

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.

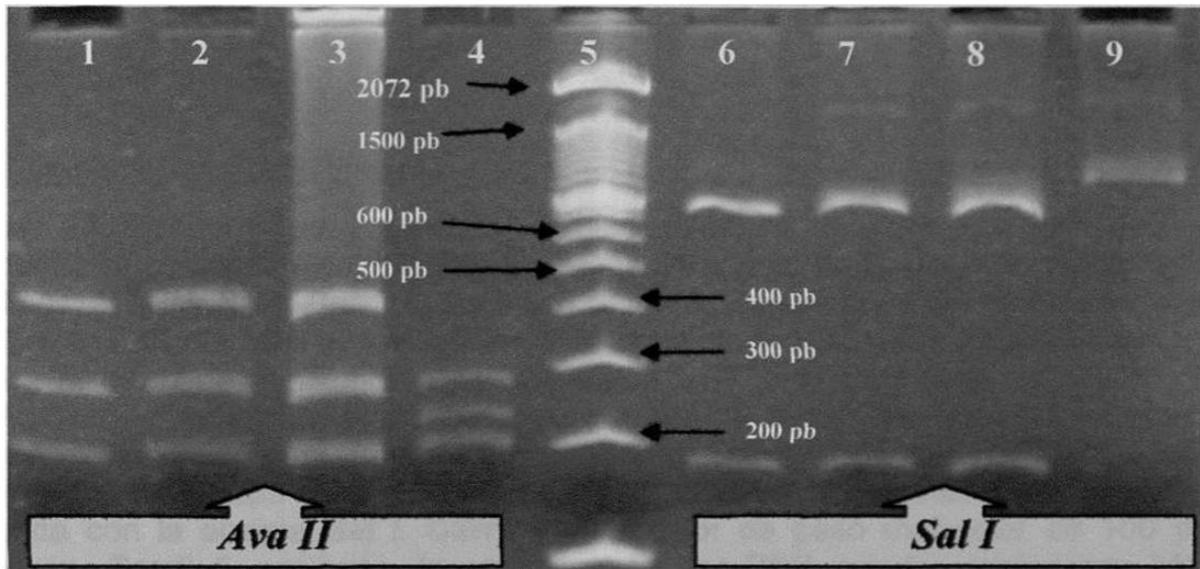


Figura 17. Resultados de los cortes de restricción con las enzimas *Ava II* y *Sal I* en productos de PCR de controles positivos y negativos y cepas de campo de *B. canis*. En el carril 1, es el producto de digestión con *Ava II* del ADNc del antígeno del estuche diagnóstico para detectar anticuerpos 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*.

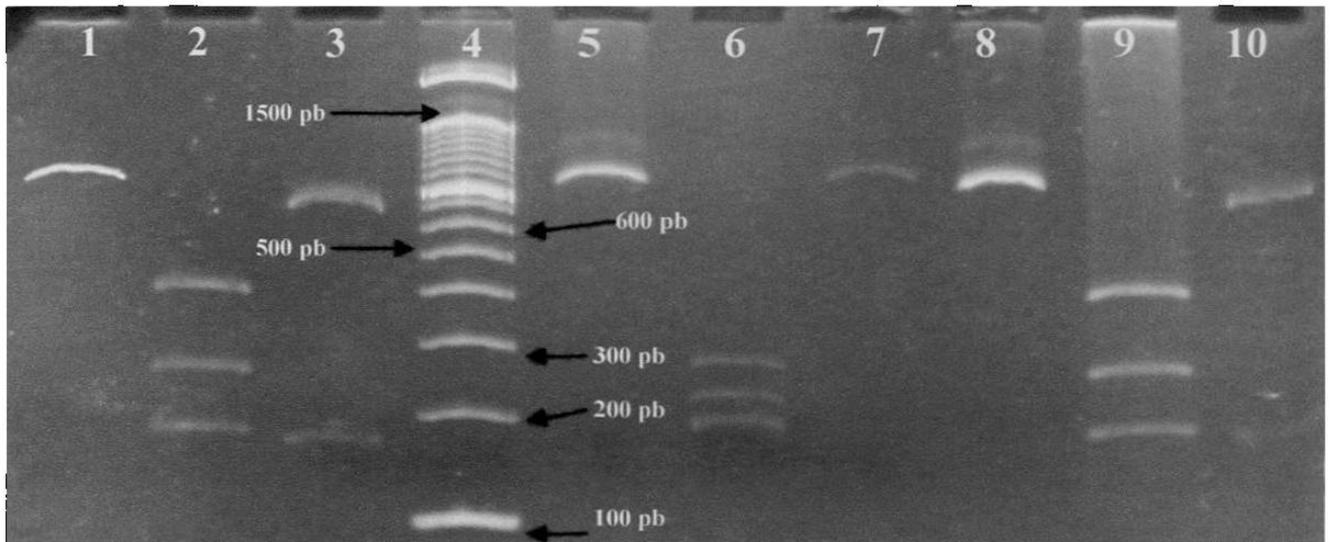


Figura 18. Electroforesis en geles de poliacrilamida 9% de productos de PCR y RFLP de controles positivos y negativos y de cepas de campo de *B. canis* digeridos con las enzimas *Ava II* y *Sal I*. **Carril 1**, producto de amplificación por PCR con los iniciadores 31SD y 31TER del ADN del antígeno del 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-t-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, esta 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^{MR} cepa RB51^{MR} 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*.

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^{MR} de *B. abortus* cepa RB51^{MR} 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.
- Bimboim, 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., Agüero, 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.

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 Microbiología. 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. 3^a. 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., Rodriguez-Mayo, M., Muñoz, JR. and Agulla, A.: 1997. Evaluation of three commercially available blood culture systems for cultivation and detection of *Brucella melitensis* . 37th 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, 1^a. 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.**

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.

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.

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.* 2nd 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., Cloeckert, 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 Cloeckert, 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.

APENDICE A

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^R: 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 Tripticasa

MERCK: Agar Citrato de Simons

Controles Biológicos positivos para PCR-RFLP

Cepas de *Brucella* spp.

SYNBIOTICS CORPÓRATION: Canine Brucellosis Antibody Test Kit.

LITON DE MEXICO PRONABIVE:

Brucel RB51^{MR} Plus, vacuna *Brucella abortus* cepa RB51^{MR} (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^R III *Bordetella bronchiseptica* vaccine, cultivo vivo avirulento

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

Lyme Vax^R *Borrelia burgdorferi* bacteria.

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)TM

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

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 (H₂O 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.

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 µl
		Temed	15.0 µl

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 Na₂HPO₄ y 2.613 g de KH₂PO₄ 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.

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.

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: Secretaría 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
trata a sus animales”***

Ghandi



