

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
Vogues Proskawer	Suspensión	48	36°	α -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 Ornitina, SIM= Sulfhídrico Indol Motilidad, MR-VP=Rojo de Metilo Vogues Proskawer.

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 Tripticasa (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 jóvenes

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^{MR} de la vacuna Bruces RB51^{MR} 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)TM 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.

TABLA II

Reactantes de la mezcla de PCR^(*) 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 ₂	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 ₂ 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)TM 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

(*) Vizcaino, 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 μ l de amortiguador de carga (colorante azul de bromofenol-Sigma®) por 8 μ 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 electroforésis 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

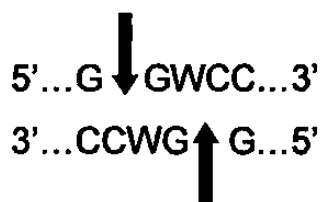
las bandas obtenidas. La electroforesis se realizó a 85 V y al cabo de 30 minutos, se tiñó el gel con Bromuro de Etidio (BE) al 0.1 % exponiendo el gel al reactivo durante 15 minutos.

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

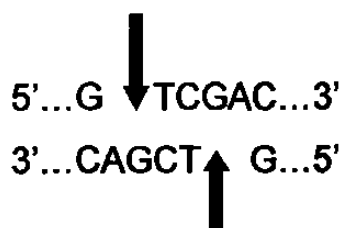
Para las pruebas de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, (RFLP) (Giffith *et al.*, 2000), se usaron las enzimas ***Ava II*** (***Appligene***) y ***Sal I*** (***Gibco BRL***) (Vizcaíno *et al.*, 1997).

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 MgCl₂, 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).

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.

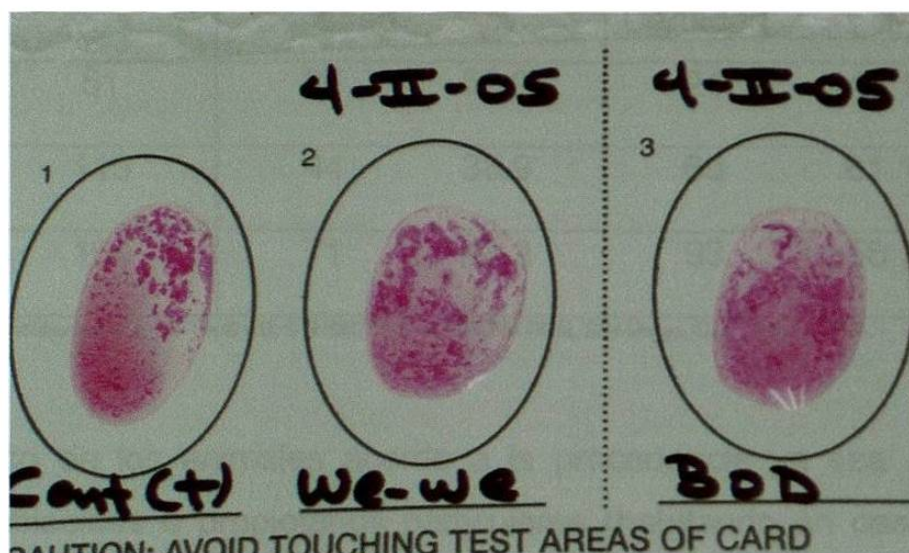


Figura 6. Prueba rápida de aglutinación en tarjeta. Muestras típicas de seroaglutinación de moderada a intensa. En el ovalo N° 1 se muestra la reacción de aglutinación del control positivo. En el ovalo N° 2 y 3 se exhibe reacciones positivas de dos caninos muestreados en el presente estudio.

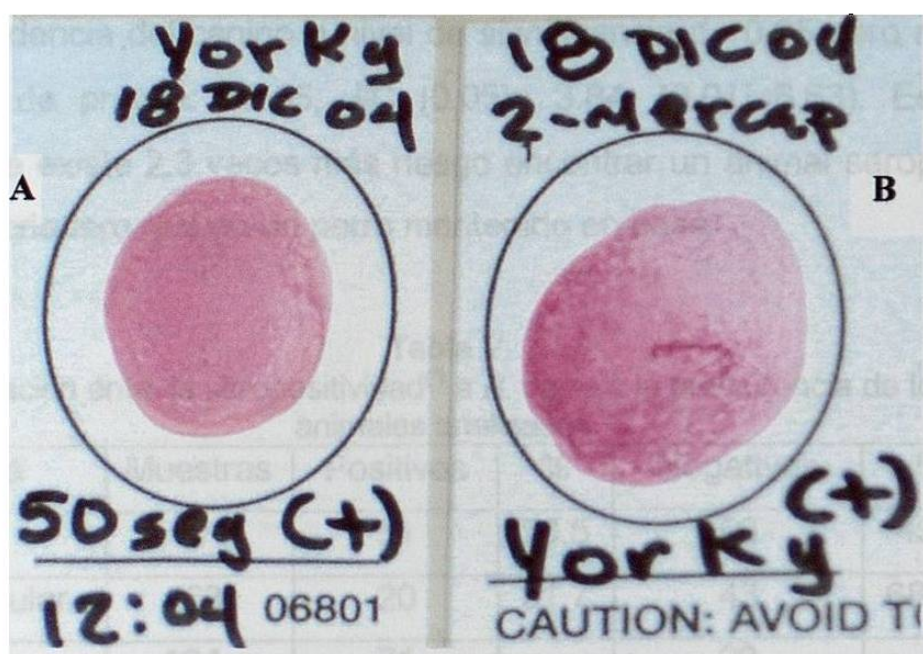


Figura 7. Reacción de seroaglutinación con y sin tratamiento con 2- β -mercaptoetanol. El suero es de un canino hembra con antecedentes de aborto y sospechoso de brucelosis canina. En 7-A, se muestra la reacción de la prueba rápida de aglutinación en tarjeta directa, mientras que en 7-B, se muestra la 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*^(*) 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; SYNBOTICS 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.

Tabla V

Relación entre la seropositividad^(*) 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 SYNBOTICS 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 ⁽¹⁾	24	12	50	12	50
Requisito para cruce ⁽²⁾	39	8	20.5	31	79.5
Monitoreo sanitario ⁽³⁾	101	51	50.5	50	49.5
Total	164	71	43.3	93	56.7

⁽¹⁾ 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.

⁽²⁾ 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.

⁽³⁾ 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 despues 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, interpretandose 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 homogenea (Figura 8, ovalo 3).

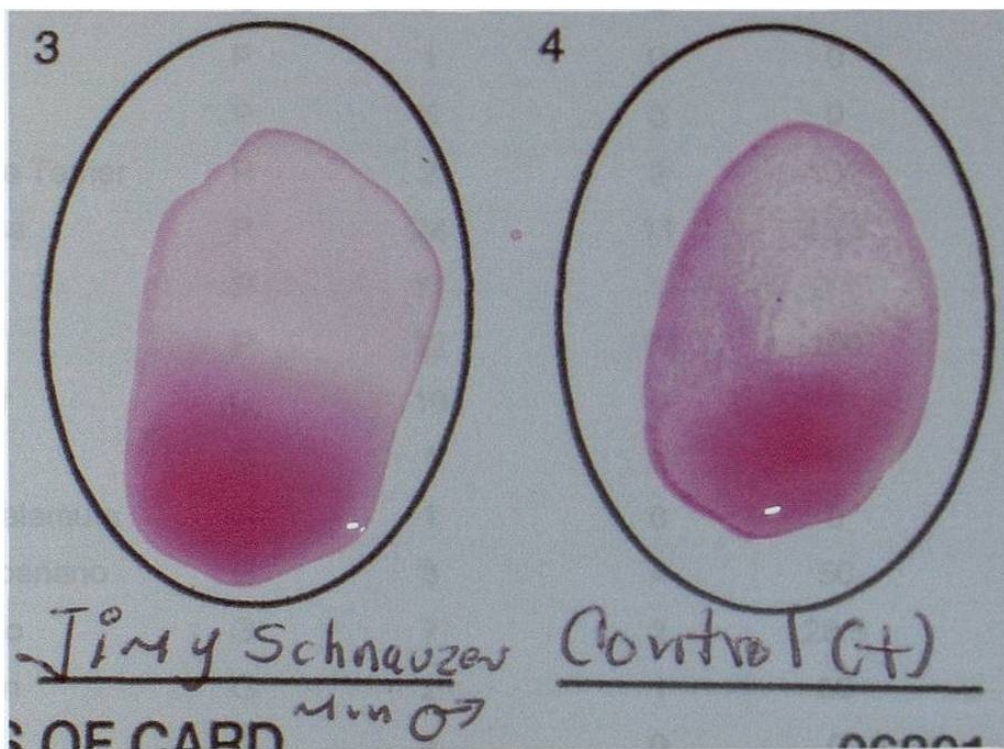


Figura 8. Caso seronegativo en un paciente canideo. En el ovalo de la izquierda se observa una reacción negativa resaltando la homogeneidad entre los reactantes, mientras que en el ovalo de la derecha, el control negativo del estuche diagnóstico muestra una reacción de aglutinación en tarjeta positiva.

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^(a).

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
TOTAL		164	71	43.3%	93

(a) Canine Brucellosis Antibody test kit, D-Tec® CB; 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- β -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 de aglutinación (dentro de los primeros 50 segundos de mezclados los reactivos) con formación franca de grumos, a ambas pruebas serológicas.

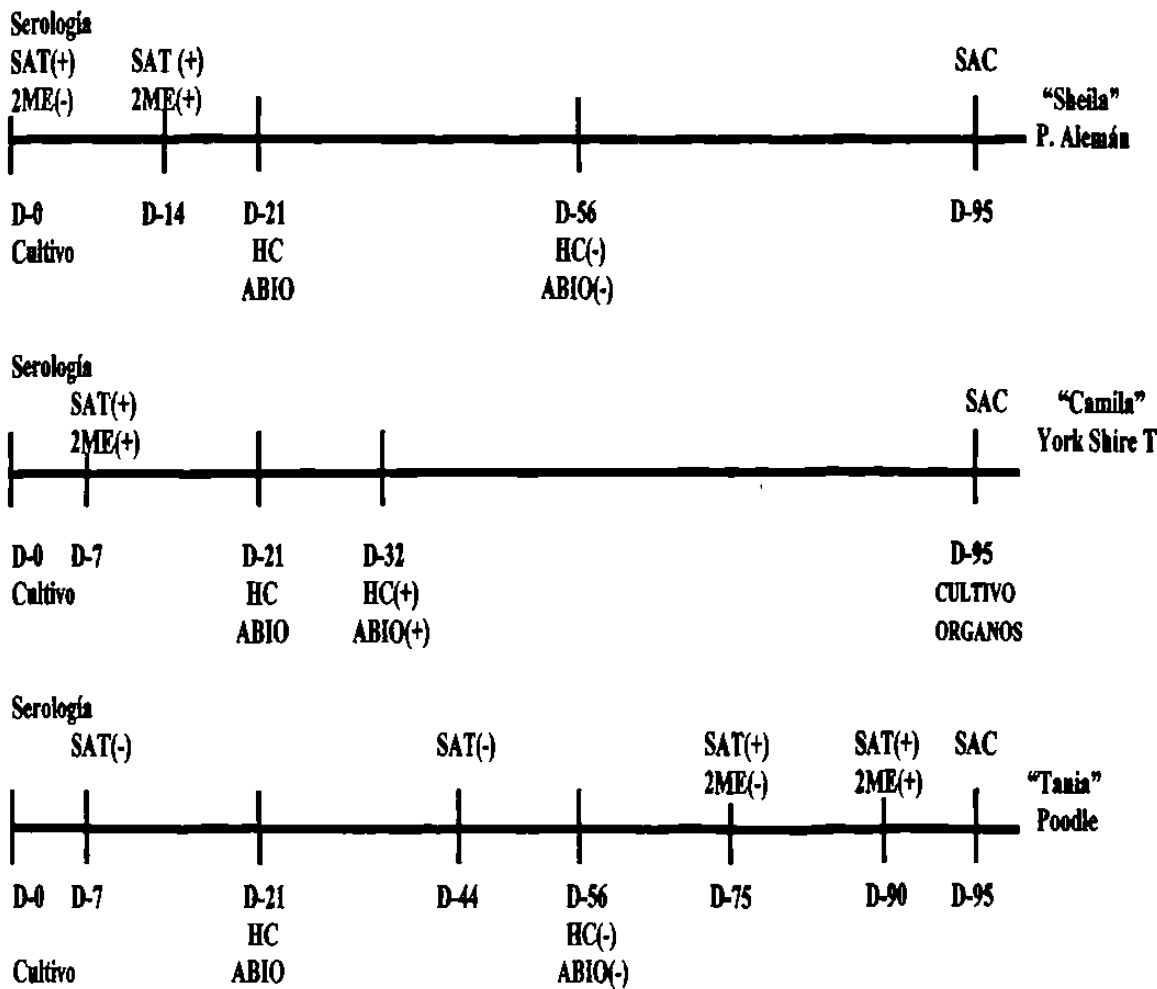
A partir de esta hembra, fue aislada *B.canis* en hemocultivo a los 25 días que resultó seropositiva.

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 canideos, 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.

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).

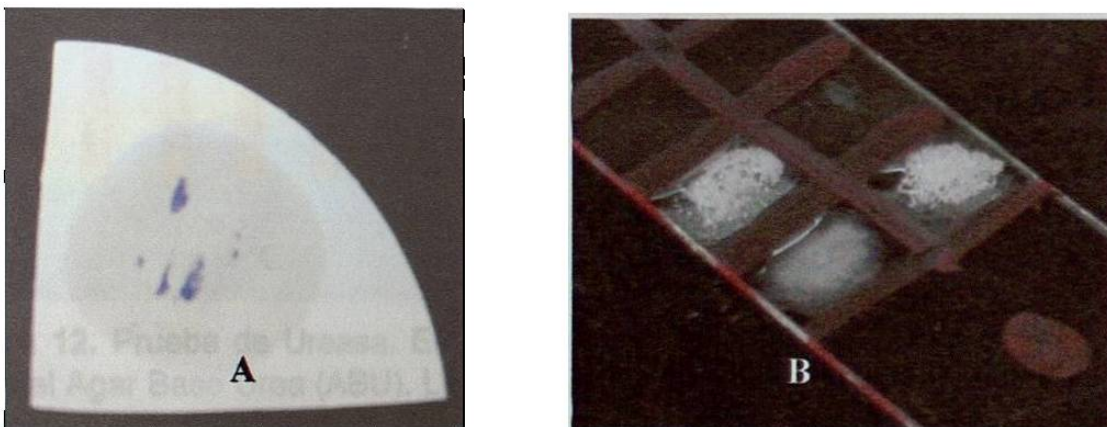


Figura 11. Pruebas de Oxidasa (A) y Catalasa (B) positivas de colonias bacterianas aisladas de muestras clínicas de perros seropositivos.

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).

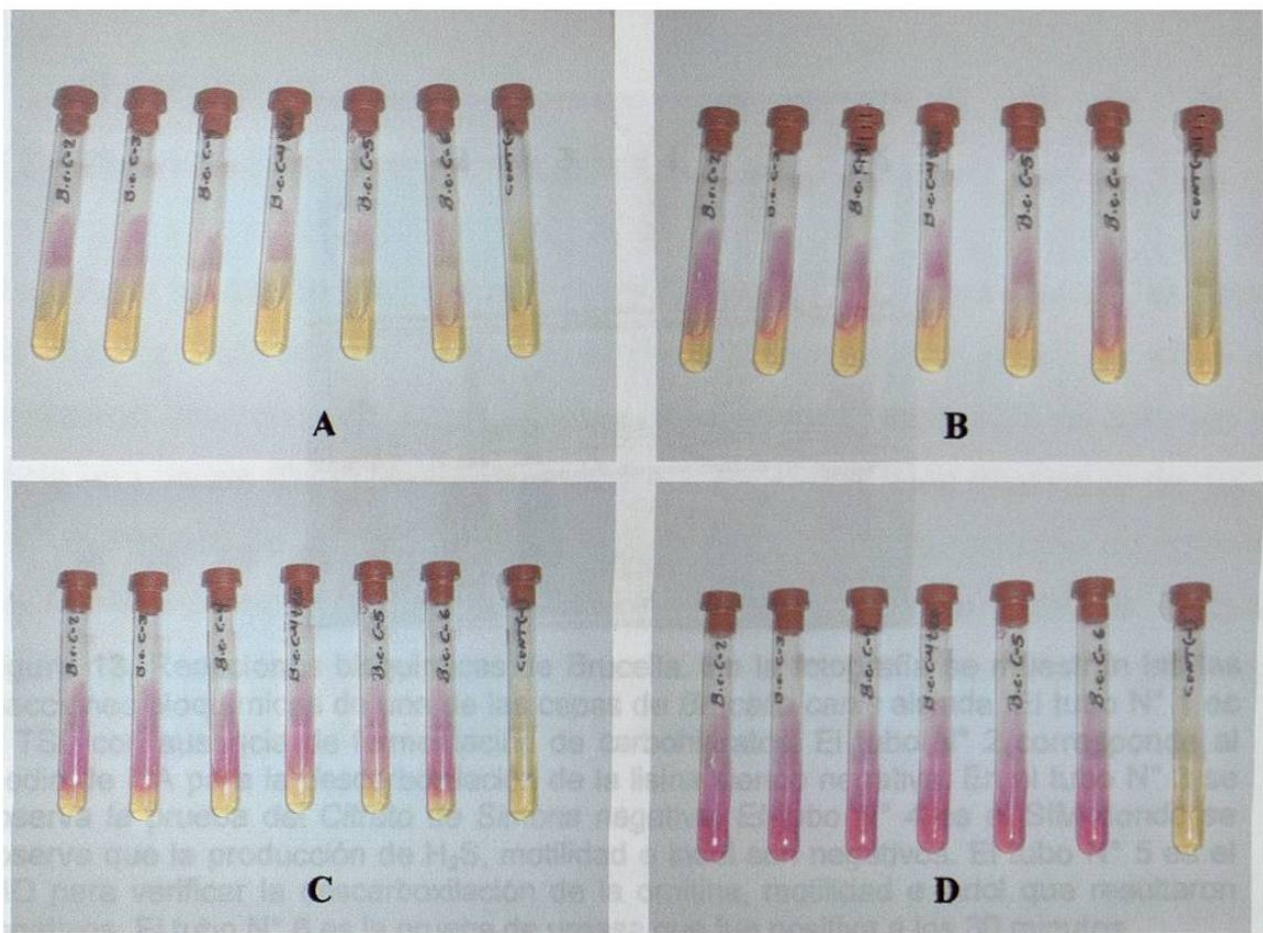


Figura 12. Prueba de Ureasa. En las imágenes se observa la reacción de la ureasa sobre el Agar Base Urea (ABU). Los tubos de izquierda a derecha corresponden a las cepas de campo de *B. canis* aisladas de muestras clínicas de cinco pacientes diferentes incluyendo la cepa "C-4 t-20" variante fenotípica 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).

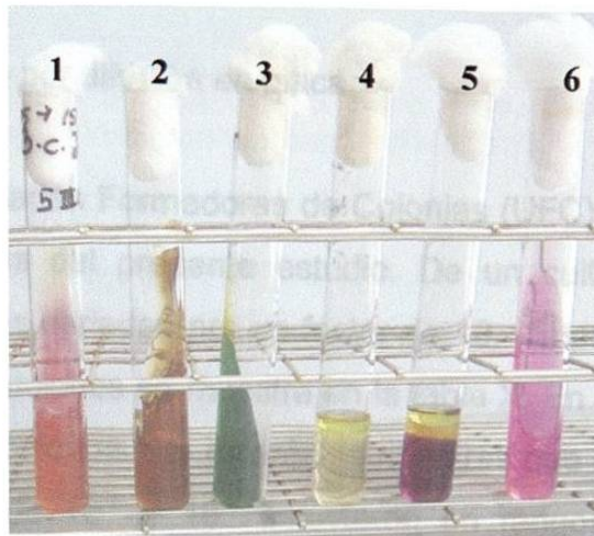


Figura 13. Reacciones bioquímicas de *Brucella*. En la fotografía se muestran las las reacciones bioquímicas de una de las cepas de *Brucella canis* aislada. El tubo N° 1 es el TSI, con ausencia de fermentación de carbohidratos. El tubo N° 2 corresponde al medio de LIA para la descarboxilación de la 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 H₂S, 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 ₂ S	LIA	CIT	U	I	MOT	MR-VP
C-1	Ak/I	-	-	-	-	-	-	-	+ ^r	-	-	-/-
C-2	Ak/I	-	-	-	-	-	-	-	+ ^r	-	-	-/-
C-3	Ak/I	-	-	-	-	-	-	-	+ ^r	-	-	-/-
C-4	Ak/I	-	-	-	-	-	-	-	+ ^r	-	-	-/-
C4t20	Ak/I	-	-	-	-	-	-	-	+ ^r	-	-	-/-
C-5	Ak/I	-	-	-	-	-	-	-	+ ^r	-	-	-/-

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

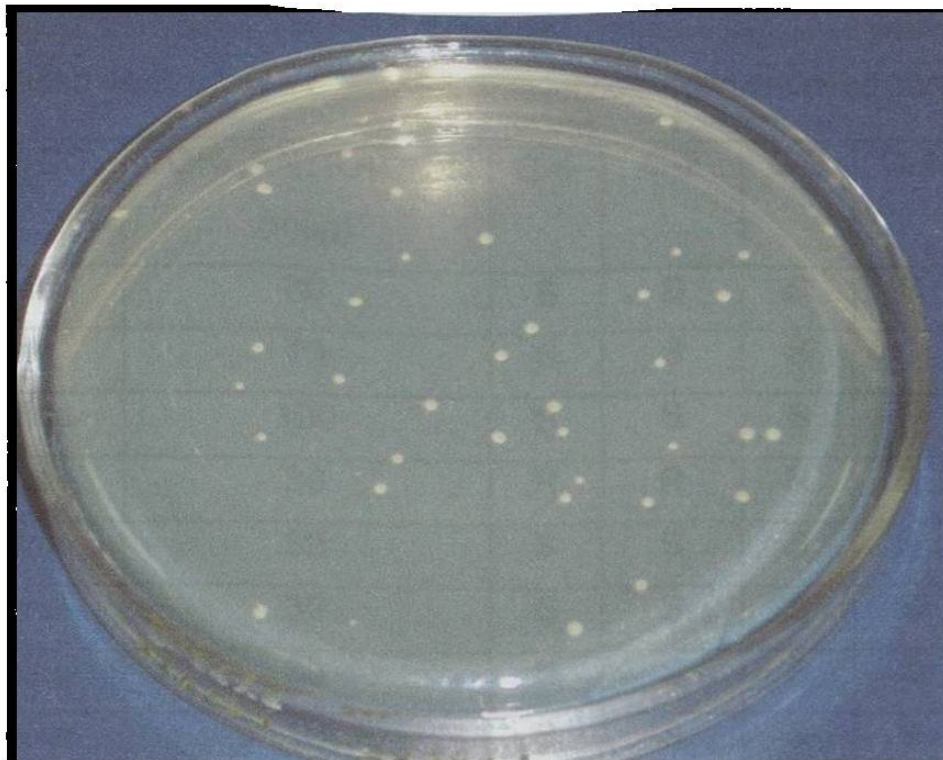


Figura 14. Cuenta viable en placa de *B. canis*. Se muestra las colonias que se desarrollaron en la cuenta viable en placa en la dilución 10^{-8} .

3.2.5 Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos

Después de incubar por 72 horas a 36°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.

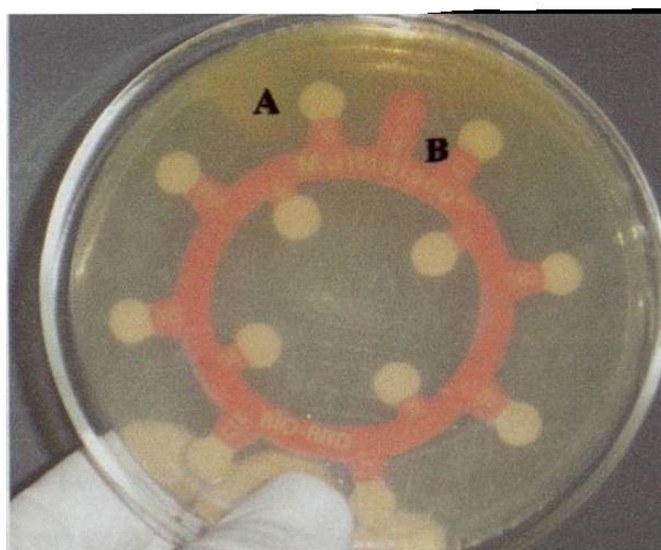


Figura 15. Patrón de susceptibilidad obtenido para una de cepas de *B. canis* (Cepa C-4) aislada a partir de un perro seropositivo. Se aprecia la inhibición, casi total, con excepción en los antibióticos Nitrofurantroina (A) y Cefalotina (B).

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^R III, Fort Dodge[®]) 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^{MR} 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 fenotípica 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).

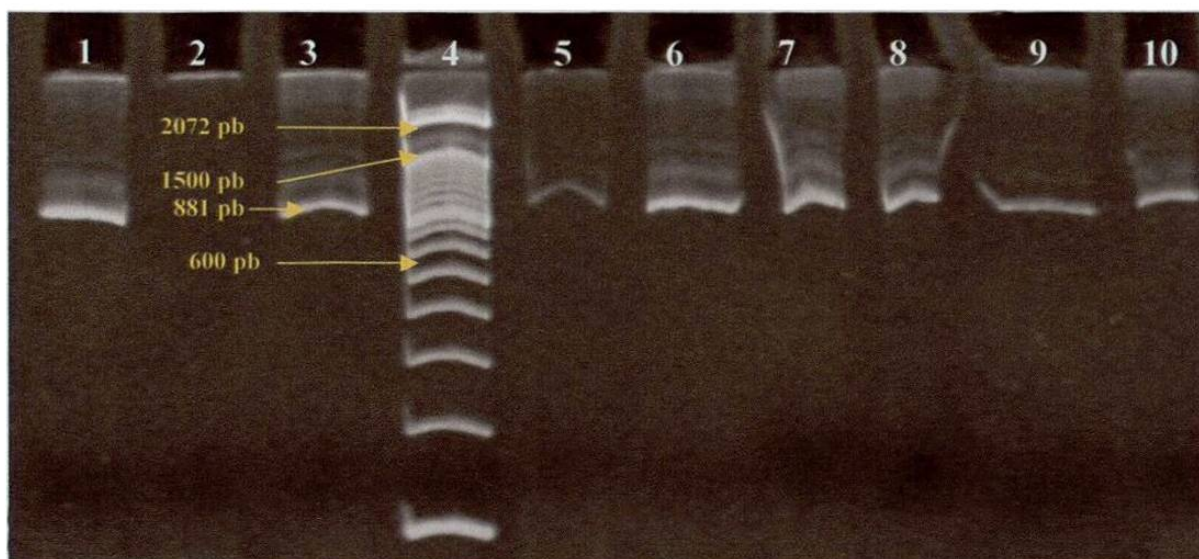


Figura 16. Amplificación del gen de la *omp 31* del género *Brucella*. Carril 1, producto de amplificación del control positivo, antígeno del estuche diagnóstico para *B. canis* (*B. ovis*) de Synbiotics, Co. Carril 2, producto de amplificación del control negativo, antígeno de la vacuna Brucel RB51[®] de *B. abortus* cepa RB51[®]. 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).