



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

TESIS

**“FENOTIPIFICACIÓN DE *Brucella microti* POR MÉTODOS
MICROBIOLÓGICOS CLÁSICOS Y PRUEBAS DE
ACTIVIDAD METABÓLICA.”**

**“PARA OBTENER EL GRADO DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO”**

PRESENTA
JOSÉ EDUARDO MARTÍNEZ GARCÍA

DIRECTOR
P.h D.C ELSA IRACENA CASTAÑEDA ROLDÁN

ASESOR INTERNO
D.C ANA MARTA LOBO SANCHEZ

24 de abril del 2015

Índice

| | Página. |
|--|---------|
| Agradecimientos | i |
| Resumen. | ii |
| Índice de tablas. | iii |
| Índice de Figuras. | iii |
| Introducción. | 1 |
| Marco teórico | 2 |
| 1. Características Generales del género <i>Brucella</i> | 2 |
| 2. Especiación | 2 |
| 3. Fisiología | 4 |
| 4. Metabolismo | 6 |
| 5. Brucelosis | 9 |
| 6. Patogenicidad | 10 |
| 7. Epidemiología | 10 |
| 8. Cuadro clínico | 12 |
| 9. Métodos directos para el diagnóstico de brucelosis | 12 |
| 10. Métodos indirectos para el diagnóstico de brucelosis | 13 |
| 11. Tratamiento | 13 |
| Marco de referencia | 14 |
| Planteamiento del problema | 16 |
| Justificación | 17 |
| Objetivos | 18 |
| Hipótesis | 19 |
| Diseño de la investigación | 20 |
| Material y Metodologías | 21 |
| Pruebas de biología molecular | 22 |
| Pruebas de actividad metabólica | 23 |
| Pruebas especiales para el Género <i>Brucella</i> | 24 |
| Diagramas de trabajo | 26 |
| Resultados y Discusión | 29 |
| Conclusiones | 36 |
| Bibliografía | 37 |

Agradecimientos

A mis papas y hermano, que me han apoyado incondicionalmente a lo largo de mi vida y durante mi carrera, porque siempre me han sabido aconsejar sabiamente guiándome a ser una mejor persona día a día.

A mis tías Alicia, Rosa y Vero que han velado por mí a la par de mis papas sin tener alguna obligación.

A la D.C Elsa Castañeda, por haberme brindado la oportunidad de trabajar a su lado durante 3 años, por toda esa paciencia que me tuvo, por la calidez humana, profesional y la amistad que me ha brindado a lo largo de estos años.

A la D.C Martha Lobo por ser la primera en creer en mí y por la amistad y cariño que me brinda.

A mis amigos Iván, Steff, Luisa Dania, Sol e Itzel, que hicieron que los 5 años de carrera fueran toda una aventura a su lado haciendo el camino más fácil y divertido.

A Laurita quien siempre fue una amiga incondicional y aunque ya no está a mi lado su espíritu siempre estará aquí.

Resumen

El género *Brucella* es el agente causal de una zoonosis cuya incidencia es ampliamente distribuida en el mundo, generando múltiples pérdidas económicas. Tradicionalmente se consideraban seis especies dentro del género *Brucella*, pero en la actualidad se han descubierto especies emergentes que no han sido estudiadas con detenimiento como es *Brucella microti*. Por lo cual fue necesario determinar sus características fenotípicas con el fin de incrementar la información existente para una rápida caracterización en un laboratorio de investigación. En este trabajo se realizó el estudio de los métodos de tipificación microbiológicos clásicos para la diferenciación fenotípica de 4 especies como: curva de crecimiento, crecimiento en diversas concentraciones de colorantes, actividad metabólica y la resistencia a antibióticos con el fin de identificar mediante estas pruebas a las cepas obtenidas en campo incluyendo a *B. microti*.

Los resultados demostraron que *B. microti* presentó una cinética de crecimiento similar a la de *B. suis* y mayor a la de *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*. Mientras que la actividad metabólica de *B. abortus*, *B. melitensis* y *Brucella suis* presento pequeñas diferencias en las distintas pruebas que se realizaron. Las pruebas con colorante y antibióticos permitieron observar sutiles diferencias que diferenciaron a todas las especies. Todas las especies de *Brucella* amplificaron el gen *bp26/IS711* en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con lo que se complementó la tipificación microbiológica del género y especies de *Brucella*.

Índice de tablas

| | Pagina |
|----------|--------|
| Tabla 1 | 3 |
| Tabla 2 | 21 |
| Tabla 3 | 22 |
| Tabla 4 | 23 |
| Tabla 5 | 24 |
| Tabla 6 | 25 |
| Tabla 7 | 29 |
| Tabla 8 | 31 |
| Tabla 9 | 32 |
| Tabla 10 | 33 |
| Tabla 11 | 34 |
| Tabla 12 | 35 |

Índice de Figuras.

| | Pagina |
|-----------|--------|
| Figura 1 | 4 |
| Figura 2 | 5 |
| Figura 3 | 6 |
| Figura 4 | 7 |
| Figura 5 | 7 |
| Figura 6 | 8 |
| Figura 7 | 9 |
| Figura 8 | 10 |
| Figura 9 | 11 |
| Figura 10 | 12 |
| Figura 11 | 14 |
| Figura 12 | 15 |
| Figura 13 | 24 |
| Figura 14 | 29 |
| Figura 15 | 31 |
| Figura 16 | 32 |
| Figura 17 | 33 |
| Figura 18 | 34 |
| Figura 19 | 35 |

Introducción

La Brucelosis o fiebre de malta es una enfermedad zoonótica mundial cuya incidencia varía de un país a otro, provocando múltiples pérdidas en el sector salud como pecuario. Esta enfermedad es provocada por bacterias pertenecientes al género *Brucella*, siendo patógenos que originan una enfermedad infectocontagiosa provocando aborto y esterilidad en la mayoría de sus reservorios animales y provocando una enfermedad sistémica en el humano, complicándose en ciertos casos o con tendencia a la cronicidad en otros.

Tradicionalmente el género *Brucella* era clasificado en seis especies según su reservorio *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (cerdos), *B. melitensis* (cabras y ovejas), *B. canis* (perros), *B. ovis* (ovejas) y *B. neotomae* (ratones). Actualmente se han descrito 5 especies emergentes siendo *B. ceti* (ballenas y delfines), *B. pinnipedialis* (focas, lobos y leones marinos), *B. papionis*, (babuinos), *B. inopinata* (rana toro, humano) y *B. microti* (roedores, topos de campo, zorros y suelo) *Brucella microti* ha atraído la atención como cepa emergente, que infecta a roedores de campo y se ha aislado consecutivamente por siete años del suelo, el que se ha sido considerado un reservorio temporal para esta especie.

Con base a lo anterior, se hace importante determinar el uso de bioquímicas y pruebas especiales del género para establecer las que correspondan a *B. microti* y pueda ser tipificada en un laboratorio de diagnóstico microbiológico.

Marco teórico

1. Características Generales del género *Brucella*

El Género *Brucella* es un grupo de bacterias gramnegativas que presentan forma de bacilos cortos de 0.5 a 0.7 μm de diámetro y 0.5 a 1.5 μm de largo, se pueden observar aislados, en pares, en cadenas cortas o grupos, al emplear la tinción de Stamp o Ziehl Neelsen modificada se tiñen de color rojo y conservan la misma morfología, no poseen capsula verdadera o endoesporas, carecen de flagelo y pili, por lo que son inmóviles. (DelVecchio *et al.*, 2002). Son bacterias aerobias y algunas cepas requieren de CO_2 para el primo aislamiento. Su temperatura óptima es de 37° C, aunque pueden crecer a temperaturas entre 20-40 °C. El pH óptimo para su crecimiento es de 6.6 - 7.4 (Corbel M J., 1991). Poseen un metabolismo oxidativo y no fermentador, catalasa (+) y oxidasa (+). Son bacterias quimiorganotrofos y requieren medios complejos que contengan aminoácidos, tiamina, niacina, biotina e iones magnesio; algunas cepas crecen mejor con suero o sangre pero no requieren hemina (FX), ni NAD (niacinadenindinucleotido) (FV), no producen hemólisis. (*Tabla 1*) (Alton, G. G, *et al.*, 1988)

2. Especiación

Estudios en la secuencia 16RNAs catalogan al género *Brucella* en el grupo α -2 de las proteobacterias (Moreno, *et al.*, E, 2002) filogenéticamente se encuentra estrechamente relacionada con patógenos y simbioses de plantas de los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium*, así como con patógenos animales *Bartonella*, *Rickettsia* y con bacterias oportunistas o del suelo *Ochrobactrum* (*Figura 1*). Estudios en las características fenotípicas y genotípicas (16RNAs) de *Brucella* suponen que su ancestro de evolución era de vida libre y está estrechamente relacionado al género *Ochrobactrum* (Schöll A.M., *et al.*, 2010)

Tabla 1. Características de las biovariedades del género *Brucella* clásico. Tomado de: Moreno E. y Moriyón I., 2006

| Species | Biovar | Type strain ^b | CO ₂ requirement on primary isolation | H ₂ S production | Growth on dyes at 20µg/ml | | Differential LPS epitope(s) |
|----------------------|--------|--------------------------|--|-----------------------------|---------------------------|----------------|-----------------------------|
| | | | | | Thionin | Basic fuchsin | |
| <i>B. melitensis</i> | 1 | 16M | - | - | + | + | M |
| | 2 | 63/9 | - | - | + | + | A |
| | 3 | Ether | - | - | + | + | AM |
| <i>B. abortus</i> | 1 | 544 | + | + | - | + | A |
| | 2 | 86/8/95 | + | + | - | - | A |
| | 3 | Tulya | + | + | + | + | A |
| | 4 | 292 | + | + | - | + ^c | M |
| | 5 | B3196 | - | - | + | + | M |
| | 6 | 870 | - | - | + | + | A |
| <i>B. suis</i> | 9 | C68 | + or - | + | + | + | M |
| | 1 | 1330 | - | + | + | - ^d | A |
| | 2 | Thomsen | - | - | + | - | A |
| | 3 | 686 | - | - | + | + | A |
| | 4 | 40 | - | - | + | - ^e | AM |
| 5 | 513 | - | - | + | - | M | |
| <i>B. neotomae</i> | | 5K33 | - | + | - ^f | - | A |
| <i>B. canis</i> | | RM6/66 | - | - | + | - ^e | R |
| <i>B. ovis</i> | | 63/290 | + | - | + | - ^e | R |

^aAdapted from Alton et al. (1988).

^bType strains can be obtained from ATCC (<http://www.atcc.org/>).

^cSome isolates do not grow on dyes.

^dSome isolates are resistant to fuchsin.

^eNegative for most strains.

^f*B. neotomae* grows on thionin at 10µg/ml.

Tanto el género *Brucella* y *Ochrobactrum* muestran fuertes similitudes aunque su biología y metabolismo son completamente diferentes, ya que los miembros del género *Brucella* son parásitos intracelulares que requieren de un hospedero mientras que *Ochrobactrum* es un organismo de vida libre y es un patógeno oportunista de personas inmunocomprometidas. (Moreno E., Moriyón I., 2006) Actualmente para propósitos prácticos se reconoce la existencia de 6 especies clásicas, mejor denominadas “nomen especies”, con sus 18 biovares (bv): *B. melitensis* bv 1, 2, 3; *B. abortus* bv 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9; *B. suis* bv 1, 2, 3, 4 y 5; *B. canis*, *B. ovis*, *B. neomatomae* y 5 nuevas especies emergentes (*B. ceti*, *B. pinippidalis*, *B. papionis*, *B. inopinata* y *B. microti*) (Scholz HC, et al. 2010), (Scholz HC, et al. 2008), (Zygmunt, M.S, et al, 2010), (Whatmore, A.M et al 2014)

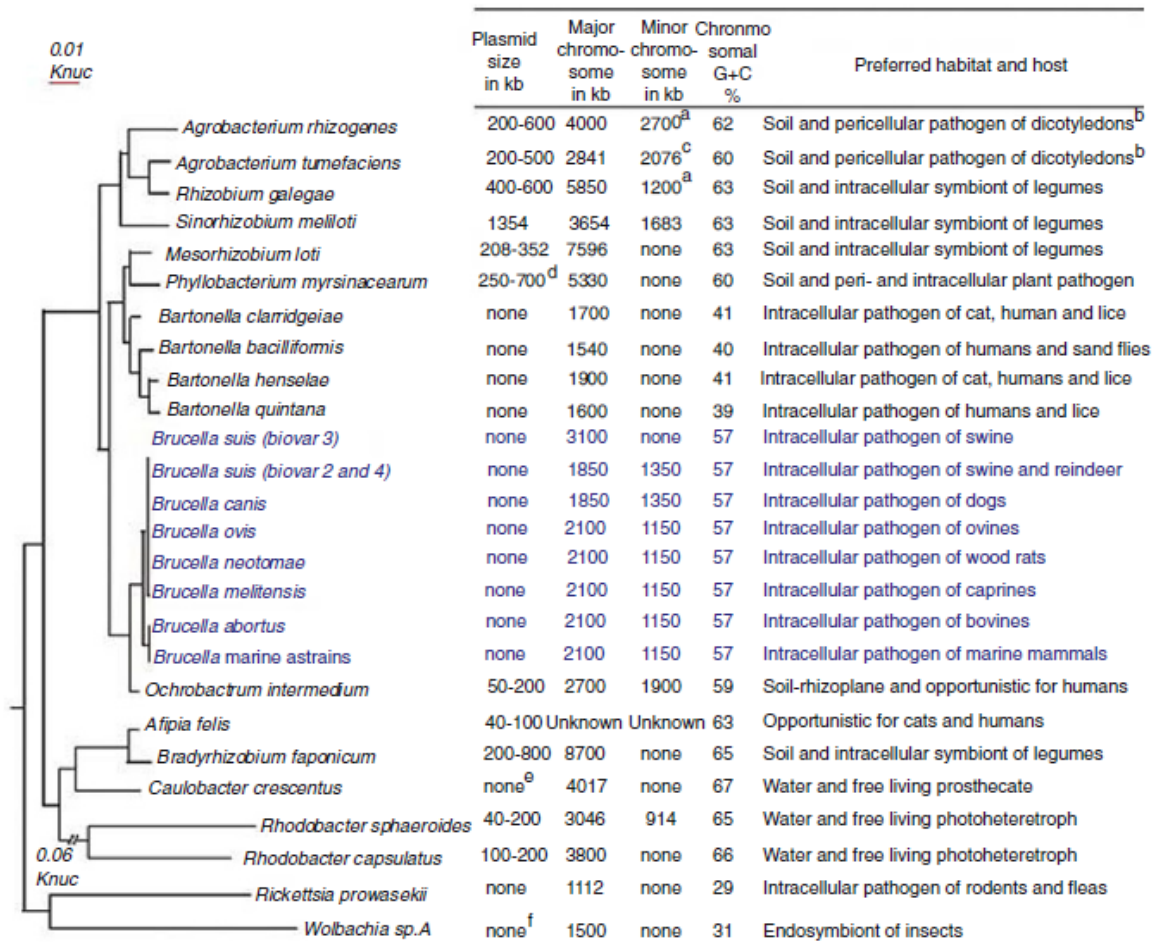


Figura 1: Árbol filogenético que muestra la relación representativa entre microorganismos relacionados a plantas, a animales, de vida libre y oportunistas del grupo de las α -proteobacterias. Tomada de Moreno E. y Moriyón I., 2006

Las especies del género *Brucella* están estrechamente relacionadas la una con la otra por ser un género mono específico, mostrando de un 98 - 99 % de similitud en su secuencia genética. (Zhong, Z., et al, 2012) A pesar de su gran homología genética *Brucella* difiere ampliamente en el tropismo de su hospedero, características fenotípicas y su patogenicidad (Whatmore A. M., et al, 2009) (Wattam, A.R et al, 2009), A pesar de la gran conservación genómica que presenta este género, existen pequeñas variaciones en el DNA que confiere determinadas características entre las especies.) (Whatmore A. M. 2013)

3. Fisiología

Brucella es una bacteria gramnegativa, por lo tanto sus envolturas celulares tienen membranas internas y externas que encierran un periplasma que contiene el peptidoglucano y algunos componentes periplasmáticos solubles, lípidos libres (fosfolípidos y lípidos neutros) que son

elementos de la membrana interna y externa. (Moriyón, I., 1998) La membrana externa contiene el LPS y varias Omps (proteínas de membrana externa) (Figura 2), (Moriyon, I *et al*, 1994) la membrana interna contiene proteínas involucradas en el transporte de sustancias y otros procesos metabólicos. Estudios de microscopía electrónica han demostrado que *Brucella* tiene una estructura clásica de las bacterias gram negativas con una membrana externa de 6.8- 8.5 nm de espesor y una membrana citoplasmática similar en cuanto al espesor. Ambas separadas por un espacio periplasmático que varía de dimensión, posiblemente dependiendo de la sección examinada. (Lapaque, N., *et al*, 2005)

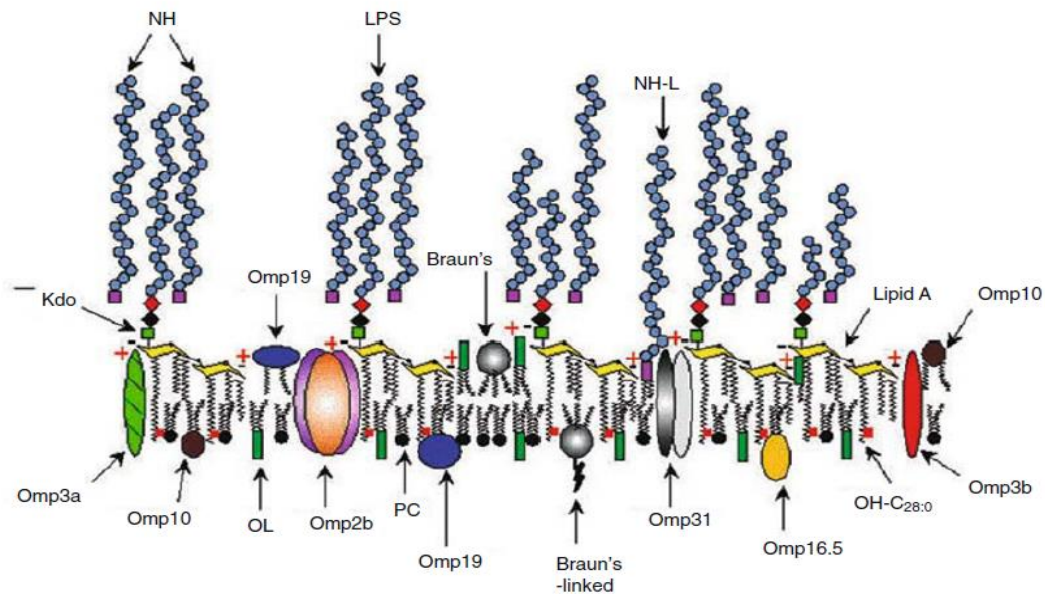


Figura 2: Modelo hipotético de la membrana externa de *Brucella*. Tomado de Lapaque, N., *et al*, 2005.

El LPS del género *Brucella* es único dentro de las bacterias gramnegativas, ya que de manera natural se puede encontrar LPS liso o rugoso en algunas de sus especies. (Figura 3). El LPS se encuentra constituido por tres partes, el polisacárido O, el Core oligosacárido y el lípido A. El polisacárido O está constituido por un homopolímero lineal compuesto por n-residuos de N-formilperosamina, el Core oligosacárido está formado por KDO (ácido 3 desoxi - D- mano octulosónico) y el lípido A está constituido por un disacárido de diaminoglucosa y ácidos grasos algunos de ellos de cadena larga, el cual le confiere resistencia a los antimicrobianos, *Brucella* contienen otro polisacárido denominado hapteno nativo (HN), que es químicamente idéntico a la cadena O, pero no está unido al núcleo (Lapaque, N., *et al*, 2005),

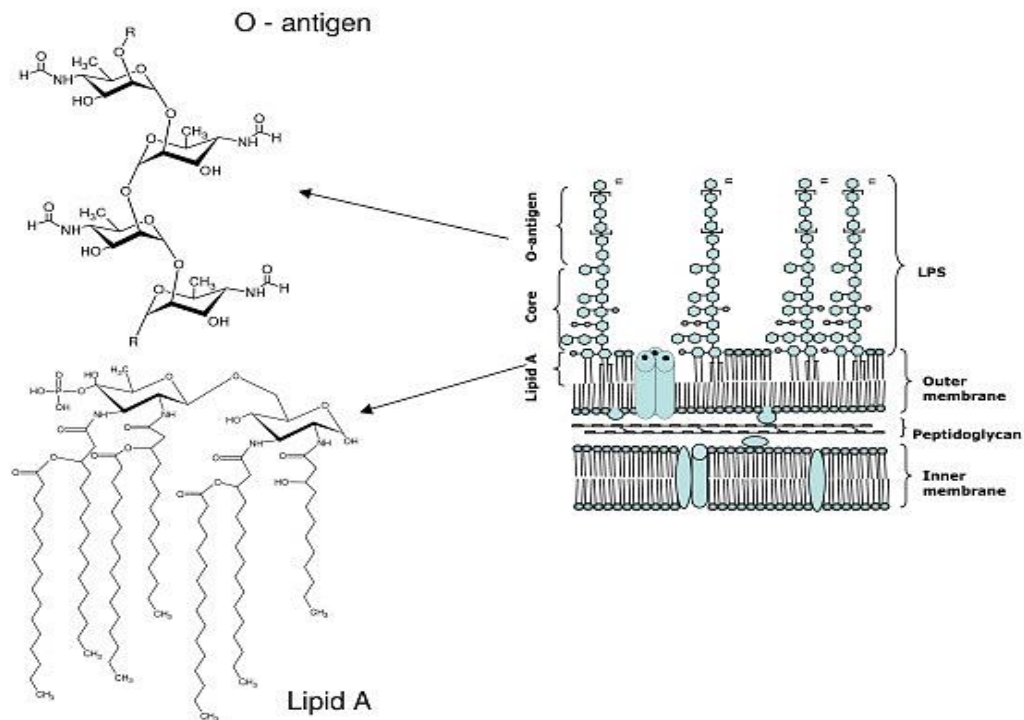


Figura 3: -Estructura del LPS en el género *Brucella*. Tomado de Lapaque, N., *et al*, 2005.

4. Metabolismo

Brucella está desprovista de enzimas hidrolíticas extracelulares que actúan sobre proteínas, ácidos nucleicos o polisacáridos. En consecuencia, estas bacterias dependen exclusivamente de nutrientes de bajo peso molecular, tales como azúcares, aminoácidos u oligopéptidos, etc. (Corbel, M.J., *et al*, 1982). Las bacterias de este género tienen genes que codifican para todas las enzimas de las rutas centrales del metabolismo de los carbohidratos, así como las del ciclo del glucógeno. Esto incluye genes para las enzimas de la ruta de las pentosas, así como para la ruta completa Entner -Doudoroff (DeVecchio *et al*, 2002) aunque ninguna de estas dos se encuentra activa en *Brucella*, debido a que su metabolismo no es fermentativo sino oxidativo (Moriyon, I *et al*, 1994).

La glucosa se fosforila y se oxida primero a gluconato-6-fosfato. El gluconato es oxidado en el ciclo de las pentosas para producir 3 moles de CO₂ más 1 mol de gliceraldehido-3-fosfato, y este último se canaliza en el ciclo del ácido tricarbóxico a través de piruvato. (Figura 5) (Corbel, M.J., *et al*, 1982).

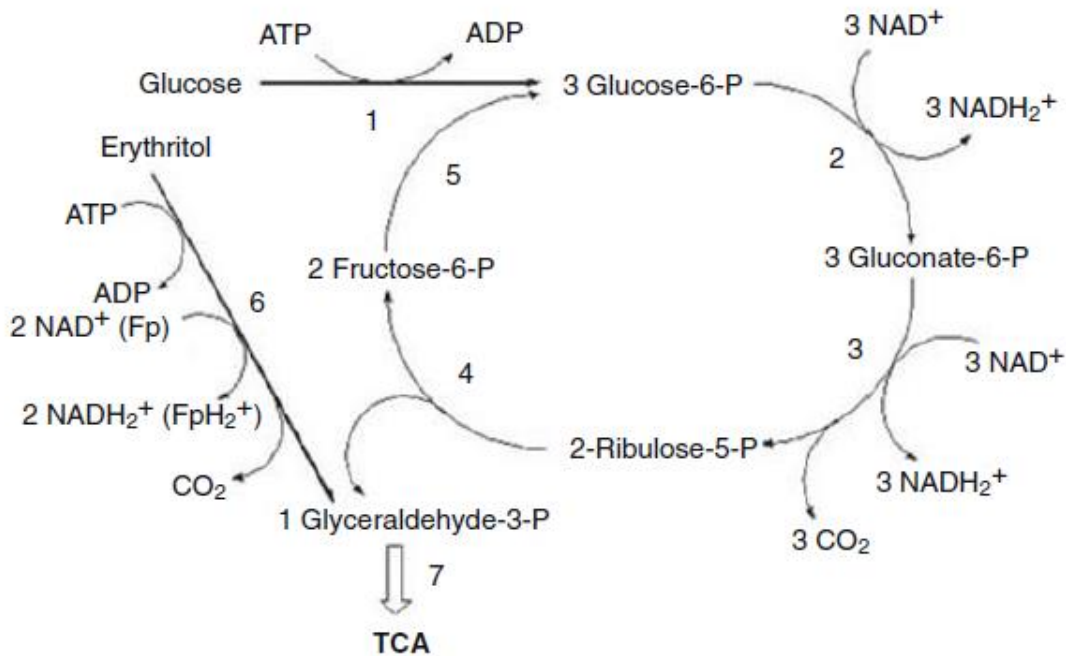


Figura 4 : Catabolismo de glucosa y eritrol en *B abortus* 1) hexoquinasa, 2) glucosa 6- fosfato, 3) gluconato 6-fosfato deshidrogenasa, 4) transaldosa y transketolasa,, 5) glucosa fosfato isómeras, 6) ruta del eritrol, 7) reacciones terminales de la vía glucolítica y piruvato deshidrogenasa lleva al ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). Tomado de (Roop, R.M., *et al*, 2004)

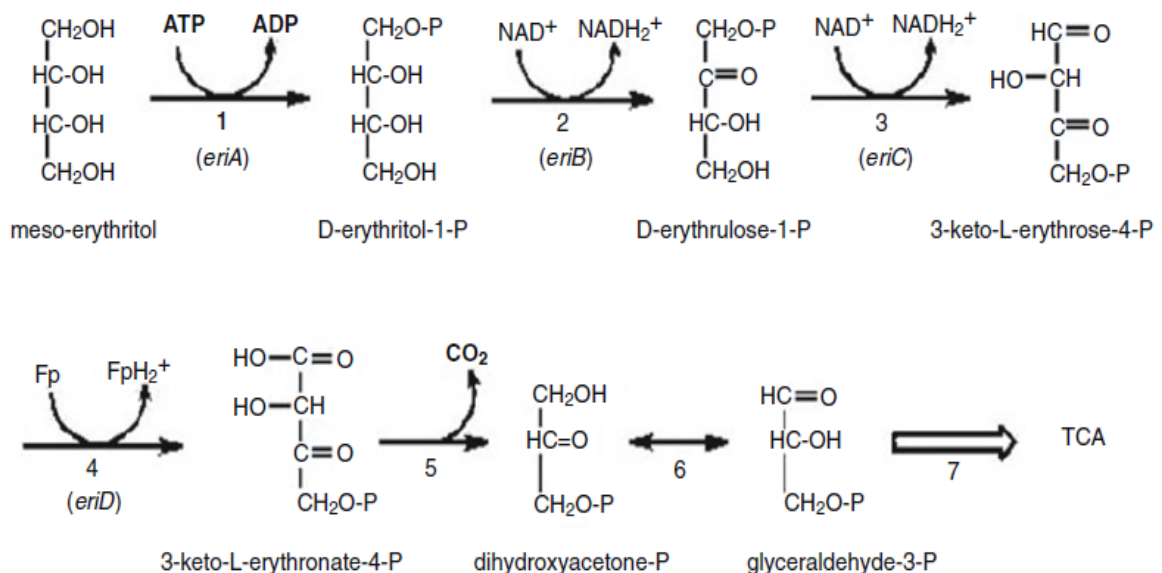


Figura 5. La vía de eritrol en *B. abortus*. 1) eritrol quinasa; 2) eritrol-1-fosfato deshidrogenasa; 3) eritrolusa-1-fosfato deshidrogenasa; 4) 3-ceto-eritrosa-4-fosfato deshidrogenasa; 5) 3-ceto-eritronato-4-fosfato descarboxilasa ; 6) fosfoeritrosa isomerasa; y 7) las reacciones de terminales de la vía glucolítica y piruvato deshidrogenasa que conduce a la del ácido tricarbóxico (TCA ciclo). Los genes putativos se indican entre paréntesis. (Moriyon, I *et al*, 1994)

El eritritol es capaz de soportar el crecimiento de todas las cepas de *Brucella* (N.B McCullough *et al*, 1951) y esto se ha confirmado en repetidas ocasiones. El crecimiento de *Brucella* en presencia de eritritol es más rápido en comparación con su crecimiento en medios que contengan otra fuente de carbono como glucosa, debido a que *Brucella* carece de enzimas que degraden a las hexosas. (Figura 4). También se encontró que en un medio simple que contiene glutamato como fuente de nitrógeno, fuente de carbono y energía, se convierte primero a cetoglutarato Y luego se metaboliza en el ciclo del ácido tricarboxílico para producir la energía y la reducción de coenzimas más metabolitos intermediarios para la biosíntesis. La oxidación de glutamato también ha demostrado estar acoplado al ciclo de la urea (ciclo de la urea y de la actividad de la ureasa). (Figura 6). (Moriyon, I *et al*, 1994)

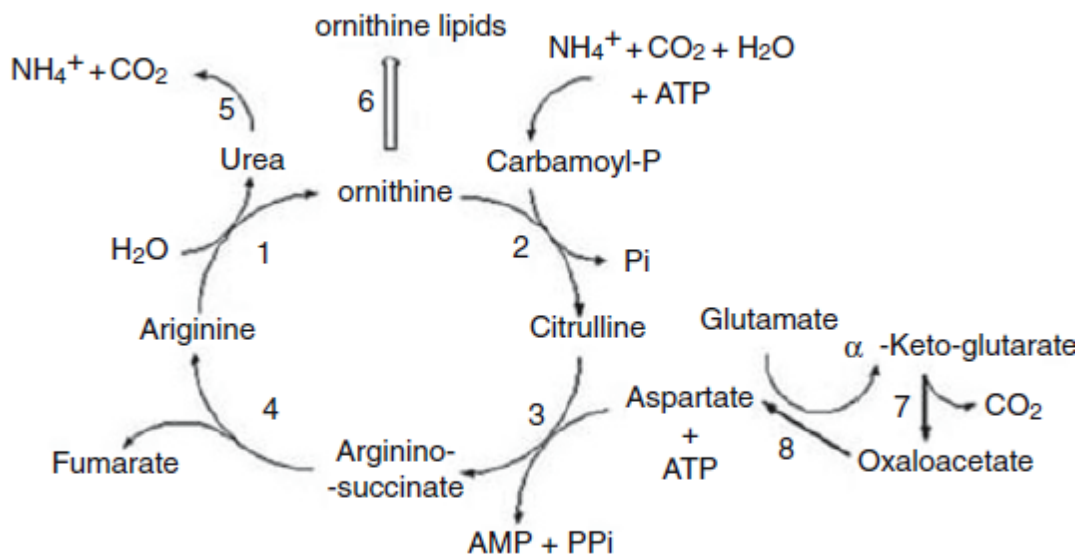


Figura 6: El ciclo de la urea y reacciones asociadas en *B. abortus*. 1) Arginasa; 2) ornitina transcarbamilasa; 3) argininosuccinato sintetasa; 4) argininosuccinasa; 5) ureasa; 7) las reacciones del ciclo del ácido tricarboxílicos; y 8) transaminasa de glutamato-aspartato

5. Brucelosis

La brucelosis es una de las enfermedades zoonóticas de importancia mundial y en México, donde el humano es solo un hospedero accidental. La brucelosis se conoce como fiebre de Malta que se caracteriza por una etapa febril de tipo ondulante. A pesar de que no es una enfermedad mortal, tiende a la cronicidad y es incapacitante. Por lo anterior debe reportarse en los sistemas epidemiológicos de salud tanto animal como humana (Freer, E. *et al*, 2001). Esta enfermedad se transmite al humano de manera directa o indirecta, es directa cuando el huésped se contagia al estar en contacto directo con las secreciones, tejidos, animales infectados o bien por el mal uso y descuido de las cepas en el laboratorio. La manera indirecta es aquella cuando se consumen alimentos no pasteurizados y contaminados con esta bacteria. (Figura 7). De todas las especies del género *Brucella*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* son las que se reportan con mayor frecuencia en humanos.

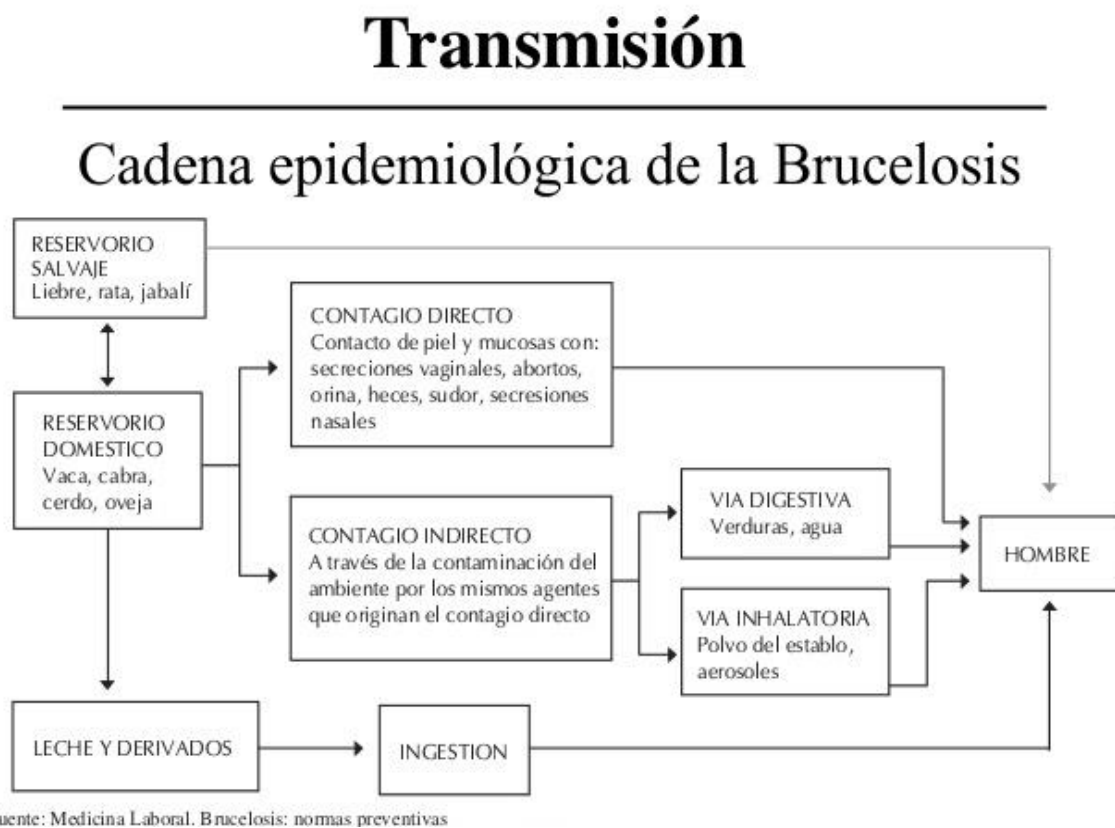


Figura 7 Manera de transmisión de *Brucella* al humano. Tomado de medicina laboral: normas preventivas

6. Patogenicidad

La brucelosis (fiebre de Malta) en los seres humanos, se caracteriza por una fase bacteriemia aguda, con tendencia a la cronicidad, que puede prolongarse durante años y afectar diferentes tejidos (Walker *et al.* 2000). Su dosis infectante va desde menos de 1,000 UFC por inhalación hasta varios millones por ingestión. Debido a esto, se ha llegado a mencionar su uso en el bioterrorismo. (Hongseok *et al.*,2001) (Godfroid *et al.*,2005)

7. Epidemiología

La distribución geográfica de las diferentes especies de *Brucella* y sus biovars es cosmopolita. *B. abortus* está más ampliamente difundida; *B. melitensis* y *B. suis* tienen una distribución irregular (Figura 8). (Banai *et al.*,2001, Pappas, 2006). Según la OMS hay 500 000 nuevos casos de brucelosis confirmadas cada año, pero es posible que millones de casos no se reconozcan y por lo tanto no se documenten (OMS, 2014).

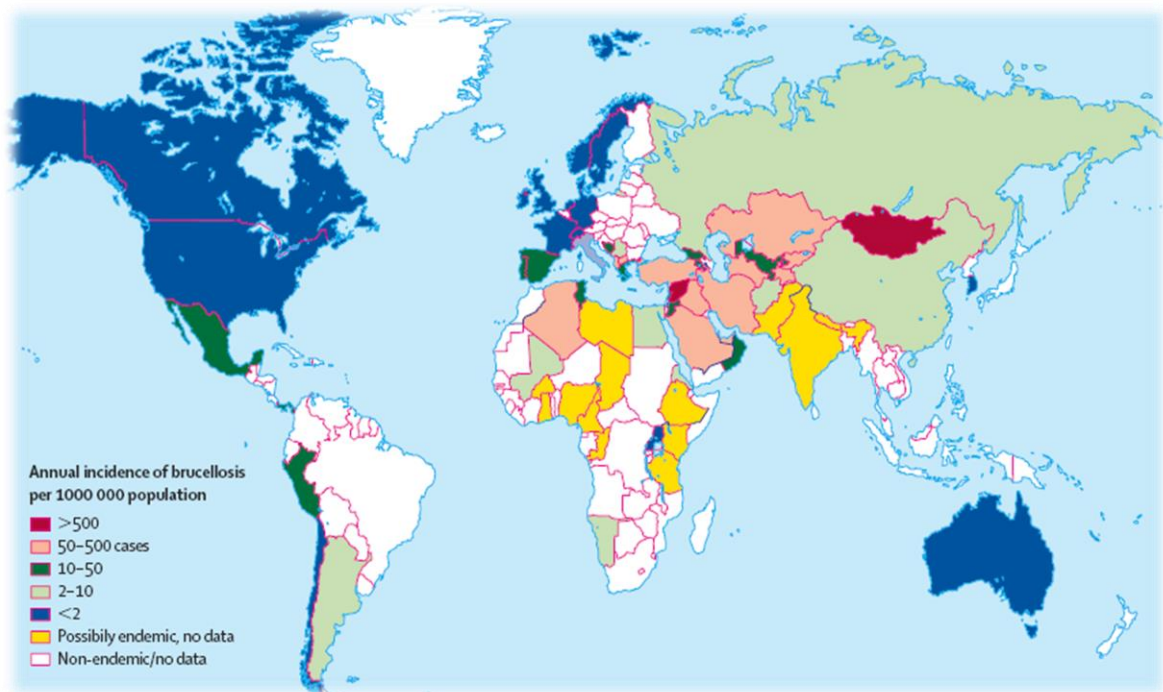


Figura 8: Distribución mundial de la Brucelosis. México es uno de los países con más casos de la enfermedad en el continente americano. Tomado de: Pappas, 2006.

A inicios de la década de los 90's en México se reportaron casos en todas las entidades, acumulándose más de 23 mil, el 70.6% de los estados que ocupan los diez primeros lugares fueron: Nuevo León, Coahuila, Guanajuato, Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Chihuahua, Zacatecas, **Puebla**, San Luis Potosí (Figura 9). En el Sistema Único de Información para la

Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) se establece que el 46.7% los notificó la Secretaría de Salud, seguido del 41.9% al Instituto Mexicano del Seguro Social y 6.1% al Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, otras instituciones oficiales aportan el 5.3% restante. (OMS-OPS, 1995)

En el 2014, el panorama de la brucelosis en el país establece que el 8.02 % se encuentra libre de brucelosis, el 14.43% se encuentra en procesos de erradicación y el 77.5 % debe de controlar está zoonosis (SAGARPA, 2014).



Figura 9: Distribución epidemiológica de brucelosis en México, los principales estados que tienen más casos de esta enfermedad se encuentran de color rojo Nuevo León, Coahuila, Guanajuato, Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Chihuahua, Zacatecas, Puebla, San Luis Potosí, los estados marcados de amarillo son los que se encuentran en control y los marcados de color verde son en los que se ha erradicado la brucelosis por completo Tomado de: SAGARPA, 2014

A finales del 2013, se publicaron en diferentes medios de comunicación que 46 municipios poblanos situados en las sierras Norte y Nororiental alcanzaron la Fase de Erradicación de la Campaña contra la Brucelosis de los Animales (Síntesis, 2013). Pero en el periodo de enero a abril del 2014 se han registrado varios brotes en la zona de la mixteca poblana, (Ambrosio, M. 2014) (Figura 10). La presencia de la Brucelosis en los hatos lecheros representa un problema de salud pública considerable a través del consumo de productos lácteos no pasteurizados, así como por el contacto del personal que labora en el campo con los animales infectados (SAGARPA, 2013).

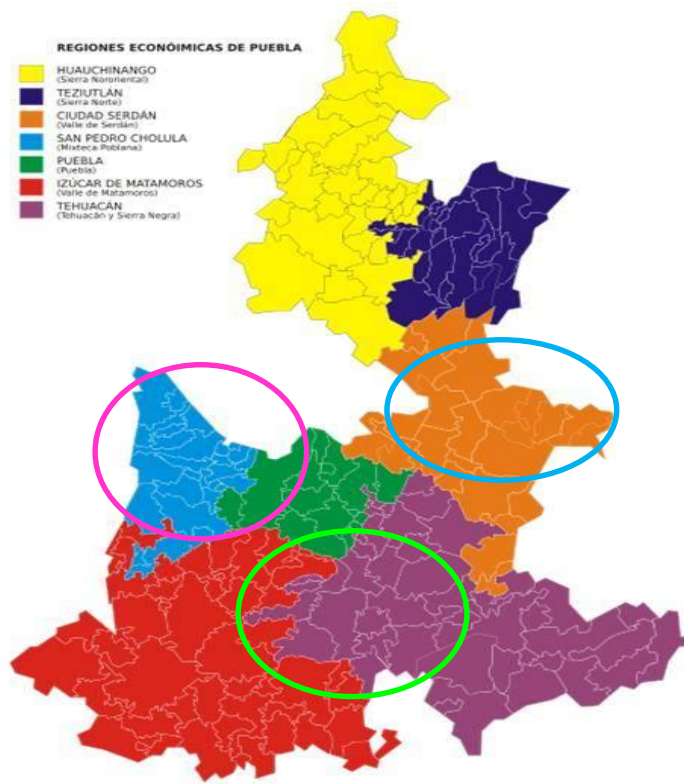


Figura 10: Cuencas lecheras del estado de Puebla. Tomado de: *Secretaría de Salud del Estado de Puebla*.

8. Cuadro clínico

La brucelosis se inicia con malestar general y fiebre de 7 a 21 días después de contraer la infección. Son frecuentes las diaforesis copiosas al atardecer o al principio de la noche, como lo son las temperaturas de 39.4 a 40°C. El patrón de la fiebre es ondulante, es decir, tardes-noches (Wenxiao Liu, Z. J. *et al* 2012), la brucelosis puede complicarse si no es bien tratada o no se detecta a tiempo, produciendo complicaciones como la artritis, osteomielitis, endocarditis y en casos severos puede llegar a meningoencefalitis o a neurobrucelosis.

9. Métodos directos para el diagnóstico de brucelosis

Se basan en evidenciar la presencia de la bacteria o de sus componentes en los tejidos de los animales o del hombre. El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de la bacteria, frecuentemente a partir de hemocultivos. La técnica más utilizada para realizarlos es la de Ruiz Castañeda, que consiste en la inoculación de sangre en frascos herméticamente cerrados que contienen, simultáneamente, un medio líquido (Caldo triptosa) y un medio sólido (Agar triptosa). Los cultivos deben mantenerse en incubación un tiempo no menor a 30 días debido a que las

bacterias del género *Brucella* son de crecimiento lento (Rosa, J. 2000). Actualmente se han desarrollado nuevos medios de cultivo que permiten el crecimiento rápido de las bacterias como el Caldo *Brucella-BUAP* (Castañeda Roldan E.I. 2005). La identificación de especies a través de métodos microbiológicos clásicos es difícil, debido a la gran homología y características que presenta este género, sin embargo, es posible diferenciarlas mediante el crecimiento en medios con colorantes. (Corbel M.J 1991).

10.Métodos indirectos para el diagnóstico de brucelosis

Las dificultades del aislamiento de *Brucella* a partir de los distintos tejidos y sangre, hacen que los métodos indirectos sean el recurso diagnóstico más utilizado. La mayoría de las pruebas de aglutinación en los laboratorios, utilizan como antígenos suspensiones bacteriana de *Brucella* en fase lisa (S) o rugosa (R) (Corbel M.J. 1991). En la actualidad otros métodos para el diagnóstico de *Brucella* son los moleculares. Sin embargo no todos los laboratorios han implementado estos métodos.

11.Tratamiento

La brucelosis humana se trata con antibióticos, aunque el tratamiento debe ser prolongado, debido a la naturaleza intracelular de *Brucella* (Halling *et al.*, 2005). La atención del paciente con brucelosis puede facilitarse siguiendo el tratamiento propuesto en la Norma Oficial Mexicana 022-SSA2-2010 para la Prevención y Control de la Brucelosis en el Humano. (Secretaría de Salud, 1994). La mayor parte de las cepas de *Brucella* son sensibles a la estreptomycinina y a las tetraciclinas (doxiciclina).

Marco de referencia

En el año 2008, se aisló una nueva cepa del género *Brucella*, denominada *B. microti*, inicialmente, se analizaron dos cepas de esta nueva especie de *Brucella* que fueron aisladas de topillos comunes sistémicamente enfermos (*Microtus arvalis*) (Figura 11) (Hubálek Z, et al. 2008) en la República Checa. Posteriormente, *B. microti* también se aisló de la mandíbula de los ganglios linfáticos de los zorros rojos en un distrito de la Baja Austria (Figura 12) (Scholz HC, et al. 2009.) e incluso directamente desde el suelo (Scholz HC, et al. 2009). Lo anterior sugiere que la ecología de *Brucella* es cambiante, y en el caso de *B. microti* es capaz de sobrevivir por largos periodos en el suelo sin necesidad de un hospedero.



Figura 11: *Microtus arvalis*, reservorio natural de *B. microti*

B. microti ha demostrado persistencia al medio ambiente, fuera de huéspedes mamíferos y la diversidad de especies de reservorio pueden jugar un papel clave en la propagación de epizootias de esta especie de *Brucella*. En contraste con las especies de *Brucella* clásicas, *B. microti* se caracteriza por el rápido crecimiento en medios estándar y exhibe notables capacidades metabólicas (Scholz HC, et al. 2010). Independientemente de la fuente animal o del medio ambiente y de origen geográfico, todas las cepas de *B. microti* exhiben actividades bioquímicas y enzimáticas en un menor tiempo en comparación de las especies clásicas de *Brucella*.

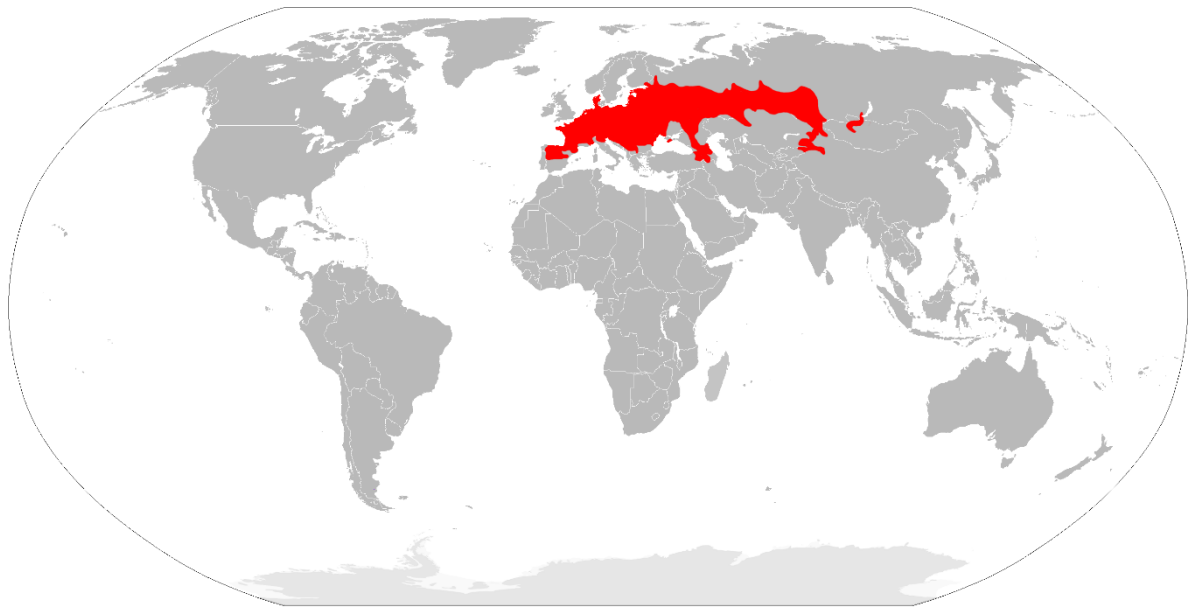


Figura 12: Países de donde se ha recuperado cepas de *B. microti* de suelo y de *Microtus arvalis*.

Hasta la fecha, la patogenicidad potencial de esta bacteria de rápido crecimiento para el ganado y los seres humanos no se conoce. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que *B. microti* es capaz de replicarse más rápido dentro de las células y macrófagos, o de forma similar al comportamiento de *B. suis*, una especie de *Brucella* que es patógeno para los seres humanos y los suidos (Jiménez de Bagüés, M.P. *et al*, 2010)

El genoma de *Brucella* está constituido por dos cromosomas circulares, el cromosoma I de 2, 117,050 y el cromosoma II de 1, 220,319 pares de bases. Comparando el genoma de *B. microti* y *B. suis* (1330) se demostró que el genoma de *B. microti* es 99.84% idéntico al de *B. suis* (1330). (Whatmore, A.M *et al*, 2009), (S. Audic, *et al*, 2009)

Planteamiento del problema

La brucelosis es una enfermedad que se transmite al tener contacto directo con animales infectados, sus secreciones, suelo contaminado, o el consumo de leche y derivados lácteos no pasteurizados. Actualmente se han descubierto nuevas especies de *Brucella*, entre ellas *Brucella microti*, que es capaz de persistir en el suelo y sobrevivir por periodos largos de tiempo; este hecho hace pensar que esta cepa emergente puede usar al suelo y a los roedores de campo como reservorio temporal. En los laboratorios donde se hace el diagnóstico microbiológico para el género *Brucella* deben contar con metodologías estandarizadas que permiten la identificación y tipificación de las especies *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* que son las que afectan al humano, pero también se pueden tipificar las nuevas especies de éste género, es por ello que en este trabajo se desea establecer un conjunto de pruebas clásicas y especiales del género para tipificar a *B. microti*. Como apoyo a la investigación en el estudio de la brucelosis.

Justificación

El diagnóstico de brucelosis en México sigue siendo el establecido por la NOM-022-SSA-2010, en donde se encuentran los métodos directos e indirectos para la identificación del género y especies de *Brucella*. En la actualidad se han reportado especies emergentes del género como *Brucella microti* por lo que se hace necesario contar con un manual de tipificación con los métodos microbiológicos clásicos y PCR para la amplificación de genes conservados como *bp26/IS711*.

En este trabajo se pretende establecer una guía de apoyo para la investigación en la tipificación del género y especies de *Brucella*.

Objetivo General

Aplicar las pruebas de actividad metabólica y los métodos microbiológicos clásicos en la Fenotipificación de *Brucella microti*.

Objetivos particulares

- Realizar pruebas de Biología molecular antes, durante y al final de las pruebas, para garantizar la amplificación del *bp26/IS711*, que es un gen conservado de *Brucella*.
- Comparar el crecimiento de *Brucella microti* y cepas de referencia mediante la cinética de crecimiento.
- Determinar la actividad metabólica de *Brucella microti* (CMM 4915) y las cepas de referencia de *Brucella*, así como los métodos microbiológicos clásicos de tipificación para este género.
- Realizar perfil de antibióticos de *B. microti* (CMM 4915) y al resto de las cepas de referencia *Brucella abortus*, (S19), *Brucella melitensis* (M16) y *Brucella suis* (1330), como una herramienta de tipificación del género.

Hipótesis

H₀: *Brucella microti* NO presenta una actividad metabólica diferente a las cepas de *Brucella melitensis* (M16), *Brucella abortus* (S19), *Brucella suis* (1330), cuando se utilizan pruebas bioquímicas y pruebas especiales para el género *Brucella*.

H₁: *Brucella microti* tiene una actividad metabólica diferente a las cepas de *Brucella melitensis* (M16), *Brucella abortus* (S19), *Brucella suis* (1330), cuando se utilizan pruebas clásicas y especiales para el género *Brucella*.

Diseño de la investigación

Tipo de estudio

El tipo de estudio que se llevó a cabo fue: Descriptivo, Observacional y Transversal.

Es descriptivo debido a que se describió el comportamiento de *B. microti* (CMM 4915) con las demás cepas de referencia. Es observacional pues solo se observó el comportamiento de *B. microti*, en comparación de las demás cepas de referencia. Es transversal por que las pruebas realizadas se hicieron durante un periodo de tiempo definido.

Muestra

Se usaron cepas ATCC de cada especie de *Brucella* (*B. microti* CMM 4915, *B. melitensis* M16 ATCC 23456, *B. abortus* S19 ATCC Vacunal, *Brucella suis* 1330 ATCC 23444)

Sede

El trabajo se realizó en el Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP), Centro de Investigación de Ciencias Microbiológicas (CIMC), en el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana.

Criterios de selección

Inclusión. Toda aquella muestra POSITIVA en las Pruebas de biología molecular (gen bp26/IS711), POSITIVA en la Prueba de Aglutinación con Suero Pentavalente.

Exclusión. Toda aquella muestra NEGATIVA en las Pruebas de biología molecular (gen bp26/IS711), NEGATIVO en la Prueba de Aglutinación con suero pentavalente.

Materiales y Metodologías

Materiales

Todas las cepas de *Brucella* que se usaron en este trabajo fueron ATCC, nuestra cepa problema *B. microti* (CMM 4915) donada por Unidad de Tecnología en Producción y Sanidad Animal. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA), Zaragoza, España. El resto de las cepas, *Brucella melitensis* M16 (ATCC 23456), *Brucella abortus* S19 (ATCC Vacunal), *Brucella suis* 1330 (ATCC 23444), fueron proporcionadas por el departamento de “Patogenicidad microbiana” del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas

Metodología

Se sembraron las cepas de referencia: *B. melitensis* (M16), *B. abortus* (S19), *B. suis* (1330) y *B. microti* (CMM 4915). Se tomaron 200 µL del cultivo y se sembraron en placas con Agar *Brucella*-BUAP y suplemento de antimicrobianos de Ferrer (Tabla 2). Las placas sembradas se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 48 horas. Posteriormente, para verificar que el cultivo de *Brucella* estaba puro, se realizó la prueba de aglutinación con suero anti-*Brucella*, y con el resultado positivo, se procedió a la extracción de DNA de estos cultivos, utilizando un kit comercial (Quick-gDNA™ MINI PREP, BIOSYS) y con el DNA extraído se realizó la PCR amplificando el gen *bp26*, específico del género *Brucella*.

Una vez crecidas las cepas y con prueba de aglutinación positiva, se procedió a realizar las pruebas de actividad metabólica (Pruebas microbiológicas clásicas, Curva de crecimiento) y pruebas especiales del género *Brucella* (tipificación con colorantes, aglutinación con suero y acriflavina y perfil de antibióticos).

Tabla 2: Preparación y cantidades de los antibióticos utilizados para el Agar *Brucella*-BUAP con suplemento de Ferrer

| COMPOSICIÓN | mg/Litro | U/Litro | Sotck/Litro |
|-------------------------|-----------|------------|-------------|
| Sulfato de polimixina B | 6 mg | 5,000 U | 0.5 mL/L |
| Bacitracina | 25 mg | 25,000 U | 10 mL/L |
| Cicloheximida | 100 mg | ---- | 1 ml/ L |
| Ácido nalidíxico | 5 mg | ---- | 1 mL/ 99mL |
| Nistatina | 100 000 U | 100, 000 U | 2 ml |
| Vancomicina | 20 mg | ---- | 1mL/999mL |

Pruebas de biología molecular

Esta prueba se llevó a cabo en tres fases, que consistieron en: extracción de DNA (kit comercial Quick –gDNA™ MINI PREP, BIOSYS), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis y revelado.

Extracción de DNA: Se tomaron 200 µL de agua estéril y se colocaron dentro de un eppendorf, con la ayuda de una punta estéril se tomó una cantidad suficiente de bacterias que se suspendieron en agua estéril, posteriormente se colocaron 800 µL de buffer de lisis y se homogenizó la mezcla con la ayuda de la micropipeta. Se dejó en reposo 10 minutos. Se colocó una columna dentro de una camisa y la suspensión bacteriana se vertió dentro de la columna, se centrifugó a 11,000 rpm/ 1 minuto y el contenido que quedó en la camisa se desechó. Se agregaron 200 µL de Pre-Wash y se centrifugó a 11,000 rpm/1 minuto, se desechó el sobrenadante y se cambió la camisa, se colocó la columna en la camisa nueva estéril y se le añadieron 500 µL de Wash Buffer, se centrifugó nuevamente a 11,000 rpm / 1 minuto, se desechó la camisa. Se colocó la columna en un eppendorf nuevo y se añadieron 50 µL de agua estéril, se centrifugó a 12,000 rpm/ 45 segundos.

Se corroboró la extracción de DNA con una electroforesis, colocando 5 µL de muestra y 2.5 µL de buffer en un gel de agarosa al 1% y un corrimiento por 30 minutos a 90 Volts. Se observó la banda característica de DNA total en un transiluminador de luz UV.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Se preparó la mezcla en un eppendorf de 250 µL, con las cantidades de los componentes que se muestran en la Tabla 3. El programa de amplificación se muestra en la tabla 4

Tabla 3: Mezcla de componentes para la PCR.

| Cantidad | Reactivos |
|----------|----------------|
| 1 µL | Rbp26/IS711 |
| 1 µL | F bp26/IS711 |
| 8 µL | Muestra (DNA) |
| 12.5 µL | Taq polimerasa |
| 2.5 µL | Agua Estéril |

Tabla 4: Programa de PCR que se utilizó para la amplificación del gen bp26 en el termociclador.

| | Temperatura | Tiempo |
|-----------------------------------|-------------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95 °C | 7 Min |
| Desnaturalización | 95 °C | 35 Seg |
| Alineación de primers | 64 °C | 45 Seg |
| Extensión | 72 °C | 3 Min |
| Se Repite de 3 a 35 ciclos | | |
| Extension final | 7 °C | 6 Min |

Electroforesis y Revelado: se preparó un gel de agarosa (0.5 gr de agarosa disueltos en 50 ml de TAE 1X) en un soporte de la cámara de electroforesis y alternador de corriente BIO-RAD, POWER/PAD 200, se colocó el gel dentro de la cámara con buffer TAE y se corrió a 90 Volts por 60 minutos. Posteriormente se tiñe el gel con bromuro de etidio al 1% por 15 minutos, se enjuaga con agua por 1 minuto y se coloca en un transiluminador de luz ultravioleta y se observaron las bandas de amplificación del gen *bp26* de 1,029 pb.

Pruebas de actividad metabólica.

Para las pruebas de actividad metabólica se utilizaron los siguientes agares para la medición de la actividad metabólica, Agar triple azúcar hierro (TSI), Agar Hierro Lisina (LIA), Citrato de Simmons, Movilidad, Indol, Ornitina (MIO), Urea de Christensen, Agar Brucella BUAP, Rojo de Metilo – Vogues proskauer (RM-VP) y Agar sangre de carnero.

Se tomó una colonia de *Brucella* y se sembró en el siguiente orden Citrato de Simmons, Urea, LIA, MIO, *Brucella*-BUAP, RM-VP y al final TSI. Se incubaron a 37 °C por 24 horas y se interpretaron los resultados. Adicionalmente se realizaron la prueba de oxidasa y catalasa.

Para la prueba de la Hemolisis se preparó una suspensión bacteriana en solución salina isotónica ajustada a una densidad óptica de 1.4 a 640 nm, se tomaron 100 µL y se sembró en Agar Sangre de Carnero de manera masiva y con la ayuda de una varilla de vidrio, una vez seco el agar, se picó el medio y se puso en incubación a 37°C y se revisó a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

Curva de crecimiento: De un cultivo estandarizado de 8 horas se tomaron 200 µL de la suspensión bacteriana y se inocularon a 20 mL de Caldo *Brucella*-BUAP. Se mantuvo el cultivo en agitación a 37°C y se tomaron alícuotas de un mililitro por 16 horas. A las muestras de cada hora se les determino su densidad óptica para establecer la fase de adaptación, logarítmica y estacionaria. Se realizó la cinética de crecimiento para cada una de las cepas que se utilizaron durante este proyecto.

Pruebas especiales para el Género *Brucella*

Tipificación con colorantes: Se preparó medio *Brucella*-BUAP y se le añadieron colorantes Tionina, fucsina y Safranina según lo establece el Manual de procedimiento de laboratorio INDRE/SAGARPA (Tabla 5), se realizaron suspensiones bacterianas en solución salina isotónica (SSI) y se ajustaron a una densidad óptica de 1.4 a 600 nm. Se tomó una placa de Agar *Brucella*-BUAP con Colorante y se divide en 4 cuadrantes, con la ayuda de un hisopó se hicieron 5 estrías paralelas empezando por el borde de la placa, procurando que ninguna de las estrías se tocan entre si y que el hisopo no estuviese demasiado húmedo, las 4 cepas se sembraron en una sola placa y se sembraron en cada uno de los colorantes a diferentes concentraciones (Figura 13), se incubaron las placas a 35 °C con una tensión parcial de CO₂ al 5% y se observaron a las 24, 48 y 120 horas.

Tabla 5: Stock de colorantes. La tabla describe el volumen requerido por litro de Agar *Brucella*-BUAP y la concentración del colorante

| Colorante | Sol'n madre | Volumen / Litro | Concentración final |
|----------------|-------------|-----------------|---------------------|
| Fucsina básica | 0.2% | 10 mL | 1/50,000 |
| Tionina | 0.2% | 20 mL | 1/25,000 |
| Tionina | 0.2% | 10 mL | 1/50,000 |
| Safranina | 0.5% | 20 mL | 1/20,000 |

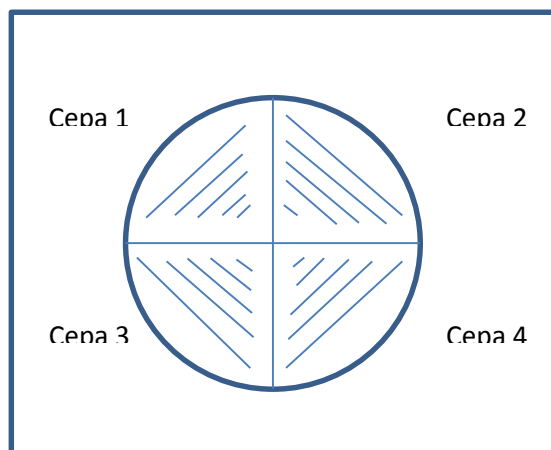


Figura 13: Siembra en medio *Brucella*-BUAP con colorante.

Aglutinación.

a) Aglutinación con suero específico a *Brucella*: En una placa de vidrio se colocaron 50 µL de suero anti-*Brucella* y 30 µL de solución salina fenolada al 5 % (SSF), se colocó una asada de la bacteria y se mezcló suavemente con la ayuda de un agitador de madera, se observó la formación de grumos para una aglutinación positiva en un minuto de reacción.

b) Aglutinación con acriflavina: Para la aglutinación con acriflavina se hizo exactamente lo mismo que en la prueba a). Se utilizó 50 µL de acriflavina al 0.1 %, se usó como control positivo a una cepa de *Brucella* y como control negativo a una cepa de *E. coli*.

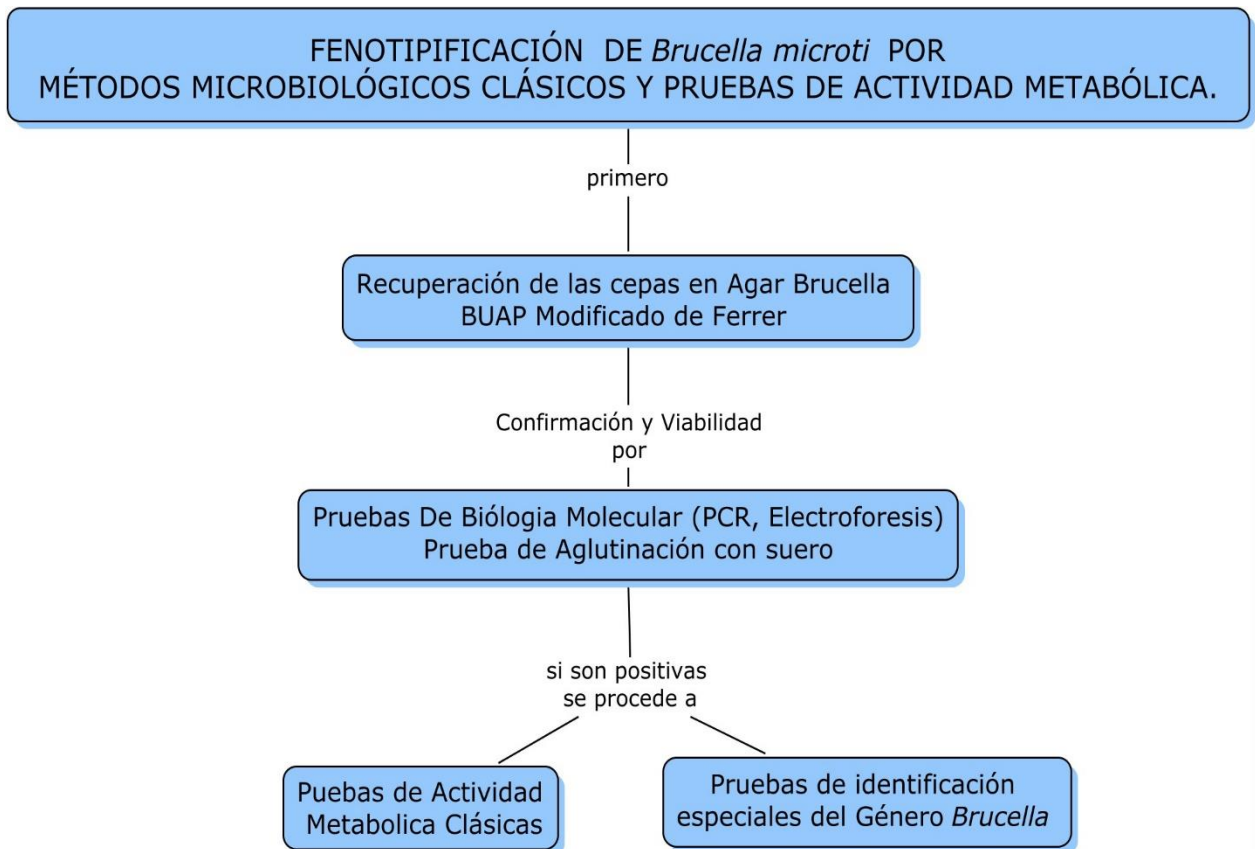
Perfil de Antibióticos por la técnica de Kirby Bauer: se prepararon los siguientes antibióticos, Cefotaxima, Ceftriaxona, Gentamicina, Ciprofloxacino y Fosfomicina. (Tabla 6). Se preparó una suspensión bacteriana en solución salina isotónica y se ajustó a una densidad óptica de 1.4 a 600 nm. En una placa de Agar *Brucella*-BUAP se colocaron 100 µL de la suspensión y con ayuda de un hisopo se extendió en toda la placa, se colocó en cada placa 5 discos de papel filtro estériles impregnados con cada uno de los antibióticos, se incubó a 35 °C por 24 horas a una Tensión parcial de CO₂ al 5% Pasadas las 24 horas se midió el halo de inhibición y se comparó con los valores reportados. (Cavelieri, S. J. *et al* (2005).)

Tabla 6: Preparación de las Soluciones STOCK de Antibióticos

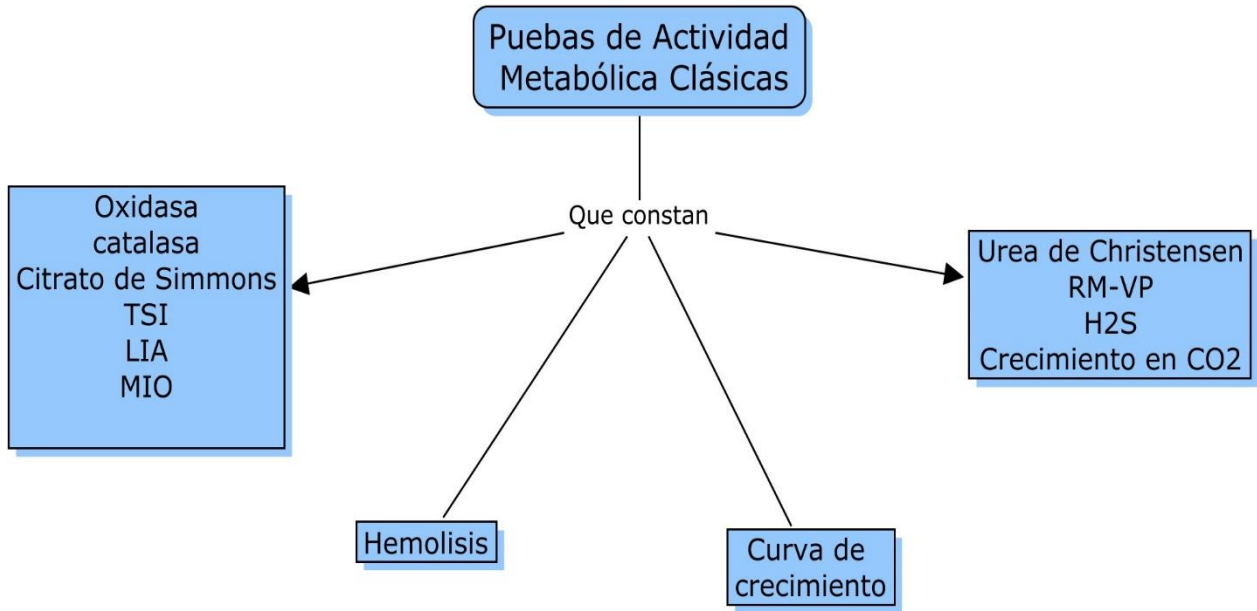
| Antibiótico | Dilución | Solución de trabajo |
|-----------------------|-----------------|----------------------------|
| Cefotaxima | 1:100 | |
| Ceftriaxona | 0.004g/mL | 40 µg/mL |
| Gentamicina | 1:25 | 10 mg/mL |
| Fosfomicina | 0.004g/mL | 40 µg/mL |
| Ciprofloxacino | 1:100 | 20 µg/mL |

Diagramas

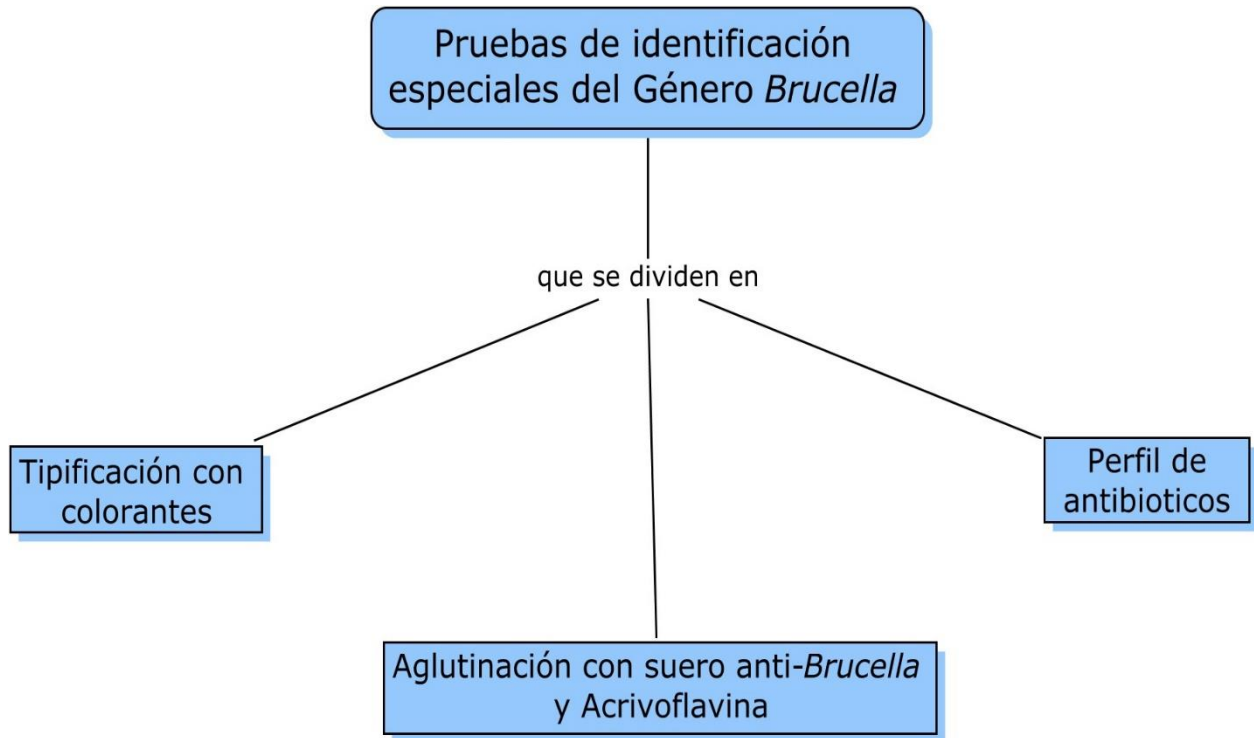
Esquema 1: Diagrama General de trabajo



Esquema 2: Pruebas de Actividad metabólica



Esquema 3: Pruebas especiales para el Género *Brucella*



Resultados y Discusión

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de las cepas *B. melitensis* (M16), *B. suis* (1330), *B. abortus* (S19), la cepa problema *B. microti* (CMM 4915) y una cepa de *E. coli* que se usó como control negativo; se amplificó el gen *bp26/IS711*, que es un gen altamente conservado y específico del género *Brucella*. La amplificación de este gen fue positivo para todas las especies de *Brucella*, para el caso de *E. coli* no hubo amplificación y no se observó la banda de 1,029 pb. (Figura 14)

Tabla 7: Amplificación del gen *bp26* mediante la técnica de PCR

| Prueba/Cepa | <i>B. abortus</i> (S19) | <i>B. melitensis</i> (M16) | <i>B. suis</i> (1330) | <i>B. microti</i> | <i>E. coli</i> |
|--------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------|----------------|
| I BP26/IS711 | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) |
| M BP26/IS711 | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) |
| F BP26/IS711 | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) |

I – PCR en la fase inicial del proyecto.

M – PCR en la fase intermedia del proyecto.

F – PCR en la fase final del proyecto.

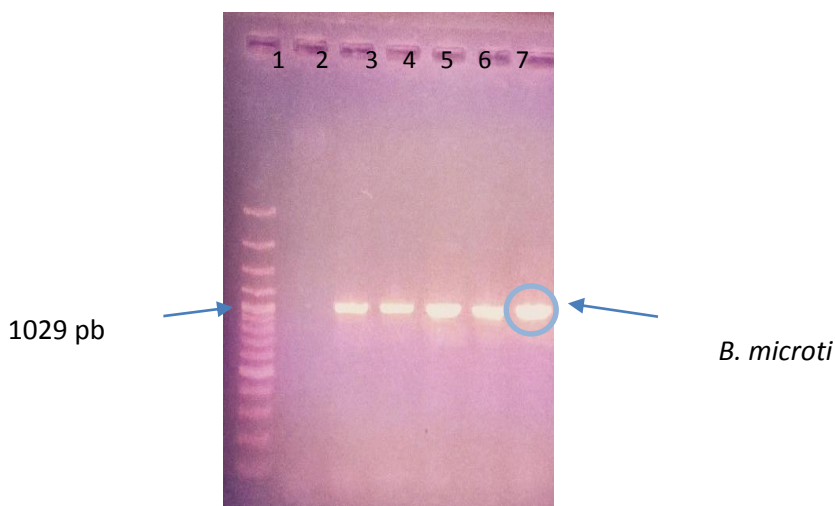


Figura 14: Resultado de la amplificación del gen *bp26/IS711*, 1, marcador de peso molecular, 2, control negativo *E. coli*, 3 Control positivo, *B. abortus* (RB51), 4, *B. abortus*, 5, *B. melitensis*, 6, *B. Suis*, 7, *Brucella microti*.

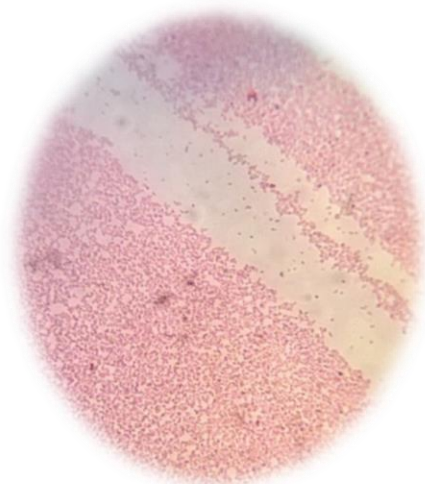
Brucella al ser un género mono específico posee varias enzimas que se encuentran codificadas en todas las especies. Este género se caracteriza por bacterias oxidativas por lo que en las pruebas donde se esperaría la utilización de Carbohidratos mediante su fermentación como TSI, CIT RM-VP o bien aquellas pruebas en donde hay descarboxilación o desaminación de aminoácidos (LIA, MIO) fueron negativos, *Brucella microti*, también presentó una actividad idéntica con las demás especies en las pruebas de catalasa y oxidasa, una característica marcada dentro de este género. *B. microti* al igual que las otras especies es ser bacterias inmóviles, debido a que *B. microti* es una bacteria oxidativa no fue capaz de fermentar la glucosa presente en el medio y dar las condiciones adecuadas para poder descarboxilar a la ornitina. En cuanto al indol el resultado fue negativo debido a que no presenta la enzima triptofanasa para utilizar al triptófano que se encuentra en el medio MIO y así producir el indol. (Tabla 8). Ninguna de las especies fue hemolítica, incluyendo a *B. microti*, aunque si crece en la gelosa sangre presentando una morfología característica y color gris aperlado (Figura 15). Debido a la gran capacidad metabólica que presenta *Brucella microti* (*Curva de crecimiento*) la ureasa se pone de manifiesto en un lapso de 15 minutos, mientras que en *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, se pone de manifiesto en lapso de 16 horas. En la producción de H₂S (ácido sulfhídrico) presento una actividad similar a la de *Brucella abortus* y *suis* al ser capaz de producirlo. En el primo aislamiento *Brucella microti* presento similitud con *Brucella melitensis* y *suis* al no requerir CO₂ en comparación de *Brucella abortus* que si lo requiere.

La morfología microscópica de *Brucella microti* es similar al de las demás especies del género, es un cocobacilo gramnegativo (figura 15), los resultados de las prueba de aglutinación con suero anti-*Brucella* fueron positiva para todas las especies que se trabajaron en este proyecto. *B. microti* no aglutino en presencia de acriflavina, mientras que *B. melitensis* (M16), *B. abortus* (S19) y *B. suis* (1330) si aglutinaron.

Tabla 8: Resultados de las Pruebas de Actividad Metabólica, mediante métodos microbiológicos clásicos

| Prueba/Cepa | <i>B. abortus</i> (S19) | <i>B. melitensis</i> (M16) | <i>B. suis</i> (1330) | <i>B. microti</i> (CMM 4915) |
|------------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Tinción de Gram | CBG(-) | CBG(-) | CBG(-) | CBG(-) |
| TSI | (-) | (-) | (-) | (-) |
| LIA | (-) | (-) | (-) | (-) |
| CIT | (-) | (-) | (-) | (-) |
| M | (-) | (-) | (-) | (-) |
| I | (-) | (-) | (-) | (-) |
| O | (-) | (-) | (-) | (-) |
| Urea | (++) | (+) | (+++) | (++++) |
| RM | (-) | (-) | (-) | (-) |
| VP | (-) | (-) | (-) | (-) |
| Ox | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Cat | (+) | (+) | (+) | (+) |
| H₂S | (+) | (-) | (+) | (++) |
| Hemolisis | (-) | (-) | (-) | (-) |
| CO₂ | (+) | (-) | (-) | (-) |
| Anti-suero | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Acriflavina | (+) | (+) | (+) | (-) |

A)



B)



Figura 15: a) Morfología Microscópica b) Morfología colonial de *Brucella microti*

La cinética de crecimiento de *Brucella microti* fue mayor en comparación con las otras especies del género (Tabla 9). La Figura 16 muestra que el crecimiento *B. microti* fue mayor que el de *B.*

abortus, *B. melitensis* y aunque también fue mayor que en *B. suis*, esta presentó una gran similitud. En la Figura 17 se aprecia que en la curva de crecimiento, *B. microti* concluyó su fase de adaptación a partir de la hora 4, iniciando su fase logarítmica. *B. suis* a partir de la cuarta hora también inicia su fase logarítmica, sin embargo, las UFC no crecen como en *B. microti*. Mientras que *B. abortus* y *B. melitensis* concluyen su fase de adaptación en la hora 7 e inician su fase logarítmica.

Tabla 9: Cinética de crecimiento de 4 especies de *Brucella* expresado en D.O en 15 horas de crecimiento.

| Tiempo | <i>Brucella microti</i> | <i>Brucella suis</i> | <i>Brucella melitensis</i> | <i>Brucella abortus</i> |
|--------|-------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------|
| | D.O | D.O | D.O | D.O |
| 0 | 0.04 | 0.08 | 0.036 | 0.06 |
| 1 | 0.041 | 0.087 | 0.046 | 0.066 |
| 2 | 0.067 | 0.095 | 0.054 | 0.068 |
| 3 | 0.095 | 0.101 | 0.069 | 0.07 |
| 5 | 0.39 | 0.291 | 0.105 | 0.11 |
| 7 | 0.878 | 0.67 | 0.14 | 0.15 |
| 9 | 1.299 | 1.08 | 0.325 | 0.621 |
| 11 | 1.624 | 1.36 | 0.715 | 1.124 |
| 13 | 1.767 | 1.488 | 0.95 | 1.35 |
| 14 | 1.881 | 1.731 | 1.115 | 1.529 |
| 15 | 1.996 | 1.782 | 1.45 | 1.629 |

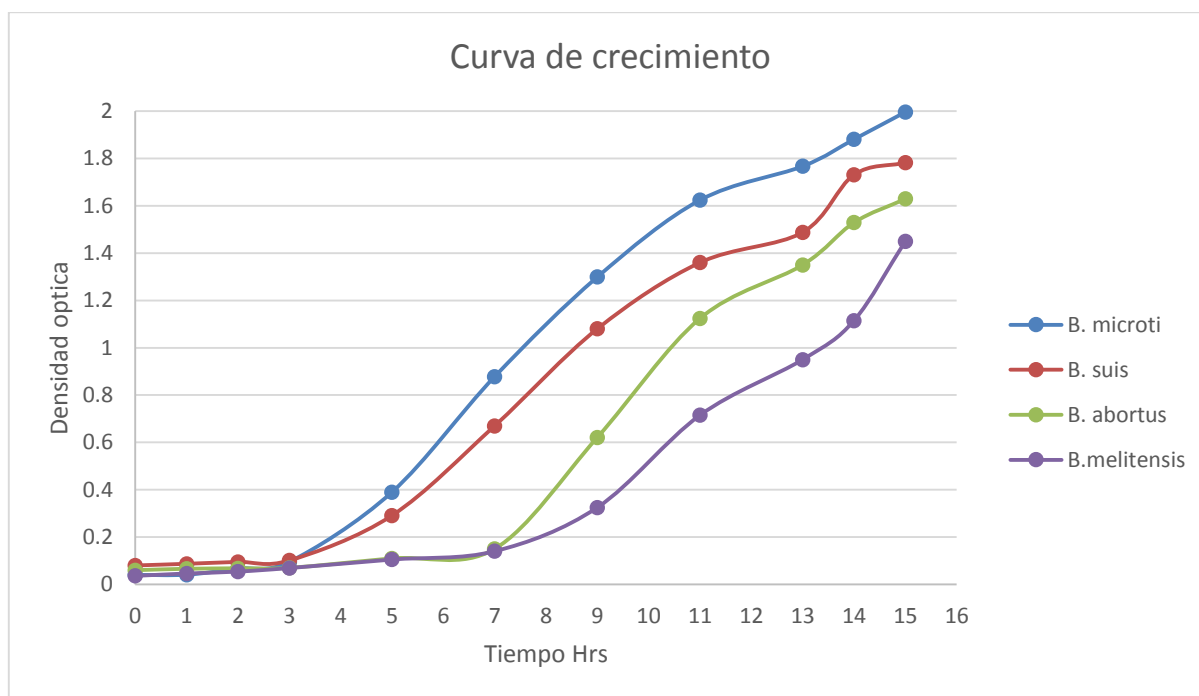


Figura 16: Cinética de crecimiento de *Brucella microti*, en comparación con el crecimiento de *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* en 15 horas.

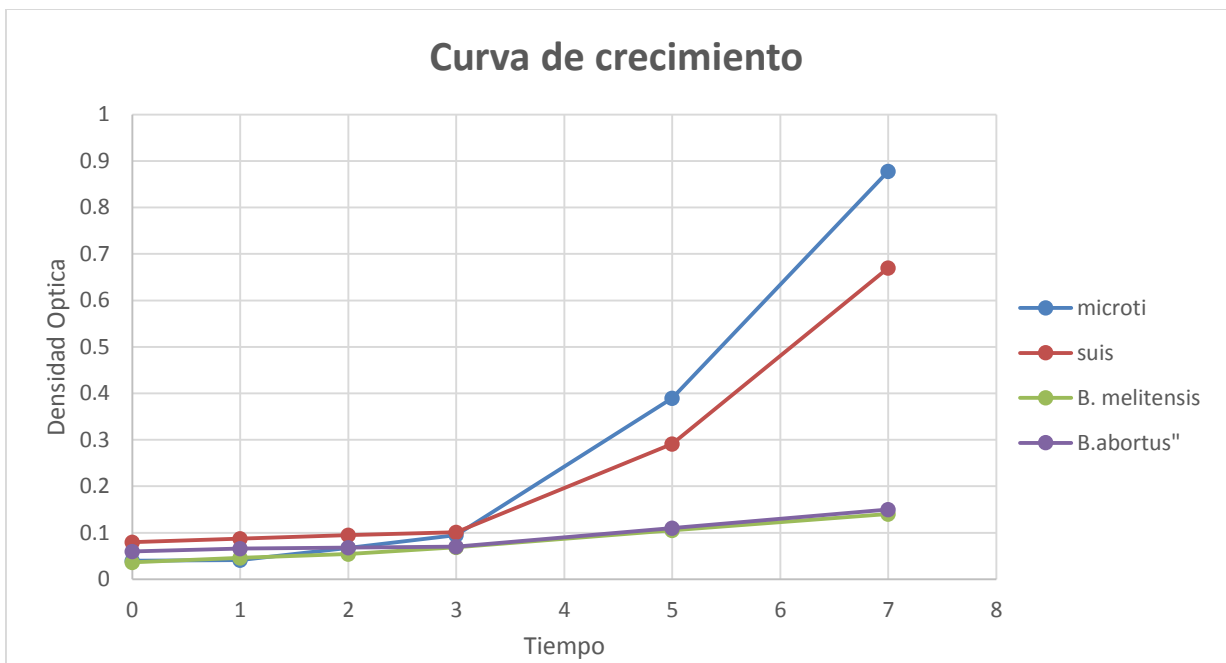


Figura 17: Cinética de crecimiento de *Brucella microti*, *B. suis*, *B. melitensis* y *B. abortus* a las 7 horas de crecimiento, en donde se observa la conclusión de la fase de adaptación.

Tabla 10: Tiempo de generación de *B. microti* en comparación con el tiempo de generación

| Tiempo de Generación | | | | | |
|-----------------------------|---|----------------------|-------------------|----------------|-------------------|
| formulas | | <i>B. melitensis</i> | <i>B. abortus</i> | <i>B. suis</i> | <i>B. microti</i> |
| $n = 3.3 (\log Y - \log x)$ | N | 9.717 | 10.212 | 17.154 | 18.774 |
| $t = hr * \min$ | T | 900 | 900 | 900 | 900 |
| $G = t / n$ | G | 92.620 min | 88.131 min | 52.466 min | 47.938 min |

Donde:

n= (número de generaciones)

t= (tiempo en crecimiento exponencial)

G = (tiempo de generación)

El tiempo de generación de *B. microti* es de 47.93 minutos mientras que el de *B. abortus* es de 88.131 minutos, el de *B. melitensis* es de 92.620 y el de *B. suis* es de 52,466 minutos, esto indica claramente que el crecimiento de *B. microti* mayor al de *B. melitensis* y al de *B. abortus* ya que el tiempo de replicación de *B. microti* es menor, mientras que comparando con el tiempo de replicación de *B. suis* demuestra ser similar pero menor al de al de *B. microti*.

Una de las características del género *Brucella* es su crecimiento en medios de cultivo con colorantes a diferentes concentraciones. En la tabla 10 se muestra que *B. microti* comparte características similares a las de *B. melitensis* que es capaz de crecer en todos los medios con colorantes y en todas las concentraciones, a diferencia de *B. suis* que solo crece en colorantes como Tionina en ambas concentraciones (1:25,000 y 1:50,000) y se inhibe en medios como Fucsina y Safranina. Mientras que *B. abortus* es capaz de crecer en Fucsina y Safranina y se inhibe en ambas concentraciones de Tionina. (Figura 18)

Tabla 11: Tipificación por sensibilidad a colorantes de varias especies del género *Brucella*.

| Prueba/Cepa | <i>B. abortus</i> (S19) | <i>B. melitensis</i> (M16) | <i>B. suis</i> (1330) | <i>B. microti</i> |
|------------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------|
| Tionina 1:25000 | (-) | (+) | (+) | (+) |
| Tionina 1:50000 | (-) | (+) | (+) | (+) |
| Fucsina | (+) | (+) | (-) | (+) |
| Safranina | (+) | (+) | (-) | (+) |

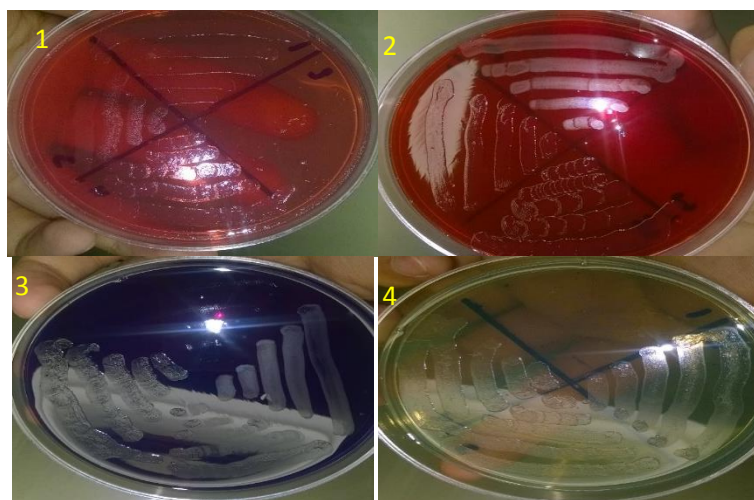


Figura 18: Crecimiento de *Brucella* con diferentes colorantes en Agar *Brucella*-BUAP. 1. *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* y *B. microti* se crecieron en agar *BRUCELLABUAP* con los colorantes Tionina, safranina y fucsina en las concentraciones recomendadas para la tipificación. 1.- Crecimiento de las 4 especies de *Brucella* en el agar con safranina, 2.- Crecimiento de las 4 especies de *Brucella* en el agar con Fucsina, 3.- Crecimiento de las 4 especies de *Brucella* en el agar con tionina [1, 50,000], 4.- Crecimiento de las 4 especies de *Brucella* en el agar con Tionina [1, 25,000].

En la tabla 11 se muestra el resultado del perfil de crecimiento de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. microti* en presencia de antibióticos, que se usaron como un criterio más en la diferenciación y tipificación de las especies del género *Brucella*. La penicilina se usa como una prueba diferencial de especie. *B. suis* y *B. abortus* son sensibles, mientras que *B. melitensis* y *B. microti* presentan resistencia a la Penicilina. Todas las especies del género *Brucella* fueron sensibles en presencia de Cefotaxima, Ceftriaxona y Gentamicina que son antibióticos de amplio espectro, en el caso de la Cefotaxima y Ceftriaxona son bactericidas de bacterias gramnegativas, Gentamicina es inhibidor de bacterias gramnegativas. De igual forma todas las especies son resistentes en presencia de Ciprofloxacino a pesar de ser un inhibidor de bacterias gramnegativo y grampositivas. Sin embargo podemos observar diferencias en presencia de Fosfomicina que es una acetilglucosamida en donde *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* tienen una sensibilidad intermedia, mientras que *B. microti* es resistente este antibiótico (figura 19)

Tabla 12: Sensibilidad a antimicrobianos de 4 cepas de *Brucella*.

| Prueba/Cepa | <i>B. abortus</i> (S19) | <i>B. melitensis</i> (M16) | <i>B. suis</i> (1330) | <i>B. microti</i> (CMM 4915) |
|-----------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Cefotaxima | S | S | S | S |
| Ceftriaxona | S | S | S | S |
| Gentamicina | S | S | S | S |
| Ciprofloxacino | R | R | R | R |
| Fosfomicina | I | I | I | R |



Figura 19: Sensibilidad de *B. microti* a antimicrobianos. 1) Sensibilidad a Cefotaxima, 2) Sensibilidad a Ceftriaxona, 3) Sensibilidad a Gentamicina, 4) Resistencia a Ciprofloxacino, 5) Resistencia a Fosfomicina.

Conclusiones

- *B. microti* fue capaz de fenotipificarse y diferenciarse de las demás especies del género: *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* por medio de los métodos microbiológicos clásicos y pruebas especiales del género *Brucella*.
- *B. microti* y las demás cepas de referencia de *Brucella* amplificaron el gen *bp26*, en la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), pero no lo hizo *E. coli*, indicando que las especies de *Brucella* se encontraron puras.
- *Brucella microti* presentó una mayor velocidad de crecimiento en comparación con las demás especies del género *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*).
- el tiempo de generación de *B. microti* es menor que el de las demás especies de *Brucella*.
- En la prueba de ureasa *B. microti* presentó actividad en un menor tiempo con respecto a *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*.
- En la prueba de producción de ácido sulfhídrico se observó que *B. microti* produjo mayor cantidad en comparación con las otras especies.
- *B. microti* no presentó aglutinación con acriflavina mientras que las demás especies de *Brucella* sí presentaron aglutinación.
- *Brucella microti* es capaz de diferenciarse de las demás especies del género *Brucella* cuando crece en medios con diferentes colorantes.
- El perfil de sensibilidad a los antimicrobianos encontrado en *B. microti* difiere de las cepas de referencia de *Brucella*.

Bibliografía.

- Alton, G. G.; Jones, L. M.; Angus, R. D.; Verger, J. M., (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. 2-7380-0042-8, 1, 19
- Ambrosio, M. *Municipios Puebla*. Recuperado el 30 de abril de 2014, de Se extiende brucelosis en ganados de la Mixteca poblana: <http://www.municipiospuebla.com.mx/nota/2014-04-04/acatl%C3%A1n-de-osorio/se-extiende-brucelosis-en-ganados-de-la-mixteca-poblana>
- Audic, S., Lescot, M., Claverie, J.-M., H.C. Scholz.. (2009). *Brucella microti*: The Genome Sequence of an Emerging Pathogen. *BMC Genomics*, 10: 1-18.
- Banai, M., Corbel, M. (2010). Taxonomy of *Brucella*. *The Open Veterinary Science Journal*, 4:85-101.
- Cavelieri, S., J. *et al* (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana/ United States of America: ASM. ISBN 1-55581-347-x
- Corbel M J., (may 1991). Identification of dye-sensitive strains of *Brucella melitensis*. *J. Clin. Microbio*, 29:1066-1068.
- Corbel, M.J., Briimley Morgan W.J. (1982). Classification of the genus *Brucella*: the current position FAO/WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Brucellosis, Central Veterinary Laboratory, 1: 281-289.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Redkar, R.J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., (October 2002). The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Current Issue*, 99: 443-448.
- DelVecchioa, V.G, Kapatralb, V. Elzerc P. Patraa, G. Mujera C.V. (December 2002). The genome of *Brucella melitensis*. *ISSUES*, 1 (4): 587 - 592.
- Freer E., Carrasco, R. (2001). *Brucella*: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 22: 1-2.
- Godfroid, J., Cloeckert, A., Liatard, J. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *INRA, EDP Sciences*, 36: 313–326.
- Halling, S., Peterson-Burch, B., Bricker, B. (2005). Completion of the Genome Sequence of *Brucella abortus* and Comparison to the Highly Similar Genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Journal of Bacteriology*, 187 (8): 2715–2726.
- Hongseok, T., Shamira, S., Robert, S., Dale, P., Garry, A. L., R., G. H. (2001). Revised Genome Sequence of *Brucella suis* 1330. *Journal of Bacteriology*, 193 (22): 6410.
- Hubalek, Z., Scholz1, H.C., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Dahouk, S.A., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H. (February 2009). *Brucella microti* sp. Nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *IJSEM*, 58: 375-382.
- Jiménez de Bagüés, M.P., Bettache, S.O., Quintana, J.F., Mitjana, O., Hanna, N., Bessoles, S., Sanchez, F., Scholz, H.C., Lafont, V., Köhler, S., Occhialini, A. (2010). The New Species *Brucella microti* Replicates in Macrophages and Causes Death in Murine Models of Infection. *J Infect Dis.*, 202: 3-10

- Lapaque, N., Moriyon, I., E., Moreno, Gorvel, J-P. (February 2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Host--microbe interactions: bacteria*, 8: 60-66.
- McCullough, N.B., Beal, G.A., (1951). Growth and manometric studies on Carbohydrate utilization for *Brucella*. *The Journal of Infectious Diseases*, 89: 66-276
- Moreno E., Moriyón I. (2006). The Genus *Brucella*. *The Prokaryotes*, 5: 315- 446.
- Moreno, E., Cloeckert, A., Moriyón I. (December 2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology*, 1 (4): 209- 227.
- Moriyón, I., López-Goñi, I. (1998). Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella mellitensis*. *Internat Microbiol*, 1: 19-26.
- Moriyón, I.; López-Goñi, I. (Abril 1994). Características estructurales y genéticas de *Brucella abortus*. *Bovis*, 25 37-59.
- OMS-OPS. (1995). Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud. X revisión. Publicación Científica, I, II (554).
- Pappas, G. (2006). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*, 6: 91-99.
- Roldan Castañeda E.I. (Marzo 2005). Suplemento nutritivo para el crecimiento de *Brucella* spp. *Scielo*, 43: 27-31.
- Roop, R. M., Bellaire, B. H., Anderson, E., Paulley, J. T. (2004). Iron metabolism in *Brucella*. *Brucella: molecular AND cellular biology*, 45: 243-262.
- Rosa, J. (2000). Zoonosis: Manual de Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio. México: Secretaría de Salud, InDRE.
- Scholl A.M., Draegera A., Göllner C., Scholz H.C., Nöckler K. (January 2010). Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *Journal of Microbiological Methods*, 80, 112- 114
- Scholz, H.C., Hofer, E., Vergnaud, G., Le Fleche, P., Whatmore, A.M., Dahouk, S.A., Pfeffer, M., Krüger, M., Cloeckert, A., Tomaso. H. (Abril 2009). Isolation of *Brucella microti* from Mandibular Lymph Nodes of Red Foxes, *Vulpes*, in Lower Austria. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9: 153- 156.
- Scholz, H.C., Hubalek, Z, Nesvadbova, J., Tomaso, H., Vergnaud, G., Le Flèche, P., Whatmore, A.M., Al Dahouk, S., Krüger, M. (Agosto 2008). Isolation of *Brucella microti* from Soil. *Emerg Infect Dis.*, 14: 1316-1317.
- Scholz, H.C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Dahouk, S.A., Kämpfer, P., Cloeckert, A., Whatmore, A.M., (April 2010). *Brucella inopinata* sp. Nov., isolated from a breast implant infection. *IJSEM*, 60: 801-808.
- Secretaría de Salud. (s.f.). Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-1994, para la Prevención y Control de la Brucelosis en el Hombre
- Síntesis. (30 de Diciembre de 2013). Erradican Brucelosis en 46 municipios poblanos. Síntesis
- Walker, T. S. (2000). *Microbiología*. México: McGraw-Hill.

- Wattam, A.R., Williams, K.P., Snyder E.E., Almeida, N.F., Dickerman, A. W., Crasta, O.R., Kenyon, R. (June 2009). Analysis of Ten *Brucella* Genomes Reveals Evidence for Horizontal Gene Transfer Despite a Preferred Intracellular Lifestyle. *Journal of Bacteriology*, 191: 3569–3579.
- Wenxiao Liu, Z. J. (2012). Complete Genome Sequence of *Brucella melitensis* Biovar 3 Strain NI, *Journal of Bacteriology*, 194 (22):6321.
- Whatmore, A.M., Davison, N., Cloeckaert, A., Dahouk, S.A., Zygmunt, S., Brew, S.D., Perrett, L.L., Koylass, M.S... (September 2014). *Brucella papionis* sp. Nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *IJSEM*, 64: 4120-4128.
- Whatmore, A.M., Groussaud, P., Stubberfield, E.J., Allix M.K.S, Perrett, L.L., Dawson, C.E. (December 2013). Examination of Taxonomic Uncertainties Surrounding *Brucella abortus* Bv. 7 by Phenotypic and Molecular Approaches. *Appl. Environ. Microbiol*, 80: 1570-1579.
- Whatmore, A.M., Schlabritz-Loutsevitch, N.E., Quance, C.R., Koylass, M.S., Cummins, L.B., Dick Jr, E.J., Snider, C.L., Cappelli, D. (February 2009). A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates first report. *Journal of Medical Primatology*, 38: 70- 73.
- Zhong, Z., Lulu, W., Chen, Y., Wang, Z., Wang, Y., Cui, M., y otros. (2012). Complete Genome Sequence of *Brucella abortus* Strain BCB034, a Strain of Biovar 2 Isolated from Human. *Journal of Bacteriology*, 194 (24): 6943.
- Zygmunt, M.S., Maquart, M., Bernardet, N., Doublet, B., Cloeckaert, A. (octubre 2010). NovellS711-Specific Chromosomal Locations Useful for Identification and Classification of Marine Mammal *Brucella* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 3765-3769.