

ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO CANINO EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA BRUCELOSIS BOVINA

Cesar Llamas Rangel¹, Hismelda Rubí García Bustamante¹, Hugo Castañeda Vázquez², Juan Carlos Serratos Arévalo¹, Ricardo Flores Castro³, María Leonor Valderrama Cháirez², Irene Victoria Vitela Mendoza⁴.

¹Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco, ²Universidad de Guadalajara, ³CENID-Microbiología Animal-INIFAP, ⁴Instituto Tecnológico El Llano, Aguascalientes

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica causada por bacterias del género *Brucella*. Afecta a diferentes especies de mamíferos domésticos como son: bovinos, equinos, ovinos, caprinos, porcinos y caninos. En México se calcula una prevalencia nacional de 9% ocasionando pérdidas en la ganadería (Gil y Samartino 2000). *B. abortus* ha sido aislada en diferentes tejidos de perros infectados experimentalmente (Pidgeon et al. 1987; Scanlan et al. 1989), de los pocos reportes en caninos destacan evidencias de la transmisión interespecífica de *B. abortus* de coyotes infectados experimentalmente a ganado bovino (Davis et al. 1988). Baek et al. en el 2003, reportaron por primera vez en Corea la transmisión de la brucelosis del ganado a los perros de establo. Se ha detectado por métodos convencionales la presencia de *B. abortus* en orina y heces de lobos infectados experimentalmente (Tessaro y Forbes 2004). En México no se tiene información acerca del papel de los perros en la incidencia de la brucelosis en los bovinos ni en humanos y desde la publicación de la NOM 041-ZOO-1995 “Campaña Nacional Contra la Brucelosis en los Animales” a la fecha, no se incluye a los caninos en los programas de vigilancia de esta enfermedad, probablemente debido a la dificultad que representa la cría, manejo y mantenimiento de caninos como unidades experimentales que reúnan características de edad, sexo, susceptibilidad y homogeneidad genética y fenotípica y la disponibilidad de áreas de aislamiento adecuadas con todas las medidas de bioseguridad ya que se trata de una enfermedad zoonótica. Por los problemas de salud pública que representa esta enfermedad, y que anualmente le genera al País grandes pérdidas económicas, resulta de suma importancia

el desarrollo de un manejo integrado de la brucelosis que incluya la delimitación y control de todos los reservorios de la enfermedad. La hipótesis planteada es que los caninos que conviven con el ganado actúan como reservorio e inciden en la prevalencia de la brucelosis bovina.

OBJETIVO

El objetivo es demostrar si los caninos actúan como reservorio de *Brucella abortus* y su papel en la transmisión a bovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

El trabajo experimental se está realizando en el Laboratorio de Mastitis y en el Laboratorio de Residuos Tóxicos II del CUCBA-UDG, y en el Instituto Tecnológico de El Llano, Ags., así como en el CENID - Microbiología Animal – INIFAP.

El trabajo de campo se realizará en ranchos ganaderos de los estados de Jalisco y Aguascalientes.

Modelo canino

Con la finalidad de establecer el ciclo de *B. abortus* en el canino así como el tipo de muestra a tomar en los animales de campo se plantea el diseño de un modelo canino con animales infectados experimentalmente con $1.6-1.7 \times 10^{12}$ unidades formadoras de colonias de *B. abortus* (cepa de referencia 2308) para el cual se tomarán diferentes tipos de muestras como son: sangre, saliva, orina, heces, exudado vaginal y fluido prepucial, y así evaluar las diferentes vías de eliminación de la bacteria en un modelo animal canino mediante un análisis de regresión lineal o no lineal.

Selección de las unidades de observación

Para la obtención de los animales, utilizados como unidades experimentales del modelo canino, se gestaron tres hembras criollas con un mismo macho para tener camadas completas con la finalidad de que fueran lo más homogéneo posible y evitar sesgo. De las camadas obtenidas se seleccionaron 10 animales sanos 6 machos y 4 hembras con características fenotípicas similares y se realizó el manejo zootécnico de las camadas de perros aplicando tratamiento acaricida el día 1 post-destete así como tratamiento de Albendazol vía oral contra parásitos internos y se aplicó la vacuna polivalente Puppy Shot® (® Fort Dodge Animal Health) así como su refuerzo Puppy Shot Booster®. También fueron vacunados contra Rabia en el centro antirrábico municipal de Zapopan y se cuenta con su certificado. Antes de ser trasladados al CENID-Microbiología Animal se les aplicó de nuevo un tratamiento acaricida y se les realizó un examen clínico riguroso y se realizó un diagnóstico para Brucelosis, tomando muestras de sangre por venopunción cefálica, y se realizó la prueba de tarjeta y la prueba de rivanol como se describe en la NOM-041-ZOO-1995; los 10 animales resultaron negativos a la prueba de tarjeta, y a todas las diluciones de la prueba de Rivanol por lo que se realizó la extracción de ADN para ser analizado mediante la herramienta molecular *Brucella*-AMOS PCR (Bricker et al. 2003) resultando también negativos.

Confinamiento o encierro primario

Para el alojamiento de los perros se utilizaron jaulas colectivas en las unidades de aislamiento del CENID - Microbiología Animal – INIFAP, las cuales tienen espacio suficiente superando el mínimo recomendado de acuerdo a las especificaciones descritas en la **NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio** y tienen las condiciones adecuadas para limpieza y desinfección.

Adicionalmente se incluyeron en las jaulas bebederos y comederos automáticos que diariamente son revisados, limpiados y llenados con agua potable y alimento comercial para perros.

Toma de muestras

Se realizaran ocho muestreos desde el día 0 hasta el día 42 post-inoculación como sigue:

1er Muestreo (d-0 post-inoculación)

2º Muestreo (d-3 post-inoculación)

3er Muestreo (d-5 post-inoculación)

4º Muestreo (d-7 post-inoculación)

5º Muestreo (d-14 post-inoculación)

6º Muestreo (d-21 post-inoculación)

7º Muestreo (d-35 post-inoculación)

8º Muestreo (d-42 post-inoculación)

Análisis de las muestras

Las muestras obtenidas serán analizadas mediante pruebas serológicas, microbiológicas y moleculares.

Las pruebas serológicas incluyen la prueba de tarjeta o rosa de bengala y la prueba de rivanol.

Para la microbiológica se utilizará medio de cultivo Agar Brucella Sangre y se identificará la bacteria por microscopia y tinción de Gram.

Para la prueba molecular se requiere del establecimiento de las condiciones de extracción de ADN de las muestras y una vez obtenido esto se realizara la amplificación por PCR con iniciadores específicos siguiendo la metodología de la Brucella AMOS PCR (Bricker et al. 2003).

Establecimiento de las condiciones de extracción de ADN y PCR

Para establecer las condiciones del muestreo, extracción de ADN y PCR se obtuvieron muestras de sangre, orina, saliva, exudado vaginal y heces de 3 animales sanos, y se inocularon por triplicado con 25 μ L. de la cepa vacunal de *B. abortus* S19, con 25 μ L. de la RB51, y con 25 μ L. de agua, y los resultados se examinaron mediante un análisis univariado.

Para la extracción de ADN de las diferentes muestras se probaron diferentes protocolos de extracción y se decidió utilizar el siguiente:

A 400 μ L de muestra se les agregó 400 μ L de una solución de lisis (2% de Triton X-100, 1% de dodecil sulfato de sodio, 100 mM de NaCl y 10 mM de Tris-HCl ajustado a pH 8.0), y se adicionó 5 μ L de proteinasa K (20 mg/ml) a las muestras sanguíneas y 10 μ L a las demás, y se incubó a 55° C, por 30 min. Posteriormente se añadió 400 μ L de fenol equilibrado con HCl se mezcló por inversión y se centrifuga a 8000 X g por cinco minutos. Se colectó el sobrenadante, se mezcló con un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24: 1), y centrifugó a 8000 X g por cinco minutos. Se colectó de nuevo el sobrenadante y se le agregó 200 μ L de acetato de amonio al 7.5 M y se deja reposar por 10 minutos. Se agregaron dos volúmenes de etanol al 95% y se mantuvieron a -20°C por una hora. Se centrifugó a 8000 X g por 10 rpm, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70 %, se retiró el alcohol y secó la pastilla. El ADN seco se resuspendió en 20 μ L de TE_{10,0.1}, y fue almacenado debidamente identificado a -20°C hasta su análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han obtenido hasta el momento resultados parciales que se centran en la obtención y el manejo zootécnico de las unidades de observación y el establecimiento de las condiciones de extracción y PCR.

En el Cuadro 1 se muestra los resultados obtenidos de la extracción de las muestras inoculadas con cepas vacunales de *B. abortus*.

Cuadro 1. Concentraciones promedio de ADN extraído de muestras de perros sanos.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Inoculada con:*
Saliva	400.000	H ₂ O
Saliva	4200.000	RB51
Saliva	240.000	N19
Ex. Vaginal	255.000	H ₂ O
Ex. Vaginal	195.000	RB51
Ex. Vaginal	315.000	N19
Sangre	160.000	H ₂ O
Sangre	280.000	RB51
Sangre	225.000	N19
Orina	105.000	H ₂ O
Orina	20.000	RB51
Orina	285.000	N19
Heces	470.000	H ₂ O
Heces	3100.000	RB51
Heces	695.000	N19

* 25 μL de Agua, cepa vacunal RB51, y N19 respectivamente.

Entre las adecuaciones realizadas a los protocolos de extracción de ADN, para su utilización en todas las muestras aquí analizadas, destacan variaciones en los tiempos de incubación con proteinasa K así como cambios en la precipitación como son el uso de cloruro de sodio en lugar de acetato de amonio y la utilización de isopropanol en lugar de etanol ya que el primero no precipita el ARN y esto evita la contaminación con este ácido nucleico además de solo requerir un volumen del alcohol.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece enormemente la participación y apoyo del Dr. Javier Carreón Amaya Profesor Investigador del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco quien en todo momento nos ha demostrado su entera y desinteresada disposición en enriquecer nuestro trabajo y contribuir con nuestra formación profesional.

Así mismo deseamos extender nuestro agradecimiento al Dr. Francisco Morales Jefe del Laboratorio de Diagnóstico del CENID – Microbiología Animal a quien se le debe en gran parte el poder continuar con nuestro proyecto.

Y no podemos dejar de agradecer a la Dra. Martha Castañeda, quien a pesar de los obstáculos ha estado presente y sin su apoyo no sería posible la culminación del proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

Gil, D. A. y L. Samartino. 2000. Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina: Food and Agricultura Organization Livestock Information and Policy Branco, AGAL.

Pidgeon G. L., C. M. Scanlan, W. R. Miller, and T. W. Mayer. 1987. Experimental infection of dogs with *Brucella abortus*. *Cornell Veterinary* 77(4): 339-47

Scanlan CM, G. L. Pidgeon, B. E. Richardson, G. M. Buening, and R. J. Kemppainen. 1989. Experimental infection of dogs with *Brucella abortus*: effect of exposure dose on serologic responses and comparison of culture methods. *Cornell Veterinary*. 79(1): 93-107.

Davis, D. S., F. C. Heck, J. D. Williams, T. R. Simpson, and L. G. Adams. 1988. Interspecific Transmission of *Brucella abortus* from Experimentally Infected Coyotes (*Canis latrans*) to Parturient Cattle. *Journal of Wildlife Diseases*, 24(3): 533-537.

Baek, B.K., C.W. Lim, M.S. Rahman, C-Hyun Kim, and A. Oluoch, I. Kakoma. 2003. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 67: 312–314

Tessaro, S. V. and L. B. Forbes. 2004. Experimental *Brucella abortus* infection in wolves. *Journal of Wildlife Diseases*. 40(1): 60–65.

Bricker, B. J., D. R. Ewalt, S. C. Olsen, and A. E. Jensen. 2003. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version

of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15: 374–378.