

Extracto de trabajo realizado en Corrientes por una Profesional Matriculada en el Consejo Profesional de Médicos Veterinarios de la Provincia de Corrientes.

Dra. Diana Martínez M.P.0816

Introducción

La brucelosis es una enfermedad infecciosa que causa cuantiosas pérdidas en la producción y su aspecto zoonótico genera importantes efectos deletéreos en la salud humana (Acha y Szyfres, 1977). En Argentina está vigente el Plan Nacional de Control y Erradicación de la brucelosis bovina, que tiene como bases la vacunación con cepa 19 de *Brucella abortus*, el diagnóstico serológico y la segregación de los bovinos positivos (SENASA, Resolución 115/99).

En la primera década del siglo XX se introdujo al país ganado bubalino debido a las grandes ventajas productivas que éste ofrece bajo sistemas climáticos y pastoriles adversos para bovinos (Zava, 2004). En explotaciones ganaderas situadas en áreas bajas y anegadizas de la región nordeste, conviven ambas especies. Es sabido que los búfalos son susceptibles a la infección por *Brucella* spp. (Borghese y Mazzi, 2005), y su cohabitación con bovinos es un factor epidemiológico relevante en el aspecto de la transmisión de la enfermedad.

Las medidas de control reglamentadas para la enfermedad son aplicadas en bovinos desde el año 1999, mientras que los bubalinos han sido incorporados oficialmente al Plan Nacional de Control y Erradicación a partir de 2005, utilizándose los mismos métodos de diagnóstico (SENASA, Resolución 725/2005).

Dentro de la especie *B. abortus* están reconocidos nueve biovares (bv), de los cuales ocho - todos excepto el biovar 5 – fueron identificados como causantes de infecciones en el continente americano (García – Carrillo, 1990). Los bv identificados en Argentina, hasta el momento, fueron el 1, 2 y 4. En la especie bubalina fueron reportadas infecciones con los biovares 1, 3, 6 y 7 de *B. abortus* (Borghese y Mazzi, 2005).

En este trabajo se reporta la identificación, por primera vez en América y en la especie bubalina, del biovar 5 de *Brucella abortus* a partir de la caracterización bioquímica y molecular de una cepa aislada a partir de un aborto bubalino ocurrido en la provincia de Formosa, Argentina.

Materiales y métodos

a. Cepas de *Brucella* spp.

El asilamiento de *Brucella* spp. de búfalo fue obtenido en INTA EEA Mercedes Corrientes a partir de un feto bubalino abortado en la provincia de Formosa y fue comparado con otras cepas conocidas, aisladas en Argentina, provenientes de distintos orígenes, siendo éstas:

B. abortus biovar 1 (RN1), aislada en INTA EEA Rafaela a partir de un feto abortado por una vaca de la provincia de Córdoba.

B. melitensis biovar 1, aislada en INTA EEA Rafaela a partir de una muestra de leche de una cabra positiva de Formosa.

B. suis biovar 1, aislada en INTA Rafaela a partir del producto de un aborto en una cerda de una piara infectada, de la provincia de Santa Fe.

b. Cultivo bacteriológico

Se utilizó el medio selectivo para *Brucella* spp. recomendado por la OIE (2008) basado en agar-triptosa base con el 1% de dextrosa, el 5% de suero equino inactivado y la adición de 100 mg de cicloheximida, 2500 UI de bacitracina, 6000 UI de polimixina B, 10 mg de ácido nalidíxico y 10 mg de vancomicina por cada litro de medio. Alternativamente se utilizó para el cultivo de *Brucella* spp. el medio de Skirrow (Draghi *et al.*, 2000). Los cultivos se incubaron en una atmósfera con 10 % de CO₂ a 37°C. Las colonias se observaron entre el cuarto y decimoquinto días, se sometieron a la coloración de Gram y se observaron con microscopio óptico con un aumento de 100 x.

c. Identificación y tipificación

Se repicaron las cepas de referencia y la obtenida de un aborto bubalino en medio de cultivo específico para *Brucella* y se realizó la tipificación fenotípica según Manual OIE (2008).

Cualquier colonia con una morfología similar a la de *Brucella* se analizó por la tinción de Gram. La identificación de los microorganismos Gram negativos se realizó a través de la morfología celular, propiedades de crecimiento y pruebas de ureasa, oxidasa y catalasa. Para completar la filiación de especies y de biovariedades se recurrió a la aglutinación con sueros monoespecíficos anti-A, anti-M ó anti-R (Alton *et al.*, 1988). La cepa obtenida fue liofilizada y enviada al laboratorio de referencia de OIE (National & OIE/FAO Animal Brucellosis Reference Lab. - Bacterial Zoonoses Unit) con sede en Francia para confirmar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Los resultados se interpretaron según recomendación de OIE (2008).

d. Caracterización molecular de las cepas de Brucella

Para la extracción del ADN se recurrió al procedimiento basado en el uso de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico.

i. Genes utilizados

Gen *omp31*. Los primers B4/B5 se utilizaron para identificar *Brucella* spp. mediante la amplificación de un segmento de 223 pb, correspondiente al gen que codifica la proteína antigénica de 31 kDa, BCSP31 (Baily *et al.*, 1992).

Gen *omp2ab*. Dos juegos de primers fueron utilizados para amplificar segmentos de este gen que codifica una de las *Outer Membrane Proteins* de las especies de *Brucella* (Leal-Klevezas *et al.*, 1995a).

a. Primers DSF/DSR2: se utilizaron para identificar *Brucella* spp. a través de la amplificación de un fragmento de entre 758 y 858 pb, correspondiente a una región polimórfica del gen *omp2*.

b. Primers DSF/DSR: se utilizaron para amplificar fragmentos correspondientes a dos copias del gen *omp2*, presentes en *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. canis* y *B. ovis* y sus biovares. El fragmento esperado fue de 804 pb, excepto en el bv1 de *B. abortus*, en cuyo caso una de las copias del gen presenta una delección de 115 pb, siendo entonces dos los fragmentos esperados, uno de 804 pb y otro de 689 pb correspondiente a la copia del gen con la delección (figura 4).

Gen *eri*. Este gen regula la capacidad *B. abortus* para metabolizar el eritritol. La cepa vacunal *B. abortus* C19 presenta en este gen una delección de 702 pb (Sangari y Agüero, 1994). Por lo tanto utilizando los primers *Eri1-Oligo2* los fragmentos esperados fueron de 1000 pb para el caso de *Brucella* spp. y de 297 pb para *B. abortus* cepa 19.

Gen *alkB*-Inserto *IS711*. El gen *alkB* es un reparador de ADN. El inserto *IS711* es una secuencia repetitiva de inserción estable dentro del genoma de *Brucella*, cuyo número y localización es variable dependiendo de la especie. Una copia del *IS711* se halla contigua a dicho gen en *Brucella* spp. y existe diversidad genética entre variedades a este respecto (Marianelli *et al.*, 2003). Basados en esta diversidad Bricker y Halling (1994) desarrollaron una PCR múltiple conocida como AMOS PCR que permite identificar los biovars 1, 2 y 4 de *B. abortus*, *B. melitensis* bv1, bv2 y bv3; *B. ovis* y *B. suis* bv1. Con el objeto de incrementar la sensibilidad, para este trabajo se realizaron pruebas independientes utilizando los primers 416F/*IS711*R y *B. melitensis*F/*IS711*R para amplificar un fragmento de 498 pb para *B. abortus* y de 731 pb para *B. melitensis* respectivamente.

ii. Primers

iii. PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

La reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 50 µl. La Mezcla de PCR incluyó buffer 1X (20 mM Tris-HCl pH 0.84 y 50 mM KCl) y una concentración final de 2.2 mM de MgCl₂, 2 mM dNTP y 0.001 nM de cada primer, 5 µl de ADN y agua destilada libre de DNAsas y RNAsas. Para incrementar la especificidad de la prueba la amplificación se llevó a cabo con la modalidad Touch Down 64°C, donde la temperatura de hibridación va descendiendo 1°C en los primeros 4 ciclos, antes de realizar los 35 ciclos a la temperatura de hibridación establecida.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con 0.01M de bromuro de etidio y se visualizaron a través de luz UV.

iv. Secuenciación

Los productos amplificados por PCR fueron purificados mediante un kit comercial (Qiagen®) y se enviaron a secuenciar. El análisis de las secuencias se realizó mediante Clustal W (Bioedit®). Las secuencias obtenidas de las cepas de referencia y de las muestras biológicas de bovinos y búfalos se compararon a través del programa Bioedit® (Hall, 1999) con las secuencias de referencia correspondientes a los bv1 (cepas 2308 y C19) y bv5 de *B. abortus* y al bv1 de *B. melitensis* depositadas en el GenBank (accesos GenBank CP000887.1, 000888.1, AM040264.1, AM040265.1, U26440.1, U26438.1, X78881.1).

Resultados

a. La tipificación bacteriológica (fenotípica) sugirió que la cepa de *Brucella* spp. aislada del feto bubalino corresponde al género *Brucella*.

La bacteria aislada del abomaso del feto bubalino fue identificada como *Brucella* spp. en base a las características de las colonias y a la coloración de Gram.

b. La caracterización molecular determinó que la cepa aislada de búfalo pertenece al biovar 5 de *B. abortus*.

i. Gen *omp31*

A partir del aislamiento de *Brucella* spp. de búfalos se logró amplificar, con los primers B4-B5, un fragmento de 223 pb, esperado para el género *Brucella*. Un idéntico fragmento fue amplificado a partir de las cepas de *B. abortus* RN1 bv1, *B. melitensis*, *B. abortus* cepa 19, *B. suis* y *B. canis* (figura 1).

Para la caracterización molecular de *Brucella* silvestre aislada a partir del feto bubalino se necesitó de la combinación de distintos primers involucrando más de un gen.

El gen *omp2ab* fue de gran utilidad para identificar especies y biovares de *Brucella*. Dos fragmentos de 689 pb y 804 pb amplificados con los primers DSF-DSR y secuenciados, identificaron *B. abortus* bv1 (*B. abortus* RN1, RB51 y C19), mientras que un único fragmento de 827 pb fue encontrado para *B. abortus* bv5 y *B. melitensis* bv1 con 100% de similitud entre ambas secuencias. Mediante los primers DSF-DSR2 se logró identificar en el mismo gen una inserción de 139 pb encontrada también en *B. abortus* bv5 y *B. melitensis* bv1. La similitud entre cepas y la delección encontrada en dicho gen fueron descritos en un trabajo de Ficht *et al.* (1996), quienes realizaron análisis de secuencias utilizando cultivos puros de cepas de *B. abortus* (bv1 y bv5), *B. canis*, *B. melitensis* (bv1), *B. neotomae*, *B. suis* (bv1) y *B. ovis*.

El gen *alkB* fue de utilidad para amplificar fragmentos específicos de 1.700 pb para *B. abortus* bv5, 498 pb para *B. abortus* bv1 y 721 pb para *B. melitensis* bv1. Los primers específicos para *B. melitensis* generaron fragmentos de ~180 pb tanto para *B. abortus* bv1 como para bv5.

Biancifiori (1998), usando los primers 416/IS711 logró amplificar no sólo *B. abortus* bv1, sino también bv2 y bv4, y observó que *B. abortus* bv3, bv5, bv6, bv7 y bv9 no generaban producto debido al polimorfismo genético. Posteriormente Ocampo-Sosa *et al.* (2005), utilizando los primers DEL564/IS711 que amplificaban una región diferente del gen *alkB*, observaron que estos biovares presentaban una delección de 5.400 pb, por lo que podían diferenciarse mediante la amplificación del mencionado fragmento de 1700 pb, mientras que bv1, bv2 y bv4 de *B. abortus* deberían generar un producto de 7.200 pb que, debido a su gran tamaño, no sería visualizado por electroforesis en gel en condiciones normales.

El biotipo 5 de *B. abortus* fue descrito por primera vez en Inglaterra en el año 1962 por Stableforth y Jones y en 1973 Meyer y Morgan establecieron la cepa de referencia. La secuencia del gen *omp2* fue reportada en el Genbank por Ficht *et al.* (1996). Todos los biovares de *B. abortus* excepto el bv5 fueron reportados en animales domésticos de Sudamérica (García-Carrillo, 1990), mientras que en la especie bubalina, Borghese y Mazzi (2005) citan que los biovares hallados fueron el bv1, bv3, bv6 y bv7. En Argentina fueron reportados aislamientos de los bv1 y bv2 en bovinos y bv1 en bubalinos (Sanmartino, 2002).

Existen reportes de aislamiento e identificación de *B. melitensis* en bubalinos de India, Irán y otros países del Medio Oriente (Sen y Sharma, 1975, citados en Renukaradhya *et al.*, 2002; Dehkordi, 2012). Las similitudes tanto fenotípicas como genotípicas entre ambas cepas, podrían haber dado lugar a que en algunas ocasiones se hayan reportado como infecciones de *B. melitensis* bv1 a

aquellas causadas por *B. abortus* bv5 en los casos en que la tipificación bioquímica y/o molecular no hayan sido lo suficientemente exhaustivas.

Luego de una profunda búsqueda, no se encontraron reportes que indiquen la presencia de *B. abortus* bv5 en búfalos ni en otras especies del continente americano.

Se necesita profundizar los estudios epidemiológicos para conocer el origen, la distribución y la importancia de *B. abortus* bv5 en diferentes mamíferos domésticos y silvestres de la región y determinar los factores de riesgo involucrados en la transmisión. Es importante además realizar estudios que determinen el nivel de protección que podría conferir la vacuna realizada con *B. abortus* C19 (bv1) frente al desafío con bv5. No menos importante es determinar el impacto de *B. abortus* bv5 en la salud pública.