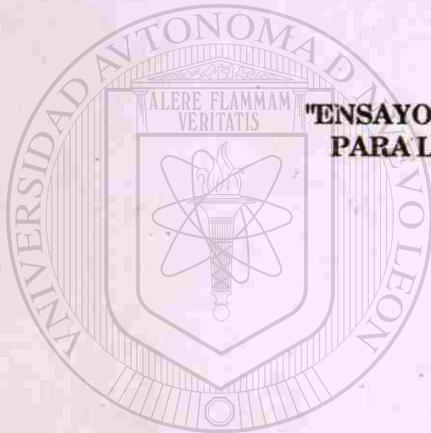


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**"ENSAYO CLINICO EN CAPRINOS INOCULADOS,
PARA LA DETECCION DE *Brucella melitensis*"**

TESIS

UANL

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

POR

Q.B.P. IRMA OLIVIA MARTINEZ VAZQUEZ

en Nicolás de los Garza, N. L., México

Diciembre de 1997

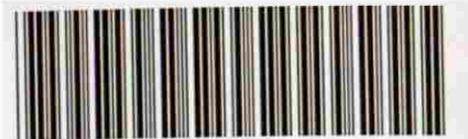
TM

SF96

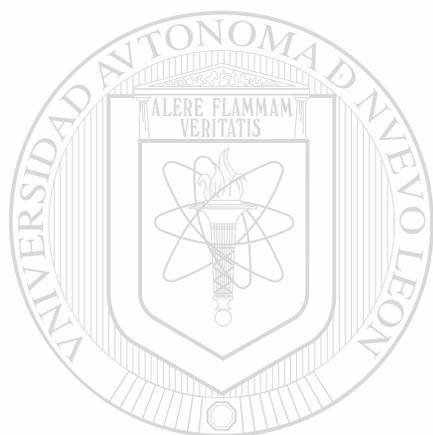
.B78

M3

C.1



1080080880



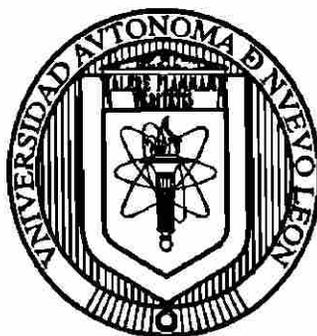
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**"ENSAYO CLINICO EN CAPRINOS INOCULADOS,
PARA LA DETECCION DE *Brucella melitensis*"**

TESIS

UANL

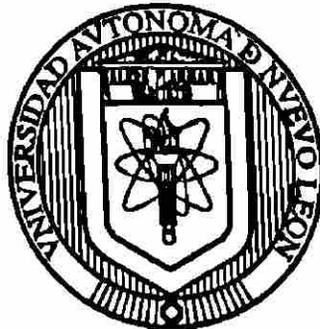
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

POR

Q.B.P. IRMA OLIVIA MARTINEZ VAZQUEZ

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**"ENSAYO CLINICO EN CAPRINOS INOCULADOS,
PARA LA DETECCION DE *Brucella melitensis*"**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

POR

Q.B.P. IRMA OLIVIA MARTINEZ VAZQUEZ

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

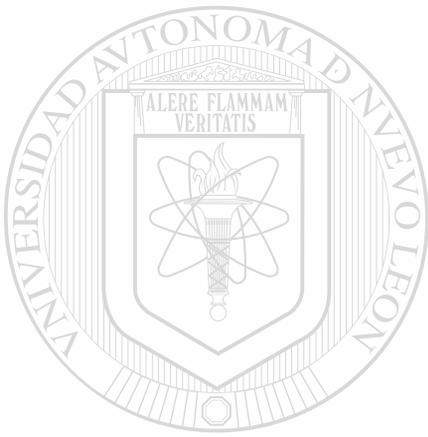
**Dra. Diana Sara Leal Klevezas
DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Juan Pablo Martínez Soriano
DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Luis Jesús Galán Wong
ASESOR INTERNO**

(Handwritten signatures and stamps)
APR 1997
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

TM
SF969
.B78
M3



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®



SECRETARÍA GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONTENIDO

	Página
INDICE	A
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	VII
RESUMEN	X
Capítulo 1.	
INTRODUCCION	1
1.1.- Hipótesis	4
1.2.- Objetivo general	5
1.3.- Objetivos específicos	5
<hr/>	
Capítulo 2.	
ANTECEDENTES	6
2.1.- Aspectos históricos de la brucelosis caprina.	6
2.2.- Origen y distribución geográfica de <i>Brucella</i> sp.	9
2.3.- Características generales del género <i>Brucella</i>	12
2.4.- Resistencia de <i>Brucella</i> a las condiciones ambientales.	13
2.5.- Características específicas de <i>Brucella melitensis</i>	14
2.6.- Modo de trasmisión y hospederos.	15
2.7.- Patogenia.	16
2.8.- Signos clínicos y lesiones.	18
2.9.- Prevención, control y erradicación.	20

2.10.- Métodos generales de diagnóstico en brucelosis caprina.	21
2.11.- Importancia médico veterinaria.	23
2.12.- Métodos experimentales de diagnóstico molecular en brucelosis caprina.	25
Capítulo 3.	
METODOLOGIA	30
3.1.- Marcadores de peso molecular.	30
3.2.- Testigos de especificidad.	30
3.2.1.-Extracción de DNA en testigos de especificidad.	31
3.2.2.-Reacción de PCR directa en testigos de especificidad.	32
3.2.3.-Electroforesis en gel de agarosa.	32
3.3.- Ensayo clínico.	33
3.3.1.-Selección de las hembras.	33
3.3.2.-Sincronización de estros y monta.	33
3.3.3.-Inoculación con la cepa de referencia.	34
3.3.4.- Forma de muestreo.	35
3.3.4.1.-Toma de muestras de sangre.	35
3.3.4.2.-Toma de muestras de exudados, secreciones y excretas.	35
3.3.4.2.1.- Exudado vaginal, nasal, ocular y saliva.	35
3.3.4.2.2.- Leche.	36
3.3.4.2.3.- Orina.	36
3.3.4.2.4.- Heces.	36
3.5.- Necropsias e histopatología.	36
3.6.- Extracción de DNA de las muestras.	38
3.6.1.- Sangre.	38
3.6.2.- Exudados extra e intracorporales y paquete leucocitario.	39
3.6.2.1.- Exudado vaginal, nasal, ocular, saliva y paquete leucocitario.	39
3.6.2.2.- Exudados intracorporales.	39
3.6.3.- Leche.	40
3.6.4.- Orina y heces	40
3.6.5.- Tejidos.	41
3.7.- Pruebas utilizadas para el diagnóstico de la brucelosis caprina.	41
3.7.1.- Serología con rosa de Bengala 3% y 8%.	41
3.7.2.- Hemocultivo.	42
3.7.3.- Cultivo de exudados, fluidos intracorporales, heces y orina.	43
3.7.4.- Cultivo microbiológico a partir de de leche.	43
3.7.5.- Aislamiento a partir de tejidos.	43

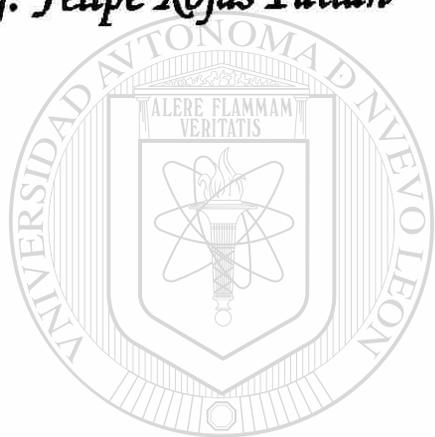
3.7.6.- Identificación de especie.	44
3.7.7.- Reacción de PCR.	44
3.7.8.- Reacción de PCR seminested.	44

Capítulo 4.

RESULTADOS Y DISCUSIONES	46
4.1.- Inducción y establecimiento de la enfermedad en animales.	46
4.2.- Análisis de sangre.	47
4.2.1.- Serología.	47
4.2.2.- Hemocultivo.	50
4.2.3.- PCR directa.	51
4.2.4.- PCR seminested.	52
4.3.- Análisis de exudado vaginal.	54
4.3.1.- Cultivo.	54
4.3.2.- PCR directa.	55
4.3.3.- PCR seminested.	57
4.4.- Análisis de leche.	58
4.4.1.- Cultivo.	58
4.4.2.- PCR directa.	59
4.5.- Análisis de tejidos y fluidos intracorporales.	61
4.5.1.- Cultivo y PCR directa.	61
4.6.- Histopatología.	62
CONCLUSIONES	65
CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS.	67
LITERATURA CITADA	68
FIGURAS Y TABLAS	78

DEDICATORIA

*A mi esposo
Ing. Felipe Rojas Patlán*



y
UANL

*A mi hijo
Felipe Rojas Martínez*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Irma Olivia Martínez Vázquez

AGRADECIMIENTOS

A las instituciones:

Escuela Preparatoria No. 2 de la UANL, por el apoyo y las facilidades otorgadas a lo largo de mi carrera.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca crédito otorgada.

Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, por las facilidades y apoyo para la realización de esta tesis.

Departamento de Microbiología e Inmunología y Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por el espacio otorgado para la realización del trabajo práctico de esta investigación.

Bioterio de la unidad "B" de la FCB de la UANL, por las facilidades proporcionadas para el mantenimiento de los animales en experimentación.

Laboratorio Central Regional de Monterrey del Comité de Fomento y Protección Pecuaria del estado de Nuevo León, por el apoyo y las facilidades otorgadas para la realización del trabajo microbiológico e histopatológico de esta investigación.

Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), por la identificación de cepas.

A las personas:

Dra. Diana Sara Leal Klevezas y al Dr. Juan Pablo Martínez Soriano por el apoyo, asesoría y dirección de esta investigación.

Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Dr. Reyes S. Tamez Guerra y Dr. Luis J. Galán Wong por la colaboración como miembros del comité de exámen.

Dr. Salvador Said Fernández, Dra. Teresa González-Garza y Barrón y M. C. Carlos Leal Garza, por el apoyo y facilidades prestadas.

Ing. Alfonso V. Rodríguez del Angel y Dr. Rogelio Gonzáles Castillo, por el apoyo, la consideración y las facilidades otorgadas para mis estudios.

Dr. Alberto Morales Loreda, M. C. Pola Becerril Montes y M. V. Z. Héctor Gerardo Lozano Garza, por el apoyo bibliográfico y sugerencias para este trabajo.

Ing. José Muraira Gutiérrez y M.V.Z. Fernando Marín Ricalde, por las facilidades prestadas.

M. V. Z. Armando Trejo Chávez, por el apoyo y asesoría en la histopatología.

Dr. Jesús García Cantú, por la donación de las cabras de experimentación.

M.V.Z. Francisco A. Ramírez Barrera, por el apoyo y asesoría en el manejo de las cabras.

Q.B.P. Irma Hernández Monroy por su colaboración en la identificación de cepas.

Dra. Ahidé López Merino, por la donación de cepas.

Dr. Antonio Luna de la Rosa y Biol. Alejandro Peña Rivera, por el apoyo y asesoría fotográfica.

A los compañeros del CIBIN-IMSS, Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular de la FCB-UANL y Laboratorio Central Regional de Monterrey, por su amistad.

Y a todos, los que de alguna manera colaboraron en la elaboración y culminación de este trabajo de investigación.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La presente investigación se realizó en:

Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS.

Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Laboratorio Central Regional de Monterrey del Comité de Fomento y Protección Pecuaria del estado de Nuevo León.

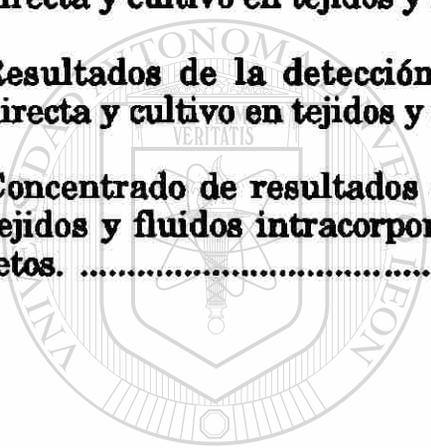
Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Página
1. Diagrama de flujo de la extracción de DNA a partir de diferentes muestras.	78
2. Diagrama de flujo de la reacción de PCR.	79
3. Diagrama de flujo general de la metodología empleada.	80
4. Representación esquemática de la PCR seminested.	82
5. Detección de anticuerpos contra <i>Brucella</i> en muestras de sangre de la cabra "A", utilizando el antígeno rosa de Bengala 3% y 8%.	81
6. Detección de anticuerpos contra <i>Brucella</i> en muestras de sangre de la cabra "B", utilizando el antígeno rosa de Bengala 3% y 8%.	81
7. Detección de <i>B. melitensis</i> en sangre de cabras.	82
8. Fragmentos derivados de la PCR directa utilizando iniciadores Bru 1 y Bru 3 en diversas muestras de cabras inoculadas.	83
9. PCR seminested en sangre y exudado vaginal de cabras inoculadas.	84
10. Detección de <i>B. melitensis</i> en exudado vaginal de cabras inoculadas.	85
11. Detección de <i>B. melitensis</i> en leche de cabras inoculadas.	85
12. Cortes histológicos de tejido infectado con <i>B. melitensis</i>	86

LISTA DE TABLAS

Tabla No.	Página
1. Porcentaje de muestras positivas por PCR directa y cultivo.	87
2. Resultados de la detección de <i>B. melitensis</i> con PCR directa y cultivo en tejidos y fluidos del feto hembra.....	87
3. Resultados de la detección de <i>B. melitensis</i> con PCR directa y cultivo en tejidos y fluidos del feto macho.	87
4. Resultados de la detección de <i>B. melitensis</i> con PCR directa y cultivo en tejidos y fluidos de la cabra "A".	88
5. Resultados de la detección de <i>B. melitensis</i> con PCR directa y cultivo en tejidos y fluidos de la cabra "B"	88
6. Concentrado de resultados de PCR directa y cultivo en tejidos y fluidos intracorporales de cabras inoculadas y fetos.	89



U A N L

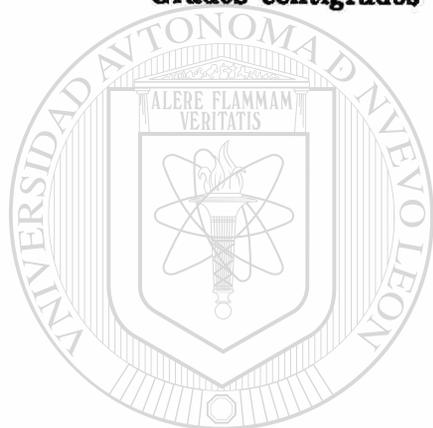
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Alu I	Enzima de restricción que reconoce la secuencia 5'-AG [↓] CT-3'
Anti-A	Anticuerpo monoespecífico contra el determinante antigénico A de la cadena O del LPS de <i>Brucella</i> spp
Anti-M	Anticuerpo monoespecífico contra el determinante antigénico M de la cadena O del LPS de <i>Brucella</i> spp
B.	<i>Brucella</i>
Bru 1	Iniciador derecho específico para detectar <i>Brucella</i> por PCR
Bru 3	Iniciador reverso específico para detectar <i>Brucella</i> por PCR
Bru 4	Iniciador reverso específico para detectar <i>Brucella</i> por PCR
bv.	Biovariedad
CIBIN	Centro de Investigación Biomédica del Noreste
cm	Centímetros
cols.	Colaboradores
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Cs	Fracción Cs del complemento
c/Acg	Muestra de sangre con anticoagulante
c/u	Cada uno(a)
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleótidos
Dr.	Doctor
Dra.	Doctora
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
D.F.	Distrito federal
ELISA	Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima
ENCB	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Ex. vag.	Exudado (s) vaginal (es)
FC	Fijación de complemento
g	Gramos
GIBCO	Grand Island Biological Company
h	Horas
HE	Tinción de hematoxilina-eosina
Hinf I	Enzima de restricción que reconoce la secuencia 5'-G [↓] ANTC-3'
IgG1	Inmunoglobulina G 1
IgG2	Inmunoglobulina G 2
IgM	Inmunoglobulina M
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
Iniciador	Oligonucleótido sintético
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias
IPN	Instituto Politécnico Nacional
kDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramos
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MC	Maestro (a) en Ciencias
M16	<i>Brucella melitensis</i> cepa de campo

mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MPA	Medroxyprogesteron
Nested PCR	Reamplificación de fragmentos de PCR con iniciadores internos
No.	Número
ng	Nanogramos
OMP	Proteína de membrana externa
omp	Gen que codifica para la proteína de membrana externa
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pBR322	Plásmido de Bolívar y Rodríguez No. 322
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	Picogramos
PGE _{2a}	Dinoprostrometamina
pH	Potencial de hidrógeno
PMN	Leucocito (s) polimorfonuclear (es)
pmol	Picomoles
"R"	Cepas rugosas de <i>Brucella</i> spp.
RB	Antígeno brucelar rosa de Bengala
RB3%	Antígeno brucelar rosa de Bengala al 3%
RB8%	Antígeno brucelar rosa de Bengala al 8%
RB51	<i>Brucella abortus</i> cepa mutante rugosa
Rev 1	<i>Brucella melitensis</i> cepa vacunal
RNA	Acido ribonucleico
RNAr	Acido ribonucleico ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
"S"	Cepas lisas de <i>Brucella</i> spp.
SAGAR	Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural
SAT	Prueba de la seroaglutinación en tubo
s/Acg	Muestra de sangre sin anticoagulante
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	segundos
S19	<i>Brucella abortus</i> cepa vacunal
SIM	Pruebas bioquímicas de movilidad, indol, ácido sulfhídrico
sp.	Especie
spp.	Especies
SSA	Secretaría de Salubridad y Asistencia
Taq	Enzima polimerasa de DNA proveniente de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Solución amortiguadora de tris-borato-EDTA
TE	Solución amortiguadora de tris-EDTA
TSI	Tres azúcares y hierro
U	Unidad (es)
UV	Ultra violeta
V	Voltios

mg	Microgramos
µl	Microlitros
-	Muestra negativa
"a"	Día del aborto en la cabra "A"
"p"	Día del parto en la cabra "B"
\$	Pesos
%	Por ciento (medida de cantidad)
+	Muestra positiva
3'	Carbón 3 de la desoxirribosa
5'	Carbón 5 de la desoxirribosa
CO₂	Dióxido de Carbono
HCl	Acido clorhídrico
H₂S	Acido sulfhídrico
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
NaCl	Cloruro de sodio
O₂	Oxígeno
∅	Centrifugar
°C	Grados centígrados



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

La brucelosis caprina es una zoonosis distribuida mundialmente, causa generalmente orquitis en machos y abortos en hembras, afecciones en las que se liberan cantidades importantes de bacterias lo que favorece su transmisión a otros animales de la misma o diferente especie, incluyendo al hombre. Para controlar y prevenir la propagación, se requieren pruebas lo suficientemente sensibles y específicas que permitan la detección temprana y la remoción de los animales portadores del patógeno. Ante la necesidad de implementar estas pruebas diagnósticas, se planteó un ensayo clínico que involucró cuatro técnicas (dos en experimentación y dos oficiales), se compararon entre si para detectar la presencia de *Brucella melitensis* durante las primeras etapas de la infección en fluidos, secreciones y exudados de caprinos inoculados experimentalmente. Se utilizaron las pruebas de a).- rosa de Bengala (RB) al 3 y 8%, b).- cultivo, y c).- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con dos modificaciones: PCR directa y PCR seminested. Se tomaron muestras de sangre, leche, saliva, heces, orina, exudados ocular, nasal, y vaginal en diferentes tiempos, por un periodo de ocho meses postinoculación, a dos cabras gestantes (cabras "A" y "B") inoculadas con *B. melitensis*. La prueba de PCR seminested detectó la bacteria en la sangre de los dos animales a los cuatro días postinoculación, mientras que la PCR directa a los 13 días. El RB al 3% fue positivo a los 12 días postinoculación en el animal "A" y a los 16 en el "B". El RB al 8% detectó anticuerpos contra *Brucella* a los 18 días postinoculación en ambos animales. En cinco de 80 hemocultivos se aisló *B. melitensis* que correspondieron a muestras tomadas en fechas cercanas al aborto o parto de los animales. En exudado vaginal se detectó la bacteria por PCR seminested a los 20 días postinoculación en la cabra "A" y a los 22 en la "B", mientras que por PCR directa a los 22 y 29 días respectivamente. En leche, la prueba de PCR directa detectó al microorganismo continuamente durante el periodo de lactancia en ambos animales y por cultivo se aisló la bacteria en fechas discontinuas en el animal "B". En el 94% de los tejidos y fluidos analizados se detectó la bacteria por PCR directa, en cambio por cultivo sólo se logró el aislamiento en el 37% de las muestras. Del total de muestras analizadas, coágulo de cavidad cardíaca fue siempre positiva por PCR directa y cultivo. Se concluye que la prueba de PCR seminested logró detectar la bacteria en la sangre de los animales antes que la PCR directa y RB al 3 y 8%. Una vez que la PCR directa y PCR seminested de sangre resultaron positivas, continuaron detectando la bacteria en forma continua, contrastando con la inconsistencia de las reacciones de aglutinación. Este ensayo clínico mostró la utilidad de las pruebas moleculares para la detección de la bacteria en etapas iniciales de una infección y además permitió identificar los fluidos y tejidos ideales para estudios futuros.

Capítulo 1

INTRODUCCION

La brucelosis caprina, es una zoonosis que constituye hoy en día uno de los problemas sanitarios mas importantes en diversas regiones del mundo (23, 60, 74). Esta enfermedad es causada principalmente por *Brucella melitensis*, aunque también *B. abortus* se ha encontrado que ocasiona infecciones en caprinos (3, 20, 65, 67, 74). Las brucelas son cocobacilos cortos (0.6-1.5 mm por 0.5-0.8 mm), gram negativos, anaerobios facultativos, inmóviles, no capsulados ni esporulados, que forman, cadenas cortas ó se encuentran aislados. Son parásitos intracelulares con capacidad de invadir los tejidos y muestran preferencia por los órganos reproductores, articulaciones, huesos y el sistema reticuloendotelial con una fuerte tendencia a establecer procesos crónicos (70, 108).

Desde el punto de vista epidemiológico se le considera como una zoonosis, pues se transmite entre especies susceptibles silvestres ó domésticas y de éstas al hombre. Las infecciones en los animales, generalmente ocasionan abortos en las hembras y orquitis en los machos, que liberan al ambiente importantes cantidades de bacterias, favoreciendo con ésto la transmisión de la enfermedad inter e intra-especies (60). El patógeno puede ser aislado a partir de carnes contaminadas y productos lácteos sin pasteurizar provenientes de animales infectados, así como de muestras clínicas, productos abortados o membranas fetales (16, 60, 72).

En el sector pecuario, la brucelosis es una enfermedad de gran impacto, ya que ocasiona hasta un 65% de abortos en vacas, cerdos, ovejas y cabras, causa una disminución en la producción de carne y leche y dificulta la comercialización del

ganado, su mejoramiento genético e incrementa los costos de operación de hatos completos (10, 53).

En nuestro país, la brucelosis está distribuida en todas las entidades federativas, siendo más frecuente en Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Guanajuato, Jalisco y Michoacán (60). Para 1994 Zavala-Trujillo (107 265) reportó que la incidencia de brucelosis en cabras en México, fué entre el 15 y 40%, este mismo autor reportó una morbilidad en la población mexicana que oscilaba en un radio de 2.8 por 100,000 habitantes, encontrándose la incidencia más alta entre los 25 y 44 años de edad. Para 1996 la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA) publica la tasa más alta de morbilidad en humanos para los estados de Guanajuato y Sonora y coincide también con los datos de Zavala-Trujillo respecto al grupo de edad más afectado (25).

Aunque se han identificado todos los elementos necesarios para el control y erradicación de la brucelosis tanto en humanos como en animales, una de las principales limitantes para su aplicación es la dificultad para lograr un diagnóstico confiable y oportuno. Los métodos actuales para el diagnóstico, como son el cultivo y la serología, aún tienen limitantes para lograr un diagnóstico seguro y adecuado (46). El hemocultivo, además de representar un riesgo de contaminación para la persona que lo realiza, se requiere de un periodo de incubación largo para la multiplicación y aislamiento de la bacteria, lo que lo hace tardado y poco exitoso. La presencia de *Brucella* puede detectarse sólo después de 13.6 días y su sensibilidad se ha estimado ser de tan sólo el 70% (41, 63). Los métodos serológicos, que son rápidos y relativamente fáciles de realizar, tienen la desventaja de poseer una sensibilidad limitada y poca especificidad, además de que no siempre permiten detectar infecciones tempranas o latentes ni distinguir los animales enfermos de los vacunados o recuperados (12, 28, 54, 71, 80).

Como se puede apreciar, en lo que respecta al diagnóstico de la brucelosis animal y en particular, la caprina, es muy importante contar ya con tecnología diagnóstica de vanguardia que aporte soluciones a corto plazo y contribuya con esto al control y erradicación de esta zoonosis, que por un lado limita la producción y comercialización de productos pecuarios y por otro afecta directamente la población rural, urbana y profesional.

A partir de los 90's, se han utilizado las herramientas de la Biología Molecular en el campo de la Microbiología. Técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y modificaciones de ésta (PCR seminested), permiten amplificar fragmentos específicos de DNA de un microorganismo, aún cuando el número de copias de la secuencia buscada sea muy pequeño y esté mezclado con otros genomas (6, 15, 81, 94).

En el caso particular del género *Brucella*, varios grupos de investigación han desarrollado protocolos para amplificar mediante PCR directa, secuencias de DNA de cepas de referencia con la finalidad de establecer métodos de diagnóstico rápido (13, 14, 33-35, 45, 55, 87), sin embargo existen sólo tres referencias sobre su aplicación directa en muestras de campo. (57, 64, 88).

A partir de 1993 en nuestro país, se ha utilizado la técnica de PCR directa para el diagnóstico rápido de brucelosis al emplear muestras de diverso origen. Se ha reportado la detección de *B. abortus* en sangre de bovinos lecheros (64) y *B. melitensis* en sangre y leche de caprinos, encontrándose una sensibilidad y especificidad absoluta mucho mayores que las pruebas serológicas (56, 57, 65). También se ha empleado la prueba de PCR seminested para detectar la presencia de *Brucella* en muestras de sangre de humanos (58).

Al ver que tanto PCR directa como PCR seminested son pruebas moleculares versátiles que están teniendo impacto en la detección de agentes infecciosos, y apoyándonos en los trabajos antes mencionados (56, 57, 58, 64, 65), donde se detectan específicamente las diferentes especies y biovariedades del género *Brucella*, se planteó este ensayo clínico para determinar la capacidad diagnóstica de las técnicas de PCR directa, PCR seminested, serología y cultivo para la detección temprana de la brucelosis caprina, a partir de fluidos, secreciones, exudados y tejidos de animales inoculados con *B. melitensis* exprofeso.

De esta manera, se pretende determinar en que tipos de muestras y qué técnica o técnicas permiten la detección de *Brucella* spp. en forma rápida y específica en la etapa inicial de la infección. Esta detección temprana puede ser útil para identificar animales infectados, los que deberán ser eliminados y así evitar la diseminación del padecimiento.

Por todo lo anteriormente descrito, se propone la siguiente hipótesis y objetivos.

1.1.- Hipotesis.

En un ensayo clínico y mediante pruebas moleculares, es posible detectar en las etapas iniciales y avanzadas de la infección, la presencia de *Brucella melitensis* en fluidos, secreciones y exudados de animales infectados con este patógeno.

1.2.- Objetivo general.

Detectar *Brucella melitensis* en fluidos, secreciones y exudados de caprinos inoculados, en etapas iniciales y avanzadas de la infección.

1.3.- Objetivos específicos.

1.3.1.- Provocar brucelosis en hembras de caprinos gestantes, mediante la inoculación de *B. melitensis*.

1.3.2.- Determinar comparativamente en que etapa postinfección es detectada *B. melitensis* por medio de PCR directa, PCR seminested, serología y cultivo.

1.3.3.- Determinar la distribución de *B. melitensis* en fluidos, secreciones y exudados, mediante las pruebas moleculares aquí propuestas y compararlas con los resultados microbiológicos.

1.3.4.- Determinar los sitios de diseminación de la bacteria, (una vez establecida la infección) en órganos y fluidos intracorporales, usando PCR directa, cultivo y observaciones de cortes histológicos.

1.3.5.- Implementar metodologías rápidas y simplificadas de extracción de DNA para el diagnóstico de *Brucella* spp. en muestras de campo.

Capítulo 2

ANTECEDENTES

2.1.- Aspectos históricos de la brucelosis caprina.

Pacheco y Thiago de Mello, 1956 (79) citados por Crespo (23), mencionan que durante la segunda mitad del siglo XIX, se iniciaron los esfuerzos para diferenciar y aislar el agente etiológico de una enfermedad que afectaba a los habitantes de la isla de Malta, situada en la zona del Mediterráneo. Se trataba de un proceso patológico febril, de difícil delimitación clínica, cuya sintomatología habitualmente se confundía con la de las fiebres tíficas y paratíficas, con consecuencias de incapacidad y muerte.

Marston, médico de la marina inglesa estacionada en la isla de Malta, fue el primero en caracterizar en 1860 esta enfermedad, diferenciándola claramente de otros procesos febriles y la llamó "fiebre intermitente gástrica del Mediterráneo". La etiología totalmente desconocida para entonces, se atribuía a diversas causas y la sinonimia del padecimiento estaba relacionada con su sintomatología o su toponimia, de ahí que tuviera una gama de denominaciones muy amplia como por ejemplo: "Fiebre de Malta", "fiebre remitente", "fiebre tifomalarial", "fiebre Mediterránea", "fiebre de las rocas", "fiebre de Gibraltar" y "fiebre ondulante", entre otras (61).

Para finales del siglo pasado, las tropas británicas destacadas en la isla de Malta necesitaban la presencia de médicos que atendieran a los soldados afectados por la mencionada enfermedad, que producía incapacidad y muerte. Para solucionar el problema, llegó un médico de la armada británica llamado David Bruce, quien comenzó a realizar investigaciones al respecto y para 1887 consiguió aislar el microorganismo del bazo de cuatro soldados fallecidos a consecuencia de la

denominada "fiebre de Malta" y lo llamó *Micrococcus melitensis*, advirtiendo que podría ser la causa de la "fiebre de Malta", Spink, 1956 (101) citado por Crespo (23). Aquel mismo año (1887), Huges confirmó los estudios de Bruce mediante la realización de nuevos aislamientos del mismo microorganismo (61).

Diez años más tarde (1897), Wright introdujo la prueba de la seroaglutinación en tubo (SAT) al diagnóstico de la septicemia causada por *M. melitensis*, que a la fecha sigue utilizándose con algunas modificaciones (61). Los estudios de este investigador, conjuntamente con los de Bruce y Huges, dejaron perfectamente establecida la etiología de lo que hoy conocemos como "brucelosis".

Para 1904 nada se sabía aún sobre la epidemiología de *M. melitensis* y tanto los habitantes como los soldados ingleses destinados en la isla de Malta seguían muriendo. Con la finalidad de solucionar el problema el gobierno Inglés creó "La Comisión de la Fiebre del Mediterráneo" integrada por David Bruce, T. Zammit, H. Kennedy, J. C. Weir, J. G. Mc.Culloch y E. M. A. Clayton. Spink 1956 (101), citado por Crespo (23).

El 14 de junio de 1905, el médico T. Zammit efectuó inoculaciones experimentales de *M. melitensis* en cabras Maltesas. Como medida científica previa a la inoculación, realizó pruebas de seroaglutinación (SAT) a los sueros de los animales seleccionados y cinco de las seis cabras dieron una fuerte reacción serológica positiva, además de que se logró aislar el microorganismo de una de ellas. Después se estableció la eliminación del microorganismo en leche y se demostró con esto, el mecanismo de transmisión al hombre y en consecuencia su carácter zoonótico (61). Estos importantes descubrimientos abrieron las puertas a numerosas investigaciones epidemiológicas y para 1906 en la isla de Malta se decreta la prohibición absoluta del

consumo de leche y sus derivados en establecimientos gubernamentales, lo que produjo una baja considerable en el número de casos de la enfermedad entre las tropas ahí destacadas, pero no en la población civil. Ninguna otra prueba podía ser más convincente de que la enfermedad era contraída por la ingestión de lácteos obtenidos de animales enfermos, Spink, 1956 (101) citado por Crespo (23).

A finales del siglo XIX surgieron nuevos descubrimientos bacteriológicos relacionados con la brucelosis. Así en 1897, B. Bang y V. Stribolt, identificaron a un organismo que inducía abortos en vacas y lo denominaron *Bacillus abortus*. Al trastorno se le conoció como "enfermedad de Bang" y nunca se le relacionó con la fiebre de Malta, debido a que la morfología descrita para esta bacteria era diferente que la reportada para *Micrococcus melitensis* (61).

En 1914, Traum aisló una nueva especie de *Brucella* a partir de fetos de porcinos y lo denominó *American melitensis*. El microorganismo se parecía morfológicamente a *Bacillus abortus*, aunque difería en algunas características bacteriológicas, actualmente es conocida como *Brucella suis* (61).

Alice Evans en 1918 confirmó experimentalmente las estrechas relaciones taxonómicas entre *Bacillus abortus* y *Micrococcus melitensis*, consideró para ello características bacteriológicas, serológicas y aspectos epidemiológicos. También logró aislar e identificar *Bacillus abortus* a partir de leche de vacas y la nombró *Bacteraceae abortus*. Esta autora propuso un nuevo nombre para la "fiebre de Malta" y la llamó "Brucelosis" en honor de David Bruce. Teniendo en consideración todos estos antecedentes, Meyer y Show en 1920 propusieron a la "Sociedad Interamericana de Microbiología", la creación de un nuevo género bacteriano, al que denominaron

Brucella, y que incluía las dos especies caracterizadas por Alice Evans, integrándose posteriormente *B. suis* (61)

A partir de la década de los 50's se fueron integrando a este género bacteriano nuevas especies. Así en 1953, Buddle y Boyes en Australia, a la vez que Simmons y Hall en Nueva Zelanda, identificaron otro miembro del género *Brucella* a partir de un proceso patológico conocido como epididimitis contagiosa del carnero y lo llamaron *Brucella ovis*. Por otra parte Stoenner y Lackman en 1957, aislaron la quinta especie a partir de la rata del desierto (*Neotoma lepidae*), a la que denominaron *Brucella neotomae*. Finalmente, en 1966, Charmichael y Bruner describieron la última especie de éste género hasta hoy conocida, reportándola como el agente causal de un brote de abortos en cánidos y la denominaron *Brucella canis* (23, 61).

2.2.- Origen y distribución geográfica de *Brucella* spp.

Son muy diversas las teorías acerca de la epidemiología de la brucelosis, puesto que la mayor parte de las especies están presentes en mayor o menor grado en los cinco continentes. Para la mayoría de los especialistas, El mediterráneo constituye, sin lugar a dudas el punto de origen de la enfermedad, a partir del cual se fue extendiendo por todo el mundo. Se cree que la aparición de numerosos casos del padecimiento en el hombre, en múltiples regiones del continente europeo como España, se debió a la importación de cabras Maltesas, ya que no existía en este país una legislación que prohibiera la importación de estos animales ni laboratorios que confirmaran la enfermedad. Sans Egaña, 1942 (98) citado por Crespo (23).

Sotillo y Serrano, 1985 (100), comentan que la raza caprina existente en la isla de Malta (raza Maltesa) es autóctona, de aptitud lechera y probablemente descienda

de la raza del cercano oriente y Africa. Debido al prestigio como productora de leche, el macho cabrío de esta raza era tradicionalmente solicitado en todo el mediterráneo con la finalidad de mejorar la producción láctea de otras razas. Así, su área de distribución se extendió por todo el Mediterráneo e inclusive a otros países de continentes diferentes.

Comenta Sáins Moreno, 1987 (96), citado por Crespo (23), que en el año de 1814 en España, se describió una enfermedad con la sintomatología clásica de la brucelosis en Cartagena, otros médicos observaron también varios casos clínicos similares en distintos lugares de España. Comenta este mismo autor (96), que uno de los pioneros que estudió la enfermedad a profundidad fue Durán Cortés y para 1906 publicó los primeros aislamientos de *Micrococcus melitensis*. En Francia, la enfermedad fue reportada por primera vez en el año de 1908, en la ciudad de París, en cabras enfermas procedentes de Mauritania que contagiaron a sus propietarios. Para 1910 en el departamento de Gard, Francia, se realizaron investigaciones epidemiológicas a consecuencia de numerosos abortos en cabras. En este país se creía que la brucelosis se limitaba solo a ciertos lugares y a humanos, además de detectar la enfermedad en las cabras, también se localizó en carneros, perros y caballos.

En el continente americano, no se ha podido precisar dónde apareció la enfermedad por primera vez, pero varios autores como García Carrillo, 1990 (39), estiman que su introducción se remonta a la época de la conquista española, cuando llegaron animales domésticos procedentes de España y otros países europeos. Se desconoce también cómo se introdujo la enfermedad en Estados Unidos de Norteamérica, y mientras algunos autores la atribuyen a la importación de cabras procedentes de Asia Menor en 1867, otros estiman que se debió al ingreso de cabras españolas y Maltesas que llegaron de Sudamérica. Sin embargo, ya se habían

reportado cuadros de brucelosis en abortos bovinos en los estados de Mississippi y Louisiana. El primer caso humano diagnosticado en los Estados Unidos, tuvo lugar en 1906. Le siguieron después varios reportes de casos de militares estadounidenses procedentes de Cuba, Filipinas y Puerto Rico, de los cuales se aisló *Micrococcus melitensis* (40).

En la actualidad la brucelosis tiene presencia en América Latina, donde destacan México, Perú, Brasil, Panamá, Colombia Venezuela, Uruguay y el norte de Argentina (39, 105). En México, Ruiz Castañeda, 1986 (90), menciona que la brucelosis se introdujo por la importación de cabras españolas de raza "Murciana" que se trajeron con la intención de mejorar la producción láctea de las ya existentes. De acuerdo a Díaz-Aparicio (27), los primeros indicios de la presencia de la brucelosis en cabras en México, datan del año de 1917 en los estados de Guanajuato y San Luis Potosí. Actualmente esta enfermedad se encuentra distribuida en todas las entidades federativas de nuestro país siendo más frecuente en los estados de Chihuahua, Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas, Zacatecas, San Luis Potosí, Querétaro, Guanajuato y Michoacán (60), que son áreas que comparten climas semiáridos muy similares, con hábitos de agricultura también parecidos (39, 61).

Aunque la existencia de numerosos abortos en el ganado produce notables pérdidas económicas, en el pasado éstos eran atribuidos a la ingestión de algunas hierbas, sin embargo actualmente sabemos con certeza que entre la variada etiología infecciosa del aborto, un alto porcentaje de estos es causado por *Brucella* spp. Es evidente la importante influencia que los factores sociales, económicos, zootécnicos, comerciales y epidemiológicos, han podido tener en la difusión de esta enfermedad a lo largo de su historia, tanto en los países del área mediterránea como en el resto de los países del mundo. Todos estos antecedentes, permiten asegurar que *B. melitensis* se

encontraba distribuída mundialmente, con anterioridad a su descubrimiento en Malta (61).

2.3.- Características generales del género *Brucella*.

Son cocobacilos cortos (0.6-1.5µm por 0.5-0.8µm), aeróbicos, gram negativos, inmóviles, sin cápsula ni esporas y dispuestos en pares, cadenas cortas ó aislados. Poseen metabolismo de tipo respiratorio y utilizan el oxígeno o los nitratos como aceptores finales de electrones. Su sistema de transporte de electrones está basado en la presencia de citocromos con oxígeno (O₂) o nitratos como aceptores finales de electrones (42, 49, 69, 108). Estas bacterias son parásitos intracelulares facultativos y tienen la capacidad de invadir los tejidos animales. Se conocen seis especies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, y *B. neotomae* que se diferencian en base a pruebas fisiológicas y según la especie animal a la que afectan. En base a la cantidad de lipopolisacárido (LPS) presente en su membrana externa, estas seis especies se clasifican además en lisas ("S") y rugosas ("R"). Por medio de tipificación se puede establecer un rango intraespecífico, es decir, la biovariedad dentro de cada una de las especies. En *B. melitensis* se han descrito tres biotipos o biovariedades (bv), en *B. abortus* siete y *B. suis* cinco, mientras que para *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae* se considera un solo biotipo en cada uno (18, 21, 69).

Cada especie posee características fenotípicas diferenciales que permiten distinguirlas entre si. La mayoría son oxidasa y catalasa positivas (excepto *B. ovis* y *B. canis*), no producen indol, ni licuan la gelatina, son capaces de hidrolizar la urea y reducir los nitratos, pueden utilizar el citrato como única fuente de carbono y son rojo de metilo negativas. *B. ovis* y algunos biotipos de *B. abortus* requieren dióxido de carbono (CO₂) para crecer. Dentro de cada especie se pueden diferenciar biovariedades

por sus características bioquímicas, requerimientos de CO₂, crecimiento en presencia de colorantes y ciertos antibióticos, metabolismo oxidativo de sustratos, reacciones de aglutinación con sueros monoespecíficos y susceptibilidad a lisis con fagos (42, 74, 105).

En el primer aislamiento, la mayoría de las cepas de *Brucella* son de crecimiento lento, y las colonias comienzan a ser visibles a partir de las 48-72 h de incubación, aunque Roux y Arnaud, 1975 (89), por cultivo de células determinaron el tiempo de duplicación del microorganismo, y encontraron que fue de 12 h. Algunas cepas requieren factores de crecimiento como tiamina, niacina y biotina, otras necesitan la adición de suero al medio de cultivo. Cabe mencionar que el pantotenato de calcio y el meso-eritritol estimulan el crecimiento de estas bacterias. Las brucelas son aerobias y no hemolíticas, requieren una temperatura de 20 a 40 °C con un óptimo de 37 °C en medios con pH de 6.6 a 7.4. Cuando crecen sobre agar, las colonias alcanzan los 2 o 3 mm de diámetro después de tres días. Estas colonias son translúcidas, de color ámbar, redondas, convexas con la superficie brillante y lisa, exhiben un característico color azul cuando son iluminadas con luz incidiendo en un ángulo de 45° (2, 8).

2.4.- Resistencia de *Brucella* a las condiciones ambientales.

Según Corbel (20), este microorganismo se cultiva fácilmente "*in vitro*", pero fuera de los animales que actúan como sus reservorios, es incapaz de sobrevivir por largos períodos de tiempo. Para Nicoletti (74) también la viabilidad de *Brucella* en el medio exterior es poco duradera, sobre todo en medios acuosos. Se estima un tiempo de sobrevivencia de seis meses en polvo, 10 en agua o suelo y hasta siete meses en exudados uterinos infectados en estado de congelación. En el suelo y a bajas

temperaturas puede sobrevivir hasta por 10 semanas y en estiércol líquido por dos y medio años (20, 61). En leche sin pasteurizar y sin fermentar pueden sobrevivir por algunas horas si se mantienen a temperaturas de 8 a 37 °C, pero en diferentes tipos de leche y crema congelados así como en queso sin pasteurizar, sobrevive por periodos de hasta ocho semanas; sin embargo cuando los quesos están elaborados bajo fermentaciones de ácido láctico, el organismo es incapaz de sobrevivir (20).

Las brucelas presentan sensibilidad al calor y son incapaces de resistir temperaturas superiores a 60 °C por más de 10 min, por lo tanto son destruidas por la pasteurización, sobre todo cuando están diluidas en líquidos, pero en suspensiones densas es difícil eliminarlas. Este microorganismo es muy sensible a las radiaciones ionizantes, luz ultravioleta y rayos gama. Desinfectantes como el etanol, isopropanol, formaldehído, hipoclorito diluido, iodóforos, fenol y derivados son efectivos para descontaminar los materiales expuestos a *Brucella* (20).

2.5.- Características específicas de *B. melitensis*.

Esta especie del género *Brucella* no requiere CO₂ para su crecimiento, no produce ácido sulfhídrico (H₂S), crece en presencia de fucsina básica y tionina a concentraciones de 1:50,000. Existen tres biovariedades que se diferencian exclusivamente por sus características de aglutinación con sueros monoespecíficos (bv. 1 aglutina con suero anti-M, bv. 2 con anti-A y bv. 3 con ambos sueros). Oxida la D-glucosa, I-eritritol, L-alanina, L-asparagina y ácido L-glutámico. No oxida L-arabinosa, D-lactosa, D-ribosa, D-xilosa, DL-citrulina, DL-ornitina y L-lisina. Cuando *B. melitensis* se encuentra en fase "S" es lisada por un fago específico denominado Bk, mientras que no la lisan los fagos Tb, Wb, Fi, ni los del grupo R (20).

La diferenciación entre la cepa patógena *B.melitensis* (M16) y la cepa vacunal Rev-1, se basa en las características diferenciales que éstas presentan cuando se hacen crecer en medios con ciertos antibióticos y colorantes. De tal manera que *B. melitensis* M16, crece en presencia de fucsina, tionina y penicilina y la cepa vacunal Rev-1 no crece en presencia de ningún tipo de colorantes pero sí en medios con estreptomycinina (2, 46).

2.6.- Modo de transmisión y hospederos.

La bacteria penetra comúnmente por las mucosas oculares, del tracto digestivo y reproductor o por heridas en la piel. Entre los animales, puede ocurrir directamente por vía oral al ingerir alimentos o agua contaminados con orina, heces o descargas vaginales de los mismos cuando están infectados, sin descartar la transmisión por vía sexual. Está comprobado sin embargo, que la fuente de infección más importante son los fetos y anexos fetales (60, 74, 105). Casi todas las infecciones en caprinos son causadas por *B. melitensis*, aunque también *B. abortus* puede ocasionar infecciones semejantes a las producidas en bovinos (3, 21, 65, 74).

Las bacterias del género *Brucella* son parásitos obligados y cada una de sus especies mantiene siempre a un hospedero principal o habitual, en el cual encuentra una adaptación superior a la que puede tener en un hospedero secundario. En función de la especificidad de hospedero, Corbel y Nicoletti (20, 74) hacen la siguiente distribución:

1.- *B. abortus*. Su hospedero principal es el ganado bovino y otros bóvidos, sin embargo se ha reportado que infecta camellos, venados, perros, caballos, ovejas, cabras, cerdos y humanos.

2.- *B. melitensis*. Las bacterias de esta especie afectan con una mayor frecuencia a cabras y ovejas, pero pueden encontrarse con frecuencia en muchas otras especies como perros, caballos, camellos, además de ser el agente causal más frecuente de brucelosis en humanos donde produce los mayores estragos.

3.- *B. suis*. Sus hospederos están relacionados con las biovariedades. Las biovariedades 1, 2 y 3 infectan principalmente a cerdos; la biovariedad 4 es encontrada comunmente en renos y la biovariedad 5 afecta a pequeños roedores. Todas las biovariedades de esta especie tienen la capacidad de reproducirse y causar enfermedad en el hombre.

4.- *B. neotomae*. Esta bacteria ha sido aislada únicamente de ratas de campo y no se ha reportado tener la capacidad de producir problemas infecciosos en humanos.

5.- *B. ovis*. Presenta una gran especificidad para infectar a carneros y ovejas; sin embargo puede infectar otras especies en forma experimental. Hasta la fecha no está demostrado que pueda causar problemas en humanos, pero existen evidencias serológicas que indican que podría producir infecciones subclínicas.

6.- *B. canis*. Las bacterias de esta especie muestran un alto grado de especificidad hacia los cánidos y ocasionalmente pueden producir infecciones en humanos.

2.7.- Patogenia.

En la brucelosis de pequeños ruminantes intervienen dos grupos de factores, los ligados al agente causal y los relacionados al hospedero. Los primeros denominados factores

de virulencia o virulencia residual y los segundos asociados a factores genéticos (especie, raza, susceptibilidad individual) o a factores fisiológicos (edad, sexo, preñez, nutrición) (1, 20, 74).

Brucella es un microorganismo de localización y multiplicación intracelular facultativa, que puede reproducirse tanto en el medio extracelular como en el interior de los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (PMN) que la fagocitan, y tomando en cuenta estas características, Corbel y Nicoletti (20, 74), han dividido en cuatro fases el desarrollo del proceso infeccioso:

a).- Primera fase.- Penetración, migración local y regional. Después de que el microorganismo penetra al hospedero, a través de las vías digestivas, nasofaríngeas y/o cutáneas, utiliza a los PMN como vehículo y migra por vía linfática hasta los ganglios regionales donde se multiplica. Esta etapa que corresponde al período de incubación, varía de 14 a 180 días. El mecanismo de penetración de *Brucella* en los PMN se inicia con la opsonización del microorganismo con moléculas del tipo IgG y la fracción C₃ del complemento. El reconocimiento, ingestión, formación del fagosoma y fusión del fagosoma-lisosoma finalizan con la muerte y digestión de la bacteria. Sin embargo las cepas virulentas, pueden sobrevivir y multiplicarse por largos períodos de tiempo dentro de los fagosomas y por lo tanto, la evolución de la infección depende de la capacidad bactericida de las células fagocíticas. El mecanismo de supervivencia de *Brucella* sp. en el interior del PMN no ha sido totalmente esclarecido, pero estudios realizados por Caning, 1990 (17), en neutrófilos de bovinos han revelado que el 5'-guanosin monofosfato y adenina, componentes de la membrana celular de cepas lisas, tienen la capacidad de inhibir la unión fagosoma-lisosoma.

b).- Segunda Fase: Diseminación septicémica.- Se inicia a partir de los ganglios linfáticos con una diseminación al torrente circulatorio en número suficiente para poder colonizar numerosos grupos ganglionares, así como el bazo, hígado o la médula ósea y provocar posteriores ondas septicémicas que coinciden con el período febril del hospedero o fase aguda. En esta fase es cuando *Brucella* alcanza la placenta, se implanta en ella y provoca en ocasiones placentitis, muerte fetal y aborto.

c).- Tercera Fase: Estado de adaptación.- Aquí se puede producir una evolución variable de la enfermedad, en la cual se puede presentar la fase aguda de la enfermedad que dependerá como ya se mencionó, de factores por parte del microorganismo y/o del hospedero; así a *Brucella* se le puede localizar en placenta, glándula mamaria, articulaciones, hígado, bazo o testículos, entre otros órganos. En esta fase, merecen especial atención las hembras gestantes, ya que numerosas investigaciones ponen de manifiesto la extremada sensibilidad de los animales en este estado y pueden así pasar otra vez por la segunda fase.

d).- Cuarta Fase: Autocuración o estado de enfermedad latente.- Cuando un animal infectado establece un equilibrio biológico con *Brucella*, y sana en forma aparente y además deja de eliminar el microorganismo al medio ambiente, se dice que se encuentra en estado de infección latente. En el caso particular de los machos se ha visto que pueden permanecer como portadores, en cambio las hembras pueden desarrollar la enfermedad en la próxima gestación.

2.8.- Signos clínicos y lesiones.

B. melitensis es una bacteria intracelular facultativa que tiene una marcada afinidad por el tracto reproductivo de los rumiantes, este organismo produce una infección

crónica en cabras preñadas ya que se replica preferentemente dentro de las células corioalantoideas de la placenta, con resultados como placentitis, muerte fetal y aborto. La severidad de la enfermedad se acentúa en los animales adultos y especialmente en las hembras, en las cuales los síntomas que generalmente sugieren la presencia de la bacteria son trastornos reproductivos y los abortos que se presentan dentro del tercer tercio de la gestación. En casi todas las infecciones hay una localización permanente del microorganismo en la ubre con la consiguiente expulsión de bacterias en la leche, se presenta también una metritis supurativa con exudado hemorrágico, en el que además se pueden observar superficies necróticas con intensa infiltración de neutrófilos, los síntomas de las infecciones genitales desaparecen dentro de los treinta días postparto; pero la enfermedad se puede presentar en la siguiente preñez y se considera además que dependiendo de los factores genéticos del animal, la bacteria puede causar pirexia, pérdida de peso, artritis o mastitis, entre otros signos (20, 30, 74).

Hutyra (48) citado por Crespo (23) comprobó que *Brucella* coloniza los cotiledones placentarios y el útero de hembras gestantes, ahí se multiplica activamente y se propaga entre el epitelio del corion y mucosa uterina, donde da lugar a procesos inflamatorios y necróticos que alteran las conexiones entre la placenta fetal y materna, de esta forma el microorganismo atraviesa la barrera placentaria y llega al feto para establecerse en pulmón, bazo, hígado, miocardio y contenido de abomaso, obstruye la circulación sanguínea del feto y provoca su muerte y expulsión. Corbel y Nicoletti (20, 74) describen que el feto está edematoso y sus cavidades contienen fluidos rojizos con miles de bacterias, en pulmón existe infiltración alveolar e intersticial difusa, edema interlobular y pleural y congestión vascular, mientras que en el bazo se presenta una hiperplasia reticuloendotelial difusa. Enright (30) reporta que en el macho se puede producir una orquitis con formación de abscesos,

epididimitis e inflamación de los órganos reproductores accesorios. La orquitis puede ser uni o bilateral y trae como consecuencia una reducción en la fertilidad por la disminución del líbido y la espermatogénesis. Se presentan focos necróticos en el parénquima testicular que coalescen y en cortes histopatológicos se observan gran número de brucelas en las células necrosadas del epitelio seminal, así como en el lumen de los túbulos seminíferos.

2.9.- Prevención, control y erradicación.

La regla más efectiva para la prevención de esta enfermedad es proteger las áreas libres de este patógeno, evitar la introducción de animales enfermos y realizar pruebas diagnósticas a los introducidos (74). Se recomienda también eliminar los animales infectados e implementar condiciones de higiene durante el parto, así como el uso de vacunas apropiadas (11).

En la actualidad se emplean vacunas de microorganismos poco o menos virulentos, como la cepa Rev 1 de *B. melitensis* la cual ha sido usada extensivamente para proteger cabras y ovejas; pero no puede ser clasificada como la ideal, ya que tiene características indeseables tales como la habilidad de infectar a humanos, inducir infecciones persistentes en algunos animales vacunados, y puede provocar artritis y choque endotóxico (99); en ocasiones se pueden presentar abortos o la excreción de las brucelas vivas en la leche, aparte de interferir con el diagnóstico serológico (11, 72, 74, 99).

Generalmente no se recomienda un tratamiento en animales para evitar la drogoresistencia por parte del microorganismo, aparte de lo costoso que resultaría la terapia y la indeseable eliminación del antibiótico en la leche (11, 74), aún así existen

reportes de tratamientos a bovinos y caprinos que pueden consistir desde una mezcla de minerales, vitaminas y elementos traza hasta antimicrobianos tales como las sulfonamidas o penicilinas, que pueden prevenir un aborto o disminuir la concentración de la bacteria (74). Otros estudios recomiendan antibióticos de amplio espectro tales como las tetraciclinas o las combinaciones de oxitetraciclina y estreptomina (74, 84).

2.10.- Métodos generales de diagnóstico en brucelosis caprina.

El diagnóstico de la brucelosis en animales está basado en diferentes aspectos como lo son las características clínicas, antecedentes epidemiológicos y pruebas diagnósticas como la serología y el aislamiento del agente causal (46). Las técnicas utilizadas oscilan desde las simples hasta las más complejas y sensibles y además son similares a las que se aplican tradicionalmente a bovinos y humanos (23). Actualmente existen diversas técnicas para el diagnóstico de la brucelosis en animales, pero en la mayoría de los países sólo se utilizan las que poseen carácter oficial o que han sido recomendadas por organismos internacionales (23, 77).

Los métodos diagnósticos pueden clasificarse en dos tipos, directos e indirectos.

Los primeros como las técnicas biológicas, microscópicas y bacteriológicas, se basan en poner en evidencia la presencia de *Brucella* en muestras de diferente tipo obtenidas del animal infectado. Dentro de éstos, el cultivo y aislamiento del agente causal es el método reconocido como "Gold standard" (2, 46). La mayoría de los problemas existentes en la ejecución de los métodos directos de detección se han eliminado, pero actualmente aún permanecen algunas dificultades como lo es la factibilidad de bioterios en el caso del diagnóstico biológico, el bajo límite de detección de *Brucella*

cuando se intenta el aislamiento y la escasa fiabilidad del análisis microscópico (el cual debe complementarse siempre con el aislamiento del agente causal) (23, 60).

Dentro de los métodos indirectos de diagnóstico o inmunológicos se encuentran los serológicos y alérgicos (intradermoreacción), los cuales se basan en detectar anticuerpos contra epitopos de *Brucella*. Son métodos muy utilizados por su rapidez, pero su especificidad y sensibilidad no son adecuadas. La intradermoreacción mide la hipersensibilidad tardía hacia antígenos de *Brucella* y actualmente está en etapa experimental (19, 26, 46).

A nivel mundial, las pruebas diagnósticas oficiales para brucelosis caprina son tres, de las cuales el rosa de Bengala o prueba de tarjeta y anillo en leche están consideradas como pruebas tamiz, y la de Fijación de complemento como prueba confirmatoria (46, 77). De estas técnicas diagnósticas, la más utilizada es la prueba de tarjeta a una concentración celular del 3%, y se constituye como la prueba básica en el diagnóstico serológico de la brucelosis caprina en los laboratorios oficiales de todo el mundo, aunque en pequeños rumiantes su sensibilidad está estimada entre el 70 y 88%, sin olvidar la falta de especificidad reportada en múltiples ocasiones[®] al presentarse reacciones cruzadas con otros microorganismos (9, 24, 27, 28, 32, 52, 80, 104).

Cuando la prueba tamiz resulta positiva en cualquier momento de la vida del animal, éste debe ser considerado como tal y en ciertos casos particulares, se recomienda la prueba de Fijación de complemento como técnica confirmatoria que descarta falsos negativos (23, 46). No hay que olvidar que las peculiaridades patogénicas de la bacteria y la reacción del huésped influyen en el diagnóstico, por lo que ninguna prueba inmunológica con resultado negativo podrá afirmar que el animal

no padezca la enfermedad. Resulta variada y compleja la problemática actual del diagnóstico de la brucelosis mediante técnicas serológicas, especialmente en caprinos, debido en parte a la insuficiente investigación en éstas especies animales y aunado a las dificultades económicas acentuadas en países en vías de desarrollo como el nuestro.

2.11.- Importancia médico veterinaria.

Además de su importancia en la salud humana, la brucelosis es una enfermedad de gran impacto para el sector pecuario, reviste una trascendencia económica, ya que la incidencia de abortos causados por esta enfermedad es de hasta el 56% en vacas, cerdos, ovejas y cabras, su importancia en el mundo se debe a que causa pérdidas en la eficiencia reproductiva de los animales, además de dificultar la comercialización, mejoramiento genético e incrementar los costos de operación de hatos completos de ganado (10, 53, 91).

Valdespino (103), menciona que en nuestro país durante el año de 1992, se estimaron pérdidas económicas por \$3.5 millones ocasionadas por abortos en cabras. En cambio en bovinos existieron pérdidas en la producción de leche y abortos por \$55.5 y \$50.5 millones respectivamente. Zavala-Trujillo y cols. (107), reporta para México, una incidencia de brucelosis caprina que va del 15% al 40%.

En el estado de Nuevo León, García y Espinoza (38) evaluaron la incidencia de brucelosis caprina, en 64,266 cabras en un tiempo de 8 años. Encontraron que los municipios con alto promedio de incidencia fueron Parás y Salinas Victoria con 22.88%, le siguieron Sabinas Hidalgo, Mina, Cerralvo y Rayones con 15.2%, en los municipios de Anáhuac, Dr. González, Agualeguas, Escobedo, Montemorelos, Garza

García y Lampazos, se detectó un promedio de 7.91% y el resto de los municipios resultaron con menos del 5%.

La Subdelegación de Ganadería local de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR) reportó para el estado de Nuevo León, la prevalencia de brucelosis caprina hasta el año de 1995. Este organismo encontró una prevalencia del 2.38% para la zona Sur del estado, 4.15% para la zona Noreste y 1.84% para la zona Norte (93).

Según datos de la Subdelegación de Ganadería del estado (SAGAR) (93), se invierten anualmente más de \$ 2,000.000.00, en los programas para controlar y erradicar esta enfermedad, en donde se ha avanzado, pero la naturaleza infecciosa de la bacteria puede hacer perder el terreno ganado por tantos años, así como el tiempo y dinero invertidos.

Además de los daños y pérdidas económicas que tiene la brucelosis a nivel veterinario, se considera que un animal afectado es siempre la fuente directa o indirecta de infección hacia humanos en donde éstos figuran como hospederos accidentales a la vez que terminales. Se ha visto que tanto los factores climáticos (temperatura y precipitación), como el tipo de producción pecuaria y los hábitos alimenticios de los animales, son factores que han influido en la transmisión de la brucelosis al hombre así como su prevalencia. Se ha comprobado también que en países endémicos, la incidencia de brucelosis humana aumenta en primavera y verano, que es donde se presenta el mayor número de partos y abortos caprinos (46).

En 1994 Zavala-Trujillo (107), reportó para la población mexicana una morbilidad con un radio de 2.8 por 100,000 habitantes, acentuándose la incidencia

más alta en personas de 25 a 44 años de edad, además se encontró el mayor número de casos reportados en los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, así como Guanajuato, Jalisco y Michoacán. Para 1996, la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA) (25), reportó la tasa de morbilidad más alta en brucelosis humana para los estados de Guanajuato y Sonora y el grupo de edad más afectado fue el comprendido entre 25 y 44 años. Estos datos de morbilidad en los estados, así como los de incidencia en humanos, siguen actualmente coincidiendo con los publicados en 1994 por Zavala-Trujillo (107), lo que revela la importancia de esta zoonosis desde el punto de vista económico y de salud pública.

2.12.- Métodos experimentales de diagnóstico molecular en brucelosis caprina.

A principios de los 90's, surgieron las primeras investigaciones relacionadas con la detección molecular del genoma de *Brucella* spp. La nueva metodología diagnóstica basa su capacidad de detección en una herramienta de la biología molecular conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa, la cual es capaz de detectar entre una mezcla de genomas, una secuencia determinada de algún microorganismo® en particular (95). A nivel mundial, diferentes grupos de investigación iniciaron los trabajos de estandarización de esta metodología para intentar la detección de *Brucella* spp. mediante el uso de iniciadores u oligonucleótidos sintéticos diseñados con base en secuencias genómicas diversas reportadas para este género.

Fue así como en 1990 Fekete y cols. (34), reportaron la detección de *Brucella* spp. cuando utilizaron iniciadores derivados del gen de la proteína de membrana externa de 43-kDa de *B. abortus* y como templado el DNA proveniente de cepas de referencia. Dos años más tarde este mismo grupo publicó la detección de *Brucella* en

tejidos altamente contaminados provenientes de abortos (35). Por otra parte, Kulakov y cols. (55) intentaron el diagnóstico en cepas de referencia, y utilizaron iniciadores basados en la misma secuencia génica del grupo anterior. En este mismo año, Baily y cols. (7), reportaron la detección de *Brucella* spp. en cepas de referencia, e iniciadores derivados del gen de la proteína BCS P31 y Herman y De Ridder (45), reportaron también la detección de *Brucella* spp., pero ellos usaron iniciadores derivados de secuencias de inserción IS 711.

Para 1993, Martínez-Soriano y cols.(64), reportaron por primera vez a nivel mundial la detección de *B. abortus* en muestras sanguíneas de bovinos lecheros infectados, ellos utilizaron un par de iniciadores específicos para el gen *omp 2* de *B. abortus* y demostraron la utilidad de esta prueba en muestras de campo.

En 1994, Bricker y Halling (13), utilizaron iniciadores derivados de las secuencias de inserción IS 711 de *Brucella*, éstos reportaron la detección y diferenciación de *B. abortus* bv. 1, 2 y 4, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis* bv.1 mediante el uso de PCR en cepas de referencia y al año siguiente publicaron la diferenciación de las cepas vacunales *B. abortus* S19 y la mutante rugosa RB51 (14).

A finales del '95 en México, Leal-Klevezas y cols. (57), utilizaron iniciadores diseñados con base en el gen *omp 2* de *Brucella* spp. (64) y dieron a conocer la detección de *Brucella* sp. en muestras de sangre y leche de caprinos infectados naturalmente, así como en sangre de humanos enfermos. En posteriores investigaciones este grupo incluyó el uso de un tercer iniciador y lograron identificar todas las especies del género *Brucella* así como la comprobación de una delección del gen *omp 2a* de las biovariedades 1 de *B. abortus* (56). Queda claro que los iniciadores diseñados por el grupo de Martínez-Soriano y cols., en una región específica del gen

omp 2, han demostrado sensibilidad y especificidad al detectar todas las especies del género a partir de cepas de referencia y en muestras de campo, y queda pendiente la determinación de la utilidad de la prueba y de estos juegos de iniciadores para la detección de la bacteria en etapas tempranas de la infección en animales inoculados.

Poco después Romero y cols. (87) publicaron la detección por medio de PCR, de todas las cepas representativas de *Brucella* así como la detección de *Brucella* en muestras de leche positivas, ellos usaron iniciadores derivados del 16S rRNA de *Brucella* (88). Para 1996, Rijpens y cols. (85), reportaron la detección del microorganismo en 1 ml de leche cruda, mediante el diseño de iniciadores en la región 16S-23S de *Brucella*. Por las mismas fechas Matar y cols. (66), reportaron la detección de *Brucella* sp. en sangre de humanos, con iniciadores derivados del gen de la proteína BCS P31. Cabe mencionar que el trabajar con las regiones 16S ó 23S tiene la desventaja de que se corre el riesgo de amplificar partes del genoma de un gran número de organismos procariotes, debido a que son regiones altamente conservadas y además multicopia.

La especificidad del PCR está basada en los dos únicos iniciadores utilizados para hibridar en sitios relativamente cercanos a la secuencia de DNA blanco bajo condiciones astringentes de temperatura y concentraciones específicas de los elementos de la reacción, pero se ha visto también que un método de extracción deficiente, el mal diseño de iniciadores y/o condiciones de la reacción, afecta la sensibilidad de la prueba para amplificar el DNA blanco (73). Aunado a esto se han reportado una serie de compuestos que en cantidades mínimas pueden actuar como inhibidores de la reacción, entre los cuales figuran la sangre, hemoglobina, formalina, ácidos húmicos, agentes quelantes (EDTA), detergentes (Tritón-X100,

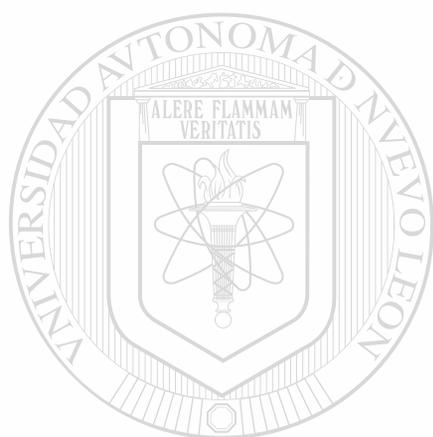
SDS), metanol y etanol, en las soluciones de extracción; metales pesados y exceso de glicerol en las soluciones de reacción, entre otros (62).

Con la finalidad de disminuir algunos inhibidores así como incrementar la eficiencia y sensibilidad del PCR, varios grupos de investigación han introducido modificaciones a la prueba para lograr una amplificación exitosa del DNA blanco. Una de las modificaciones más utilizadas es una técnica conocida como PCR nested o PCR anidado, el cual permite diluir todas las posibles impurezas presentes en la muestra de PCR (5).

La prueba se puede realizar en dos tubos o en uno sólo, cuando se realiza en dos tubos implica agregar un primer par de iniciadores (externos) en una primera reacción de PCR y se deja correr por 26 a 35 ciclos. Al terminar, el tubo es abierto y una pequeña parte del producto se transfiere a un segundo tubo que contiene, además de todos los elementos de la reacción, el segundo par de iniciadores (internos) que son complementarios al producto de la primera amplificación, se corre de 25 a 35 ciclos y el producto se visualiza en geles de agarosa o poliacrilamida. El procedimiento en un tubo es similar a una reacción de PCR pero es más complejo ya que contiene los dos grupos de iniciadores (externos e internos) y aquí se tiene que calcular muy bien la temperatura de hibridación de estos dos grupos de iniciadores (31, 36, 44, 106).

El PCR nested es una herramienta muy utilizada para la identificación de patógenos de interés humano, veterinario y agrícola (43, 78, 82) o microorganismos en los cuales el cultivo y el diagnóstico serológico son difíciles, caros o no disponibles, o también para aquellos microorganismos de lento crecimiento (4, 29) e inclusive para estudiar la persistencia de patógenos intracelulares (47, 50, 68).

Conociendo los alcances y limitaciones de la prueba de PCR, en este trabajo se va a hacer uso de una modificación a la misma, que se conoce como PCR seminested, esta prueba tiene el mismo fundamento que el PCR nested, sólo que uno de los dos iniciadores (externo) utilizados en la primera reacción de amplificación o PCR, es seleccionado para formar el par de iniciadores que se utiliza en la reamplificación o PCR seminested, o sea que aquí un iniciador es común para las dos reacciones de amplificación.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Capítulo 3

METODOLOGIA

3.1.- Marcadores de peso molecular.

Se utilizó el DNA del plásmido pBR322 (SIGMA) digerido con las enzimas de restricción *Alu I* o *Hinf I* (GIBCO BRL). Tamaños de 11 a 910 pares de bases (pb) fueron obtenidos cuando el plásmido fue digerido con la enzima *Alu I*, con *Hinf I* los fragmentos fueron de 75 a 1631 pb. La digestión se llevó a cabo con 50 µg del DNA plasmídico, 10 U de enzima y 20 µl de la solución amortiguadora correspondiente, se completó con agua bidestilada estéril a un volumen total de 200 µl y se incubó toda la noche a una temperatura de 37 °C. Posteriormente se agregaron 20 µl de solución Halt (25 % glicerol, 0.25 % xilencianol, 0.25 % azul de bromofenol, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 1% SDS en agua bidestilada estéril) (97). Se conservaron a 4 °C hasta el momento de su utilización .

3.2.- Testigos de especificidad.

Como testigos negativos se utilizaron DNAs extraídos de muestras sanguíneas de cabras sanas, los positivos fueron las cepas de referencia *Brucella abortus* S19 y *B. melitensis* M16 (provenientes de la colección del Laboratorio Central Veterinario en Waybridge, Gran Bretaña), proporcionadas por la Dra. Ahidé López Merino, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, en México, D.F.

3.2.1.- Extracción de DNA de testigos de especificidad.

Las muestras de sangre de las cabras sanas se procesaron según protocolo de extracción del apartado 3.6.1. Para las colonias bacterianas, tomó una asada y se resuspendió en 400 µl de solución salina estéril, contenida en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml de capacidad. La suspensión se centrifugó 1 min a 5,000 rpm (microcentrífuga Eppendorf 5415 C), se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 400 µl de solución amortiguadora TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA), a esta suspensión se le agregaron 200 µl de solución de lisis total (2% Tritón-X 100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0), 200 µl de fenol saturado (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 2% 2-mercaptoetanol y 0.1% hidroxiquinoleína) y 200 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (97). Se agitó por 1 min en vortex (VWR-Scientific) y se centrifugó por 5 min a 10,000 rpm. La fase acuosa se separó y a ésta se le agregó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó por 1 min en vortex y se centrifugó 5 min a 10,000 rpm. La fase superior se separó y a ésta se le agregaron 2.5 volúmenes de etanol salado (2 % KCl en etanol 95%) y se mantuvo a -20 °C por un mínimo de 2 h.

Al término de este tiempo los tubos se centrifugaron por 5 min a 10,000 rpm, el sobrenadante se descartó y los tubos se colocaron en posición invertida sobre papel absorbente por 2 min. Una vez que se evaporaron los restos de alcohol, se agregó 1 ml de etanol al 70%, frío. Se agitó suavemente y luego se centrifugó por 5 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se descartó y los tubos se colocaron en posición invertida sobre papel absorbente para eliminar el alcohol remanente. Finalmente, se agregó a cada tubo 20 µl de solución amortiguadora TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA). Los DNAs extraídos se conservaron a 4 °C hasta el momento de efectuarse la PCR directa (Fig. 1).

3.2.2.- Reacción de PCR directa en testigos de especificidad.

En tubos Eppendorf de 500 μ l de capacidad, se depositaron aproximadamente 200 ng del DNA molde, 25 pmol de cada uno de los iniciadores diseñados para *Brucella* (Bru 1 y Bru 3) (57), 2.5 μ l de solución amortiguadora 10X (50 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 8.0), 1 μ l de MgCl₂ (50 mM), 200 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos (dNTPs) (Perkin Elmer Cetus Co., Norwalk. Conn.), 2.5 U de la enzima DNA *Taq* Polimerasa (Perkin Elmer Cetus Co., Norwalk. Conn.) y se completó a un volumen de 25 μ l con agua ultrapura estéril. Para prevenir la evaporación, se agregaron a cada tubo de reacción 25 μ l de aceite mineral estéril (Fig. 2).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 480, de acuerdo al protocolo diseñado por Martínez-Soriano y cols. (64), que contempla un paso de desnaturalización inicial de 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos, cada uno de los cuales incluye un paso de desnaturalización de 1 min a 94 °C, uno de alineamiento de 1 min a 60 °C y uno de polimerización de 1 min a 72 °C, finalmente se incluye un ciclo de extensión de 10 min a 72 °C (Fig. 2).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2.3.- Electroforesis en gel de agarosa.

Una vez terminada la reacción de polimerización, los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) (Sigma USA) disuelto en solución amortiguadora TBE 0.5X (0.045 M Tris-borato, 0.001 M EDTA pH 8.0) adicionado de bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 μ g/ml (97) (Fig. 2).

Del producto de amplificación se tomaron 7 μ l y se mezclaron con 2 μ l de solución Halt. El volumen total se depositó en el gel y en los extremos 0.16 μ g del marcador de peso molecular. El gel permaneció sumergido en una cámara de

electroforesis (Fotodyne, modelo 1214) que contenía solución amortiguadora TBE 0.5X, el fraccionamiento se realizó bajo un flujo eléctrico de 100 V y cuando el frente del corrimiento (dado por la banda azul del colorante) estaba a las 3/4 partes del gel, se eliminó la corriente y el gel se colocó sobre la superficie del transiluminador (Fotodyne, modelo UV-440/RM-4), para observar el DNA teñido por el bromuro de etidio y el tamaño de los fragmentos obtenidos se comparó con los del marcador de peso molecular preestablecido (Fig. 2). Posteriormente los geles fueron fotografiados con una cámara FOTODYNE -POLAROID, FCR-10, filtro TIFFEN 40.5MM RED 23A, provista de película Polaroid 667 instantánea.

3.3.- Ensayo clínico.

3.3.1.- Selección de las hembras.

Para este estudio se eligieron cuatro hembras caprinas con edades entre los dos y cinco años, sin vacunar y comprobadas de estar libres de *Brucella* sp. con base en pruebas de aglutinación, cultivo y PCR directa. Debido a la alta contagiosidad de *B. melitensis* y para el estricto control de la infección, se planeó este "ensayo clínico" con sólo dos hembras inoculadas. Una vez que las cabras se certificaron libres de *Brucella*, dos de ellas se separaron para figurar como testigos negativos y las otras dos sirvieron como testigos positivos, para facilitar la identificación de las mismas, la hembra de cinco años de edad se etiquetó como cabra "A" y la de dos años como "B" (Fig. 3).

3.3.2.- Sincronización de estros y monta.

Para que la inoculación fuera exactamente dentro del tercer tercio de la gestación, se sincronizaron los celos para aparear a la vez las dos hembras y que éstas presentaran signos y síntomas característicos al mismo tiempo. En un área del pabellón de la oreja

se les aplicó un implante subcutáneo, el cual contenía 1.5 mg de norgestomet. En seguida, se les aplicó intramuscularmente una inyección con 1.5 mg de valerato de estradiol y 0.75 mg de medroxyprogesterona (MPA). El implante permaneció *in situ* por un espacio de 11 días y al momento de retirarlo se le suministró a cada hembra 0.5 mg de dinoprostrometamina (PGE_{2a}) parenteralmente.

Se dejaron transcurrir 72 h para que el celo apareciera, y después de este tiempo las hembras denominadas "A" y "B", se sometieron a la monta natural con machos libres de *Brucella*. A los 21 días después de la monta, la Cabra "B" no dió señales de preñez, por lo que volvió a ser sometida a la monta. De tal manera que al momento de la inoculación la cabra "A" contaba con 101 días de gestación y la cabra "B" con 80 días.

3.3.3.- Inoculación con la cepa de referencia.

Para evitar el ingreso de nuevas biovariedades a la región de Nuevo León, se usó la cepa de referencia *B. melitensis* M16, perteneciente a la bv. 1, predominante de la región de Nuevo León y mantenida por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) "Dr. Manuel Martínez Báez".

Cuando las dos cabras se encontraban dentro del tercer tercio de gestación (101 días de preñez para la "A" y 80 para la "B"), se procedió a la inoculación de las mismas, para lo cual se depositó en cada ojo 75 µl de una suspensión bacteriana con 10⁷ células (estimado por nefelómetro), de la cepa de referencia *B. melitensis* M16. Los animales inoculados permanecieron en jaulas metabólicas, en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y los sanos utilizados como testigos negativos, en los corrales de la Facultad de Agronomía de la UANL.

3.3.4.- Forma de muestreo.

Se obtuvieron muestras de sangre, exudados (nasal, ocular y vaginal), secreciones (leche, saliva) y excretas (orina y heces) de los animales sanos e inoculados. La colecta de muestras se realizó antes de la inoculación y después de la misma cada tercer día por un lapso de dos meses, luego cada semana por un período de dos meses. A partir del quinto mes y hasta que el animal resultara negativo por serología o falleciera, las muestras se colectaron cada 15 días.

3.3.4.1.- Toma de muestras de sangre.

Se rasuró y desinfectó un área sobre la vena yugular del animal. Con equipo vacutainer se extrajeron dos muestras de sangre de aproximadamente 5 ml (una muestra con EDTA como anticoagulante y la otra sin éste). Las muestras con anticoagulante se utilizaron para el hemocultivo y las pruebas moleculares, las muestras sin anticoagulante se dejaron a temperatura ambiente para retraer el coágulo, se centrifugaron y el suero se separó para realizar la prueba serológica de RB

(Fig. 3). UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.3.4.2.- Toma de muestras de exudados, secreciones y excretas.

3.3.4.2.1.- Exudado vaginal, ocular, nasal y saliva.

Se prepararon tubos de ensaye de 18 x 150 mm con tapón de rosca que contenían 3 ml de solución salina estéril. Con un aplicador estéril con punta de algodón, se tomó muestra de la mucosa de la cavidad (ocular, nasal, oral y vaginal). Cada muestra se depositó dentro del tubo de ensaye correspondiente, con solución salina estéril. Estas muestras permanecieron en congelación hasta el momento en que fueron utilizadas para las pruebas moleculares y microbiológicas.

3.3.4.2.2.- Leche.

La ubre del animal fue lavada, se desinfectó el extremo del pezón con una torunda de algodón humedecida en alcohol al 70%. Una vez seca la ubre, se ordeñó la cabra, las primeras dos expulsiones de leche fueron eliminadas, y a partir de la tercera, se depositaron aproximadamente 10 ml de la muestra en recipientes de vidrio esterilizados. Las muestras de leche se guardaron a 4 °C para luego realizar pruebas moleculares y microbiológicas.

3.3.4.2.3.- Orina.

Las muestras de orina fueron colectadas en bolsas especiales de plástico usadas para la recolección en infantes. Se limpió la parte externa de la vulva de la hembra y se colocó el pegamento de la bolsa sobre la piel del animal. Una vez que se obtuvo el espécimen, la bolsa se desprendió y se selló, se guardó en congelación hasta el momento de efectuar el cultivo y las pruebas moleculares.

3.3.4.2.4.- Heces.

En el caso de las heces se tomó una pequeña porción de aproximadamente 1 g, se depositó en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm con tapa de rosca que contenía 3 ml de solución salina estéril y se mantuvo en congelación hasta el momento de su procesamiento.

3.5.- Necropsias e histopatología.

De los dos fetos abortados (una hembra y un macho), se colectaron muestras de bazo, cerebro, corazón, hígado, pulmón y riñón. De estos tejidos, una parte se preservó en

formol al 10% para luego ser procesadas en la histopatología y otra se mantuvo en congelación hasta el momento de ser analizada con PCR directa y cultivo. También se tomaron muestras de fluidos intracorporales como el coágulo de cavidad cardíaca, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, médula ósea, médula espinal y contenido gástrico, éstas se congelaron hasta ser analizadas por PCR directa y cultivo. De las dos hembras adultas se colectó bazo, cerebro, corazón, cotiledón (sólo en la cabra "A"), ganglio linfático, glándula mamaria, glándula salival, hígado, ojo, páncreas, pulmón, riñón, útero y vejiga. De estos tejidos, una parte se preservó en formol al 10% para luego ser procesadas en la histopatología y otra se mantuvo en congelación hasta el momento de ser analizada con PCR directa y cultivo. También se tomaron muestras de fluidos intracorporales como el coágulo de cavidad cardíaca, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, médula ósea, médula espinal y el contenido de útero y líquido amniótico sólo en la cabra "A", estos especímenes se congelaron hasta ser analizadas por PCR directa y cultivo.

El estudio histopatológico se realizó con la finalidad de observar daños característicos provocados por *B. melitensis* en órganos clave. Se seleccionaron porciones de tejido de aproximadamente 0.5 cm de grosor preservadas en formol al 10%, y se procesaron para la técnica de inclusión en parafina. De los bloques obtenidos, se realizaron cortes en microtomo y se obtuvieron así laminillas que fueron procesadas por la técnica de tinción de rutina de Hematoxilina-Eosina (HE). Los cortes histológicos se observaron al microscopio para determinar y confirmar las lesiones producidas.

3.6.- Extracción de DNA de las muestras.

3.6.1.- Sangre .

En tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad, se depositaron 400 µl de sangre con EDTA como anticoagulante, se añadió 1 ml de solución de lisis de eritrocitos (155 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 0.1 mM EDTA pH 7.4), se mezcló el tubo manualmente y se centrifugó por un min a 5,000 rpm (microcentrífuga Beckman modelo 5415 C), el sobrenadante se descartó y el paquete de glóbulos blancos se lavó de tres a cuatro veces hasta que se eliminó la hemoglobina liberada al romperse los eritrocitos.

El paquete de células blancas fue resuspendido en 400 µl de solución amortiguadora TE, luego se agregaron 400 µl de solución de lisis total y 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml). La mezcla se agitó con vortex por 30 seg y se incubó a 60 °C por 30 min (Multiblok Lab-Line, LR19314). Pasado el tiempo de incubación, se agregaron a la mezcla 400 µl de fenol saturado y se homogenizó en vortex por 20 seg, se centrifugó 5 min a 10,000 rpm.

El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se le agregaron 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), la suspensión se homogenizó en vortex por 20 seg y se centrifugó por 5 min a 10,000 rpm. Se extrajo la fase acuosa y se le añadieron 200 µl de acetato de amonio 7.5 M. Se incubó en hielo por 10 min y luego se centrifugó 5 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se le agregó 1 ml de etanol 95% ó 0.6 volúmenes de isopropanol para precipitar el DNA. La mezcla permaneció por un mínimo de 2 h o toda la noche, a una temperatura de -20 °C.

Después de transcurrido ese tiempo se centrifugó por 5 min a 10,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol frío al 70% para lavar el DNA. Se centrifugó por 5 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se descartó y los tubos se

colocaron en posición invertida para permitir evaporar los restos de alcohol. El DNA obtenido se resuspendió en 20 μ l de solución amortiguadora TE y se mantuvo a -20 °C (Fig. 1).

3.6.2.- Exudados extra e intracorporales y paquete leucocitario.

3.6.2.1.- Exudado vaginal, nasal, ocular, saliva y paquete leucocitario.

Para la extracción de DNA a partir de estas muestras, se utilizó el protocolo de Kawasaki (51), el fundamento de dicha técnica incluye la lisis celular con detergentes, desnaturalización enzimática e inactivación por calor.

Las muestras se centrifugaron 2 min. a 3,000 rpm , se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de solución amortiguadora TE. La suspensión se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó 1 min a 3,000 rpm y el sobrenadante se descartó. El sedimento se resuspendió en 200 μ l de "bufferK" (1% de laurenth 12 ó 0.5 % de tween 20, 100 μ g/ml de proteinasa K) y la mezcla se llevó a incubación por 1 h a 55 °C y después se calentó a 95 °C por 10 min para inactivar proteasas. La muestra se almacenó a -20 °C. Para la técnica de PCR se utilizaron 7 μ l de la muestra descongelada.

3.6.2.2.- Exudados intracorporales.

Las muestras de contenido gástrico, líquido amniótico, cefalorraquídeo y sinovial, médula ósea y médula espinal, fueron procesadas con la técnica descrita por Rys (92). Se depositaron 500 μ l de la muestra en tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad. Se centrifugaron 3 min a 10,000 rpm y el sobrenadante se descartó. Al sedimento se le agregaron 250 μ l de "buffer de digestión" (1M dithiotreitol, 0.25M de EDTA pH 8.0,

10% SDS y 20 µg/ml de proteinasa K) y se incubó 1 h a 37 °C. Se transfirieron 300 µl del digerido a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se siguió el protocolo de extracción fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, como se describe en el apartado 3.6.1.

3.6.3.- Leche.

Las muestras de leche se dejaron reposar toda la noche a 4 °C para permitir la formación de una capa superior de crema, de donde se tomaron alícuotas de 400 µl que se depositaron por separado en tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad. Para extraer el DNA bacteriano a partir de este tipo de muestras, se siguió el protocolo del apartado 3.6.1, excepto el uso de la solución de lisis de eritrocitos (Fig. 1). Los DNAs extraídos se conservaron a -20 °C.

3.6.4.-Orina y heces.

Para orina se siguió el protocolo de extracción de DNA de Lebech y Hansen, (59). Se calentaron 5 ml de orina a 100 °C por 5 min; después se centrifugó 10 min a 10,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 ml de PBS pH 7.4 (97) se centrifugó nuevamente 10 min a 10,000 rpm, el sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 20 µl de agua destilada. Se calentó 5 min a 100 °C. se centrifugó 1 min a 10,000 rpm. 7 µl del sobrenadante se utilizaron para la PCR directa.

Para heces se usó el método de Frankel y cols. (37). Aproximadamente 200 mg de heces se colocaron en un tubo eppendorf y suspendieron en 1 ml de PBS pH 7.4, se centrifugó por 1 min a 3,000 rpm y el sobrenadante se descartó. El sedimento se resuspendió en 75 µl de "buffer Tris-HCl" pH 8.0 (20% sacarosa p/v, 50 mM EDTA, 100

μg de lisozima) y se incubó 30 min a 37 °C. Se agregaron 300 μl de NaCl 50 mM (1% SDS p/v, 800 μg de proteinasa K), se incubó 60 min a 37 °C. A partir de aquí se siguió el método de extracción fenol-cloroformo del apartado 3.6.1. Los extractos crudos obtenidos y los DNAs fueron conservados a -20 °C.

3.6.5.-Tejidos .

Para la extracción de DNA a partir de tejidos, se usó la técnica de Fekete y cols. (33), pero se modificó tanto la cantidad de tejido a utilizar como la forma del macerado, asimismo se agregó un paso de desnaturalización enzimática con proteinasa K por 30 min a 56 °C. Dentro de bolsas plásticas para macerar (AGDIA) se pesaron porciones de tejido que fluctuaron entre 4 y 7 g y para obtener un macerado líquido, se mezclaron con uno ó dos volúmenes de solución salina estéril. Las muestras se trituraron por tres min en un homogenizador de tejidos (SEWARD Stomacher 80). Se tomaron 400 μl del macerado y se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se agregaron 200 μl de "buffer NETS" (0.01 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.01 M Tris-HCl pH 7.6) y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNAsa. Se incubó 1 h a 55-60 °C y se agregaron 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K y 0.5% p/v de SDS. Se incubó 2 h a 55-60 °C, y se calentó 10 min a 95 °C para inactivar proteasas. A partir de aquí se aplicó el método de extracción de DNA fenol-cloroformo del apartado 3.6.1. Los DNAs, extraídos fueron conservados a -20 °C.

3.7.- Pruebas utilizadas para el diagnóstico de brucelosis caprina.

3.7.1.- Serología con RB 3% y 8%.

Sobre una placa de vidrio cuadrículada, se depositaron 30 μl de suero a probar. En seguida se agregaron 30 μl del antígeno RB 8%, se mezcló bien con un palillo de

madera y la placa se agitó suavemente por un lapso de 3 min. La placa se colocó sobre una lámpara de luz blanca para identificar los positivos (sueros que presentaban aglutinación). A estos sueros también se les practicó la prueba de aglutinación con RB 3%, esta prueba se realizó de la misma manera que al 8%, pero se substituyó el antígeno al 8% por el de 3%.

3.7.2.- Hemocultivo.

Del tubo que contenía 5 ml de sangre con anticoagulante, se tomaron 3 ml para inocularlos asépticamente en un frasco para hemocultivo con medio bifásico de Ruiz-Castañeda modificado (46, 60). El frasco se agitó suavemente con la mano y se dejó reposar 5 min en posición horizontal. Después se incubó verticalmente a 37 °C durante 8 semanas y se revisó cada 24 h a partir del séptimo día de incubación para observar la aparición de colonias sospechosas.

Se hicieron resiembras a los siete, 14 y 30 días aún cuando no hubiera crecimiento visible. Para esto se extrajeron de 0.1 a 0.2 ml del medio líquido perfectamente homogeneizado y se depositaron por duplicado en cajas de cultivo con agar *Brucella* enriquecido (2% dextrosa, 1% glicerol, 0.5% extracto de levadura). La muestra se extendió con una asa o varilla curva de vidrio y las cajas se incubaron a 37 °C, una en aerobiosis y la otra en una atmósfera de 5% de CO₂. Se revisaron las cajas diariamente durante 10 días y las colonias que aparecieron al primero y segundo día de incubación, se descartaron. Aquellas que se desarrollaron después del tercer día y que presentaron morfología colonial parecida a *Brucella*, fueron resemebradas en medio Farell con antibióticos (2) para identificarlas posteriormente como se describe en el apartado 3.7.6. Si en el transcurso de dos meses no se consiguió aislar a la bacteria, el hemocultivo se consideró negativo. El criterio de identificación de colonias sospechosas

así como el tiempo y forma de incubación de las cajas de cultivo fué el mismo para los cultivos a partir de exudados, fluidos intracorporales, heces, orina, leche y tejidos.

3.7.3.- Cultivo de exudados, fluidos intracorporales, heces y orina.

Las muestras almacenadas a -20 °C se descongelaron a temperatura ambiente y se mezclaron con vortex. Con un aplicador estéril con punta de algodón se tomó parte de la muestra y se sembró por duplicado en cajas con medio selectivo Farell, después se incubaron según protocolo del apartado 3.7.2.

3.7.4.- Cultivo microbiológico a partir de leche.

Las muestras de leche se dejaron reposar toda la noche a 4 °C para permitir que se formara la capa superior de crema. Con un aplicador estéril con punta de algodón se tomó parte de esta capa y se sembró por duplicado en cajas con medio selectivo Farell. La muestra se extendió sobre la superficie con una asa o varilla curva de vidrio, se dejó absorber la muestra por 15 min y se llevó a incubación, según protocolo del apartado 3.7.2.

3.7.5.- Aislamiento a partir de tejidos.

Dentro de bolsas plásticas para macerar (AGDIA), se pesaron porciones de tejido que fluctuaron entre 4 y 7 g y para obtener un macerado líquido, se mezclaron con uno ó dos volúmenes de solución salina estéril. Las muestras se trituraron por tres min en un homogenizador de tejidos (SEWARD Stomacher 80). Se tomaron 100 µl del macerado y se depositaron por duplicado en cajas de cultivo que contenían medio selectivo Farell, la muestra se extendió sobre la superficie con una asa o varilla curva

de vidrio y se dejó absorber sobre el agar, se llevaron a incubación según protocolo del apartado 3.7.2.

3.7.6.- Identificación de especie.

Todas las colonias que por su morfología sugerían que se trataba de *Brucella* sp., fueron identificadas en forma presuntiva mediante aglutinación con suero de bovino que contenía anticuerpos contra *Brucella*, tinción de gram y prueba de PCR directa. Aquellas que aglutinaron con el suero bovino, que fueron bacilos cortos gram-negativos y positivas en la prueba de PCR directa, se enviaron al Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE-SSA) en México, D.F., donde se efectuaron las pruebas confirmatorias para su identificación completa que incluyeron pruebas fisiológicas, serotipificación y fagotipificación.

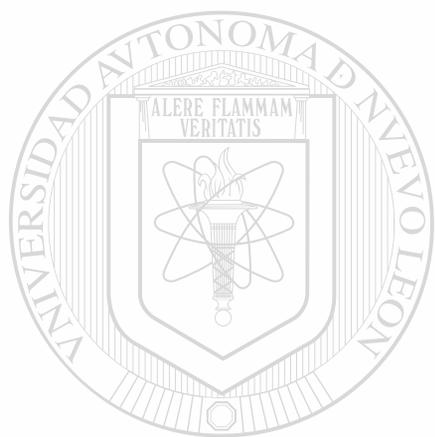
3.7.7.- Reacción de PCR directa.

Para efectuar las pruebas de PCR directa a partir de sangre, leche, coágulo de cavidad cardíaca y tejidos, se procedió conforme a la metodología descrita en el apartado 3.2.2. y para los exudados, fluidos intracorporales, paquete leucocitario, heces y orina, también se siguió el mismo protocolo, solo que la cantidad de DNA molde (2 μ l) se substituyó por un volumen de 7 μ l de extracto crudo de la muestra a analizar.

3.7.8.- Reacción de PCR seminested.

Todas las muestras que resultaron negativas por PCR directa, fueron sometidas a la prueba de PCR seminested. Para llevar a cabo esta prueba, se siguió el protocolo del apartado 3.2.2. Se realizó una primera reacción de amplificación con los iniciadores

Bru 1 y Bru 4 para intentar amplificar un fragmento genómico bacteriano de aproximadamente 820 pb (Fig. 4), utilizando el mismo programa del termociclador utilizado en el apartado 3.2.2.. A partir de esta primera reacción, se tomó un volumen de 2 µl como DNA molde y se llevó a cabo una segunda reacción de PCR ó PCR seminested, pero ahora utilizando los iniciadores Bru 1 y Bru 3, los cuales amplifican una fracción de 190 pb a partir del fragmento de aproximadamente 820 pb (Fig. 4), el programa del termociclador fue igual que el utilizado en la primera reacción.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1.- Inducción y establecimiento de la enfermedad en animales.

De las dos hembras sometidas a la cruce (monta natural), solo la cabra "A" quedó preñada; de tal manera que a los 21 días después, se realizó otro intento de cruce con la cabra "B". Por esta razón la cabra "A" contaba con 101 días de gestación y la cabra "B" con 80, al momento de ser inoculadas. Después de inocular vía ocular la cepa de referencia *Brucella melitensis* M16 en las dos hembras gestantes, se produjo en la cabra "A" la sintomatología y daños característicos de una brucelosis, como el aborto de dos crías (una hembra y un macho), que se presentó dentro del tercer tercio de la gestación (35 días postinoculación) y su muerte septicémica (43 días postinoculación).

En la cabra "B", la enfermedad pasó inadvertida, se comportó como un animal asintomático a lo largo del experimento y parió a término (71 días postinoculación) una hembra. No obstante, se observó en este animal una disminución gradual del peso corporal y finalmente murió al año de haber sido inoculado. La cría tampoco presentó sintomatología propia de una brucelosis pero le fueron tomadas muestras de sangre y exudados semanalmente desde el primer día de nacida, con el objeto de conocer si la infección le había sido transmitida.

No obstante la cantidad de brucelas inoculadas (10^7), suficientes para producir la enfermedad, la respuesta a la infección fue muy diferente en los dos animales, así la cabra "A" presentó la sintomatología aguda característica de una brucelosis, mientras que la "B" sólo manifestó algunos signos inespecíficos, que la hizo pasar como un animal asintomático. Finalmente la autopsia reveló que los dos animales fallecieron a

causa de la infección por *Brucella* y se comprobó que la bacteria inoculada fue la misma que produjo la enfermedad en ellos, ya que el patógeno logró ser aislado y caracterizado como *B. melitensis* bv. 1. Los signos y síntomas presentados por ambos animales, concuerda con las aseveraciones de varios autores como Alton, Corbel y Nicoletti (1, 20, 74), los cuales proponen que el estado nutricional, la edad, el número de partos, el estado inmunológico, tiempo de gestación, raza, sexo y la herencia, son factores determinantes para la susceptibilidad a la brucelosis en este tipo de animales.

Cabe mencionar que al momento de la inoculación la cabra "A" contaba con 6 años de edad, un peso de 45 kg, cinco partos previos y 101 días de gestación, factores que probablemente favorecieron el establecimiento de la enfermedad. La cabra "B" tenía 3 años de edad, un peso de 40 kg, dos partos anteriores y 80 días de gestación, lo cual podría contribuir al comportamiento tan opuesto en relación a la presentación de la enfermedad observado en ambas cabras, la respuesta de estos dos animales hacia la enfermedad concuerda con lo encontrado por Enright (30), quien inoculó animales y encontró en algunos la susceptibilidad hacia *Brucella* y en otros resistencia y llamó a estos últimos portadores asintomáticos.

4.2.- Análisis de Sangre.

4.2.1.- Serología.

La prueba serológica RB 3%, detectó los anticuerpos contra *Brucella* en la cabra "A" a los 12 días postinoculación (Fig. 5), la detección fue sistemática hasta el día 43 y no se observaron inconsistencias de la prueba, es decir, dió resultados del mismo tipo (positivos) en los sueros obtenidos en días sucesivos en el periodo de tiempo que el animal fué muestreado. Cuando estos mismos sueros fueron retados con RB 8%, sí se presentaron inconsistencias en la detección de anticuerpos dando resultados positivos

en sueros obtenidos en ciertos días y negativos en los colectados en otros, además se detectaron dichos anticuerpos inicialmente a los 18 días después de la inoculación (6 días después que el RB 3%) y las inconsistencias con el antígeno RB 8% continuaron presentándose hasta que el animal falleció.

El segundo animal en experimentación (cabra "B"), logró sobrevivir 233 días después de la inoculación, lo que permitió observar más ampliamente el comportamiento de las pruebas serológicas. Aquí el RB 3% permitió la detección de anticuerpos a los 16 días postinoculación y hasta el día 76 (Fig. 6). En este lapso de tiempo se tuvieron siempre resultados positivos, pero después se presentaron inconsistencias notables. Con el RB 8%, la detección se inició a los 18 días postinoculación (2 días después que el RB 3%) y muy pronto se observaron inconsistencias que continuaron hasta que el animal falleció.

El RB 3% detectó en ambos animales los anticuerpos contra *Brucella* a los 14 días en promedio (día 12 para el animal "A" y 16 para el "B") y la consistencia permaneció por 31 días para "A" y 60 para "B" (Fig. 7). Estos resultados contrastan con los obtenidos con el RB 8%, el cual detectó los anticuerpos en ambos animales a los 18 días después de la inoculación y las inconsistencias en la detección se presentaron tanto en las etapas tempranas (cabra "A" y "B") como en las tardías (cabra "B") (Fig. 7). En la cabra "B" se pudo observar que ambas pruebas serológicas (RB 3% y 8%) se comportaron de la misma manera en etapas tardías de la infección y mostraron una inconsistencia similar.

Aunque el RB 8% ^{esta} estandarizada para bovinos, la dilución de RB 3% resultó útil en caprinos, ya que detectó antes que el RB 8% los anticuerpos contra *Brucella* en los dos animales en estudio. Díaz Aparicio (26) encontró, que al

incrementar la relación de suero con respecto al antígeno, los falsos negativos desaparecían, en caprinos inoculados y vacunados. Este investigador sugiere que el antígeno de RB debe ser titulado en forma diferente para el caprino que para el bovino, además sugiere que la baja sensibilidad del RB encontrada en otros estudios sea debida al empleo de suspensiones antigénicas excesivamente concentradas, porque como es bien sabido se necesita proporciones óptimas de antígeno y anticuerpos para formar precipitados claramente visibles.

Los resultados obtenidos con el RB 8%, mostró la limitante de esta prueba diagnóstica, ya que detectó los anticuerpos circulantes contra *Brucella* en ambos animales de manera intermitente y con intervalos de tiempo variados que oscilaron entre los cuatro, siete y 62 días. Esta incapacidad del RB 8% para detectar anticuerpos de manera continua y al inicio de la infección, establece una limitante para su uso, ya que si el suero de un animal da un resultado negativo, no se descarta la posibilidad de que el animal esté infectado con *Brucella*. Nicoletti (74), atribuye tal comportamiento de la prueba, a la cantidad de anticuerpos presentes al momento de hacer la toma de la muestra, a la presencia intermitente de la bacteria en torrente sanguíneo y a su capacidad de establecer procesos crónicos con signos y síntomas no aparentes como los presentados en la cabra "B". Por otra parte Alton (1), establece que con posterioridad a la respuesta inmune inicial, desaparecen en el animal síntomas y anticuerpos y se convierte por algún tiempo en portador asintomático de difícil detección mediante técnicas serológicas de diagnóstico habitual.

Aunque existen diversos reportes acerca de la baja sensibilidad y especificidad de la prueba de RB en bovinos y caprinos, con base fundamentalmente en compararla con el cultivo (27, 28, 32, 80, 104), a la fecha son nulos los trabajos

que reporten el registro cuidadoso de la prueba de RB en animales bajo condiciones experimentales, y este ensayo clínico permitió observar el comportamiento del RB a dos concentraciones al medir el comportamiento de dicha prueba a lo largo del experimento. Además, se encontró que el RB 3% resultó ser más sensible que el RB 8% para la detección de *Brucella*, por lo que debe ser considerada como una prueba útil en el diagnóstico de esta enfermedad en caprinos.

4.2.2.- Hemocultivo:

De 23 hemocultivos realizados a la cabra "A", solo se logró el aislamiento de la bacteria inoculada en tres muestras, que correspondieron a los días 29, 36 y 42 postinoculación (Fig. 7), dos de estos tres aislamientos, corresponden a fechas cercanas al aborto (días 29 y 36). En la misma figura 7 se observa que en la cabra "B" sólo se logró aislar la bacteria en dos muestras, una a los 66 días postinoculación (cinco días antes del parto) y otra a los 112 días. Cabe mencionar que en este animal se practicaron 57 hemocultivos, a diferencia de los 23 realizados en el animal "A".

El hemocultivo resultó ser la prueba con menos sensibilidad comparada con el resto y aunque está considerado como una prueba confirmatoria, aquí se demostró una vez más la poca sensibilidad reportada en múltiples ocasiones, en donde la han estimado ser de tan sólo el 70% (41, 63). El bajo porcentaje de aislamiento de la bacteria utilizando el medio de cultivo Farell (2), puede en un momento dado estar ligado a: que el medio Farell ha sido diseñado para el crecimiento de *B. abortus* y además está comprobado que inhibe el crecimiento de *B. melitensis* (26). Alton (2) indica que *B. melitensis* posee requerimientos estrictos para su desarrollo, sin descartar su conocido caprichoso crecimiento. Además, se debe considerar lo propuesto por Zinsser (108), el cual sugiere que para lograr el aislamiento de

cualquier microorganismo se requiere de una cantidad mínima detectable del mismo.

Con el hecho de haber aislado la bacteria solo en tres fechas muy cercanas al aborto en el animal "A" y una en la proximidad del parto en el "B", se comprobó una vez más lo reportado por Gotuzzo y cols. (41), los cuales atribuyen que la eficiencia de los cultivos de sangre aumenta en la fase de bacteremia y decrece con la cronicidad de la infección. Con base en los resultados obtenidos y tomando en cuenta el tiempo que se invierte en aislar el microorganismo a partir de cultivos, sugerimos que el hemocultivo no sea el método de elección para el diagnóstico de *Brucella* en etapas iniciales de la infección.

4.2.3.- PCR directa.

Con el fin de establecer metodologías rápidas y simplificadas de extracción de DNA a partir de sangre, se utilizaron dos técnicas, la de fenol cloroformo modificada para sangre total (65) y la de Kawasaki (51) que implica lisis de leucocitos y desnaturalización por calor. Con la primer técnica se invirtieron aproximadamente 3 h y el DNA obtenido fue más estable y produjo amplificación de fragmentos más claros al visualizarlos en el gel de agarosa. Con la técnica de Kawasaki, se emplearon 1.5 h, el DNA obtenido se degradó más rápido y se obtuvieron amplificaciones no muy claras cuando se visualizaron en el gel, aunque no se vió afectada su especificidad. Los resultados que se presentan en las figuras 8 y 9 de este trabajo se refieren a productos amplificados con muestras de DNA extraídas mediante la técnica de fenol cloroformo modificada. Cabe mencionar que la técnica de Kawasaki (51), por su rapidez y sencillez debe ser considerada para aplicarla en el diagnóstico molecular presuntivo. La técnica de fenol cloroformo modificada (65), aunque invierte más tiempo que la anterior,

también se recomienda, ya que ha sido usada para extraer DNA de microorganismos intracelulares en diferentes tipos de muestras.

El diagnóstico con PCR directa inició la detección de la bacteria a los 13 días postinoculación en ambos animales y permaneció detectándola consistentemente a lo largo del experimento (Fig. 7). Al comparar los resultados de PCR directa y RB 3% observamos una correlación al inicio de la detección y una consistencia durante los siguientes 30 días para la cabra "A" y 58 para la "B", después de los cuales la PCR directa permaneció detectando al microorganismo de manera constante y el RB 3% de forma intermitente (Fig. 7). La PCR directa superó al RB 8% así como al hemocultivo en el inicio y consistencia de la detección. Al comparar los resultados obtenidos con PCR directa y RB 3%, se infiere que ambas pruebas sugieren la presencia de *Brucella* en una etapa similar del padecimiento y que además fueron más eficientes que el RB 8% y el hemocultivo para detectar de una forma indirecta ó directa al microorganismo en estudio. En la figura 8 carril 4, observamos los productos de amplificación derivados de la PCR directa en sangre, utilizando los iniciadores Bru1 y Bru3, este producto amplificado mide aproximadamente 190 pb y es característico del género *Brucella*. Los resultados aquí obtenidos, sugieren que la prueba de PCR directa podría complementar el diagnóstico serológico con RB 3%, muy utilizado en las campañas de control y erradicación de esta enfermedad, ya que señalaría realmente a los animales negativos.

4.2.4.- PCR seminested.

Las muestras sanguíneas en las que no fue posible detectar el DNA de la bacteria mediante la PCR directa (muestras PCR negativas), fueron sometidas a la prueba de PCR seminested, que empleó dos iniciadores en la primera reacción de amplificación

(Bru 1 y Bru 2) y otros dos en la reamplificación o PCR seminested (Bru 1 y Bru 3), aquí un iniciador (Bru 1) fue común para las dos reacciones (Fig. 4). En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos con esta prueba, la cual logró detectar el DNA de la bacteria en la sangre de las dos hembras a los cuatro días postinoculación, lo que significó un adelanto en el inicio de la detección de nueve días con respecto a PCR directa, 12 en relación a RB 3%, 14 en lo que respecta al RB 8%, y mucho mayor (25 días en "A" y 62 en "B") considerando el hemocultivo.

En la figura 9 panel A, se representan esquemáticamente las dos amplificaciones secuenciales que involucró el PCR seminested, el panel B, muestra la fotografía de un gel de agarosa en el cual se fraccionaron los productos de la primera amplificación con los iniciadores Bru 1 y Bru 2, aquí podemos constatar que sólo en el carril 7 se puede observar un fragmento de aproximadamente 820 pb correspondiente al testigo positivo (*B. abortus*). En el panel C de la misma figura 9, carriles 3, 6 y 7, se observa un fragmento de 190 pb producto de la segunda reamplificación o PCR seminested que confirma la presencia de *Brucella* en las muestras analizadas.

El hecho de que algunas muestras de sangre negativas por PCR directa, resulten positivas por PCR seminested, es atribuido a bajas concentraciones de DNA molde y a posibles inhibidores presentes en la PCR directa (algunos arrastrados desde la extracción del DNA), que son diluïdos cuando se realiza la prueba de PCR seminested (62, 73). Entre los principales inhibidores presentes en la reacción de PCR directa están: restos de sangre, hemoglobina, formalina, ácidos húmicos, agentes quelantes (EDTA), detergentes (Tritón-X100, SDS), metanol, metales pesados y exceso de glicerol (62, 73).

La sensibilidad del PCR seminested demostrada en este experimento, pudo haberse debido en parte, a que se hizo una dilución de los inhibidores cuando se tomaron 2 μ l de la primera amplificación como molde para la reamplificación, además de que si el fragmento amplificado inicialmente (de 820 pb) pudo haber estado en cantidades tan pequeñas que no fue posible visualizarlo en el gel (Fig. 9 panel B) y con la reamplificación este pudo ser magnificado en cantidad y visualizado en el gel (Fig. 9 panel C). Estudios donde se ha utilizado el PCR nested como prueba diagnóstica, en otros tipos de muestras diferentes a las utilizadas aquí, se ha visto que se incrementa la sensibilidad del PCR hasta en un 100% sin modificar la especificidad e inclusive se reporta la detección de cantidades muy pequeñas de DNA molde de hasta 3 pg (47, 78, 82, 83, 86, 102).

En este estudio quedó demostrada la utilidad del PCR seminested para la detección de *B. melitensis* en muestras de sangre de cabras en etapas tempranas y avanzadas de la infección, asimismo se recomienda la utilización de esta prueba para estudiar la persistencia de patógenos intracelulares o para usarla en muestras que contengan poca cantidad de DNA molde.

4.3.- Análisis de exudado vaginal.

4.3.1.- Cultivo.

En el animal "A" la bacteria se aisló al día 22 postinoculación, observándose luego un lapso de 10 días de cultivo negativo y, a partir del día 33 se reinició un segundo aislamiento consecutivo que permaneció hasta el día 43 (fecha del desceso del animal). Por el contrario, en la cabra "B" el aislamiento se presentó a partir del día 56 postinoculación y continuó así hasta el 83 (27 días consecutivos) (Fig. 10).

El aislamiento en ambos animales fue semejante con respecto al número de días previos al parto o aborto ya que como se puede ver en la figura 10, en el animal "A" se logró 13 días antes del aborto, mientras que en el "B" a los 15 días antes del parto. Esto sugiere que el inicio de eliminación del microorganismo en exudado vaginal, puede en un momento dado estar influenciado por la proximidad del aborto o parto en el animal. Crespo (23), encontró que en cultivos de exudado vaginal de cabras, la eliminación de la bacteria se inició unos días antes del parto o aborto y permaneció por dos meses más. El trabajo de Crespo sólo coincide con éste, en el inicio de la detección en los dos animales, ya que en la cabra "A" se aisló en un periodo consecutivo de 21 días y en la "B" por 27 días, que son periodos menores a lo reportado por el investigador antes mencionado. Para Nicoletti (76) el establecimiento y eliminación de brucelas en un animal infectado, depende de varios factores tales como la respuesta inmunológica, edad, etapa de la gestación e incluso factores genéticos. En esta investigación consideramos que tanto la edad, el estado de gestación así como la respuesta inmune en ambos animales, fueron factores determinantes que influyeron para el cese de la eliminación de la bacteria en exudado vaginal, es decir un periodo corto de aislamiento en la cabra "B" (27 días), y posiblemente escaso número de bacterias eliminadas en este tipo de muestra. Sin embargo cabe mencionar que la bacteria fué aislada hasta el día 83 postinoculación en exudado vaginal y se correlaciona con el último aislamiento en leche (Fig. 10 y 11), lo que sugiere que en esta etapa de la enfermedad, solamente disminuye la cantidad de bacterias necesarias para ser aisladas por cultivo en estos dos fluidos.

4.3.2.- PCR directa.

Para la extracción de DNA en muestras de exudado vaginal, se empleó la técnica de Kawasaki (51), que implica lisis de células y desnaturalización por calor, las

características de la extracción fueron similares a las obtenidas en el apartado 4.2.3 y además resultó apropiada, rápida y completamente sencilla en este tipo de muestras que contienen gran cantidad de células epiteliales, además de leucocitos, hongos y otras bacterias.

La prueba de PCR directa detectó la bacteria en el exudado vaginal de la cabra "A" a partir del día 22 postinoculación (13 días antes del aborto) y consecutivamente hasta el día 43, en cambio en el animal "B" la detección se inició a partir del día 29 postinoculación (42 días antes del parto) y permaneció en forma continua hasta el día 133 (Fig. 10). También se observó que en las muestras de la cabra "A" se obtuvieron resultados similares con PCR directa y cultivo, con respecto al periodo de inicio y término de la detección, aquí el cultivo presentó inconsistencias y la PCR directa mostró ser siempre positiva en el transcurso del muestreo. Al comparar el diagnóstico por PCR directa y cultivo en las muestras de la cabra "B", vemos que la prueba molecular detectó la bacteria 27 días antes y 47 días después que el cultivo (Fig. 10), el cultivo coincide con PCR directa solamente por 27 días (del 56 al 83).

Estos resultados demuestran que la prueba molecular de PCR directa es más eficiente comparada con la microbiológica en cuanto a la persistencia de la detección (e inicio de la detección en caso de la cabra "B"), considerando además que la edad, el avance en el estado de gestación y la susceptibilidad del animal a la enfermedad, fueron factores definitivos para el establecimiento y desarrollo de la enfermedad. En el animal "A" (de mayor edad y estado de gestación), el inicio y final de la detección fueron similares con PCR directa y cultivo contrastando con el animal "B", (de menor edad y tiempo de gestación), en el cual la PCR directa superó el periodo de detección de la bacteria días antes y después que el cultivo.

La mayoría de los datos reportados acerca de la eliminación de *Brucella* en exudado vaginal, están hechos con base en aislamientos microbiológicos y para tal efecto determinan que la bacteria comienza a eliminarse a los 10 o 15 días antes del parto (20, 22, 30), en cambio en este trabajo, utilizando PCR directa como prueba diagnóstica, se pudo constatar (al menos en el animal "B") que la eliminación de *Brucella* en exudado vaginal, comienza a ser eliminada mucho antes de lo reportado por cultivo.

4.3.3.- PCR seminested.

Las muestras de exudado vaginal PCR negativas de la cabra "A", fueron sometidas a la prueba de PCR seminested. En la figura 9 panel C, se muestran los fragmentos obtenidos por PCR seminested a partir de muestras de exudado vaginal, los fragmentos amplificados tienen un tamaño de 190 pb y son característicos del género *Brucella*. La prueba PCR seminested detectó a la bacteria consistentemente por un periodo de 23 días (del 20 al 43 postinoculación), en cambio en el animal "B" el periodo de detección fue de 108 días (del 22 al 133 postinoculación), según se ve en la figura 10. En esta figura vemos también que en el animal "A", el cultivo, PCR directa y PCR seminested fueron equiparables en cuanto al inicio de la detección del microorganismo, pero en el animal "B" se marca un adelanto de siete días con respecto a PCR directa y 34 en relación al cultivo. Estos resultados de exudado vaginal, demuestran que la prueba molecular de PCR seminested es más eficiente comparada con la PCR directa en cuanto al inicio de la detección del microorganismo. Aunque el análisis en este tipo de muestras queda restringido sólo a hembras, se considera importante, ya que da la pauta para utilizarlo como una opción más en el diagnóstico de hembras asintomáticas. No obstante la anterior limitante, en otro tipo de muestra (apartado

4.2.4.), se ha visto la capacidad diagnóstica de PCR seminested comparada con la PCR directa.

4.4.- Análisis de leche.

4.4.1.- Cultivo.

En la cabra "A", la bacteria se aisló consecutivamente en los seis días que duró el periodo de secreción, en cambio en el animal "B", se observó el aislamiento de la bacteria en fechas no consecutivas desde el inicio hasta el final del periodo de secreción, ya que este animal logró vivir 233 días postinoculación (Fig. 11). De los dos aislamientos logrados en la cabra "B", uno corresponde al primer día de lactancia (71 días postinoculación) y el otro a los 15 días después (día 86). Los resultados de aislamientos no consecutivos obtenidos en este trabajo, concuerdan con lo reportado por Nicoletti y Enright (30, 75), los cuales mediante aislamientos en animales experimentales establecieron que la eliminación de *Brucella* en leche era en forma intermitente. Otros autores atribuyen que el éxito en el aislamiento de *Brucella* en este fluido, depende de la frescura de la muestra, método de transporte, asepsia al momento de la toma, temperatura a la que se envió la muestra y manejo de la misma en el laboratorio (46). El aislamiento negativo de la bacteria utilizando el medio de cultivo Farrell (2), se discutió en el apartado 4.2.2.

Aunque actualmente el aislamiento y caracterización de *Brucella* es reconocida como una de las pruebas oficiales, consideramos que no podría figurar como una prueba rutinaria para el diagnóstico sistemático de la brucelosis en leche, ya que como se sabe es lento, poco sensible y riesgoso (41, 46, 60). Por todo lo anterior sugerimos que para la identificación rápida de patógenos que presentan difícil aislamiento, se cuente ya con técnicas de vanguardia como las moleculares utilizadas en este trabajo.

4.4.2.- PCR directa.

En la leche de ambos animales la PCR directa mostró resultados positivos, esto significó 6 días de detección consecutiva en el animal "A" (del día 37 al 43 postinoculación) y 25 en el "B" (del día 71 al 96 postinoculación) (Fig. 11). En el animal "A", los resultados de PCR directa y cultivo fueron similares desde el inicio hasta el final de la detección, aunque cabe aclarar que el periodo de secreción láctea fue muy corto a causa del deceso del animal. La detección consecutiva de la bacteria por las dos pruebas (cultivo y PCR directa) en el animal "A", sugiere la gran cantidad de bacterias presentes en el mismo, debido en gran parte, a la respuesta de éste hacia la infección. Nicoletti (74), reporta que en un animal infectado con *Brucella*, la eliminación de la bacteria en leche, comienza con el inicio de la secreción después del aborto o parto y puede permanecer hasta por dos meses más, desafortunadamente debido a la muerte de la cabra "A" no se pudo dar un seguimiento más largo para detectar *Brucella* en este fluido.

La cabra "B" tubo un periodo de lactancia de 25 días (19 días más que en la "A") pero no lo suficiente, como para permitir observar el contraste de las dos pruebas diagnósticas por más tiempo, aunque si se logró observar una ventaja notable de la PCR directa sobre el cultivo, ya que la prueba molecular detectó en forma consecutiva a la bacteria y del cultivo sólo se obtuvieron dos aislamientos en diferentes fechas (Fig. 11). La detección consecutiva del microorganismo mediante PCR directa en el animal "B", contrasta con los resultados del cultivo y también con lo reportado por Nicoletti y Enright (30, 75), los cuales proponen que la eliminación de la bacteria en leche se realiza en forma intermitente. Los resultados aportados por la PCR directa sugieren que *B. melitensis* se estuvo eliminando durante todo el transcurso de la lactancia y además que la cantidad de bacterias eliminadas en este

fluido, no siempre fueron suficientes para ser aisladas pero si para ser detectadas por la prueba molecular de PCR directa.

La capacidad de detección de la PCR directa sobre el cultivo, estriba en que se requieren cantidades relativamente pequeñas de la bacteria comparadas con la necesarias para lograr el aislamiento, además, la prueba molecular va a tener la capacidad de detectar en forma directa y específica el DNA de *Brucella*, y de incrementar el número de moléculas presentes en la muestra; lo que no sucede con el cultivo, que como se mencionó anteriormente, se necesitan cantidades mínimas detectables del microorganismo para poder aislarlo (2, 108). En la figura 8 carril 5, se puede observar el fragmento de 190 pb producto de la PCR directa con los iniciadores Bru 1 y Bru 3 en muestras de leche.

Aunque la leche es un tipo de muestra útil para el diagnóstico de la brucelosis en cabras, por ser abundante y de fácil obtención, tiene la limitante de no poder ser utilizada en machos o hembras "secas", por lo que queda restringida exclusivamente al periodo de secreción de leche en las hembras. Sin embargo, debido a la gran sensibilidad de la prueba de PCR directa mostrada aquí, donde se detectó al microorganismo desde el inicio hasta el final del periodo de secreción (Fig. 11), no se descarta la posibilidad de que en un futuro se utilice la PCR directa como una prueba que complemente los métodos de detección existentes y que además permita incrementar la eficiencia del diagnóstico de la brucelosis en leche de bovinos y caprinos infectados.

4.5.- Análisis de tejidos y fluidos intracorporales.

4.5.1.- Cultivo y PCR directa.

Las muestras de tejido a analizar por PCR directa y cultivo se maceraron primeramente con un microhomogenizador de tejidos (KONTEX), posteriormente se cambió a un macerador tipo stomacher, y se vió aumentado el número de muestras positivas, tanto por PCR directa como por cultivo. Se realizaron diluciones de los DNAs extraídos de ciertas muestras de tejido, para poder lograr amplificar con PCR directa, esto se debió a que se trataba de tejidos con alta irrigación sanguínea y por lo tanto que contenían gran cantidad de bacterias circulantes. Tanto fetos como adultos presentaron el mismo tipo de muestras a diluir (corazón, hígado, riñón, cerebro, pulmón, médula ósea y espinal) y las diluciones de DNA molde variaron desde 1:100 hasta 1:900, de este volumen final se tomaron 2 µl como DNA molde para realizar la PCR directa.

Se analizaron un total de 63 muestras entre tejidos y fluidos intracorporales, de las cuales 24 fueron de los dos fetos abortados y 39 de las dos cabras adultas. De las 24 muestras de fetos, 9 fueron positivas por cultivo (37.5%) y 23 por PCR directa (95.8%), en cambio de las 39 muestras de adultos, 14 fueron positivas por cultivo (35.9%) y 36 por PCR directa (92.3%) (Tabla 1). Comparada con el cultivo, la PCR directa mostró un porcentaje de detección del 93.65%, ya que de 63 muestras analizadas en total, en 59 de ellas se detectó al microorganismo, en cambio el cultivo dió un porcentaje de aislamiento del 36.5% ya que de las 63 totales, sólo en 23 se aisló la bacteria (Tabla 1).

En las muestras de fetos abortados y cabras adultas la PCR directa superó el número de muestras positivas comparada con el cultivo (Tablas 2, 3, 4, 5). En el feto hembra se observaron más muestras positivas que en el feto macho por ambas técnicas y sólo la muestra de coágulo de cavidad cardíaca resultó positiva por cultivo y PCR

directa en ambos fetos (Tablas 2 y 3). Las muestras de coágulo de cavidad cardíaca de adultos y fetos, fueron consistentemente positivas por PCR directa y cultivo (Tabla 2, 3, 4, 5). En la cabra "B" las muestras de glándula mamaria, glándula salival y páncreas fueron negativas por PCR y cultivo (Tabla 5), al igual que la muestra de cerebro en el feto macho (Tabla 3).

El aislamiento negativo en glándula mamaria de la cabra "B", sugiere la ausencia del microorganismo en este lugar y coincide con lo reportado por Alton (1), quien en un experimento con cabras aisló *B. melitensis* en leche y tejido mamario únicamente en el periodo de la secreción láctea, y después del cual ya no fue posible aislar al microorganismo de este tejido y este autor propone que la presencia de *Brucella* en glándula mamaria, sólo ocurre cuando el animal está lactando. Con los resultados negativos de glándula salival y páncreas en el animal "B", podemos inferir la ausencia del microorganismo en estos órganos, debido en parte al estado de cronicidad que presentó este animal, ya que como se ha reportado en múltiples ocasiones, *Brucella* sp. tiene una fuerte tendencia a establecer procesos crónicos y se ausenta de algunos tejidos para mantenerse por algún tiempo en articulaciones y huesos (70, 108). En la figura 8 se presentan los resultados de PCR directa de diversas muestras, utilizando los iniciadores Bru I y Bru 3, en la parte superior se presenta una descripción esquemática del fragmento amplificado y en la inferior una fotografía de los fragmentos obtenidos en geles de agarosa. El fragmento amplificado de 190 pb, es característico del género *Brucella*.

4.6.- Histopatología.

Al hacer el estudio histopatológico de algunos órganos seleccionados (pulmón, hígado, riñón, bazo, útero y cerebro) de los fetos abortados y hembras adultas, se pudieron

observar lesiones típicas de una infección producida por *B. melitensis*. El pulmón de los fetos presentó un fuerte infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear a nivel del parénquima, en bronquios y bronquiolos se observó edema, infiltrado de tipo polimorfonuclear, además de material fibrinoide y descamación del epitelio cilíndrico simple, lesiones típicas y características de una bronconeumonía supurativa asociada a una infección por este microorganismo (Fig. 12 panel B).

En el encéfalo y cerebelo de fetos y cabras adultas, se encontraron alteraciones tales como áreas de desmielinización, algunos focos de microhemorragias, gliosis reactiva, edema perivascular marcado y congestión moderada difusa.

En hígado de las cabras "A y B", se observó a nivel del parénquima una degeneración grasa marcada de los hepatocitos, caracterizada por una gran vacuolización citoplásmica, originada por la degradación de los organelos celulares, además de la pérdida total del arreglo de los cordones hepáticos, múltiples focos de hemorragia y congestión centrilobulillar severa (Fig. 12 panel C). En preparaciones de riñón de las cabras adultas, se observaron daños renales tales como la degeneración hídrica de túbulos contorneados proximales, necrosis del epitelio de la corteza, respuesta inflamatoria por células del tipo mono y polimorfonucleares, congestión severa difusa, y múltiples focos de hemorragia. En el bazo se observó a nivel de parénquima, cambios caracterizados por la atrofia de centros germinativos linfoides, congestión severa difusa y múltiples focos de hemorragia.

El útero de la cabra "A" se analizó con dos tinciones diferentes (HE y gram), en donde se observó a nivel de la mucosa una fuerte reacción inflamatoria compuesta por células de tipo mono y polimorfonuclear, así como también una severa exfoliación del

epitelio cilíndrico simple, múltiples focos de hemorragia y congestión severa difusa (Fig. 12 panel A y D).

Los daños observados en estos tejidos, son atribuibles a la reacción de reconocimiento de las endotoxinas (constituyentes de las paredes celulares de *Brucella* sp.), con los anticuerpos del huésped. Tal reconocimiento (endotoxina-anticuerpo), inicia la activación de la cascada del complemento, y una vez terminada ésta se inicia la lisis celular que conlleva a la presentación de la necrosis. Paralelamente a la activación de la cascada del complemento, se activan eritrocitos, neutrófilos, macrófagos, plaquetas y linfocitos B, el acúmulo de éstos, potencia el proceso necrótico ya que liberan entre otros factores enzimas proteolíticas y factores quimiotácticos (30, 42, 48).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente estudio, se demostró la utilidad de la prueba de PCR seminested para la detección específica de *Brucella melitensis* en etapas tempranas de la brucelosis en caprinos, y su aplicabilidad como una herramienta adicional de diagnóstico dentro de las acciones de los programas de control y erradicación de la enfermedad. Esto representa una importante aportación ya que el éxito de estos programas llevará a limitar el padecimiento en los animales y en consecuencia su transmisión al hombre.

Consideramos también que al mejorar el control zoonosario, se lograría una mejor selección de los productos pecuarios de importación, salvaguardando de esta manera la sanidad de nuestro ganado y por ende su productividad y competitividad a nivel nacional e internacional. También se evitaría el sacrificio de animales sanos vacunados (falsos positivos por serología) y el pasar por alto los infectados asintomáticos (falsos negativos en las pruebas serológicas).

Sería deseable extender este ensayo para determinar el comportamiento de las pruebas aquí empleadas en el seguimiento de la enfermedad en caprinos, valorando factores como sexo, edad, raza, etapa de la gestación y con un apropiado número de animales que nos permita un análisis estadístico.

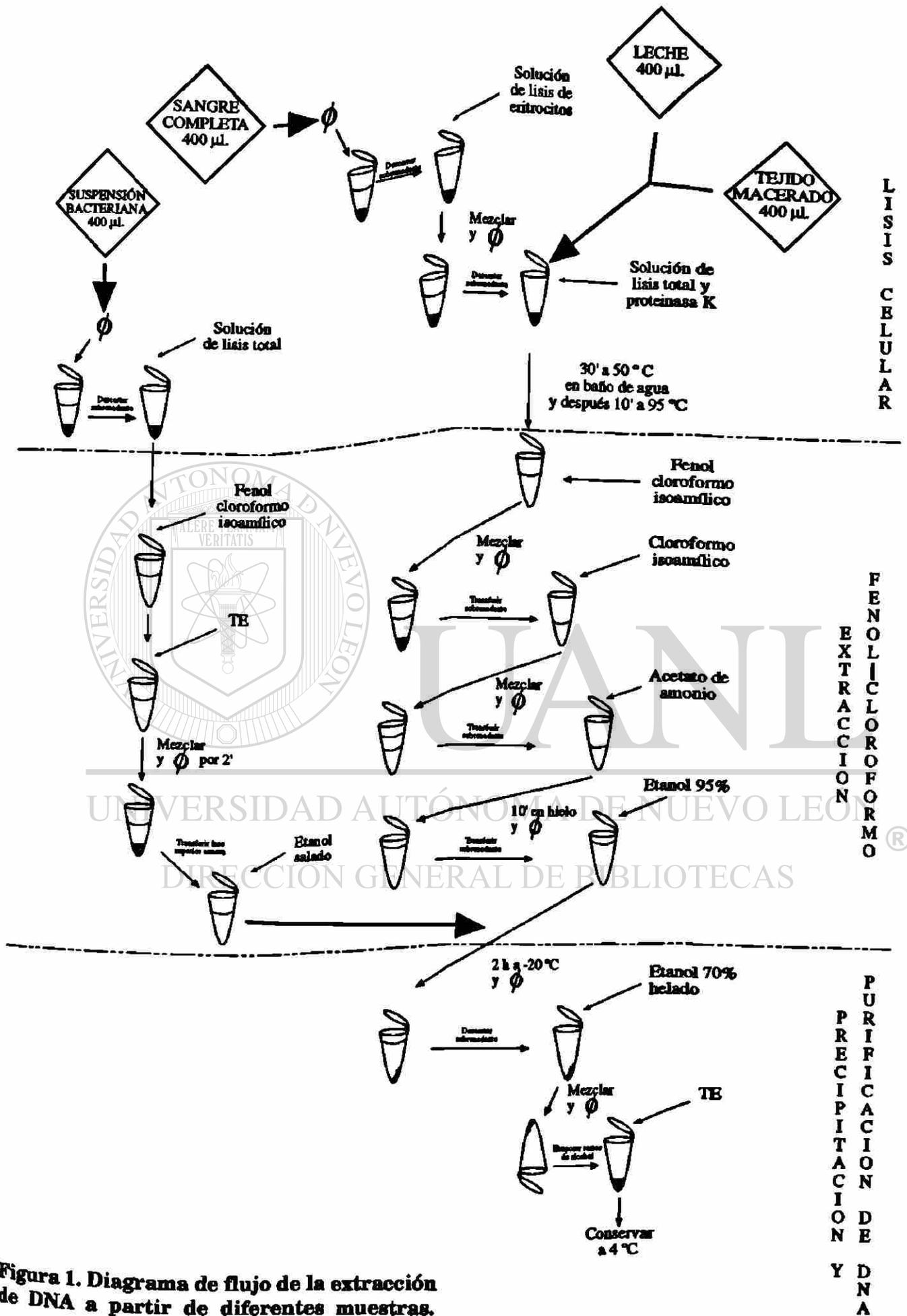
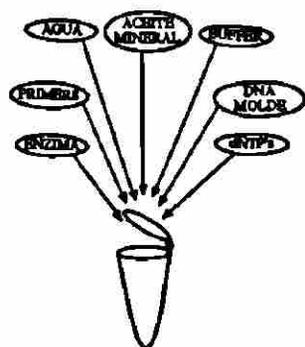


Figura 1. Diagrama de flujo de la extracción de DNA a partir de diferentes muestras.



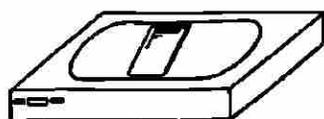
Elementos de la reacción de PCR



Proceso de amplificación (3 h)



Fraccionamiento electroforético (45 min)



Visualización del gel de agarosa en lámpara de luz U.V.

Figura 2. Diagrama de flujo de la reacción de PCR
Tomado de Martínez-Vázquez 1995 (65)

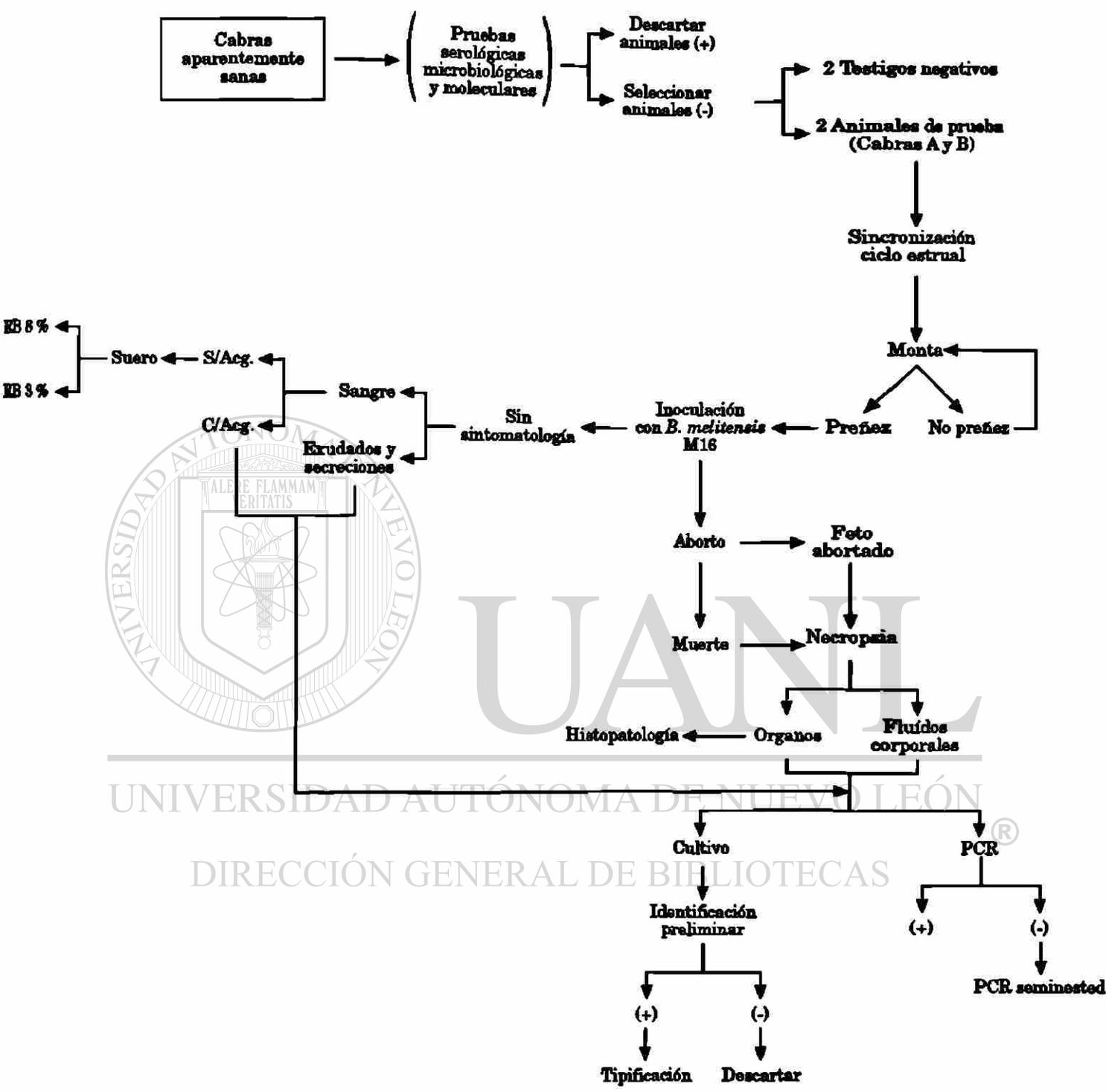


Figura 3. Diagrama de flujo general de la metodología empleada.

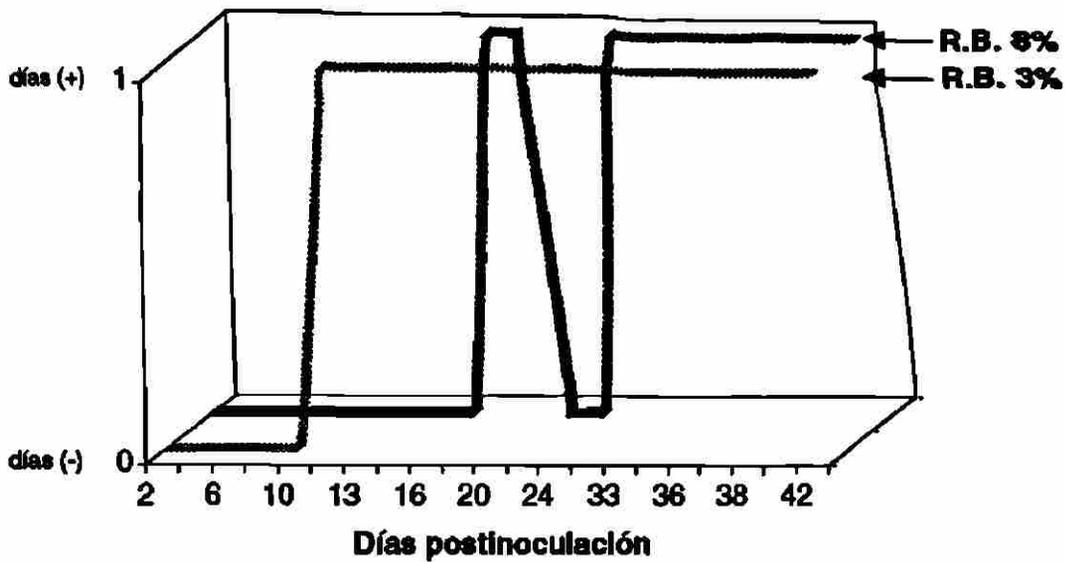


Figura 5. Detección de anticuerpos contra *Brucella* en muestras de sangre de la cabra "A", utilizando el antígeno rosa de Bengala 3% y 8%. Representación esquemática de los resultados obtenidos en el periodo posterior a la inoculación de *B. melitensis*. 0 = Resultado negativo, 1 = Resultado positivo.

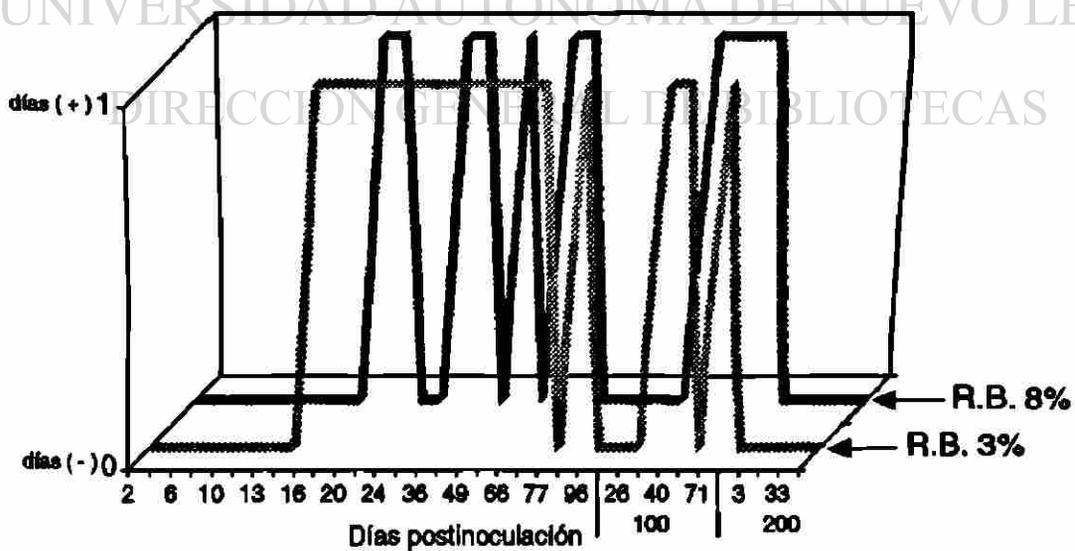
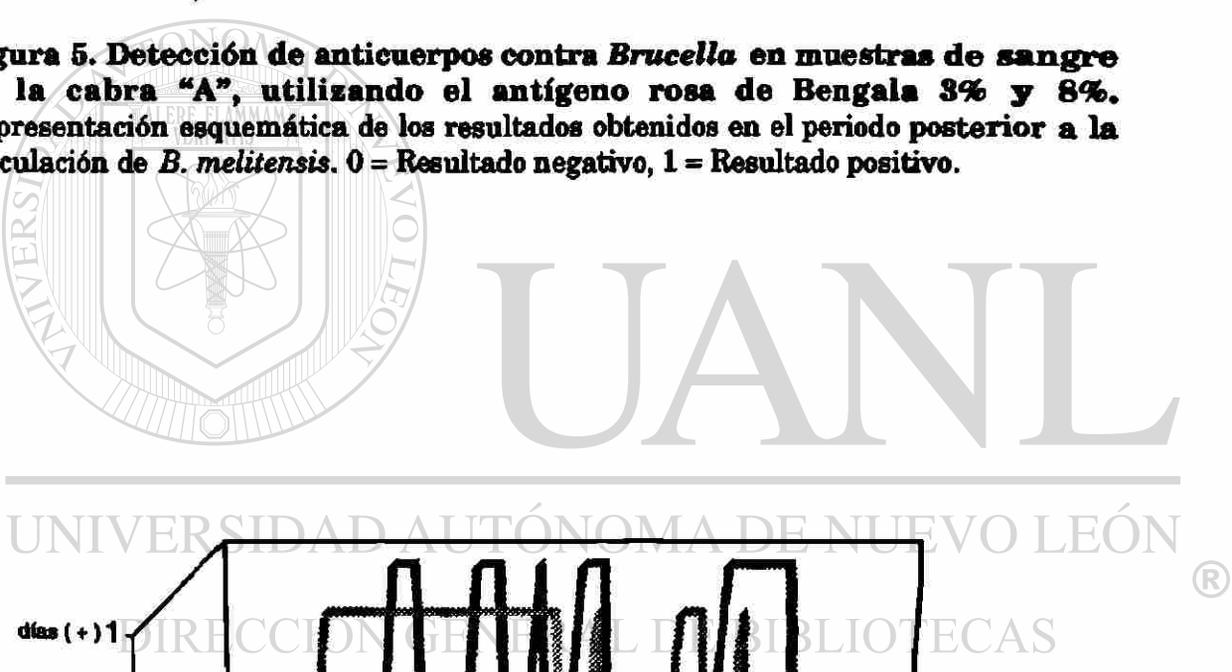


Figura 6. Detección de anticuerpos contra *Brucella* en muestras de sangre de la cabra "B", utilizando el antígeno rosa de Bengala 3% y 8%. Representación esquemática de los resultados obtenidos en el periodo posterior a la inoculación de *B. melitensis*. 0=Resultado negativo, 1=Resultado positivo.

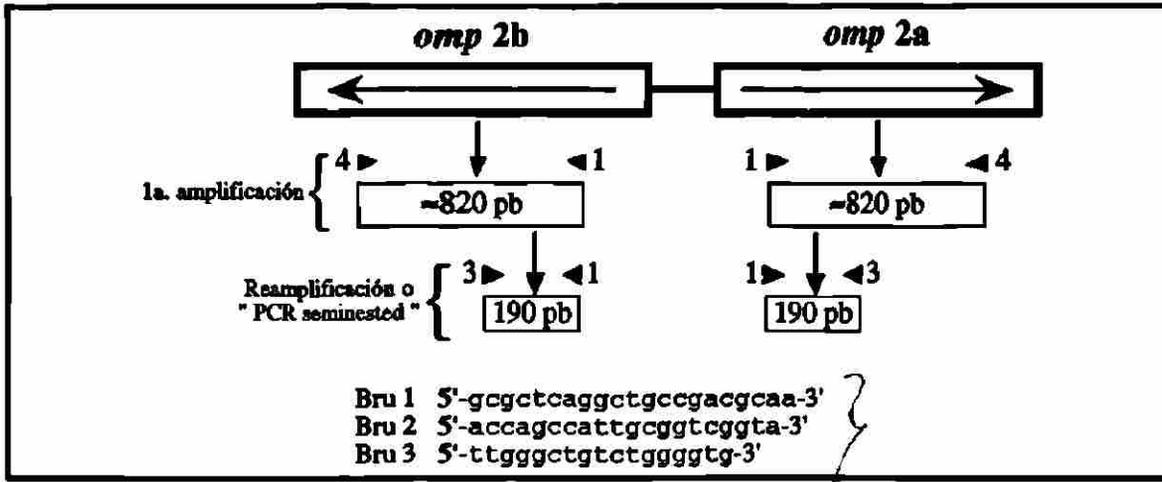


Figura 4. Representación esquemática del PCR seminested. Los rectángulos etiquetados ~ 820 pb representan el producto de la primera amplificación con los iniciadores Bru 1 y Bru 4. Los rectángulos etiquetados con 190 pb son el resultado final de la reacción de PCR seminested con iniciadores Bru 1 y Bru 3.

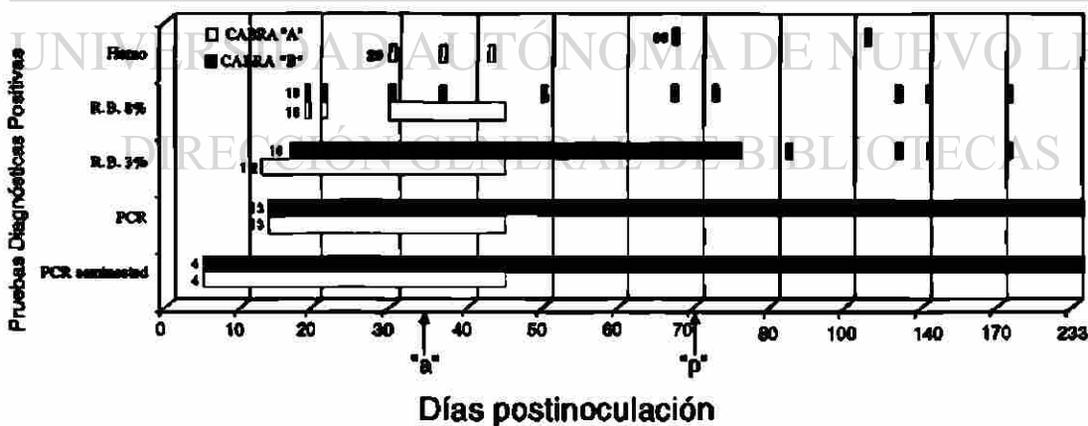


Figura 7. Detección de *B. melitensis* en sangre de cabras inoculadas. Representación esquemática de los resultados positivos obtenidos en el periodo posterior a la inoculación de *B. melitensis* utilizando diferentes pruebas diagnósticas. Hemo=Hemocultivo, RB8%=rosa de Bengala al 8%, RB3%=rosa de Bengala al 3%, PCR=PCR directa con iniciadores Bru 1 y Bru 3, PCR seminested=Reamplificación de muestras previamente amplificadas.

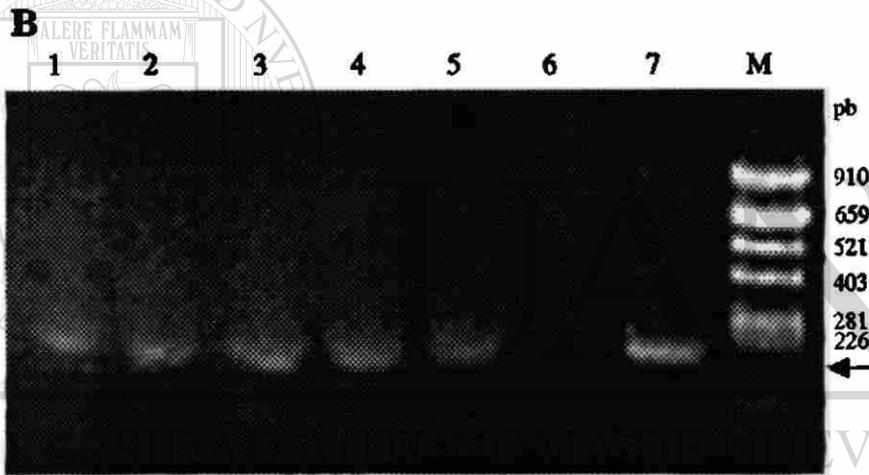
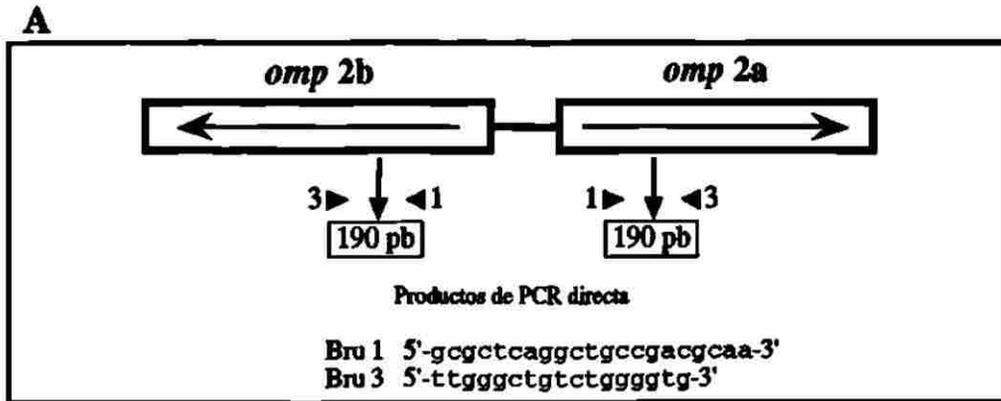
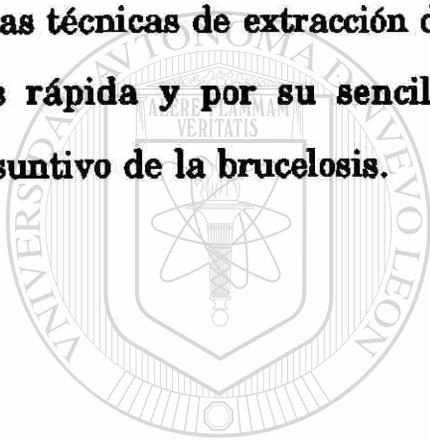


Figura 8. Fragmentos derivados de la PCR directa utilizando iniciadores Bru 1 y Bru 3 en diversas muestras de cabras inoculadas. Panel A. Orientación de las dos copias del gen *omp 2* y posición de los iniciadores utilizados. Los rectángulos punteados representan los fragmentos amplificados de 190 pb. Panel B. Gel de agarosa que muestra los productos de 190 pb, amplificados por PCR directa a partir de DNA extraído de diversas muestras. Carril 1=útero; Carril 2=bazo; Carril 3=médula ósea; Carril 4=sangre; Carril 5=leche; Carril 6=Testigo negativo (DNA de cabra sin brucelosis); Carril 7=Testigo positivo (*B. abortus* S19); Carril M=marcadores de peso molecular pBR322-*Alu* 1.

CONCLUSIONES

- Se logró la infección de cabras inoculadas con *B. melitensis*.
- Se demostró que *B. melitensis* causó la enfermedad en los animales en experimentación, comprobado por sintomatología, observación de daños histopatológicos, reacciones seroaglutinantes, PCR, recuperación y tipificación de la bacteria originalmente inoculada.
- De las dos pruebas serológicas utilizadas, el RB 3% resultó ser la más sensible para detectar anticuerpos contra *Brucella* en etapas tempranas de la infección.
- La prueba serológica RB 8%, no fue consistente en la detección de anticuerpos contra *Brucella*, en etapas tempranas y tardías de la enfermedad, en cambio el RB 3% presentó este comportamiento sólo en etapas tardías.
- La PCR seminested resultó ser la prueba más sensible, que logró detectar la presencia de *B. melitensis* antes que las otras pruebas utilizadas.
- Las pruebas de PCR seminested y PCR directa fueron más consistentes en la detección del microorganismo, comparadas con el cultivo y las pruebas serológicas de RB 3% y 8%.

- **Ambas pruebas de PCR (seminested y directa), detectaron a la bacteria en un mayor número de muestras con respecto al cultivo, y del total de muestras analizadas el coágulo de cavidad cardíaca fue siempre positiva por PCR y cultivo.**
- **Las muestras que se deben utilizar para el diagnóstico de brucelosis, ya sea con PCR o con cualquier otra técnica, son sangre (en animales vivos) y coágulo de cavidad cardíaca (en animales muertos).**
- **De las técnicas de extracción de DNA probadas, la de Kawasaki (51) fue la más rápida y por su sencillez puede ser utilizada en el diagnóstico presuntivo de la brucelosis.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



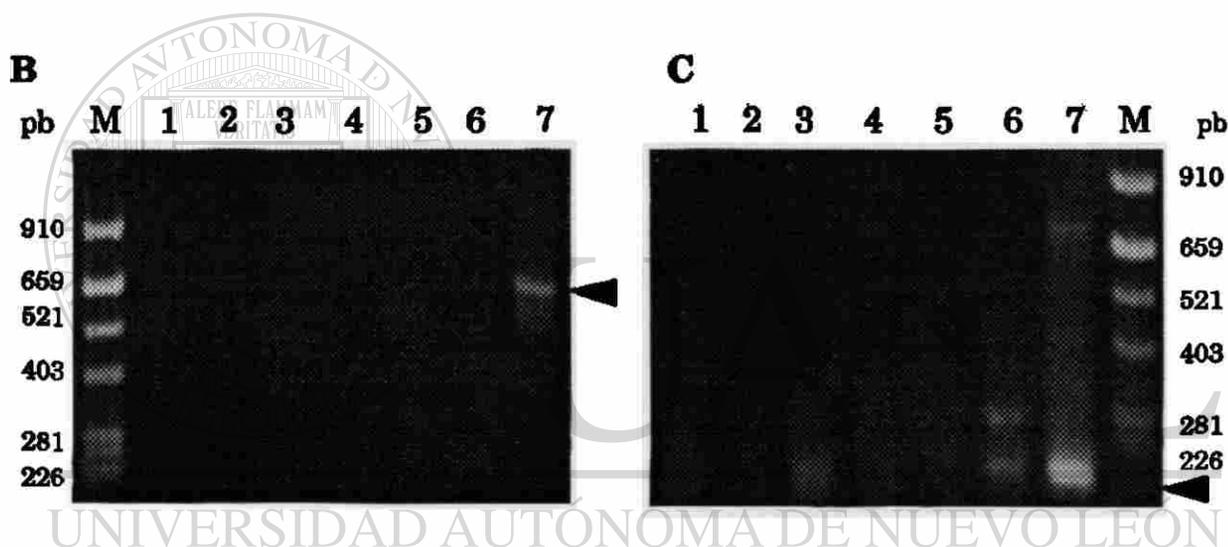
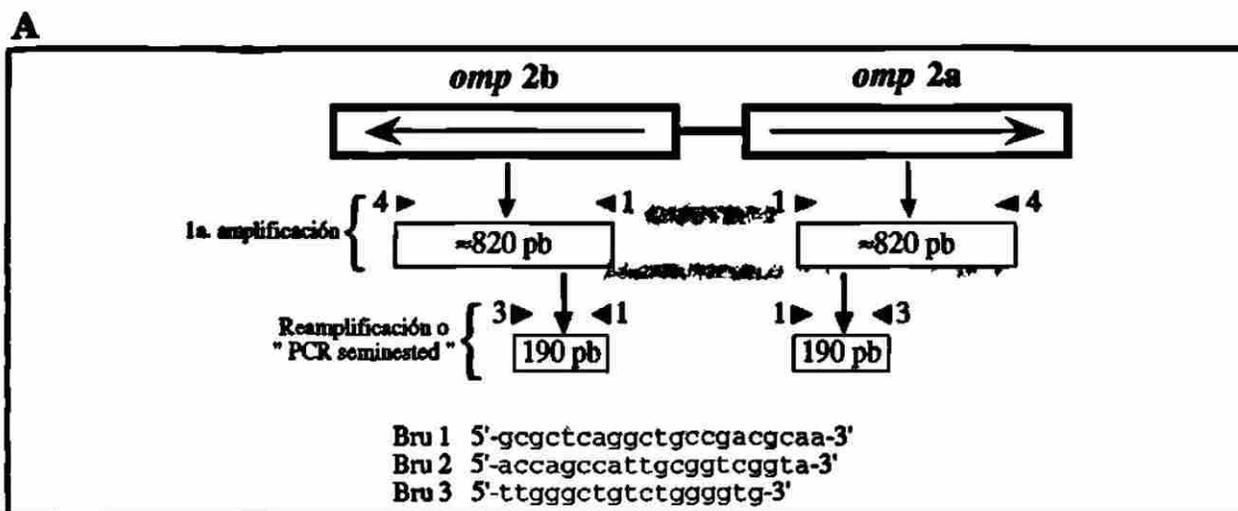


Figura 9. PCR seminested en sangre y exudado vaginal de cabras inoculadas. Panel A. Representación esquemática de la orientación de las dos copias del gen *omp 2* y posición de los iniciadores (Bru 1, 3 y 4). Los rectángulos etiquetados ~ 820 pb representan el producto de la primera amplificación con los iniciadores Bru 1 y Bru 4. Los rectángulos etiquetados 190 pb son el resultado final de la reacción de Seminested PCR con iniciadores Bru 1 y Bru 3. Panel B. Fraccionamiento en gel de agarosa de los productos de la primera amplificación. Carril M es el marcador de peso molecular PBR 322-*Alu I*. Carriles 1 - 3, muestras de sangre de caprinos infectados tomados a diversas fechas; carriles 4 - 6, muestras de exudados vaginales de caprinos infectados tomados a diversas fechas; carril 7, testigo positivo (*Brucella abortus*). Panel C. Productos de la reamplificación o PCR seminested, el contenido de los carriles es el mismo que el descrito para el Panel B.

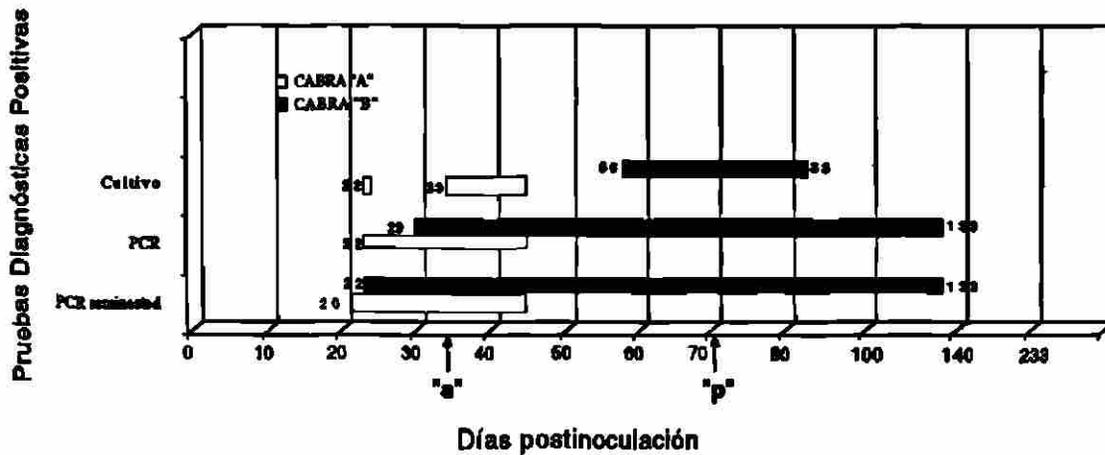


Figura 10. Detección de *B. melitensis* en exudado vaginal de cabras inoculadas. Representación esquemática de los resultados positivos obtenidos en el periodo posterior a la inoculación de *B. melitensis* utilizando diferentes pruebas diagnósticas. Cultivo=Aislamiento microbiológico, PCR=PCR directa con iniciadores Bru 1 y Bru 3, PCR seminested=Reamplificación de muestras previamente amplificadas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

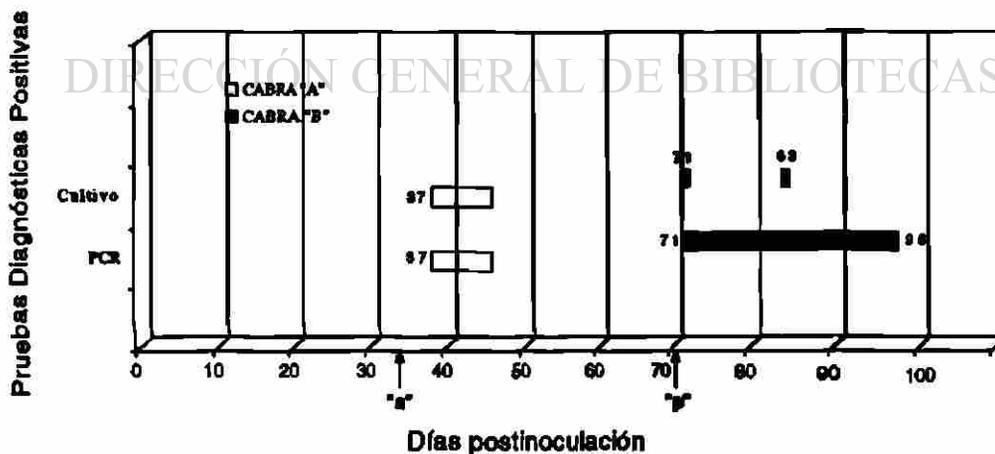


Figura 11. Detección de *B. melitensis* en leche de cabras inoculadas. Representación esquemática de los resultados positivos obtenidos con diferentes pruebas diagnósticas, durante el periodo de lactancia de cada animal. Cultivo=Aislamiento microbiológico, PCR=PCR directa con iniciadores Bru 1 y Bru 3.

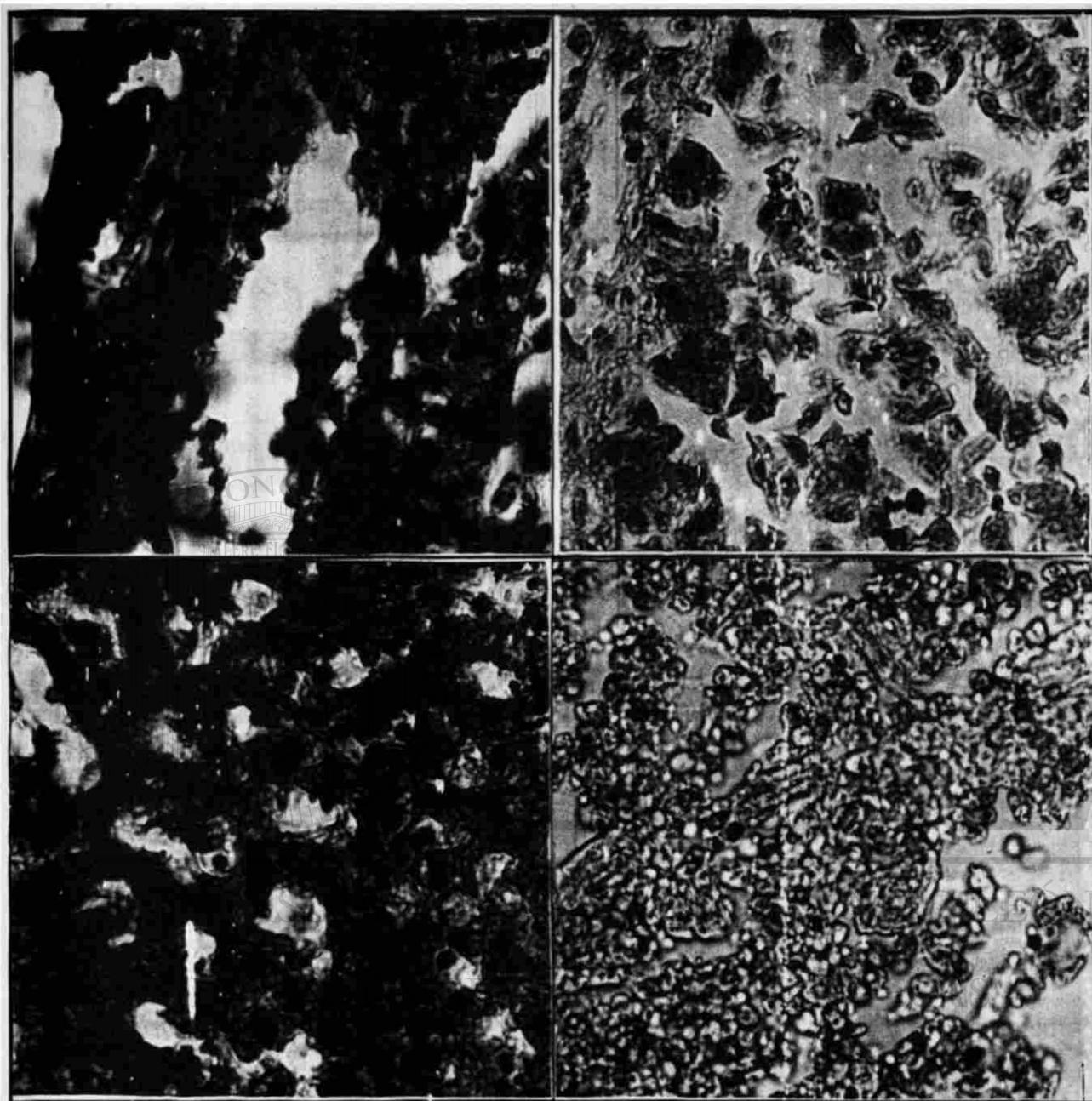


Figura 12. Cortos histológicos de tejido infectado con *B. melitensis*. A. Útero con una reacción inflamatoria en mucuosa y detritos celulares, focos de hemorragia y edema marcado; B. Pulmón con desepitelización marcada de los bronquiolos, infiltrado inflamatorio linfocitario, edema marcado y presencia de material fibrinoide; C. Hígado con un cambio graso marcado, desarreglo de los cordones hepáticos, edema discreto y congestión moderada difusa; D. Tinción de Gram en útero, donde se aprecia en color naranja células polimorfonucleares y abundantes detritos celulares.

Tabla 1. Porcentaje de muestras positivas por PCR directa y cultivo.

Prueba diagnóstica	Adultos		Fetos		Totales	
Cultivo	35.9%	(14/39)	37.5%	(9/24)	36.50%	(23/63)
PCR	92.3%	(36/39)	95.8%	(23/24)	93.65%	(54/63)

Tablas 2 y 3. Resultados de la detección de *B. melitensis* con PCR directa y cultivo, en tejidos y fluidos internos de feto hembra y feto macho.

Muestras de feto hembra	PCR	Cultivo
Bazo	+	+
Cerebro	+	-
Corazón	+	-
Hígado	+	+
Médula espinal	+	+
Médula ósea	+	-
Pulmón	+	+
Riñón	+	+
Coágulo de cavidad cardíaca	+	+
Contenido gástrico	+	-
Líquido céfaloraquídeo	+	+
Líquido sinovial	+	-

Muestras de feto macho	PCR	Cultivo
Bazo	+	-
Cerebro	-	-
Corazón	+	-
Hígado	+	-
Médula espinal	+	-
Médula ósea	+	-
Pulmón	+	-
Riñón	+	-
Coágulo de cavidad cardíaca	+	+
Contenido gástrico	+	+
Líquido céfaloraquídeo	+	-
Líquido sinovial	+	-

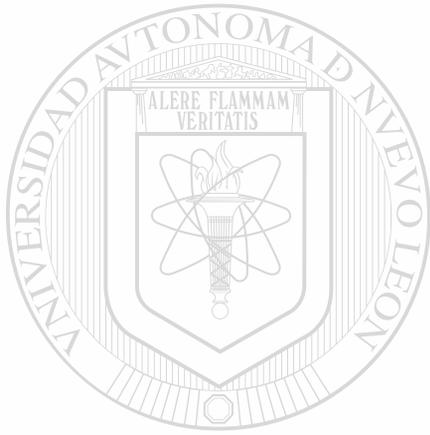
Tablas 4 y 5. Resultados de la detección de *B. melitensis* con PCR directa y cultivo, en tejidos y fluidos internos de cabras "A" y "B".

Muestras de cabra "A"	PCR	Cultivo
Bazo	+	+
Cerebro	+	-
Corazón	+	-
Cotiledón	+	+
Ganglio linfático	+	-
Glándula mamaria	+	+
Glándula salival	+	-
Hígado	+	-
Médula espinal	+	+
Médula ósea	+	+
Ojo	+	-
Páncreas	+	-
Pulmón	+	-
Riñón	+	+
Útero	+	+
Vejiga	+	-
Líquido amniótico	+	+
Líquido cefaloraquídeo	+	-
Líquido sinovial	+	-
Coágulo de cavidad cardíaca	+	+
Contenido de útero	+	-

Muestras de cabra "B"	PCR	Cultivo
Bazo	+	+
Cerebro	+	-
Corazón	+	-
Ganglio linfático	+	-
Glándula mamaria	-	-
Glándula salival	-	-
Hígado	+	-
Médula espinal	+	+
Médula ósea	+	-
Ojo	+	-
Páncreas	-	-
Pulmón	+	-
Riñón	+	-
Útero	+	+
Vejiga	+	-
Líquido cefaloraquídeo	+	-
Líquido sinovial	+	+
Coágulo de cavidad cardíaca	+	+

Tabla 6. Concentrado de resultados de PCR directa y cultivo en tejidos y fluidos intracorporales de cabras adultas inoculadas y fetos.

		Razo	Ribón	Coágulo	M. espinal	Hígado	Pulmón	Corazón	L. cefaloroquídeo	L. anobial	M. ósea	Útero	GL. linfático	Ojo	Vejiga	Cerebro	GL. mamaria	GL. salival	Páncreas	C. gástrico	C. útero	L. amniótico	Coledón
CULTIVO	CABRA A	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	ND	-	+	+	
	CABRA B	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	
	FETO ♀	+	+	+	+	+	-	+	-	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	
	FETO ♂	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	
PCR	CABRA A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	
	CABRA B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND	
	FETO ♀	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	
	FETO ♂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LITERATURA CITADA

1. **Alton, G. G. 1985.** The Epidemiology of *Brucella melitensis* infections in sheep and goats. p. 187-196. *In: Brucella melitensis.* J. M. Verger and M. Plomet (ed.). Martinus Nijhobb publishers for CFC. The Haugue.
2. **Alton, G. G., L. M. Jones, R. D. Angus, and J. M. Verger. 1988.** Techniques for the Brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique INRA. Imprimerie Louis Jean, Paris.
3. **Anderson, T. D. 1986.** Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with *Brucella abortus*. I.- Gross and Histologic Lesions. II.- Ulltrastuctura Studies. *Vet. Pathol.* 23:219-277.
4. **Arnheim, N., T. White, and W. E. Rainer. 1990.** Application of PCR: Organismal and Population Biology. *Science* 40:174-182.
5. **Atlas, R. M., and A. K. Bej. 1990.** Detecting bacterial pathogens in enviromental water samples by using PCR and gene probes. p. 399-406. *In: PCR Protocols. A guide to methods and applications.* G. Innis M. A., D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (ed.). Academic Press, San Diego California.
6. **Aurelius, E., B. Johansson., B. Sköldenberg., Å. Staland., and M. Forsgren. 1991.** Rapid Diagnosis of Herpes Simplex Encephalitis by Nested Polymerase Chain Reaction Assay of Cerebrospinal Fluid. *Lancet* 337:189-192.
7. **Baily, G. G., J. B. Krahn, B. S. Drasar, and N. G. Stoker. 1992.** Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA Amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 95:271-275.
8. **Balows, A., W. J. Hausler, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy. 1991.** Manual of Clinical Microbiology. fifth ed. Coordinating ed., A. Balows, Washington, D. C.
9. **Barbuddhe, S. B., V. K. Yadava, and D. K. Singh. 1994.** Detection of IgM and IgG antibodies against *Brucella* by dot-ELISA in humans. *J. Commun. Dis.* 26:1-5.
10. **Beal, V. C. 1984.** Current estimated brucellosis losses. Veterinary Services. Animal and Plant Health Inspection Services. U.S. Department of Agriculture. Hyattsville, Md.
11. **Blood, D. C., J. A. Henderson, O. M. Rodostits, J. H. Arundel, y C. C. Gay. 1988.** Brucelosis causada por *Brucella melitensis*. p. 680-681. *In:*

Medicina Veterinaria. 5a. ed. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México.

12. **Breitmeyer, R. E., D. W. Hird, and T. E. Carpenter. 1992.** Serologic and Bacteriologic Test Results After Adult Vaccination With Strain 19 in Three Dairy Herds Infected With Brucellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200:806-811.
13. **Bricker, B. J., and S. M. Halling. 1994.** Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:2660-2666.
14. **Bricker, B. J., and S. M. Halling. 1995.** Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR Assay for Differentiation of *Brucella abortus* Vaccine Strains S19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.* 33:1640-1642.
15. **Burgener-Kairuz, P., J.-P. Zuber, P. Jaunin, T. G. Buchman, J. Bille, and M. Rossier. 1994.** Rapid Detection and Identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida glabrata)* in Clinical Specimens by Species-Specific Nested PCR Amplification of a Cytochrome P-450 Lanosterol-a-Demethylase (L1A1) Gene Fragment. *J. Clin. Microbiol.* 32:1902-1907.
16. **Callis, J., H. Bachrach, J. Bittle, J. Dalrymple, R. Gamble, J. Glosser, F. Murphy, A. Thiermann, and S. Thompson. 1989.** Biotechnology and its public health implications in zoonotic diseases. p. 377-400. *In: Biotechnology for livestock production.* Plenum Press, New York.
17. **Canning, P. C. 1990.** Phagocyte function in resistance to brucellosis. p. 151-163. *In: Advances in Brucellosis Research.* L. G. Adams. (ed.). College Station Press. Texas, A&M University.
18. **Castañeda, M. R. 1974.** Studies on the Pathogenesis of Brucellosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 64:289.
19. **Cheville, N. F., A. E. Jensen, D. C. Morfitt, and T. J. Stabel. 1994.** Cutaneous Delayed Hypersensitivity of Cattle Vaccinated With Mutant Strains of *Brucella abortus*, Using Brucellins Prepared. *Am. J. Vet. Res.* 55:1261-1266.
20. **Corbel, M. J. 1989.** Brucellosis, microbiological aspects. p. 29-31. *In: Brucellosis.* M. M. Madkour (ed.), University Press, Cambridge, U.K.
21. **Corbel, M. J., and W. J. Brinley-Morgan. 1984.** Genus *Brucella*. p. 377-388. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* N. Krieg, and J. Holt (ed.), vol. 1. Williams & Wilkins Co, Baltimore/London.

22. **Cordes, D. O., and M. E. Carter. 1979.** Persistency of *Brucella abortus* infection in six herds of cattle under brucellosis eradication. *NZ Vet. J.* **27**:255-259.
23. **Crespo, L. F. 1994.** *Brucelosis Ovina y Caprina*. Primera ed. Office International des Epizooties, Paris, Francia.
24. **Delgado, S., M. Fernandez, and P. Carmenes. 1995.** Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of sheep infected and vaccinated with *Brucella melitensis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **72**:206-209.
25. **DGESSA.ISSN/1405-2636. 1996.** Boletín Mensual de Epidemiología. Sistema Unico de Información. p. 11-20. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. vol. **13**.
26. **Díaz-Aparicio, E. 1993.** Diagnóstico serológico de la brucelosis caprina. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra España.
27. **Díaz-Aparicio, E., C. Marín, B. Alonso-Urmeneta, V. Aragón, S. Pérez-Ortiz, M. Pardo, J. M. Blasco, R. Díaz, and I. Moriyón. 1994.** Evaluation of Serological Tests for Diagnosis of *Brucella melitensis* Infection of Goats. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1159-1165.
28. **Diosdado, F., E. Corona, S. Soria, L. Salgado, E. Días, y A. Morilla. 1994.** Frecuencia de anticuerpos contra brucelosis porcina en algunas explotaciones de la República Mexicana. p. 90. XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias.
29. **Eisentein, B. I. 1990.** The Polimerase Chain Reaction: A New Method of Using Molecular Genetics for Medical Diagnosis. *N. Engl. J. Med.* **322**:178-183.
30. **Enright, F. M. 1990.** The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. p. 301-320. *In: Animal Brucellosis*. K. Nielsen, and J. R. Duncan (ed.), CRC Press, Boca Raton Florida.
31. **Erlich, H. A., D. Gelfand, and J. J. Sninsky. 1991** Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* **252**:1643-1651.
32. **Falade, S. 1978.** A Comparison of Three Serological Test in the Diagnosis of Caprine Brucellosis. *Res. Vet. Sci.* **24**:376-377.
33. **Fekete, A., J. A. Bantle, and S. M. Halling. 1992.** Detection of *Brucella* by Polymerase Chain Reaction in Bovine Fetal and Maternal Tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**:79-83.
34. **Fekete, A., J. A. Bantle, S. M. Halling, and M. R. Sanborn. 1990.** Preliminary Development of a Diagnostic Test for *Brucella* Using Polymerase Chain Reaction. *J. Appl. Bacteriol.* **69**:216-227.

35. **Fekete, A., J. A. Bantle, S. M. Halling, and R. W. Stich. 1992.** Amplification Fragment Length Polymorphism in *Brucella* Strains by use of Polimerase Chain Reaction with Arbitrary Primers. *J. App. Bact.* **174:7778-7783.**
36. **Feray, C., D. Samuel, V. Thiers, M. Gigon, F. Pichon, A. Bismuth, M. Reynes, P. Maisonneuve, H. Bismuth, and C. Brechot. 1992.** Reinfection of Liver Graft by Hepatitis C After Liver Transplantation. *J. Clin. Invest.* **89:1361-1365.**
37. **Frankel, G., L. Riley, J. A. Giron, N. Strockbine, S. Falkow, and G. K. Schoolnik. 1990.** Detection of *Shigella* in Feces Using DNA Amplification. *J. Infec. Dis.* **161:1252-1256.**
38. **García, C. J., y A. A. Espinoza. 1992.** Incidencia de brucelosis (*Brucella melitensis*) en cabras de Nuevo León, México. Memorias del IX Congreso Nacional Caprino. 22-25 de septiembre de 1992, Monterrey, N.L. México.
39. **García-Carrillo, C. 1990.** Animal and Human Brucellosis in the Americas. Office International des Epizooties, Paris, Francia.
40. **García-Carrillo, C. 1987.** La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana. Oficina internacional de Epizootias., Paris.
41. **Gottuzo, E., C. Carrillo, J. Guerra, and L. Llosa. 1986.** An Evaluation of Diagnostic Methods for Brucellosis . The Value of Bone Marrow Culture. *J. Infec. Dis.* **153:122-124.**
42. **Gyles, C. L., and C. O. Thoen. 1993.** Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Second ed. Coordinating ed., I. S. University, Ames, Iowa.
43. **Hamelin, R. C., P. Bérubé, M. Gignag, and M. Bourassa. 1996.** Identification of Root Rot Fungi in Nursery Seedlings by Nested Multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62:4026-4031.**
44. **Haqqi, T. M., G. Sarkar, C. S. David, and S. S. Sommer. 1988.** Specific Amplification of a Refractory Segment of Genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **16:1844.**
45. **Herman, L., and H. D. Ridder. 1992.** Identification of *Brucella* spp. by Using the Polimerase Chain Reaction. *App. Env. Microbiol.* **58:2099-2101.**
46. **Hernández-Monroy, I., P. Peña-Flores, y X. Betancourt-Morillo. 1996.** Brucelosis. Publicación Técnica del INDRE-SSA, Manual de procedimientos de laboratorio. vol. 19. INDRE/SAGAR.
47. **Hofner, M. C., W. C. Carpenter, N. P. Ferris, R. P. Kitching, and F. Ariza-Botero. 1994.** A Hemi-Nested PCR Assay for the Detection and

- Identification of Vesicular Stomatitis Virus Nucleic Acid. *J. Virol. Methods* **50**:11-30.
48. **Hutyra, F., M. J., y R. Manniger. 1973.** Patología y terapéutica de los animales domésticos. Editorial Labor, S. A., Barcelona.
49. **Jawetz, E., J. L. Melnik, y E. A. Adelberg. 1985.** Microbiología Médica. 11a edición. El manual moderno, México, D.F.
50. **Kaneko, S., S. M. Feinstone, and R. H. Miller. 1989.** Rapid and Sensitive Method for the Detection of Serum Hepatitis B Virus DNA Using the Polymerase Chain Reaction Technique. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1930-1933.
51. **Kawasaki, E. S. 1990.** Sample preparation from blood, cells, and other fluids. p. 146-152. In: PCR Protocols. A guide to methods and applications. A. Michael, D. Innis, H. Gelfand, J. J. S., and T. J. W. (ed.), Firsth. ed. CRC Press, London.
52. **Kittelberger, R., F. Hilbin, M. F. Hansen, and M. Penrose. 1995.** Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9. I immunoblot analysis of the antibody response to *Brucella* protein antigens in bovine brucellosis. *Vrt. Microbiol.* **47**:3-4.
53. **Kolar, J. 1987.** Goat brucellosis and human health. IV Conference on goats. Empresa Brasileira do Pesquisa Agropecuaria.
54. **Krambovitis, E., J. Tselentis, and D. Tsoukatos. 1992.** A simple Enzyme Immunoassay for Detecting Brucellosis Antibodies. *FEMS Microbiol. Immunol.* **4**:129-136.
55. **Kulakov, Y. K., V. N. Gorelov, V. L. Motin, G. V. Brukhanskii, and A. G. Skavroskaya. 1992.** A Highly Sensitive Nonisotopic DNA Hybridization System Using Amplification (PCR) for the Identification and Indications of *Brucella*. *Molekulyarnaya Genetika, Microbiologiya i Vurisologiya* **7-8**:23-27.
56. **Leal-Klevezas, D. S., A. López-Merino, and J. P. Martínez-Soriano. 1995.** Molecular Detection of *Brucella* spp.: Rapid Identification of *B. abortus* biovar 1 Using PCR. *Arch. Med. Res.* **26**:263-267.
57. **Leal-Klevezas, D. S., I. O. Martínez-Vázquez, A. López-Merino, and J. P. Martínez-Soriano. 1995.** Single Step PCR for the Detection of *Brucella* spp. From Blood and Milk of Infected Animals. *J. Clin. Microbiol.* **33**:3087-3090.
58. **Leal-Klevezas, D. S., I. O. Martínez-Vázquez, y J. P. Martínez-Soriano. 1995.** "Nested PCR" en la Confirmación del Diagnóstico de Brucelosis en Humanos. p. 16. Reunión Regional de Investigación Médica del IMSS.

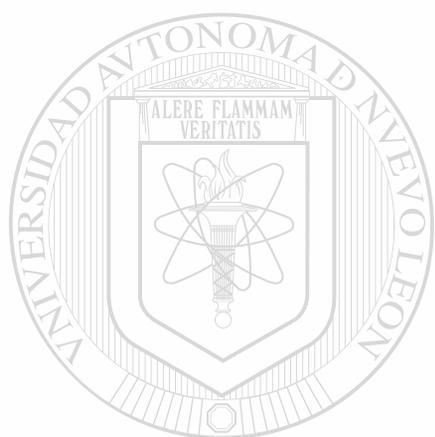
59. **Lebech, A. M., and K. Hansen. 1992.** Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in Urine Samples and Cerebrospinal Fluid Samples From Patients with Early and Late Lyme Neuroborreliosis by Polimerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**:1646-1653.
60. **López-Merino, A. 1991.** Brucelosis. Avances y perspectivas. p. 54. Publicación Técnica del INDRE-SSA, No. 6.
61. **Madkour, M. M. 1989.** Historical aspects of brucellosis. p. 1-9. *In: Brucellosis.* M. M. Madkour (ed.), University Press, Cambridge, U.K.
62. **Mahbubani, M. H., and A. K. Bej. 1994.** Applications of polymerase chain reaction methodology in clinical diagnostics. p. 307-326. *In: PCR Technology. Current Inovations.* Hugh G. Griffin and Annette M. Griffin (ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
63. **Martín-Moreno, S., L. Guinea-Esqueda, P. Carreró-González, R. Visedo-Orden, S. García-Carbajosa, T. Calvo-del-Olmo, and D. REverte-Cejudo. 1992.** Diagnosis of Brucellosis in an Area. Evaluation of Routine Diagnostic Test. *J. Med. Clin. Barc.* **98**:481-485.
64. **Martínez-Soriano, J. P., E. L. Cab-Barrera, R. Tamez-González, y D. S. Leal-Klevezas. 1993.** Detección de *Brucella abortus* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Bioquímica* **18**:10-16.
65. **Martínez-Vázquez, I. O. 1995.** Detección molecular de *Brucella* sp. en muestras de sangre y leche de caprinos. Tesis de licenciatura en Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Universidad Autónoma de Nuevo León.
66. **Matar, G. M., I. A. Khneisser, and A. M. Abdelnoor. 1996.** Rapid Laboratory Confirmation of Human Brucellosis by PCR Analysis of a Target Secuence on the 31-kilodalton *Brucella* Antigen DNA. *J. Clin. Microbiol.* **34**:477-478.
67. **Mathur, T. N. 1967.** Isolation of *Brucella abortus* From Goats and Sheep in the Punjab. *Ind. J. Vet. Sci.* **37**:277-286.
68. **Matsumoto, C., S. Mitsunaga, T. Oguchi, Y. Mitomi, T. Shimada, A. Ichikawa, J. Watanabe, and K. Nishioka. 1990.** Detection of Human T-cell Leukemia Type (HTLV-1) Provirus in an Infected Cell Line an in Peripheral Mononuclear Cells of Blood Donors by the Nested Double Polymerase Chain Reaction Method: Comparison With HTLV-1 Antibody Tests. *J. Virol.* **64**:5290-5294.
69. **Meyer, A., and M. Shaw. 1984.** Genus *Brucella*. p. 377-378. *In: , Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1.*

70. Meyer, M. E. 1990. Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella*. p. 1-18. In: Animal brucellosis. Klaus Nielsen and J. Robert Duncan (ed.), vol. 1, Boca Raton, Florida, USA.
71. Milner, A. R., W. N. M. Mack, K. J. Coates, J. Hill, I. Gill, and P. Sheldrick. 1990. The Sensitivity and Specificity of a Modified ELISA for the Diagnosis of Johne's Disease From a Field Trial in Cattle. *Vet. Microbiol.* 25:193-198.
72. Morgan, W. T. B., and A. McDiarmid. 1960. The Excretion of *Brucella abortus* in the Milk of Experimentally Infected Cattle. *Res. Vet. Sci.* 1:53-56.
73. Mullis, K. B. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.* 262:56-65.
74. Nicoletti, P. 1989. Brucellosis in animals. Control, eradication and prevention. p. 250-280. In: Brucellosis. M. M. Madkour (ed.), vol. 21. University Press, Cambridge, Great Britain.
75. Nicoletti, P. 1980. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 24:69-84.
76. Nicoletti, P. 1982. Problems in the control of caprine brucellosis. Third International Conference on goat production and disease. Tucson, Arizona.
77. NOM-041-ZOO-1995. 1996 Norma Oficial Mexicana. Campaña Nacional contra la brucelosis en los animales. p. 43-54. Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
78. Oggioni, M. R., L. Fattorini, B. Li, A. De Milito, M. Zazzi, G. Pozzi, G. Orefici, and P. E. Valensin. 1995. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by Selective Nested Polymerase Chain Reaction. *Mol. Cell Probes* 9:321-326.
79. Pacheco, G. M., and T. d. Mello. 1956. Brucelose. Monografias do Instituto Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro.
80. Perry, M., and D. R. Bundle. 1990. Antigenic Relationships of the Lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* Strains With Those of *Escherichia coli* O157:H7, *Brucella melitensis*, and *Brucella abortus*. *Inf. Immun.* 58:1391-1395.
81. Persing, D. H., T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White. 1993. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. American Society of Microbiology. Washington, D. C.
82. Pierre, C., D. Lecossier, Y. Boussougant, D. Bocart, V. Joly, P. Yeni, and A. J. Hance. 1991 Use of a Reamplification Protocol Improves Sensitivity

- of Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples by Amplification of DNA. *J. Clin. Microbiol.* **29**:712-717.
83. **Podzorski, R. P., and D. H. Persing. 1993.** Molecular detection and identification of microorganisms. p. 130-155. *In: Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications.* T. F. S. David H. Persing, Fred C. Tenover, Thomas J. White (ed.). ASM Press, Washington, D. C.
 84. **Radwan, A. I., S. I. Bekairi, and A. A. Mukayel. 1992.** Treatment of *Brucella melitensis* Infection in Sheep and Goats With Oxytetracycline Combined With Streptomycin. *Rev. Sci. Tech* **11**:845 - 857.
 85. **Rijpens, N. P., G. Jannes, M. V. Asbroeck, R. Rossau, and L. M. F. Herman. 1996.** Direct Detection of *Brucella* spp. in Raw Milk by PCR and Reverse Hybridization With 16S-23S rRNA Spacer Probes. *App. Env. Microbiol.* **62**:1683-1688.
 86. **Rodríguez, J. C., E. Fuentes, and G. Royo. 1997.** Comparison of two different PCR detection methods. Application to the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *APMIS* **105**:612-616.
 87. **Romero, C., C. Gamazo, M. Pardo, and I. López-Goño. 1995.** Specific Detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**:615-617.
 88. **Romero, C., M. Pardo, M. J. Grillo, R. Díaz, J. M. Blasco, and I. López-Goñi. 1995.** Evaluation of PCR and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on Milk Samples for Diagnosis of Brucellosis in Dairi Cattle. *J. Clin. Microbiol.* **33**:3198-3200.
 89. **Roux, J., and C. Arnaud-Bosq. 1975.** The intracellular multiplication of *Brucella*. The theory for an experimental model. *Ann. Microbiol.* **126A**:461-481.
 90. **Ruiz-Castañeda, M. 1986.** Brucellosis. Tercera ed. La Prensa Médica, México, D.F.
 91. **Russel, A., W. S. Runnels y A. W. Monlux. 1978.** Principios de Patología Veterinaria. 8a edición. Editorial CECSA, México, D.F.
 92. **Rys, P. N. 1993.** PCR detection of *Borrelia burgdorferi*. p. 203-210. *In: Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications.* T. F. S. David H. Persing, Fred C. Tenover, Thomas J. White (ed.). ASM Press, Washington, D. C.
 93. **SAGAR. 1997.** Prevalencia de brucelosis caprina para 3 zonas del estado de Nuevo León, hasta 1995. Subdelegación de Ganadería del estado de Nuevo León.

94. **Saiki, R. K. 1990.** Amplification of genomic DNA. p. 13-20. *In: PCR Protocols. A guide to methods and applications.* Academic Press (ed.), , San Diego California, USA.
95. **Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis, G. Horn, H. Erlich, and N. Arnheim. 1985.** Novel Method for the Prenatal Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Am. J. Hum. Gen.* **37:172.**
96. **Sáins-Moreno, L. 1987.** La historia natural de la brucelosis humana en España (Aspectos epidemiológicos). *Información veterinaria* no. 65. ed, España.
97. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.** *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
98. **Sanz Egaña, C. 1942.** El ganado cabrío. Raza, explotación y enfermedades. Ed. Espasa Caepe. S.S., Madrid.
99. **Schurig, G. G., R. M. I. Roop, T. Bagchi, S. M. Boyle, D. Buhrman, and N. Sriranganathan. 1991.** Biological Propierties of RB51; a Stable Rough Strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* **28:171-188.**
100. **Sotillo, J. L., y V. Serrano. 1985.** Producción animal. Etnología zootécnica. Editorial Tébar, Madrid.
101. **Spink, W. W. 1956.** Brucelosis. University of Minesota, U.S.A.
102. **Uchihi, R., T. Yamamoto, T. Kojima, K. Tamaki, and Y. Katsumata. 1994.** Efficient Amplification of the HLA-DQA1 Gene in Single Genomes Using a Semi Nested Polymerase Chain Reaction. *Nippon Hoigaku Zasshi* **48:329-335.**
103. **Valdespino, O. J. R. 1994.** Impacto económico de la brucelosis y tuberculosis bovina durante 1992 en México. p. 858. XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, Gro. México.
104. **Varela-Díaz, V. M., L. M. Jones, and M. V. Pérez-Escandi. 1973.** *Brucella melitensis* Rev 1 and *Brucella abortus* 45/20 Vaccines in Goats: Pattern of Immunoglobulin Production After Vaccination and Challenge. *Am. J. Vet. Res.* **34:203-207.**
105. **Young, E. J., and M. J. Corbel. 1989.** *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects.* CRC Press, Inc. Boca Ratón. FL.
106. **Young, K. K. Y. 1994.** The Detection of Mycobacterial DNA Using PCR. p. 537-558. *In: PCR Based Diagnostics in Infectious Disease.* G. D. Ehrlich, and G. S. J. (ed.), First ed. Blackwell Scientific Publications Inc., Massachusetts, USA.

107. **Zavala, T. L., Z. A. Nava, C. J. Guerra, and M. C. Quiroz. 1994. Brucellosis. p. 225-241. Infectious disease clinics of North America. vol. 8.**
108. **Zinsser. 1988. Microbiology. Nineteenth ed. Coordinating ed., A. Lange.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®