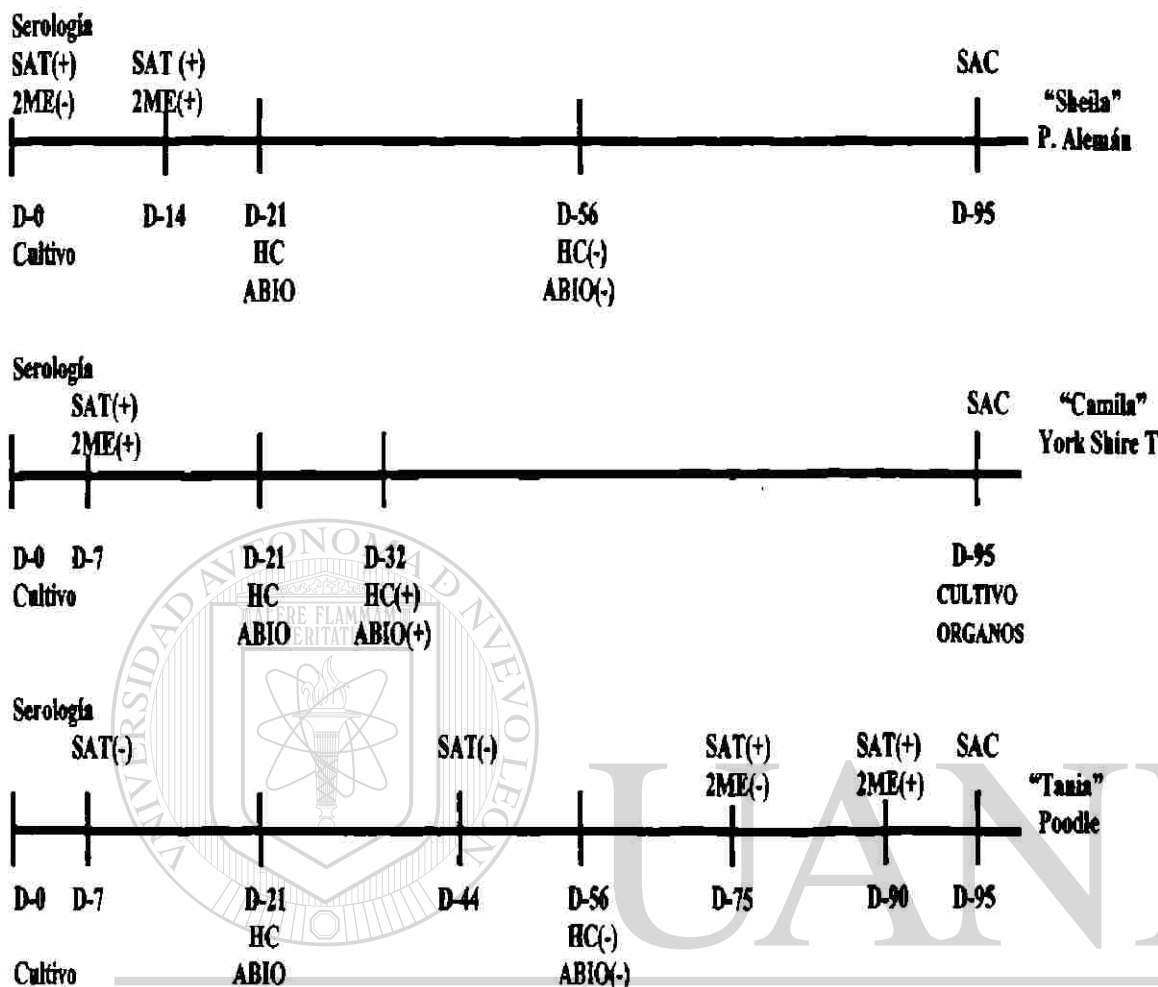
A partir de esta hembra, fue aislada *B.canis* en hemocultivo a los 25 días que resultó seropositiva.

Posteriormente, y dado que en particular esta hembra permaneció seropositiva (con intensa reacción a la aglutinación) durante más de tres meses, el propietario decidió la eutanasia de los tres ejemplares.

La dinámica de los eventos de la serología y el aislamiento e identificación de *B. canis* en torno a estos ejemplares se muestra en la figura 10.

**Figura 10**

**Dinámica de eventos de la serología y aislamiento de *Brucella canis* en tres ejemplares caninos, hembras infectados naturalmente**



D= Día, SAT=Prueba de aglutinación rápida de tarjeta, 2ME=prueba del 2-β-mercaptoetanol, HC=hemocultivo, ABIO=Agar Biotriptasa, SAC= sacrificio.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Al ejemplar Yorkshire terrier se le practicó la necropsia apreciándose solo una intensa esplenomegalia y un discreto puntilleo hemorrágico en hígado. *Brucella canis* fue aislada a partir del bazo, hígado y ganglios inguinales, todos ellos con alteraciones o aumentados de tamaño.

El cuarto de los casos, en el que se logró el aislamiento de *B.canis*, fue a partir de un macho York Shire Terrier. Este ejemplar fue remitido para su análisis debido al antecedente de haberse cruzado con la hembra York Shire Terrier del caso 3. El animal resultó seropositivo con una reacción moderada a la

aglutinación. Al hemocultivo este ejemplar resultó positivo a los 15 días en el medio bifásico de Ruiz Castañeda y en el Agar Biotriptasa.

El quinto aislamiento se logró de una muestra de sangre sin anticoagulante, de la que se separó el suero y se dejó el coágulo en el tubo de ensayo habiéndose conservado por cerca de tres años en refrigeración. Al momento de resuspender el coágulo en la solución TE pH 8 (Tris base EDTA) para los análisis de biología molecular, se tomó una muestra y se inoculó el medio Biotriptasa incubándose en aerobiosis a 37° C. Al cabo de ocho días se logró recuperar una bacteria con características del género *Brucella spp.* La cepa fue denominada C5-CP33 (Caso 5-Coágulo Pug No. 33). Antes de realizar la identificación bioquímica se obtuvo una muestra y se sometió directamente a la extracción de ADN para realizar la reacción de PCR. El aislado resultó positivo a *B. canis* según análisis de PCR-RFLP (ver adelante). La muestra pertenecía a un ejemplar macho de criadero de la raza Pug seropositivo a la MET-SAT.

### 3.2.2. Morfología colonial y microscópica

Después de incubar de 3 a 10 días a 37° C en condiciones de aerobiosis, se observaron colonias con características del género *Brucella spp.* Las colonias presentaron una forma redonda, regular con bordes lisos, ligeramente elevadas de superficie lisa, de color beige o crema y con medidas de tres a cuatro milímetros de diámetro (Figura 9). A la tinción de Gram se mostraron como cocobacilos muy pequeños, Gram negativos, no esporulados, no encapsulados. Sin embargo, en algunos casos de estos primo-aislamientos se observó crecimiento bacteriano dentro de los siguientes cinco a seis días en promedio; empero en otros, el crecimiento bacteriano tardó hasta 12 a 14 días. Aun así, se permitió la incubación hasta por 18 días para favorecer el completo desarrollo de las colonias bacterianas. Las inoculaciones que al cabo de 21 días no manifestaron crecimiento se dejaron hasta por 30 días en incubación.

En el segundo de los casos en que se logró el aislamiento de la bacteria, se observó un crecimiento uniforme, pero en determinadas partes de la tercera y



cuarta estría se observaron colonias con características morfológicas del género *Brucella spp.* pero de un tamaño menor.

Esto se refiere a que medían menos de dos milímetros y circunstancialmente estaban en zonas aisladas y abiertas, es decir, no se encontraban colonias bacterianas aglomeradas lo que permitía diferenciar dos tipos de colonias semejantes pero diferentes en tamaño (Figura 9).

Tanto la identificación bioquímica como la molecular, arrojaron resultados característicos de *Brucella canis* en los dos tipos de colonias incluyendo la rápida producción de ureasa detectada en menos de 30 minutos en el medio de Agar Base Urea, es decir, coinciden bioquímica y molecularmente a la especie *B. canis*.

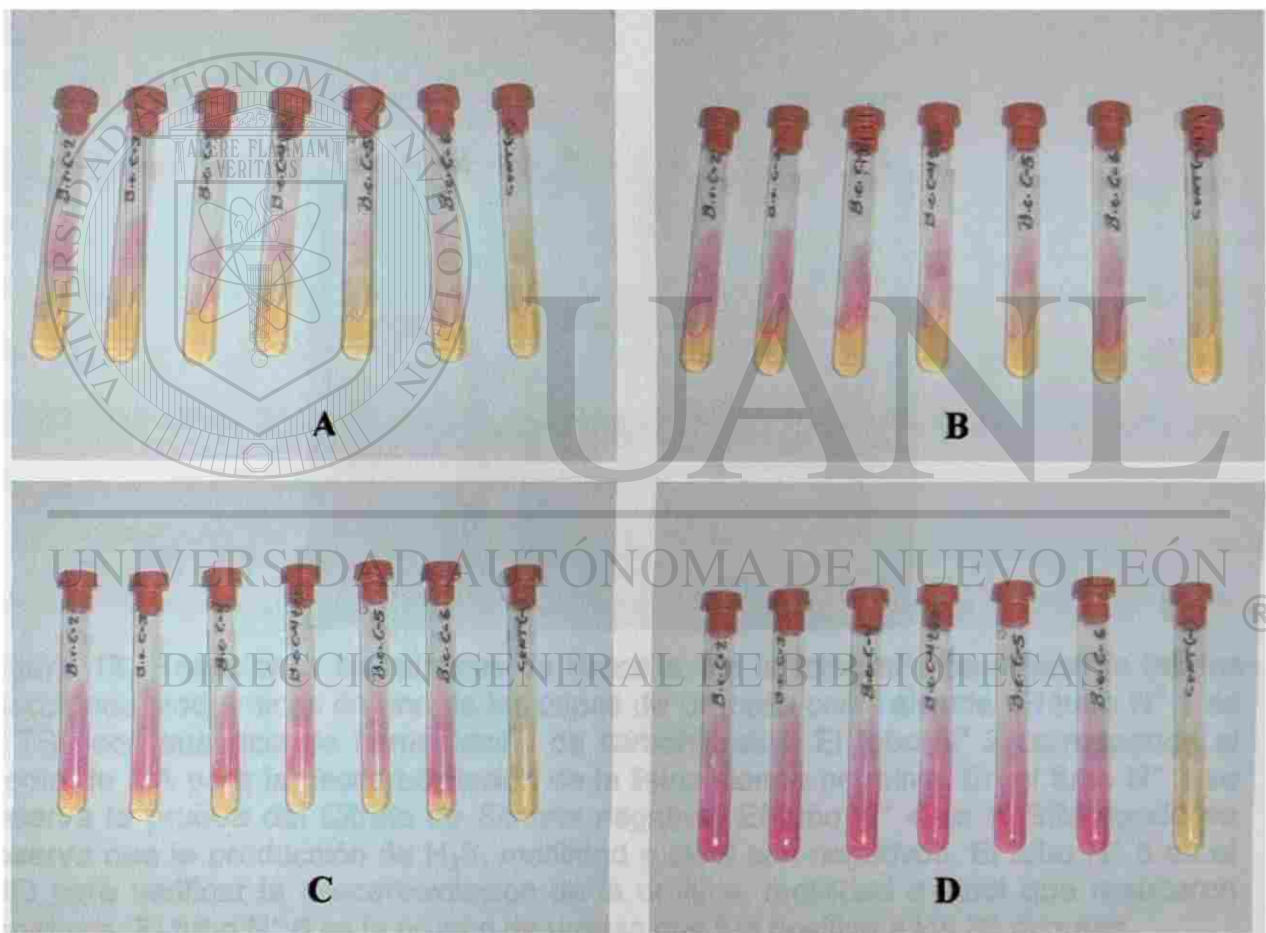
### 3.2.3. Identificación bioquímica

Las colonias con características morfológicas del género *Brucella* aisladas de las muestras mencionadas, se les sometió a una batería de reacciones para conocer su perfil bioquímico. Las pruebas enzimáticas catalasa y oxidasa positivas resultaron positivas (Figura 11).



**Figura 11.** Pruebas de Oxidasa (A) y Catalasa (B) positivas de colonias bacterianas aisladas de muestras clínicas de perros seropositivos.

La prueba de ureasa se realizó junto con las otras pruebas bioquímicas, no obstante cabe destacar que las colonias aisladas dieron una reacción positiva rápida en el agar ureasa de Christensen observando el viraje de color de la reacción desde los primeros minutos de inoculación (15-20 minutos) hasta las dos horas que manifestó un cambio de color del 75 al 80% del agar inclinado. A las 9 horas el agar estaba completamente rosa incluyendo el fondo del tubo en el cual no había inóculo ya que la prueba se realiza sólo por estría en superficie y nó por punción. El tubo control negativo del agar urea de Christensen se mantuvo negativo todo el tiempo inclusive hasta las 48 horas de incubación que se recomienda para bacterias productoras lentas de ureasa (Figura 12).

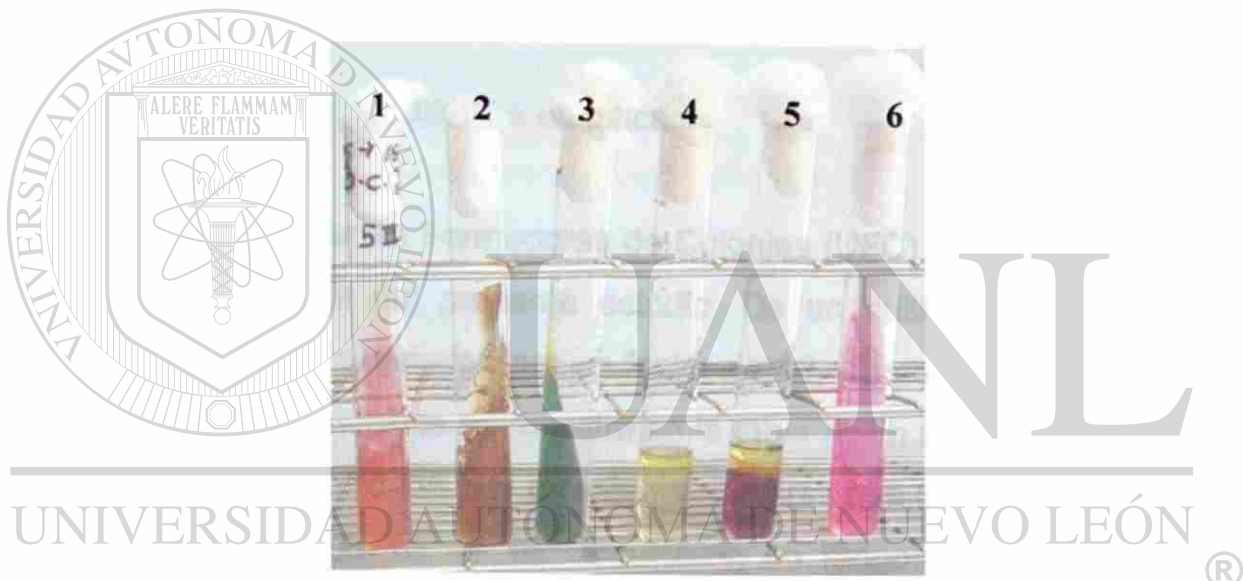


**Figura 12.** Prueba de Ureasa. En las imágenes se observa la reacción de la ureasa sobre el Agar Base Urea (ABU). Los tubos de izquierda a derecha corresponden a las cepas de campo de *B. canis* aisladas de muestras clínicas de cinco pacientes diferentes incluyendo la cepa "C-4 t-20" variante fenotípica en el tamaño (aislada del caso 2). En 12-A, se muestra los tubos a los 20 a 30 minutos después de la inoculación. En 12-B corresponde a un tiempo de reacción de una hora mientras que en 12-C después de dos horas de incubación. En la figura 12-D se muestra una reacción positiva total al cabo de nueve horas de incubación. El tubo control negativo es el último tubo hacia la derecha.

En la figura 13, observamos los tubos con los medios para pruebas bioquímicas en donde el TSI es el primer tubo de izquierda a derecha y se mantiene sin cambios.

La prueba del Citrato de Simmons para verificar el uso del Citrato como única fuente de carbono, resultó negativa. Esto se verifica en el tubo N° 3 de izquierda a derecha en donde no hay viraje de color.

La descarboxilación de la Lisina (LIA) y de la Ornitina (MIO) fueron negativas en ambos casos (ver figura 13, tubos 2 y 5).



**Figura 13.** Reacciones bioquímicas de *Brucella*. En la fotografía se muestran las las reacciones bioquímicas de una de las cepas de *Brucella canis* aislada. El tubo N° 1 es el TSI, con ausencia de fermentación de carbohidratos. El tubo N° 2 corresponde al medio de LIA para la descarboxilación de la lisina siendo negativa. En el tubo N° 3 se observa la prueba del Citrato de Simons negativa. El tubo N° 4 es el SIM donde se observa que la producción de H<sub>2</sub>S, motilidad e indol son negativos. El tubo N° 5 es el MIO para verificar la descarboxilación de la ornitina, motilidad e indol que resultaron negativos. El tubo N° 6 es la prueba de ureasa que fue positiva a los 30 minutos.

La prueba de motilidad resultó negativa, al igual que el Indol habiéndose realizado en los medios de SIM y de MIO (ver tubos N° 4 y 5 de figura 13).

En el medio de SIM se realizó la prueba de la producción de ácido sulfhídrico la cual resultó negativa. En la tabla IX se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas para los 6 cepas de *B. canis* aisladas de perros seropositivos.

**Tabla IX**

Reacciones a las diversas pruebas bioquímicas de las cepas de *B. canis* aisladas de muestras clínicas de perros seropositivos.

Clave	TSI	GLU	LAC	SAC	GAS	H <sub>2</sub> S	LIA	CIT	U	I	MOT	MR-VP
C-1	Ak/I	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>r</sup>	-	-	-/-
C-2	Ak/I	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>r</sup>	-	-	-/-
C-3	Ak/I	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>r</sup>	-	-	-/-
C-4	Ak/I	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>r</sup>	-	-	-/-
C4t20	Ak/I	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>r</sup>	-	-	-/-
C-5	Ak/I	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>r</sup>	-	-	-/-

Ak=reacción alcalina, I=reacción inerte, GLU=Glucosa, LAC=Lactosa, SAC=Sacarosa, LIA= Agar Hierro Lisina, U=Urea, CIT=Citrato de Simons, I=Indol, MOT=Motilidad, MR-VP= Rojo Metilo/Vogues Proskawer, r.viraje rápido 15-30 minutos.

### 3.2.4 Cuenta viable por difusión en placa

Se obtuvo las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para dos de las cepas de *B.canis* aisladas del presente estudio. De un cultivo joven de 48 h se realizaron diluciones seriadas por un factor de 10. El promedio de colonias en cada una de las diluciones se muestra en la tabla X. En las diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  el número de colonias fue incontable mientras que la cantidad de colonias en las diluciones de  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  estuvieron en rangos de 189-239 y 33-40 UFC/ml, respectivamente. En la figura 14 se muestra una perspectiva del número de colonias desarrolladas en la dilución de  $10^{-8}$ .

**Tabla X**

Relación de la cuenta viable en placa por el método de extensión en superficie de dos de las cepas de *Brucella canis* aisladas a partir de perros seropositivos.

Dilución	Unidades Formadoras de Colonias (UFC)
$10^{-1}$ a $10^{-6}$	Incontables
$10^{-7}$	239 - 189 UFC
$10^{-8}$	40 - 33 UFC
$10^{-9}$	0



**Figura 14.** Cuenta viable en placa de *B. canis*. Se muestra las colonias que se desarrollaron en la cuenta viable en placa en la dilución  $10^{-8}$ .

### 3.2.5 Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos

Después de incubar por 72 horas a  $36^{\circ}$  C, se observaron las cajas con los antibiogramas apreciándose una gran sensibilidad a los antibióticos empleados.

En la tabla XI se muestran los antibióticos analizados así como la respuesta de las cepas aisladas contra estos.

Solo contra los antibióticos Cefalotina y Nitrofurantoina todas las cepas mostraron resistencia.

En el caso de la cepa C-5 en adición mostró una moderada sensibilidad al antibiótico Cloranfenicol. En la figura 15 se muestra el patrón de susceptibilidad observado.

**Tabla XI**

Susceptibilidad de *B. canis* a diferentes antibióticos recomendados para bacterias Gram negativas.

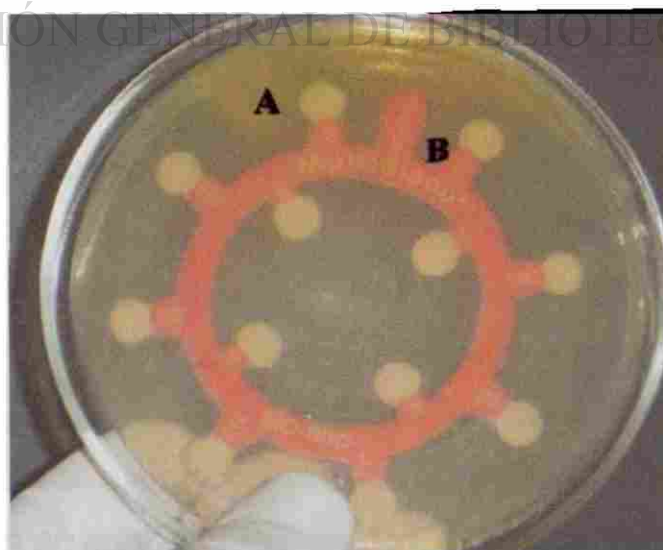
ANTIBIOTICO	CONCENTRACIÓN (mcg)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
Amikacina	30	S	S	S	S	S
Ampicilina	10	S	S	S	S	S
Carbencilina	100	S	S	S	S	S
Cefalotina	30	R	R	R	R	R
Cefotaxima	30	S	S	S	S	S
Ceftriaxona	30	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	30	S	S	S	S	MS
Gentamicina	10	S	S	S	S	S
Netilmicina	30	S	S	S	S	S
Nitrofurantroina	300	R	R	R	R	R
Pefloxacina	5	S	S	S	S	S
Sulfametoxazol Trimetoprim	25	S	S	S	S	S

C-1, C-2,C-3,C-4,C-5: clave asignada a cada cepa aislada (Caso 1, caso 2 etc...); S: Susceptible, R:Resistente, MS:Moderadamente susceptible. mcg: microgramos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Figura 15.** Patrón de susceptibilidad obtenido para una de cepas de *B.canis* (Cepa C-4) aislada a partir de un perro seropositivo. Se aprecia la inhibición, casi total, con excepción en los antibióticos Nitrofurantroina (A) y Cefalotina (B).

### 3.2.6 Preparación de cultivos microbianos para la obtención de ADN genómico.

Las bacterias, usadas como controles negativos de la especificidad de los oligonucleotidos empleados, fueron empleadas de la colección del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL. Todas se multiplicaron adecuadamente en tubos con Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC). Las bacterias inoculadas fueron *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* y *Bordetella bronchiseptica*. Esta última fue obtenida de cultivos de una bacterina vacunal comercial (Bronchi – Shield<sup>®</sup> III, Fort Dodge<sup>®</sup>) la cual se sembró en placas de agar sangre y de agar Soya Tipticasa. Esta cepa se desarrolló muy bien a las 48 horas de incubación, obteniendo colonias puras con las características morfológicas y bioquímicas del género *Bordetella spp.* Además, se empleó una levadura del género *Malassezia* (Del cepario del LCDV de la FMVZ-UANL) obteniéndose un buen desarrollo en caldo ICC.

El ADN genómico de *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira canicola*, *Brucella abortus* y *B. melitensis*, fue obtenido a partir de productos vacunales.

## 3.3 Biología Molecular

### 3.3.1 Resultados de la PCR. Amplificación del gen *omp-31* del género *Brucella* a partir de cultivos bacterianos, antígenos vacunales y serológicos.

De las muestras procesadas por serología y bacteriología, se tomaron seis aislados bacterianos correspondientes a cinco casos (ver 3.2 de resultados). En todos los casos las muestras resultaron positivas mediante PCR-RFLP. Similarmente, a partir de muestras de bazo, hígado y ganglios de un ejemplar seropositivo (ver resultados caso 3), el protocolo para la detección molecular detectó la presencia de secuencias de *B. canis* en estos tejidos aún antes del crecimiento bacteriano en cultivos. No obstante, bajo la metodología empleada, las muestras de suero, sangre y coágulos de ejemplares positivos y negativos por serología al procesarlos por PCR todos resultaron negativos. Esto es, que

no fué posible obtener productos amplificados a partir del ADN total de este tipo de muestras bajo el protocolo y oligonucleotidos empleados.

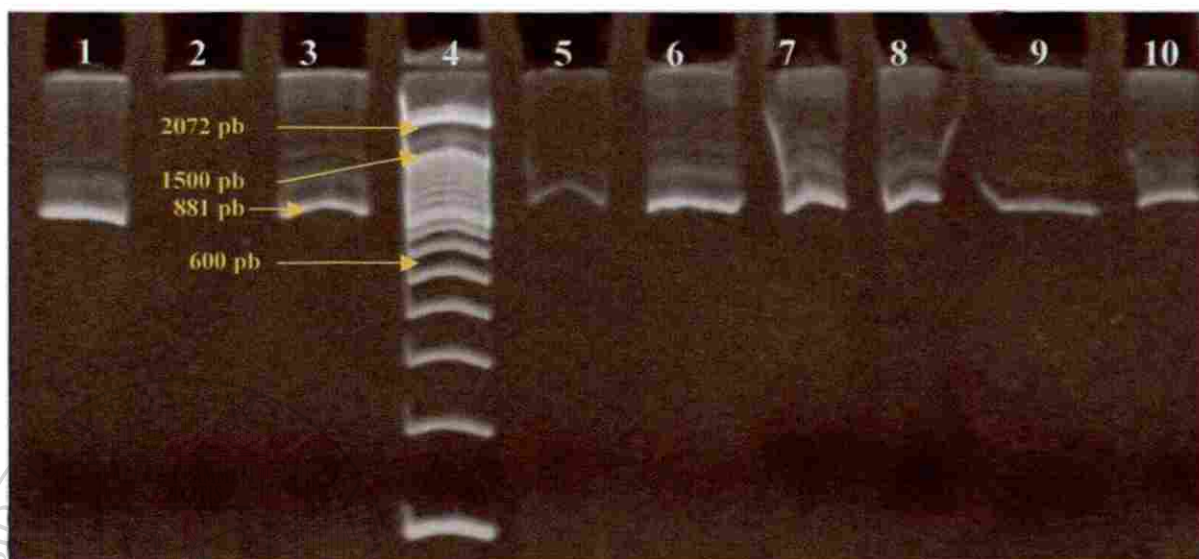
De forma similar, y con el propósito de determinar la sensibilidad del protocolo de PCR empleado, no fue posible amplificar el gen *omp-31* a partir de diluciones seriadas de cultivos jóvenes de las cepas C2 y C4 de *B.canis* aisladas en el presente trabajo. Solo fue posible amplificar la fracción genética a partir del cultivo sin diluir y en la dilucion  $10^{-1}$  (datos no mostrados).

Las seis cepas bacterianas aisladas en el presente trabajo resultaron positivas a la prueba de PCR. En todas estas cepas se amplificó un fragmento ubicado entre 800 y 900 pb (Figura 16, carriles 5 al 10). De igual manera otras cepas de diferentes especies del genero *Brucella*, utilizadas para los propósito del presente trabajo como controles positivos de amplificación del gen *omp-31*, generaron un producto de similar tamaño (Figura 16, carriles 1 y 3). Una de estas fue la cepa Reo198 de *B. ovis*, del antígeno usado en el estuche diagnóstico de Synbiotics, Co. para la detección de anticuerpos contra *B. canis*, mientras que la otra fue una cepa de *B. melitensis* (cepa REV-1) empleada como antígeno vacunal (melirev-N, LITON de México PRONABIVE; Reg. SAGARPA B-0653-002)(Figura 16, carriles 1 y 3, respectivamente). En adición se empleó la cepa RB-51 de *B. abortus*, empleado como antígeno vacunal (BRUCEL<sup>MR</sup> RB51 PLUS, SAGARPA B-0653-047) para la prevención de brucelosis en becerras, como control negativo interno del genero *Brucella* dado que esta especie no amplifica con los oligonucleotidos usados (Figura 16, carril 2) (Vizcaíno *et al.*, 1997). De este antígeno vacunal no fue posible obtener productos de amplificación mediante la reacción de PCR (Figura 16, carril 2).

De las seis cepas de campo aisladas de muestras clínicas de canideos seropositivos, incluyendo la cepa "C4-t20" (aparentemente una variante fenotipica de tamaño), se logró obtener un producto del tamaño esperado (Figura 16, carriles 5-10) y compatible con el tamaño de banda obtenido para *B.ovis* y *B. melitensis*. Con el ADN de microorganismos diferentes al género *Brucella ssp.*, no fue posible amplificar o evidenciar banda alguna bajo el protocolo usado de la PCR (Datos no mostrados). Mediante este ensayo fue



corroborada la especificidad de los oligonucleotidos empleados para amplificar la mayoría de las especies del género *Brucella* (Vizcaíno *et. al.*, 1997).



**Figura 16.** Amplificación del gen de la *omp 31* del género *Brucella*. Carril 1, producto de amplificación del control positivo, antígeno del estuche diagnóstico para *B. canis* (*B. ovis*) de Synbiotics, Co. Carril 2, producto de amplificación del control negativo, antígeno de la vacuna Brucel RB51<sup>®</sup> de *B. abortus* cepa RB51<sup>®</sup>. Carril 3, producto de amplificación del control positivo, antígeno de la vacuna melirev – N Cepa REV de *B. melitensis*. Carril 4, marcador de peso molecular de 100 pb de Invitrogen. Carril 5, *B. canis* cepa BC-1. Carril 6, *B. canis* cepa BC-2. Carril 7, *B. canis* cepa BC-3. Carril 8, *B. canis* cepa BC-4. Carril 9, *B. canis* cepa C4-t20. Carril 10, *B. canis* cepa C5-CP33.

®

### 3.3.2 Resultados de RFLP, Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción, del gen *omp-31* del género *Brucella*.

Los análisis de digestión del gen *omp 31* con las enzimas de restricción, *Ava II* y *Sal I* arrojaron un patrón de corte compatible con el género *Brucella spp.* y sus diferentes especies según lo reportado por Vizcaíno y colaboradores (Vizcaíno *et al.*, 1997), (Figura 17).

Acorde con estos últimos investigadores, con la enzima *Ava II* se generan tres patrones de restricción, de los cuales *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. suis*. se ubican en el patrón 1 ó 2 mientras que las cepas de *B. canis* en el patrón 3 (P3).

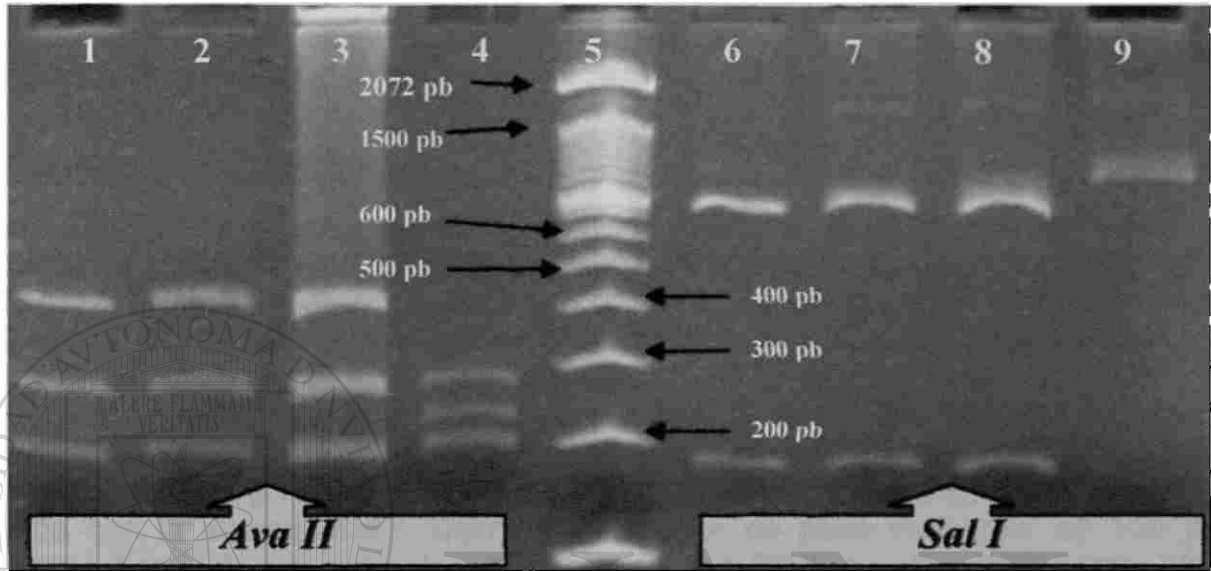
Con el uso de la enzima *Sal I* solo se generan dos patrones, reconociendo que la mayoría de las especies de cepas analizadas se ubican en el patrón 1 (P1), mientras que un grupo de *B. canis* produce el patrón 2 (P2).

Esta variación genética observada fue empleada para diferenciar acorde a este sistema las cepas de campo aisladas en el presente estudio.

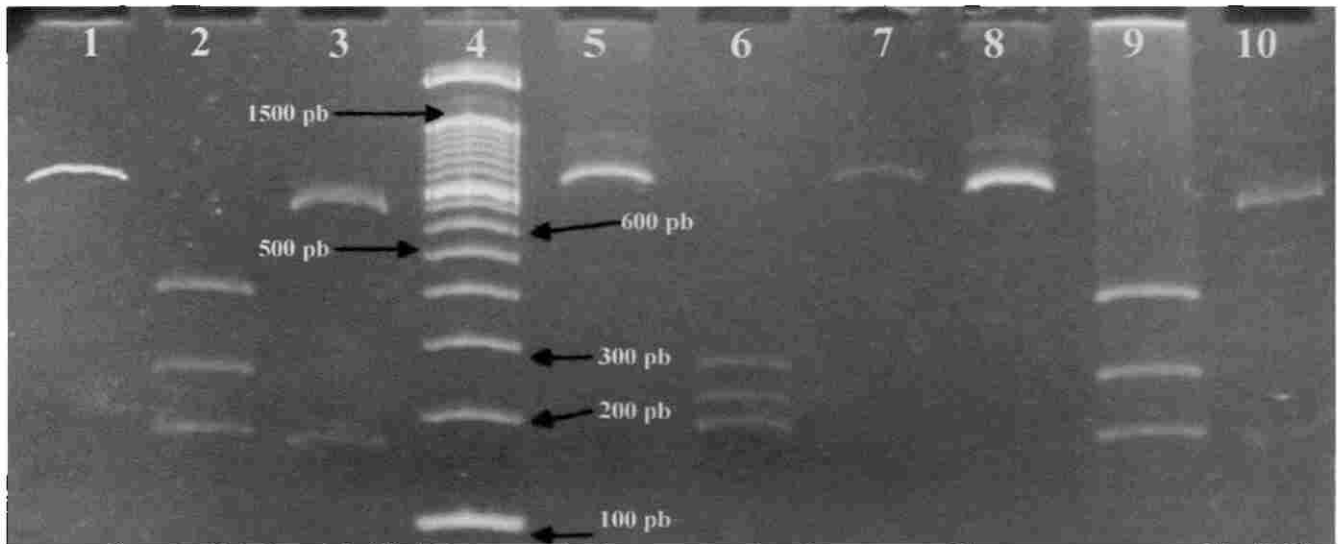
Con el uso de la enzima *Ava II*, las cepas de campo aisladas en el laboratorio presentaron el P3, en la que se obtienen cuatro fragmentos (cada una de cerca de 182, 281, 356 y 388 en los geles de poliacrilamida 9%) del ADNc, hipotéticamente dos sitios de corte, pero en diferente sitio del gen que codifica para la *omp-31*. Con esta enzima *B. ovis* y *B. melitensis* generaron un patrón diferente (Vizcaíno *et al.*, 1997) de tres fragmentos pero de tamaño diferente (Figura 17 y 18). Con esta enzima las 6 cepas de *B. canis* mostraron esta característica de forma constante. Estas mismas cepas de *B. canis* aparentemente resistieron el corte con la enzima *Sal I* (Figura 17 carril 9 y figura 18 carril 7), y generaron un patrón de corte similar al obtenido por Vizcaíno y colaboradores para *B. canis* (Vizcaíno *et al.*, 1997). Esto no sólo confirmó molecularmente que las cepas aisladas de los perros seropositivos corresponden a *B. canis* sino también que estas cepas pertenecen a uno de los dos grupos genéticos reportados para *B. canis* (Vizcaíno *et al.*, 1997). Este grupo es diferente al grupo donde se ubica la cepa de referencia RM6/66 (ATCC 23365, BCCN R18) de *B. canis*, el cual aparentemente es el más numeroso, y corresponde a un grupo de aislados de *B. canis* recuperados de un perro en Canada (BCCN 87.65) y otro de México (BCCN 87.62) pero de fuente/hospedador no conocida.

En la figura 17 se muestra los productos de PCR así como los patrones de restricción obtenidas con las enzimas *Ava II* y *Sal I* en las cepas de *B. ovis* (Cepa Reo 198, BCCN R22) y *B. melitensis* (cepa REV). Ambas cepas mostraron un patrón de restricción idéntico (Patrón 1 en ambos casos) con las enzimas usadas (Figura 17 carriles 2 [*Ava II*] y 3 [*Sal I*] para *B. ovis* y carriles 9 [*Ava II*] y

10 [Sal I] para *B.melitensis*). Acorde a lo reportado por Vizcaíno y colaboradores ambas especies pueden diferenciarse subsecuentemente mediante el uso de la enzima de restricción Sau3AI (Vizcaíno *et al.*, 1997), no obstante, este experimento no fue llevado a cabo en el presente trabajo.



**Figura 17.** Resultados de los cortes de restricción con las enzimas *Ava II* y *Sal I* en productos de PCR de controles positivos y negativos y cepas de campo de *B. canis*. En el **carril 1**, es el producto de digestión con *Ava II* del ADNc del antígeno del estuche diagnóstico para detectar anticuerpos contra *B. canis* de Synbiotics, Co., que utiliza la *B. ovis* cepa Reo 198 (BCNN R22) USA. **Carril 2**, es la misma muestra que la anterior, solo que la enzima *Ava II* es de un laboratorio diferente. **Carril 3**, muestra la digestión del ADN con *Ava II* del control de *B. melitensis* cepa REV del antígeno de la vacuna melirev – N. **Carril 4**, producto de digestión con *Ava II* del ADN de una de las cepas de campo de *B. canis* – C-4. **Carril 5**, marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®). **Carril 6 al 9**, corresponden a las mismas muestras antes mencionadas, pero digeridas con la enzima de restricción *Sal I*.



**Figura 18.** Electroforesis en geles de poliacrilamida 9% de productos de PCR y RFLP de controles positivos y negativos y de cepas de campo de *B. canis* digeridos con las enzimas *Ava II* y *Sal I*. **Carril 1**, producto de amplificación por PCR con los iniciadores 31SD y 31TER del ADN del antígeno del estuche diagnóstico para detectar anticuerpos contra *B. canis* de Synbiotics, Co., que utiliza la *B. ovis* cepa Reo 198 (BCNN R22) USA. **Carril 2**, producto de digestión con la enzima *Ava II* del ADN del antígeno del estuche diagnóstico para detectar anticuerpos contra *B. canis* de Synbiotics, Co., que utiliza la *B. ovis* cepa Reo 198 (BCNN R22) USA. **Carril 3**, misma muestra anterior digerida con la enzima *Sal I*. **Carril 4**, marcador de peso molecular de 100 pb de Ivitrogen. **Carril 5**, producto de amplificación por PCR con los iniciadores 31SD y 31TER del ADN de una de las cepas de campo de *B. canis* – C-4. **Carril 6**, producto de digestión con *Ava II* del ADN de una de las cepas de campo de *B. canis* – C-4, que muestra el Patrón 3 (P3). **Carril 7**, producto de digestión con *Sal I* del ADN de una de las cepas de campo de *B. canis* – C-4. **Carril 8**, producto de amplificación del control positivo, antígeno de la vacuna melirev – N Cepa REV de *B. melitensis*. **Carril 9**, producto de digestión del ADN con la enzima de restricción *Ava II* del control de *B. melitensis* cepa REV del antígeno de la vacuna melirev – N. **Carril 10**, producto de digestión del ADN con la enzima de restricción *Sal I* del control de *B. melitensis* cepa REV del antígeno de la vacuna melirev – N.

## CAPITULO 4

### DISCUSION

La brucelosis canina, causada por *B. canis*, es una enfermedad de amplia distribución mundial (Hollet, 2006). En México, la presencia de *B. canis* fue demostrada en el Distrito Federal en 1976 (Flores-Castro *et al.*, 1976) y en el área metropolitana de Monterrey Nuevo León en 1989 (Alonso, 1989). Estos y subsecuentes estudios seroepidemiológicos han revelado que la *B. canis* es endémica en este país afectando a diferentes grupos de perros con diversos estados clínicos (Ramírez, 1992; Alonso, 1989; Flores-Castro *et al.*, 1976, Flores-Castro *et al.*, 1977; Méndez-Nárez, 1998; Arredondo, 2003). Acorde a los datos obtenidos en el presente estudio referentes al alto porcentaje de ejemplares seropositivos, el aislamiento de *Brucella canis*, así como la identificación bioquímica y molecular de esta bacteria reafirman el carácter endémico de ésta infección en la población de perros de Monterrey y su área metropolitana. Además, muestran que *B. canis* ha sido capaz de mantenerse y diseminarse en esta población desde los primeros reportes de su aislamiento en perros del área (Alonso, 1989). Dado lo anterior y debido al carácter zoonótico de *B. canis* (Méndez-Nárez, 1998; Shin and Carmichael, 1999; Ortega-Pacheco, 2001;) es menester señalar la importancia de profundizar en estudios específicos de seguimiento en los diferentes grupos de perros (criadero, casa, campo, etc.) para establecer protocolos de manejo del perro bruceloso y educar a los propietarios y manejadores de esta especie (Shin and Carmichael, 1999; Wanke, 2004). Recientemente, en el estado de Georgia de los Estados Unidos de América, se han establecido protocolos de manejo de perros y criaderos con brotes o antecedentes de infección por *B. canis* debido al potencial zoonótico de esta bacteria (Hollet, 2006). Además, este microorganismo ha sido ubicado dentro de los agentes infecciosos con viabilidad de uso como arma biológica

(Hoover and Friedlander, 1997). De esta manera, la brucelosis canina, causada por *B. canis*, es una de las enfermedades zoonóticas más importantes en pequeñas especies (Corbel, 1997; Shin, 1999, Wanke, 2004) y ha ganado una gran relevancia su estudio dado el estrecho contacto que guarda el humano con sus mascotas. Esta bacteria, previamente ha sido reportada serológicamente en la zona estudiada en diferentes períodos de tiempo y en diferentes grupos de perros con diferentes estados de salud (Flores-Castro *et al.*, 1977; Carmichael and Joubert, 1988; Alonso, 1989; Ramírez, 1992; Flores-Castro, 1995; Méndez-Nárez *et al.*, 1998; Arredondo, 2003).

Su actividad intracelular y su resistencia a la destrucción lisosomal dentro de los macrófagos, hacen del tratamiento y su diagnóstico más difícil (Cozar *et al.*, 2002) y la sintomatología inaparente hacen que la transmisión se mantenga viable y activa entre las especies caninas y también entre los perros y el humano (Castillo *et al.*, 2003; Cotrino y Espíndola, 2004), siendo la forma más común entre canideos a través del apareamiento (Méndez-Nárez *et al.*, 1998) y hacia el humano por contacto directo con perros infectados (Castillo *et al.*, 2003; Lucero *et al.*, 2005 A).

De este modo, se buscan métodos diagnósticos eficaces que nos permitan detectar la enfermedad antes del apareamiento y de este modo prevenir y mantener controlada esta enfermedad.

Actualmente los métodos serológicos, sobre todo las pruebas de aglutinación, son los más solicitados y comercializados, sin considerar que los sueros de esos animales en ocasiones pueden dar reacciones cruzadas con otras bacterias (Alton *et al.*, 1988, Cuttler *et al.*, 2005, Joklik *et al.*, 1978, López-Merino, 2000). Aunado a esto, se ha procedido de forma errónea al emitir un diagnóstico definitivo en base a los resultados serológicos, con las típicas consecuencias; el sacrificio del animal antes de aislar e identificar la bacteria. El protocolo de la prueba rápida de tarjeta del laboratorio Synbiotics, Co., aclara en su instructivo que el diagnóstico final de la brucelosis canina, será el aislamiento e

identificación de la *B. canis* del ejemplar (Carmichael, 1968; Flores-Castro and Carmichael, 1984; Greene and George, 1990; Johnson and Walker, 1992; Shin and Carmichael, 1999).

Para esto, el hemocultivo sigue siendo la técnica bacteriológica confirmatoria más recomendada para las etapas tempranas de la infección hasta los seis a doce meses (Ruíz, 1945; Flores-Castro *et al.*, 1977; Leonard, 1992; López-Merino, 2000). Cuando el hemocultivo resulta negativo, la bacteria puede ser recuperada de aspirados de médula ósea debido a su localización intracelular en células reticuloendoteliales (Johnson and Walker, 1992).

Un estudio que respalda lo antes dicho, es el reporte de Wooley y colaboradores en 1978 en donde aislaron e identificaron la *B. canis* de un macho Beagle que resultó seronegativo a la prueba de aglutinación rápida de tarjeta. Es necesario mencionar, que dicho ejemplar pertenecía a un criadero de la misma raza que se encontraba en estudios seroepidemiológicos con casos de machos y hembras seropositivos (Wooley *et al.*, 1978). Por el contrario, no se puede descartar el diagnóstico de brucelosis canina en perros seropositivos que resultaron con hemocultivos negativos, sobretodo si el padecimiento es crónico, ya que la bacteriemia puede ser intermitente, provocando que la bacteria no se encuentre constantemente en el torrente sanguíneo y por lo tanto, no se pueda aislar en el cien por ciento de los casos de hemocultivo, más sin embargo, podría aislarse de exudados de descargas vaginales postaborto (siguientes semanas al aborto), de semen (tres a once semanas postinfección), de epidídimo (35 a 60 semanas postinfección), próstata (después de la semana 64), orina (ocho a 30 semanas postinfección), (Johnson and Walker, 1992).

En la presente investigación se intenta identificar la *B. canis* por métodos convencionales de bacteriología y además por técnicas moleculares. Para esto se realizó el ensayo serológico como un tamiz para la detección de casos positivos los cuales fueron procesados a cultivos bacteriológicos y posteriormente moleculares.

Las pruebas serológicas de aglutinación pueden tener una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95.7% en casos crónicos (Ramírez, 1992). Otros estudios reportan 62.5% de sensibilidad y 99.7% de especificidad (Wooley *et al.*, 1978).

Los resultados obtenidos por las pruebas serológicas de aglutinación fueron en general del 43.3% de seropositividad (71/164), en comparación con los estudios realizados en la región por Alonso en 1989, Ramírez en 1992 y Arredondo en el 2003 [18.32% (24/131), 11.9% (11/92) y 15.49% (11/71) respectivamente], nuestros resultados se encontraron por arriba de la media.

En comparación con estudios realizados en la ciudad de México, donde se han encontrado en perros callejeros seroprevalencias del 28 y 11.8% (Flores-Castro y Segura, 1976; Flores-Castro *et al.*, 1977) respectivamente, y 11.21% (12/107) de seroprevalencia en muestras de sueros de perros importados a la ciudad de México a través de la Aduana del Aeropuerto Internacional y otras muestras de clínicas veterinarias (Gutiérrez, 1983), en nuestra investigación la seroprevalencia fue superior (43.3%-71/164).

Esto hace ver que la seroprevalencia es alta y que la bacteria sigue cada vez más activa y propagándose. Sin embargo, si estos se comparan con los resultados obtenidos por Méndez-Nárez en la ciudad de México (45.4%) (Méndez-Nárez *et al.*, 1998), y los reportes de Briseño en el 2004 (42.8%) de seroprevalencia de *B. canis* en México, (Briseño *et al.*, 2004) concuerdan con los porcentajes obtenidos en nuestro estudio.

Esto denota que la actividad de la bacteria no solamente continúa, sino que va en aumento y se disemina rápidamente y cada vez son más razas las involucradas en estos resultados, ya que las reportadas por Méndez-Nárez en 1998 y recientemente por Hollet en el 2006, coinciden con algunas razas positivas del presente estudio (Méndez-Nárez *et al.*, 1998; Hollet, 2006), no así las que describe Carmichael y Kenney en 1968 y luego reafirma Moore dentro de un estudio publicado en 1969 en las que incluyen como raza principal a los Beagle, por ser el mayor número de casos de dicha raza. No obstante, encuentran seropositivos ejemplares de la raza Weimaraner, FoxHound,



Antiguo Pastor Inglés, Pointer y un galgo de la raza Grayhound (Carmichael and Kenney, 1968; Moore, 1969). Hollet reporta cerca de 11 razas y además perros criollos, de los cuales concordamos con cinco razas como los son Cobrador Dorado, Chihuahuas (11 casos positivos de 24), Yorkshire Terrier (2 casos seropositivos de 2 y confirmados bacteriológica y molecularmente), Poodle (un solo caso y positivo) y Pomerania (cuatro casos positivos de cuatro).

Méndez-Nárez solo trabajó Schnauzer Miniatura con 15 casos seropositivos (45.4%) de un total de 33 Schnauzer Miniatura y estamos reportando nosotros en este estudio 21 casos seropositivos de 32 ejemplares de ésta raza.

Interesantemente, los ejemplares de la raza Rottweiler estudiados (16 muestras) no mostraron seropositividad en ningún caso. Una posible razón puede ser que los sistemas de prevención y la capacitación a criadores y propietarios que han tenido a través del Club o Asociación de criadores de Rottweiler en donde prácticamente exigen la prueba de aglutinación rápida en tarjeta para cualquier cruce, como lo demuestran los resultados contenidos en los expedientes de la Unidad de Investigación Veterinaria en Enfermedades Infecciosas y el Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

Otra raza que no mostró seropositividad, es el Bulldog, que aunque fueron pocas muestras, ninguna fue positiva. Esta raza ha sido enlistada por la Federación Canofila Mexicana, como una de las razas que deben mostrar el certificado libre de *Brucella canis* junto con los Cobradores de Labrador, únicas dos razas a las que se les pide este requisito obligatorio.

De la raza Beagle, que son de las más reportadas en brotes y estudios experimentales, solo tuvimos un caso y resultó negativo. Sería de interés muestrear más ejemplares de esta raza en Nuevo León y sus estados vecinos para poder valorar la susceptibilidad y prevalencia de la enfermedad en esta raza.

De los 71 casos seropositivos, que se obtuvo en el presente trabajo, solo fue posible obtener muestras para aislamiento de *B. canis* de cinco ejemplares. En todos estos casos la bacteria fue aislada manifestandose con reacciones

bioquímicas reportadas para este género y particularmente para esta especie (Alton *et al.*, 1988; Mac Faddin, 2003). Desafortunadamente, en la mayoría de los perros seropositivos no fue posible obtener muestras debido principalmente a la no cooperación del propietario para confirmar la infección mediante análisis bacteriológico (Alton *et al.*, 1988; Carmichael, 1976). Esta situación tal vez refleja el desconocimiento de la población de propietarios con respecto a la confirmación de *B. canis* a través de estudios subsecuentes como ha sido recomendado previamente por diversos autores (Carmichael and Kenney, 1968; Moore and Gupta, 1970; Pickerill and Carmichael, 1972; George and Carmichael, 1974; Wanke, 2004).

En 1989 Alonso, en la misma área estudiada, solo consiguió aislar tres cepas de una muestra aparente de 24 (12.5%) perros seropositivos (Alonso, 1989) y aunque desafortunadamente en ese trabajo no se refiere si todos los perros seropositivos fueron sometidos a análisis bacteriológicos es importante señalar que los datos contrastan con el presente estudio dado que se logró obtener seis aislamientos de 5 casos diferentes. Interesantemente, en estos aislamientos se incluye una cepa ("C4-20") que fenotípicamente es diferente en el tamaño a las otras cepas aisladas pero que bioquímica y molecularmente corresponde a *B. canis*. Sin embargo, en otras investigaciones el índice de recuperación de *B. canis* es de moderado a bajo a partir de perros seropositivos (Flores-Castro y Segura, 1976; Flores-Castro *et al.*, 1977). Una probable explicación puede deberse a la bacteremia intermitente especialmente en casos de infección crónica (Leonard, 1983; Johnson and Walker, 1992).

El contraste entre los resultados de estos estudios con los del presente trabajo, eventualmente pueden atribuirse a que en esta investigación solo fueron muestreados ejemplares de criadero, de propietarios particulares y de criadores profesionales. En todos estos casos se les exige el certificado de seronegatividad a *B. canis* mediante la prueba de aglutinación rápida en tarjeta, mientras que en los estudios previos se basaron en muestras obtenidas de perros callejeros y de ejemplares recolectados en centros antirrábicos (Flores-Castro y Segura, 1976; Flores-Castro *et al.*, 1977).

La detección molecular realizada en el presente trabajo bajo un protocolo (modificado) previamente reportado (Vizcaíno *et al.*, 1997) permitió, reconocer todas las cepas aisladas de perros seropositivos como *B. canis*. Este procedimiento, está basado en el polimorfismo genético que muestra el gen de la *omp-31* del género *Brucella spp.* (Vizcaíno *et al.*, 1997), permitió reconocer que las cepas aisladas en el presente trabajo, pertenecen a un grupo genéticamente distinto al de la cepa de referencia (RM6/66) aislada en los Estados Unidos de Norteamérica (George and Carmichael, 1974). Sería interesante determinar si esta agrupación genética se refleja en otras regiones genéticas ó bien si existen más variantes genéticas dentro de esta especie del género *Brucella*. Si bien, las especies del género muestran una alta homología genética (Verger *et al.*, 1985; Paulsen *et al.*, 2002), basados en estudios de secuenciación de todo el genoma de *B. melitensis* (Del Vecchio *et al.*, 2002), *B. abortus* (Chain *et al.*, 2005; Halling, *et al.*, 2005) y *B. suis* (Paulsen *et al.*, 2002) ocurren regiones genéticas que son específicas de especie y probablemente algunos marcadores de virulencia entre cepas de la misma especie (Chain *et al.*, 2005). Bajo el protocolo trabajado, los controles positivos dieron los productos de amplificación esperados en el experimento, es decir, bandas de 881 pb, que confirman la presencia del gen (y regiones adyacentes) que codifica para la proteína de membrana externa, *omp-31* en *Brucella spp.* (Vizcaíno *et al.*, 1997). Los controles positivos fueron el antígeno del estuche diagnóstico para detectar anticuerpos contra *B. canis* de Synbiotics, Co. que utiliza la *B. ovis* cepa Reo 198 (BCNN R22) USA y el antígeno de la vacuna melirev – N Cepa REV de *B. melitensis* cepa RB51. Nuestras cepas estudiadas, *B. canis* cepa BC-1, *B. canis* cepa BC-2, *B. canis* cepa BC-3, *B. canis* cepa BC-4, *B. canis* cepa BC-4-t-20 y *B. canis* cepa BC-5-CP33, y los controles positivos mostraron un patrón de expresión de la proteína OMP-31 de *Brucella spp.* característico (Figura 16, carril 1 y 3).

Con el ensayo realizado usando enzimas de restricción, los resultados fueron satisfactorios. Esta técnica sugiere el uso de cuatro enzimas de restricción para diferenciar todas las especies del género *Brucella spp.* En el presente trabajo,

solo empleamos dos enzimas, pues el motivo primario fue la diferenciación molecular de las brucelas aisladas de perros seropositivos a Brucelosis. Las enzimas *Ava II* y *Sal I* cortan en sitios específicos y definidos produciendo un perfil de tres patrones identificándolos como P1, P2 y P3 (Vizcaino *et al.*, 1997). Nuestros aislados de *B. canis* se sometieron a la digestión con estas enzimas dando el patrón P3 de *B. canis* con la enzima de restricción *Ava II*, mientras que las otras especies tales como *Brucella suis* da un patrón de corte P1 y P2, *B. ovis* presenta el patrón P1, *B. melitensis* da el patrón P1 al igual que *B. neotomae*.

*B. abortus* es descartada inmediatamente ya que desde la PCR no amplifica con los iniciadores 31SD y 31TER recomendados por Vizcaino para la amplificación de una fracción del gen de la proteína *omp-31* (Vizcaino *et al.*, 1997).

Por otra parte, con la enzima *Sal I*, las cepas de *B. canis* aisladas en nuestro laboratorio presentan el patrón P2 mientras que *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis* y *B. neotomae* dan el patrón P1.

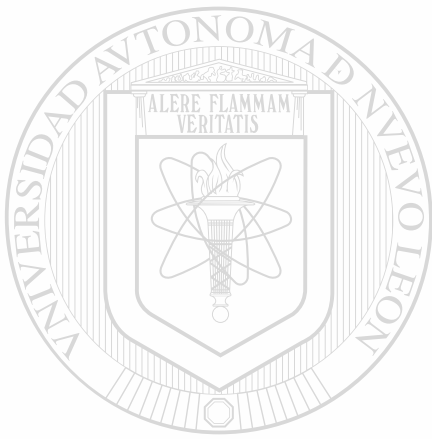
Por lo tanto, el hecho de haber probado estas dos enzimas de restricción, *Ava II* y *Sal I*, nos permitió reconocer que las cepas aisladas de muestras clínicas de perros seropositivos corresponden molecularmente a *B. canis*; basados en el polimorfismo que presenta el gen que codifica para la proteína externa de membrana *omp-31*.

El control negativo para la especificidad de los iniciadores 31SD y 31TER, fue el antígeno vacunal de *B. abortus* de la vacuna Brucel RB51<sup>MR</sup> cepa RB51<sup>MR</sup> que en contraste con las otras especies de brucelas, no expresó la reactividad contra la proteína OMP-31 del género *Brucella spp.* ante la técnica de la PCR con los iniciadores 31SD y 31TER.

De igual forma, a partir de las bacterias y levadura utilizadas en el experimento, (*Bordetella bronchyseptica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp* *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira canicola* y la levadura *Malassezia spp.*), no se amplificó ningún producto ante los iniciadores 31SD y 31TER, mostrando así, una

especificidad total de los iniciadores hacia las bacterias del género *Brucella*, *spp.*

El protocolo molecular aquí descrito, puede eventualmente ajustarse para encontrar la *B. canis* en muestras clínicas lo cual facilitaría enormemente el diagnóstico de la Brucelosis Canina ya sea en animales seropositivos como seronegativos (Wooley, *et al.*, 1978) a *B. canis* ó incluso en aquellos casos de perros afectados por otros miembros del género *Brucella*.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES

La identificación molecular a través de dos iniciadores diseñados para el género *Brucella spp.* usados en estudios taxonómicos previos, funcionaron bien en la identificación de la bacteria *Brucella canis* aislada de muestras clínicas de perros seropositivos a brucelosis canina.

Este procedimiento se vió limitado para encontrar la *B. canis* en muestras clínicas tales como sangre, coágulos, contenido estomacal de fetos, restos de tejidos placentarios de productos de aborto, órganos, así como de diluciones bacterianas superiores a la  $10^{-1}$  de los cultivos de *B. canis*.

La confirmación molecular del gen que codifica para la proteína *omp-31* del género *Brucella spp.* fué confirmado en el laboratorio al igual que el patrón P3 para la enzima de restricción *Ava II* y el patrón P1 para la enzima *Sal I*.

Aunque el número de ejemplares muestreados para serología en este estudio fueron 164, se considera que el número de muestras para cultivo bacteriológico fue bajo, ya que tan solo se pudieron coleccionar especímenes de cinco ejemplares seropositivos. No obstante, de los cinco perros se logró el aislamiento e identificación bioquímica y molecular de la *B. canis* cumpliendo con los protocolos en los que se establece que el diagnóstico final de la brucelosis canina causada por *B. canis* es precisamente el aislamiento de la bacteria de perros seropositivos. No se debe declarar un diagnóstico final basado solamente en serología por pruebas de aglutinación, debe confirmarse en el laboratorio de bacteriología.

Este estudio demuestra el carácter endémico de *B. canis* en perros de Monterrey, Nuevo León y su área metropolitana. De acuerdo a los datos de

serología, existe una probabilidad de 2.3 veces más de encontrar animales seropositivos en criaderos que en perros alojados en casas particulares.

En la presente investigación fueron usados exitosamente las cepas controles tanto del estuche diagnóstico de Synbiotics, Co. para la detección de anticuerpos contra *B. canis*, así como los antígenos de la vacuna Brucel RB51<sup>MR</sup> de *B. abortus* cepa RB51<sup>MR</sup> y el antígeno de la vacuna melirev – N Cepa REV de *B. melitensis*.

A este respecto se llega a la conclusión que estos productos pueden ser empleados con confianza tanto como controles positivos y como controles negativos.

En base a los aislamientos logrados, se concluye que los medios utilizados en este experimento fueron funcionales y permitieron técnicamente la selección de colonias sugestivas de *B. canis*, en donde se obtuvo en uno de los casos la manifestación de dos tipos de colonias semejantes en forma y tipo, pero diferentes fenotípicamente en tamaño.

La cepa C-4 con una morfología típica y normal del género *Brucella spp.* y de un tamaño aproximado de 3 a 4 mm y por otro lado, en el mismo cultivo se observaba una colonia más pequeña, menor de 2 mm, que bioquímica y molecularmente resultó ser también *B. canis* nominando a esta cepa C-4-t-20.

El presente estudio, demuestra que la técnica de PCR-RFLP puede ser utilizada en el diagnóstico e identificación de colonias bacterianas de *Brucella canis* proveniente de muestras clínicas de perros seropositivos, apoyando así, al cultivo y aislamiento que es el diagnóstico definitivo de la brucelosis canina causada por *Brucella canis*. No obstante, se deben realizar ajustes a la técnica para determinar si este procedimiento puede emplearse para el análisis de otras muestras clínicas tales como muestras de sangre, coágulos, sueros, exudados de fluidos vaginales, semen, saliva, leche y tejidos de órganos.

## LITERATURA CITADA

Al-Eissa, YA.: 1999. Brucellosis in Saudi Arabia: Past, present and future. *Annals of Saudi Medicine*. 19:403-405.

Akan, M., Sareyyüpoğlu, B., Tel OY. and Ciftci, A.: 2005. Seroprevalence of *Brucella canis* infection of dogs in two provinces in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*.29:779-783.

Alonso, LE.: 1989. Presencia de brucelosis canina en la ciudad de Monterrey y su área metropolitana. Tesis N°. 24, Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia-UANL.

Alonso ML. y Flores CR: 1995. Presencia de *Brucella canis* en perros de Monterrey. Memorias de la Reunión de Investigaciones Pecuarias en México.

Alton G. and Forsyth J.: 1998. Brucella. Department of Medical Microbiology and immunology A&M. University of Texas. En: <http://www.medmicro.wisc.edu/>.

Alton, GC., Jones, LM., Agnus, RD. and Verger JM.: 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA. 1ª. ed. Paris, Francia. pp.17-37, 123-134, 169-174.

Arredondo, BV.: 2003. Prevalencia de anticuerpos contra *Brucella canis* en caninos callejeros y de un criadero mediante la prueba de aglutinación en placa. Tesis N°. 210, Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia-UANL.

Arsenault, J., Girard, Ch., Dubreuil, P., Bélanger, D.: 2004. Lack of evidence of *Brucella ovis* infection in rams infection in rams. *Can Vet J*. 45:312-313.



Ates, Ö., Cayli, SR., Kocak, A., Kutlu, R., Önal, RE. and Tekiner, A.: 2005. Spinal epidural abscess caused by brucellosis; two case reports, *Neurol Med Chir.* 45:66-70.

Bagley, CV., Paskett, ME., Matthews, NJ. and Stenquist NJ.: 1985. Prevalence and causes of ram epididymitis in Utah. *J Am Vet Med Assoc.* 186:798-801.

Baily, GG., Krahn, JB., Drasar, BS & Stoker, NG.: 1992. Detection of *Brucella melitensis* y *Brucella abortus* by DNA amplification, *J Trop Med Hyg.* 95:271-275.

Birboim, HC. y Doly, J.: 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 16, 71-77.

Blasco, JM. y Gamazo, C.: 1994. Brucelosis animal. *Investigación y Ciencia*, 218: 56-62.

Blasco, JM., Gamazo, C., Winter AJ., Jiménez, MP., de Bagué, SC., Marín, CM., Barberán, M, Moriyón, L., Alonso-Urmeneh, B. y Díaz, R.:1993. Evaluation of whole cell and subcellular vaccines against *Brucella ovis* in rams. *Vet Immunol Immunopatho.* 37:257-270.

Bogdanovich, T., Skumik, M., Lübeck, PS., Ahrens, P. and Hoorfar, J.: 2004. Validated 5\_ Nuclease PCR Assay for Rapid Identification of the Genus *Brucella*. *J Clin Microbiol.* 42:2261–2263.

Briceño, GH., Páramo, RRM., Flores, CR. y Suárez, GF.: 2004. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. *Vet Méx.* 35:121-128.

Bricker, BJ., Ewalt, DR., Macmillan, AP., Foster, G., and Brew, S.: 2000. Molecular Characterization of *Brucella* Strains Isolated from Marine Mammals *J Clin Microbiol.* 38:1258-1262.

Brown, J., Blue JL., Wooley, RE., Dreesen, DW. and Carmichael, LE.: 1976. A serologic survey of a population of Georgia dogs for *Brucella canis* and an evaluation of the slide agglutination test, *J Am Vet Med Assoc.* 169:1214-1216.

Carmichael, LE.: 1966. Abortion in 200 Beagles. *J Am Vet Med Assoc.* 149:1126.

Carmichael, LE.:1968. Brucella abortion in bitches. *J Am Vet Med Assoc.* 152: 35-36.

Carmichael, LE. and Bruner, DW.: 1968. Characteristics of a newly recognized *Brucella* species responsible for contagious abortions in dogs. *Cornell Vet.* 58 :579-592.

Carmichael, LE. and Green, EG.: 1990, Canine brucellosis. In: Green, CE. (Ed), *Infectious Diseases of the dog and cat.* W. B. Saunders Co, Philadelphia, PA, pp.573.

Carmichael LE. and Joubert JC.: 1988. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell Vet.* 87:69-98.

Carmichael, LE. and Kenney, RM.: 1968. Canine abortion by *Brucella canis*. *J Am Vet Med Assoc.* 152:605-616.

Carmichael LE. and Kenney RM.: 1970. Canine Brucellosis, The clinical disease. Pathogenesis and immune response. *J Am Vet Med Assoc.* 156:1726-1734.

Castillo VV., Cotrino BV. y Moreno TC.: 2003. *Brucella canis* Encuesta Serológica sobre Brucella canis en Pacientes Atendidos en la Clínica de Pequeños Animales de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá), LMV Ltda. webmaster.

Chain, PSG., Comerci, DJ., Tolmasky, ME., Frank W. Larimer, FW., Malfatti, SA., Vergez, LM., Aguero, F., Land, ML., Ugalde, RA, and García, E.: 2005. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun.* 73:8353-8361.

Clavareau, Ch.: 1998. Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Microbiology.* 144:3267-3273.

Corbel, MJ.: 1997. Brucellosis: an overview. *Emerging Infect Dis.* 3:213-221.

Cottrino, BV. y Espíndola, A.: 2004. Brucelosis Canina: Revisión y Reporte de Casos LMV Ltda. webmaster.

Cózar Olmo, JA., Díaz Torres, MJ., Cuenca Burgos, MJ., Sánchez García, F. y Lomeña Álvarez, G.: 2002. Absceso esplénico de origen brucelar. *An Esp Pediatr.* 57:593-94.

Currier, RW., Raithel, WF., Martin, RJ. and Potter, ME.: 1982. Canine brucellosis. *J Am Vet Med Assoc.* 180:132-133.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cutler, SJ., Whatmore, AM., and Commander, NJ.: 2005. Brucellosis – new aspects of an old disease. *J App Microb.* 98:1270–1281.

Dawkins, BG., Machotka, SV. and Suchmann, D.: 1982. Pyogranulomatous dermatitis associated with *Brucella canis* infection a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 181:1432-1433.

DelVecchio, VG., Kapatral, V., Redkar, RJ., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, I., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E.,

Selkov, E., Elzerš, PH., Hagijs, S., O'Callaghan, D., Letesson, JJ., Haselkom, R., Kypides, N., and Overbeek, R.: 2002. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:443–448.

Díaz, E., Hernández, L., Valero, G. y Arellano, B.: 2001. Diagnóstico de Brucelosis Animal, INIFAP, Primera Edición, México.

Dillon, AR. and Henderson, RA.: 1981. *Brucella canis* in a uterine stump abscess in a bitch. *J Am Vet Med Assoc.* 178:987-988.

Elfaki, MG, Zaman, TU, Al-Hokail, AA and Nakeeb, SM.: 2005. Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 53:1-7.

Flores-Castro, R.: 1995. Estudio sobre la presencia de *Brucella canis* en México. Resúmenes de la XII Reunión Anual. Inst. Nal. De Investigaciones Pecuarias, S.A.G., México.

---

Flores-Castro, R. y Carmichael, L. E.: 1984. Brucelosis Canina en Terapéutica Veterinaria. Compañía Editorial Continental, Primera edición, México, pp. 1276-1278.

Flores-Castro, R. and Segura, R.: 1976. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. *Cornell Vet.* 66:347-352.

Flores-Castro, R., Suárez-Güémez, F., Ramírez-Pfeiffer, C. and Carmichael, LE.: 1977. Canine Brucellosis: Bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico city. *J Clin Microbiology.* 6:591-597.

Forbes, LB., Nielsen, O., Measures, L. and Ewalt, DR.: 2000. Brucellosis in ringed seals and harp seals from Canada. *J Wildlife Dis.* 36:595-598.

Fox, KF., Fox, A., Nagpal, M., Steinberg, P. and Heroux, K.: 1998. Identification of *Brucella* by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation of *Brucella canis* from other *Brucella spp.* pathogenic for humans by carbohydrate profiles. *J Clin Microbiol.* 36: 3217–3222.

Fredrickson, LE. and Barton, CE.: 1974. A serologic survey for canine brucellosis in a metropolitan area. *J Am Vet Med Assoc.* 165:987-989.

Gándara, B., López-Merino, A., Rogel, MA., and Martínez-Romero, E.: 2001, Limited genetic diversity of *Brucella spp.* *J Clin Microbiol.* 39:235-240.

Gaultney, JB., Wende, RD. and Williams, RP.: 1971. Microagglutination procedures for febrile agglutination tests. *App Microbiol.* 22:635-640.

George, LW. and Carmichael, L.: 1973. A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. Proceedings of the council of research workers animal diseases. *Am J Vet Res.* 35:905-909.

George, LW. and Carmichael, LE.: 1974. A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. *Am J Vet Res.* 35:905-909.

George, LW. and Carmichael, LE.: 1984. Antisperm responses in male dogs with chronic *Brucella canis* infection. *Am J Vet Res.* 45:274-281.

Godfroid, J., Cloeckert, A., Liutard, JP., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-bastuji, B. and Letesson, JJ.: 2005. From the discovery of the Malta fever's Agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* 36:313-326.

González VL.: 1983. Estudio sobre la presencia de *Brucella canis* en criaderos nacionales. Tesis de Licenciatura Fac.de Est. Prof. Cuautitlan UNAM, Méx.

Greene, CE. and George, LW.: 1990. Canine Brucellosis in: Infectious Diseases of the dog and cat. 1ª. ed. Mc Graw Hill, Inc. USA. pp. 646-662.

Griffiths, AJF., Gelbart, WM., Miller, JH. and Lewontin, RC.: 2000. Genética Moderna. 1ª ed. Mc Graw Hill-Interamericana de España. Madrid, España. pp. 299 -372.

Gutiérrez, HR.: 1983. Contribución al estudio sobre *Brucella canis* en perros nacionales y en perros introducidos al país por la Aduana del Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México. Tesis de Licenciatura de la F.M.V.Z - UNAM, México.

Halling, SM., Peterson-Burch, BD., Bricker, BJ., Zuerner, RL., Qing, Z., Li, LL., Kapur, V., Alt, DP. and Olsen, SC.: 2005. Completion of the Genome Sequence of *Brucella abortus* and Comparison to the Highly Similar Genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.*187:2715–2726.

Henderson, RA., Hoerlein, BF., Kramer, TT. and Meyer, ME.: 1974. Discospondylitis in three dogs infected with *Brucella canis*. *J Am Vet Med Assoc.* 165:451-455.

Hoff, GL., Bigler, WJ., Trainer, DO., Debbie JG., Brown GM., Winkler, WG., Richards, SH. and Reardon, M.: 1974. Survey of selected carnivore and opossum serums for agglutinins to *Brucella canis*. *J Am Vet Med Assoc.* 165:830-831.

Hollett, RB.: 2006. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology.* 66:575-587.

Hoover, DL. and Friedlander, AM.: 1997. Brucellosis in: Medical aspects of chemical and biological warfare. 1a. ed. Office of The Surgeon General at TMM Publications Borden Institute Walter Reed Army Medical Center Washington, DC. USA. pp. 513- 522.

Johnson, ChA. and Walker, RD.: 1992. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *The compendium, Small Animal*. 14:763-773.

Joklik, WK., Willett, HP. and Amos, DB.: 1983. Zinsser Microbiologia. 17ª. ed. Editorial Médica Panamericana, S. A. Buenos Aires, Argentina. pp. 746-753.

Ko, J. and Splitter, GA.: 2003. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: Current understanding and future approaches to vaccines development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev*. 16:65-78.

Larsson, MH.: 1980. Pesquisa de aglutininas anti *Brucella canis* em soros humanos na cidade de Sao Paolo, Brasil.

Leal-Klevezas, DS., Martínez, IO., López-Merino, A., and Martínez-Soriano, JP.: 1995. Single-Step PCR for Detection of *Brucella* spp. from Blood and Milk of Infected Animals. *J Clin Microbiol*. 33:3087-3090.

Leonard, JL.: 1983. Canine brucellosis testing. *J Am Vet Med Assoc*. 183:1133

Lewis, GE. and Anderson JK.: 1973. The incidence of *Brucella canis* antibodies in sera of military recruits. *Am J Public Health*. 63:204-205.

López -Merino, A.: 2000. *Brucella*. En: Martínez-Romero, E. y Martínez-Romero, JS. editores. *Microbios en Línea*, Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno.

López-Merino, A., Migranas, R., Pérez, A., Magos, C., Salvatierra, B., Tapia, R., Valdespino, JL. y Sepúlveda, J.: 1992. Seroepidemiología de la brucelosis en México. *Salud Pública Méx*. 34:210-230.

Lovejoy GS., Carver, HD., Moseley, IK. and Hicks, M.: 1976. Serosurvey of dogs for *Brucella canis* infection in Memphis, Tennessee. *Am J Public Health*. 66:175-176.

Lucero, NE., Foglia, L., Ayala, SM., Gall, D. and Nielsen, K.: 1999. Competitive Enzyme Immunoassay for Diagnosis of Human Brucellosis. *J Clin Microbiol*. 37:3245–3248 .

Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM. and Lopez, G.: 2002. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J Med Microbiol*. 51:656-60.

Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM. and Jacob, N.: 2005 A. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol*. 54:457-461.

Lucero NE, Jacob NO, Ayala SM, Escobar GI, Tuccillo P, Jacques I.: 2005 B Unusual clinical presentation of brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol*. 54:505-8.

Mac Faddin, JF.: 2003. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Médica Panamericana. 3ª. ed. Buenos Aires, Argentina. pp. 580, 605-606,660-661.

Malfatti, SA., Vergez, LM., Agüero, F., Land, ML., Ugalde, RA. and Garcia, E.: 2005. Whole-Genome Analyses of Speciation Events in Pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun*. 73:8353-8361.

McKee, MA. and Ballard, JL.: 1999. Mycotic aneurysms of the tibioperoneal arteries. *Ann Vascular Surgery*. 13:188-190.

Memish, ZA. and Balkhy, HH .: 2004. Brucellosis and international travel. *J Travel Med* 11:49-55.



Méndez-Nárez, G., Mota-Cortés, E., Díaz-Aparicio E., Monroy-Basilio, J I.: 1998. Seguimiento de un brote de *Brucella canis* en un criadero de la ciudad de México. Trabajo presentado en el XIX Congreso Nacional de la AMMVEPE León.

Meenu S., Manju, S. and Lata, K.: 2005. Pneumonic presentation of brucellosis. *Indian J Pediatr.* 72:65-66.

Miller, WG., Adams G., Ficht. TA., Cheville, NF., Payeur, JP., Harley, DR., House, C. and Ridgway, SH. : 1999. *Brucella* induced abortions and infection in Bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildlife Med.* 30:100-110.

Monroe, PW. Stanley L. Silberg, Patrick M. Morgan, and Michael Adess: 1975. Seroepidemiological Investigation of *Brucella canis* Antibodies in Different Human Population Groups. *J Clin Microbiol.* 2 (5):382-386.

Montes, I., Hernández, P., Rodríguez-Mayo, M., Muñoz, JR. and Agulla, A.: 1997. Evaluation of three commercially available blood culture systems for cultivation and detection of *Brucella melitensis* . 37<sup>th</sup> ICAAC. Toronto, Canadá.

Morata, P., Queipo-Ortuño, MI. and Colmenero, JD.: 1998. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol.* 36: 2443–2446.

Moore JA. and Gupta, BN.: 1968. Eradication of *Brucella canis* infection from a dog colony. *J Am Vet Med Assoc.* 153:523-527.

Moore JA.: 1969. *Brucella canis* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 155: 2034-2037.

Moore JA. and Gupta, BN.: 1970. Epizootiology, diagnosis, and control of *Brucella canis*. *J Am Vet Med Assoc.* 156:1737-1740.

Munford, RS., Weaver, RE., Patton, Ch., Feeley, JC. and Feldman, RA.: 1975. Human disease caused by *Brucella canis*, a clinical and epidemiologic study of two cases. *J Am Med Assoc.* 231:1267-1269.

Nielsen, O., Stewart, REA., Nielsen, K., Measures, L. and Duignan, P.2001. Serologic survey of *Brucella* spp. antibodies in some marine mammals of North America. *J Wildlife Dis.* 37:89–100.

Noviello, S., Gallo, R., Kelly, M., Limberger, RJ., DeAngelis, K., Cain, L., Wallace, B. and Dumas, N.: 2004. Laboratory-acquired Brucellosis. *Emerg Infect. Dis.* 10:1848-1850.

Olivares, E.: 1990. Diseños experimentales. (versión 2.0) Fac. de Agronomía de la UANL.

Ortega-Pacheco, A.: 2001. La sobrepoblación canina: un problema con repercusiones potenciales para la salud humana. *Rev Biomed.* 12:290-291.

Paulsen, IT., Seshadri, R., Nelson, KE., Eisen, JA., J. F. Heidelberg, JF., Read, TD., Dodson, J., Umayam, L., Brinkac, LM., Beanan, MJ., Daugherty, SC., Deboy, RT., Durkin, AS., Kolonay, JF., Madupu, R., Nelson, WC., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, SE., Riedmuller, S. Tettelin, H., Gill, SR., White, O., Salzberg, SL., Hoover, DL., Lindler, LE., Halling, SM., Boyle, SM. and Fraser, CM.:2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:13148–13153.

Petri, A. and Watson, P.: 1999. **Statistics for Veterinary and Animal Science**. Blackwell Science LTD. USA. P.168.

Piampiano, P., McLeary, M., Young, LW. and Janner, D.: **Brucellosis: 2000. Unusual presentations in two adolescent boys. *Pediatr Radiol.* 30:355-357.**

Pickerill, PA. and Carmichael, LE.: 1972. **Canine brucellosis: control programs in comercial kennels and effect on reproduction. *J Am Vet Med Assoc.* 160:1607-1615.**

Polt, SS., Dismukes, WE., Flint, A. and Schaefer, J.: 1982. **Human Brucellosis caused by *Brucella canis*. *Ann Intern Med.* 97:717-719.**

Quinn, PJ., Carter, ME., Markey, BK. and Carter, GR.: 1994. **Brucellas species, *In: Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, 1ª. ed. USA. pp. 261-267.**

Ramírez, FA.,: 1992. **Seroprevalencia de *Brucella canis* en perros clínicamente sanos destinados a crusa en el área metropolitana de Monterrey, N. L., Tesis N°. 42, Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia-UANL.**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Randhawa, AS., Nelly, VP. and Baker, EF.: 1977. **Agglutinins to *Coxiella burnetii* and *Brucella spp.*, with particular reference to *Brucella canis*, in wild animals of southern Texas. *J Am Vet Med Assoc.* 171:939-942.**

Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M. and López-Goñi, I.: 1995. **Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol.* 33:615-617.**

Ruiz, M.: 1945, **Brucelosis, Anales del Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Nuevo León. 2:91-109.**

Rufino, R.: 2003. Diagnóstico de enfermedades infecciosas en equinos de la república Argentina. *Vet Arg.* 20:671-684.

Serra, J. y Viñas, M.: 2004. Laboratory diagnosis of brucellosis in a rural endemic area in northeastern Spain. *Int Microbiol.* 7:53-58.

Shin, S.J. and Carmichael, L.:1999. Brucellosis canina causada por *Brucella canis*, in: Recent Advances in canine infectious diseases, International Veterinary Information Service, [www.ivis.org](http://www.ivis.org).

Sohn, A.H., Probert, W.S., Glaser, C.A., Gupta, N., Bollen, A.W., Wong, J.D., Grace, E.M. and McDonald, W.C.: 2003. Human Neurobrucellosis with Intracerebral Granuloma Caused by a Marine Mammal *Brucella spp.* *Emerg Infect Dis.* 9:485-488.

Spink, W.W.: 1969. Present status of brucellosis in man: clinical and diagnostic problems. *J Am Vet Med Assoc.* 155:2091-2093.

Swenson, R.M., Carmichael, L.E. and Cundy, K.R.: 1972. Human infection with *Brucella canis*. *Annals Intern Med.* 76:435-438.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tan, J.S.: 1997. Human zoonotic infections transmitted by dogs and cats. *Arch Intern Med.* 157:1933-1943.

Thompson C.: 1975. *Brucella canis* isolated from the eye of a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 166:583-584.

Thrusfield, M.: 1995. *Veterinary Epidemiology.* 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell Science. Oxford. pp. 479.

Verguer, JM., Grimont, F., Grimont, PAD. and Grayon, M. : 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by desoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst. Bacteriol.* 35:292-295.

Vizcaíno, N., Cloeckaert, A., Zygmunt, MS. and Dubray, G.: 1996. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis omp31* gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 64:3744-3751.

Vizcaíno, N., Verger, JM., Grayon, M., Zygmunt, MS. and Cloeckaert, A.: 1997. DNA polymorphism at the *omp-31* locus of *Brucella spp.*: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. *Microbiol.* 143:2913–2921.

Wallach, JC., Giambartolomei, GH., Baldi, PC. and Fossati, CA.: 2004. Human Infection with M- Strain of *Brucella canis*. *Emerg Infect Dis.* 10:146148.

Wanke, MM.: 2004. Canine Brucellosis. *Animal Reprod Sci.* 82-83:195-207.

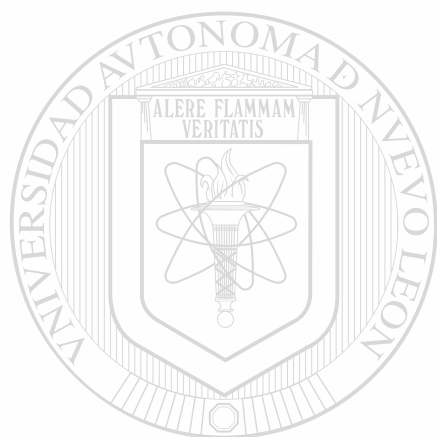
Wesley, WS.: 1969. Present status of brucellosis in man: clinical and diagnostic problems. *J Am Vet Med Assoc.* 155:2091-2093.

Whatmore, AM., Murphy, TJ., Shankster, S., Young, E., Cutler, SJ. and Macmillan, AP.: 2005. Use of amplified length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. *J Clin Microbiol.* 43:761-769.

Wooley, RE., Hitchcock, PL., Blue, JL., Neuman, MA., Brown, J. and Shotts, EB.: 1978. Isolation of *Brucella canis* from a dog seronegative for Brucellosis. *J Am Vet Med Assoc.* 173:387-388.

Ying, W., Nguyen, MQ. and Jahre, JA.: 1999. *Brucella canis* Endocarditis: Case report. *Clin Infect Dis.* 29:1593-1594.

Zerva, L., Bourantas, K., Mitka, S., Kansouzidou, A. and Legakis, NJ.: 2001, Serum Is the Preferred Clinical Specimen for Diagnosis of Human Brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol.* 39:1661-1664.



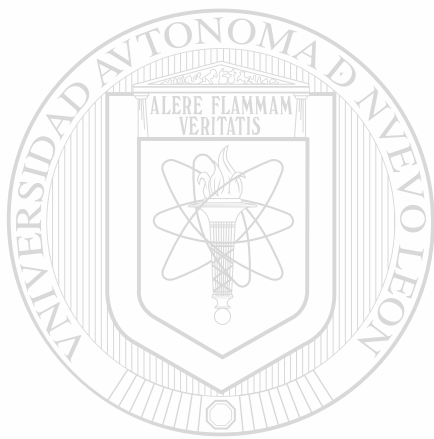
UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**APENDICE A**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## MATERIALES

### Reactivos

PROQUIM: Etanol Absoluto

RESEARCH ORGANICS: Fosfato de potasio monobásico (S39037); Fosfato de potasio dibásico (P29126), Cloruro de potasio y cloruro de sodio (Lote T41997).

MWG: Primers

GICOBRL: Agarosa ultrapura (1062319), Agua UPE (1070078)

PROMEGA: Taq polimerasa en amortiguador B (Lote 142932), 190930),

dNTP's (Lote 134522), PCR DNA Marker (Lote 1394B13).

INVITROGEN: Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Lote 1216293)

SIGMA: Azul de bromofenol (Lote: 37H3708), Bromuro de etidio (68H3640),

OXOID: Urea 40 % (SR0020K)

QUIMICA DINAMICA SA DE CV: (p) dimetilamino benzaldehido, Acido Clorhídrico

BECTON – DICKINSON AND COMPANY: Juego de colorantes para Tinción de Gram

GENTRA SYSTEMS PUREGENE<sup>®</sup>: Genomic DNA Purification Kit

### Medios de cultivo

DIFCO: Caldo Infusión Cerebro Corazón

DIBICO: Medio de Cultivo Agar Biotriptasa, Agar Hierro Triple Azucar, Agar Hierro Lisina, Agar MIO, Agar Mc. Conkey

OXOID: Agar Base Urea (Christiensen)

BD BIOXON: Agar Soya Trypticasa

MERCK: Agar Citrato de Simons



## Controles Biológicos positivos para PCR-RFLP

### Cepas de *Brucella spp.*

**SYNBIOTICS CORPORATION:** Canine Brucellosis Antibody Test Kit.

### LITON DE MEXICO PRONABIVE:

Brucel RB51<sup>MR</sup> Plus, vacuna *Brucella abortus* cepa RB51<sup>MR</sup> (Reg. SAGARPA B-0653-047)

melirev – N, vacuna *Brucella melitensis* cepa REV (Reg. SARH B-0653-002)

### Otras bacterias

#### FORT DODGE LABORATORIES, INC.:

Bronchi – Shield<sup>R</sup> III *Bordetella bronchiseptica* vaccine, cultivo vivo avirulento

LCI – GP *Leptospira canicola* – *grippotyphosa*– *icterhaemorrhagiae* – *pomona* bacteria.

Lyme Vax<sup>R</sup> *Borrelia burgdorferi* bacteria.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **EQUIPO**

**EPENDORF: Microcentrifuga modelo 5415C**

**BIORAD:**

**Cámaras para electroforesis horizontal MINI-SUBCELL GT N°. B170-4408 y B179-4483**

**Micropipeta de 0.5-10 µl (B166-0505EDU)**

**Fuente de poder PAC200 y 3000**

**Transiluminador**

**CORNING: Potenciometro 430**

**EXPLORER: Balanza Analítica E 11140 SN D 007024738**

**OHAUS: Balanza CT 1200**

**MAYTAG: Congelador de – 20° C Admira 2-35583-001**

**WHITE – WESTINGHOUSE: Refrigerador convencional**

**SO-LOW: Ultracongelador – 40° C**

**MISONIX: Campana de seguridad para PCR**

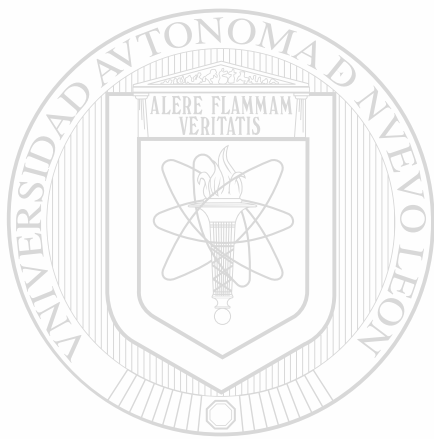
**MJ RESEARCH, INC.: Termociclador Programmable Thermal Controller (PTC-100)<sup>TM</sup>**

**Cámara de electroforesis C. B. S. Scientific Co. modelo MGV-102**

**Cámara de electroforesis Zigma, modelo Z 35, 280-2**

**Fotodocumentador MultiDoc-It Digital Imaging System UVP**

**Incubadora bacteriológica**



**APENDICE B**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## PREPARACION DE SOLUCIONES

Para la preparación de las soluciones, mezclas y reactivos, se utilizó agua bidestilada y para las soluciones empleadas en Biología Molecular para la extracción de ADN y para la PCR se uso agua ultrapura estéril (H<sub>2</sub>O UPE) libre de DNAsa y RNAsa.

### 1.- Reactivos y Medios para Bacteriología

#### Medios de Cultivo

##### Medio bifásico de Ruíz Castañeda

Solución A: Se pesa el caldo Soya Trypticasa en proporción a 30 g/ 1 lto. según el volumen a preparar. Cada frasco de medio de cultivo lleva 40 ml de caldo Soya Trypticasa, por lo tanto, se pesaron 0.75 g y se le agregan 25 ml de agua bidestilada pH 7.0; se deja remojar por 5 minutos y después se calienta hasta que se disuelva totalmente; se esteriliza en autoclave a 121° C por 15 minutos.

Solución B: Se pesa el agar Soya Trypticasa en proporción de 40 g/1 lto. según el volumen a preparar. Cada frasco de medio de cultivo lleva 50 ml de Agar Soya Trypticasa, por lo tanto, se pesaron 2 g del agar en polvo y se colocaron en un matraz Erlen Meyer y le agregaron 50 ml de agua bidestilada estéril, se deja remojar por 5 a 10 minutos y después se disuelve a fuego lento; se vierte en el frasco oblonga y se tapa y se esteriliza a 121° C/15'.

#### Medio completo:

Una vez esterilizada la solución B, se dejan reposar los frascos sobre la mesa en posición inclinada hasta su solidificación. Después, con una pipeta estéril y en condiciones de asepsia absoluta, se vierten 25 ml de la solución A al frasco del medio quedando la fase sólida unida a uno de los lados del frasco y el caldo Soya Trypticasa en el fondo del frasco.

#### Agar Biotriptasa

Este medio especialmente recomendado para el aislamiento de *Brucella spp.* de alimentos y muestras clínicas, se prepara en proporción a 41 gramos/un litro según el volumen requerido. Para 100 ml de medio de cultivo se pesaron 4.1 g del medio de cultivo y se añadieron 100 ml de agua bidestilada, se dejó remojar por 5 a 10 minutos y se disolvió al calor; se le agrega una solución de Cristal Violeta al 0.1 % en proporción de 1.4 ml por litro de medio, por lo tanto, se añaden 0.14 ml de Cristal Violeta al 0.1 % por cada 100 ml de medio de cultivo Biotriptasa. Se procedió a esterilizar en autoclave a 121° C por 15 min. y se

### **Agar Eosina Azul de Metileno EMB**

Se pesa en proporción de 36 gramos/litro según el volumen requerido. Para 100 ml de medio de cultivo se pesan 3.6 g del polvo del agar EMB y se le añaden 100 ml de agua bidestilada, se deja remojar por 5 a 10 minutos y se disuelve al calor; se esteriliza en autoclave a 121° C por 15 minutos. Se deja templar la temperatura y se vacían cajas de petry con 15 a 20 ml cada una; se dejan solidificar y se almacenan en refrigeración.

### **Agar Mac. Conckey**

Se pesa en proporción de 50 gramos/litro según el volumen requerido. Para 100 ml de medio de cultivo se pesan 5 g del polvo del agar y se le añaden 100 ml de agua bidestilada, se deja remojar por 5 a 10 minutos y se disuelve al calor; se esteriliza en autoclave a 121° C por 15 minutos. Se deja templar la temperatura y se vacían cajas de petry con 15 a 20 ml cada una; se dejan solidificar y se almacenan en refrigeración.

### **Agar Soya Trypticasa**

Se pesa en proporción de 40 gramos/litro según el volumen requerido. Para 100 ml de medio de cultivo se pesan 4 g del polvo del agar y se le añaden 100 ml de agua bidestilada, se deja remojar por 5 a 10 minutos y se disuelve al calor; se esteriliza en autoclave a 121° C por 15 minutos. Se deja templar la temperatura y se vacían cajas de petry con 15 a 20 ml cada una; se dejan solidificar y se almacenan en refrigeración.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### **Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC)**

Se pesa en proporción de 37 gramos/litro según el volumen requerido. Para 100 ml de medio de cultivo se pesan 3.7 g del polvo del caldo y se le añaden 100 ml de agua bidestilada, se deja remojar por 5 a 10 minutos y se disuelve con agitación constante; no es necesario disolverlo al calor pero es opcional; se vacía a tubos de ensayo con 2 o 3 ml y se esteriliza en autoclave a 121° C por 15 minutos y se almacenan en refrigeración.

## Medios de Cultivo para Pruebas Bioquímicas

Todos los medios de cultivo para la identificación bioquímica se realizaron en tubos de ensayo con agar inclinado o en algunos casos (SIM, MIO) en posición vertical. Las variantes en la cantidad de medio que se utiliza así como las condiciones de esterilización se explican en el cuadro N° 2.

Medio Cul	Gr/lto	T° Esteril	Tiempo	Posición	Cantidad
TSI	59.4	118° C	15	Inclinado	3.5 ml
LIA	33	121° C	12	Inclinado	3.5 ml
MIO	31	121° C	15	Vertical	2.5 ml
FENILALA	23	121° C	15	Inclinado	3.5 ml
SIM	30	121° C	15	Vertical	2.5 ml
UREA *	24g/950ml	115° C	20	Inclinado	3.5 ml
CITRATO	22.5	121° C	15	Inclinado	2.5 ml

\* Agar Base Urea. Se le añade 50 ml de una solución de Urea al 40%

El agar base urea lleva una preparación especial ya que lleva un aditivo especial que es la urea al 40 %. Se pesa en proporción de 2.4 gramos/95 ml., (24g/950 ml). Ya pesados los 2.4 gramos, se depositan en un matraz y se le añaden 95 ml de agua bidestilada, se deja remojar por 5 a 10 minutos y se calienta hasta total disolución. Se esteriliza en el mismo matraz a 115° C por 20 minutos y se deja enfriar a una temperatura de 40 – 45° C, momento en el cual se le agrega un vial de urea al 40 % estéril con un volumen de 5 ml. Se homogeniza el medio en el matraz y con una pipeta estéril se dispensan 3.5 ml en cada tubo de ensayo previamente esterilizados y secados, los cuales se dejan en posición inclinada hasta su total solidificación. Una vez sólidos los medios se almacenan en refrigeración.

### Medios de cultivo para pruebas bioquímicas

La preparación de medios de cultivo es muy semejante, variando las cantidades de polvo puro de cada medio, todos se disuelven al calor, se vierten distintas cantidades en tubos de ensayo y se someten a esterilización a diferentes temperaturas y tiempos (ver tabla arriba) y luego se habrán de inclinar algunos tubos y otros se quedan verticales.

## 2.- Reactivos para electroforesis en gel de agarosa

### Amortiguador TBE 10X pH 8.0

Se preparó una solución de Tris/Ac. Bórico al 2 mM mezclando 108 g de Tris Base (1 M) con 55 g de Acido Bórico (1 M) diluyéndose en 900 ml de agua desionizada. Posteriormente se agregan 40 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0) y se afora a un litro. Se esteriliza y se mantiene a temperatura ambiente o 4° C.

## Amortiguador TBE 1X

Se mezclan 900 ml de agua con 100 ml de TBE 10X y homogenizar por agitación.

## Gel de Agarosa

Agarosa al 0.8 % (w/v). Pesar 0.8 g de agarosa, añadir 100 ml de solución TBE 1X, dejar remojar y agitar por 2 a 3 minutos, calentar en el microondas hasta completa disolución.

Agarosa al 1.5 % (w/v). Pesar 1.5 g de agarosa, añadir 100 ml de solución TBE 1X, el resto del procedimiento es igual al anterior.

En la presente investigación, se trabajaron geles de agarosa al 1.8 y al 2 %.

## 3.- Preparación de reactivos para electroforesis en gel de poliacrilamida

### Ingredientes del gel de poliacrilamida (10 ml)

30 %	Bisacrilamida	3.2 ml
2 mM	Tris base-pH 8	1.6 ml
	Agua bidestilada estéril	4.7 ml
10 %	APS	196.0 $\mu$ l
	Temed	15.0 $\mu$ l

### Solución bis-acrilamida 30 %

Disolver 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de bis-acrilamida, aforar a 100 ml y filtrar en papel Whatmann #1. Almacenar a temperatura ambiente en frascos ámbar u oscuros.

### Persulfato de amonio 10 %

Disolver 1 g de Persulfato de Amonio en 10 ml de agua bidestilada Colocar alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf de 1.5 ml y almacenar en congelación hasta su uso.

### Amortiguador Tris-base [2M] pH 8.8

Tris-base	12.1 g
Agua bidestilada	35.0 ml
HCl	4.0 ml*

\*Aproximadamente hasta alcanzar el pH de 8.8, luego aforar a 50 ml

### **Amortiguador de corrimiento 10 X**

1.5 M	Glicina	34.6 g
2.0 M	Tris-base	7.2 g

Aforar a 300 ml con agua bidestilada. Para preparar la solución al 1X se mezclan 25 ml (10X) + 250 ml de agua bidestilada.

### **4.- Reactivos en general**

#### **PBS 150 mM (pH 7.2):**

Disolver 0.876 g de NaCl, 1.12 g de KCl, 2.04 de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2.613 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> aforando a 100 ml de agua desionizada. Ajustar pH con NaOH. Dispensar en alícuotas y esterilizar en autoclave.

#### **Amortiguador de carga:**

Disolver 25 g de azul de bromofenol (Sigma®), 25 mg de xilencianol y 3 ml de glicerol aforando a 10 ml.

#### **Bromuro de etidio 0.1 %:**

Se adicionan 20 µl de bromuro de etidio (10Mg/ml) en 200 ml de agua bidestilada.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®



## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Arnoldo Aguirre Ramos

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias Veterinarias

Tesis: DETECCIÓN MOLECULAR Y AISLAMIENTO DE *Brucella canis* EN PERROS DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L.

Campo de Estudio: Salud Animal

### Biografía:

Datos Personales: Nacido en Poza Rica, Veracruz, México el 1° de Octubre de 1960. Hijo del Sr. Arnoldo Aguirre Ramos y María Guadalupe Ramos Salinas de Aguirre.

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Educación: Egresó en 1982 de la Universidad Autónoma de Nuevo León, obteniendo el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo (QBP) por la Facultad de Ciencias Biológicas en 1985.

### Experiencia Profesional:

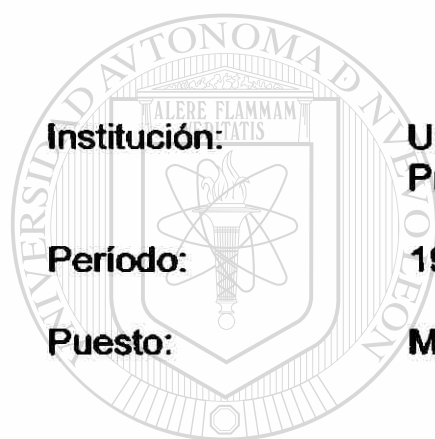
Institución: Centro de Estudios Universitarios Preparatoria

Período: 1979-1980

Puesto: Maestro por horas de Química y Biología

**Institución:** Secretaria de Salubridad y Asistencia  
**Período:** 1980-1981  
**Puesto:** Asesor Sanitario en el área de Alimentos Bebidas y Medicamentos, pasteurizadoras de leches y CECOPOS, y Rastros de Equinos.

**Institución:** Anderson-Cleyton, Co.  
**Período:** 1982-1983  
**Puesto:** Químico Analista departamento de Control de Calidad



**Institución:** Universidad Autónoma de Guerrero  
Preparatoria Popular de Tlacotepec, Guerrero  
**Período:** 1983  
**Puesto:** Maestro por horas de Biología, Química y Física

---

**Institución:** Universidad Autónoma de Nuevo León  
Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Período:** 2 de Noviembre de 1987 a la fecha

**Puesto:** Personal Profesional no Docente, Químico Analista en el Laboratorio de Bacteriología, Coordinador de Escolar, Coordinador de Servicio Social, Coordinador de Prácticas de Laboratorio, Maestro por horas, desde 1989, Nombramiento de Profesor Ordinario (Septiembre del 2001).

***“La grandeza de una nación y***

***su progreso moral pueden ser***

***juzgados según la forma en que***

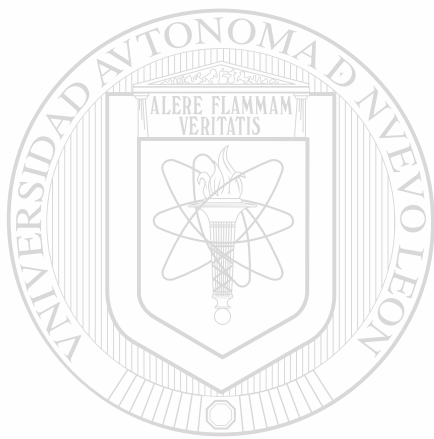
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

***trata a sus animales”***

***Ghandi***



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



