

TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Brucella suis*

Muñoz P. M., M. J. de Miguel, J. M. Blasco, C. M. Marín
Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) Gobierno de Aragón.
Apartado 727. 50.080 Zaragoza

INTRODUCCIÓN

La brucelosis porcina por *Brucella suis* es un proceso considerado como inexistente o de muy escasa prevalencia en España y, en consecuencia, no existe ningún programa nacional de erradicación. Sin embargo, cada vez son más frecuentes los brotes de brucelosis en porcino extensivo y, además, existe una prevalencia muy elevada de la infección en el jabalí (Godfroid, 2002; Muñoz *et al.*, 2003). La mayoría de las infecciones en suidos (domésticos y salvajes) son producidas por las biovariedades 1, 2 y 3 de *B. suis*, considerándose también la liebre europea como un hospedador habitual de *B. suis* biovar 2. Las técnicas microbiológicas convencionales (esencialmente, crecimiento en medio con fucsina básica y producción de SH₂), descritas para la diferenciación de las biovariedades mencionadas (Alton *et al.*, 1988), dan resultados variables y conducen a errores de tipificación muy frecuentes (Muñoz *et al.*, 2003). Con la finalidad de solventar este problema, se han evaluado técnicas de diagnóstico y tipificación moleculares, siendo las más empleadas una PCR múltiple (denominada AMOS-PCR) basada en la secuencia de inserción *IS711* de *Brucella* (Bricker y Halling, 1994), y diversos PCR-RFLP basados en los polimorfismos de genes de las proteínas de membrana externa *Omp2a*, *Omp2b* y *Omp31*, habiéndose identificado marcadores moleculares considerados como específicos de las diferentes biovariedades (CloECKaert *et al.*, 1995; Vizcaíno *et al.*, 1997). Sin embargo, estas técnicas no han sido valoradas con un número representativo de cepas de campo y de diferentes especies animales. El objetivo de este trabajo es analizar los diferentes patrones moleculares obtenidos en las técnicas mencionadas, a partir de distintas cepas europeas de *B. suis* aisladas de animales domésticos y salvajes, y evaluar su eficacia para la identificación de sus diferentes biovariedades.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado 71 cepas de *B. suis* aisladas en España, Portugal y Croacia. Un total de 24 de las 30 cepas españolas analizadas fueron aisladas de 13 explotaciones porcinas (11 extensivas de cerdo ibérico y 2 intensivas de cerdo blanco cruzado con ibérico) y las 6 restantes, de jabalís abatidos en cotos de caza de Ciudad Real. Quince cepas fueron aisladas por el Centro Nacional de Brucelosis de Lisboa, a partir de otras tantas explotaciones portuguesas de cerdo ibérico. Las restantes 26 cepas estudiadas procedían de aislamientos realizados en el Instituto Veterinario de Zagreb (Croacia) a partir de animales domésticos (7 cepas de porcino y 2 de equinos) y salvajes (8 liebres y 9 jabalís).

Los cultivos bacterianos puros fueron previamente tipificados como *B. suis* mediante las técnicas microbiológicas convencionales (Alton *et al.*, 1988). De cada uno de estos cultivos se obtuvo ADN mediante un kit comercial (QIAamp DNA miniKIT, QIAGEN). Los patrones moleculares de cada una de las cepas se determinaron tras amplificación por PCR de los genes *omp2a*, *omp2b* y *omp31* y posterior restricción enzimática (RFLP) de los productos amplificados (CloECKaert *et al.*, 1995, Vizcaíno *et al.*, 1997). Paralelamente, usando un cebador de la *IS711* de *B. suis*, se aplicó un

AMOS-PCR (Bricker y Halling, 1994), complementando la técnica con un cebador del gen *ery* de *Brucella* (AMOS-*Ery*; Ocampo *et al.*, en prensa).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los perfiles moleculares obtenidos con los distintos marcadores analizados y su tipificación bacteriológica correspondiente se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipificación bacteriológica convencional (crecimiento en fucsina y producción de SH₂) y resultados moleculares de las biovariedades de referencia y de los distintos aislamientos de *Brucella suis* analizados.

Origen de las cepas	Cepas	Biovar	Producción de SH ₂	Crecimiento en Fucsina básica	PCR Múltiple AMOS- <i>Ery</i> ^a	PCR-RFLP de genes ^b				
						<i>omp</i> 2b	<i>omp</i> 2a	<i>omp</i> 31	Ecor I	Kpn I
Referencia	1330	1	+	-	2A	P1	P1	P2	P2	P1
	Thomsen	2	-	-	1A	P3	NC	NC	NC	P2
	686	3	-	+	1A	P1	NC	P2	P2	P1
España	24 ^c	1/2	+/-	-	1A	P3	NC	P2	P2	P2
	6 ^d	1/2	+/-	-	1A	P1	P1	P2	P2	P2
Portugal	15 ^e	1/2	+/-	-	1A	P3	NC	P2	P2	P2
	14 ^f	1	+	-	2A	P1	P1	P2	P2	P1
Croacia	6 ^g	2	-	-	1A	P1	P1	NC	NC	P2
	6 ^h	3	-	+	2A	P1	P1	P2	P2	P1

^a AMOS-*Ery*: Patrón 1A = Una banda de amplificación; Patrón 2A = Dos bandas de amplificación,

^b P1, P2, P3 = Patrones de restricción descritos como característicos de los genes *omp2a*, *omp2b* y *omp31* con las enzimas de restricción Ecor I, Kpn I, Sty I, Nco I y Ava II; (NC= no corta) en las cepas de referencia.

^c 20 cepas de cerdo y 4 de jabalí; ^d 4 cepas de cerdo y 2 de jabalí; ^e 15 cepas de cerdo; ^f 8 cepas de liebre y 6 de jabalí; ^g 6 cepas de cerdo; ^h 1 cepa de cerdo, 2 cepas de caballo y 3 de jabalí.

Si bien las cepas de referencia 1330, Thomsen y 686 (correspondientes a las biovariedades 1, 2 y 3, respectivamente) presentaron todos los patrones moleculares descritos como característicos (Cloeckert *et al.*, 1995; Vizcaíno *et al.*, 1997), los resultados no fueron tan evidentes con las cepas de campo analizadas. En el caso de las cepas españolas, tanto en las aisladas de cerdos como de jabalís, se encontraron dos combinaciones diferentes de patrones moleculares en PCR-RFLP (6 cepas con una combinación de patrones y 24 cepas con otra). Ninguna de estas dos combinaciones coincidía totalmente con la combinación de patrones considerados característicos de las biovariedades 1 y 2 de referencia, presentando siempre perfiles "intermedios". Cuando se aplicó la técnica AMOS-*Ery*, ninguna de estas cepas presentó el perfil característico de *B. suis* biovar 1. Todas las cepas portuguesas presentaron la misma combinación de patrones moleculares, que fue idéntica a la obtenida en la mayoría (24) de las cepas españolas. De igual modo, ninguna de las cepas aisladas en Portugal presentó el patrón característico de *B. suis* biovar 1 con AMOS-*Ery*. En base a estos resultados no fue posible concluir en una identificación precisa de las biovariedades aisladas en la Península Ibérica.

En contraste, las cepas de origen Croata presentaron combinaciones de patrones moleculares diferentes a los obtenidos con cepas Ibéricas. Todas las cepas identificadas microbiológicamente como *B. suis* biovar 1 presentaron patrones moleculares coincidentes y considerados característicos para esta biovariedad, incluidos los de AMOS-*Ery*. Sin embargo, las cepas identificadas microbiológicamente y mediante AMOS-*Ery* como *B. suis* biovar 2 resultaron en patrones característicos de la biovariedad 1 ó 2, según el gen amplificado. Las tipificadas como *B. suis* biovar 3

(que deberían presentar algunos patrones coincidentes con los de la biovariedad 1 y otros con los de la biovariedad 2), mostraron el patrón descrito como característico de *B. suis* biovar 1 tanto en PCR-RFLP como en AMOS-*Ery*. Al igual que ocurrió con las cepas Ibéricas, los perfiles obtenidos con cepas Croatas no guardaron relación con la especie animal de la que fueron aisladas.

Estos resultados sugieren la existencia de dos biovariedades de *B. suis* características de la Península Ibérica, ambas con marcadores microbiológicos y moleculares intermedios entre las biovariedades 1 y 2 de *B. suis*. Por otra parte, se han identificado dos biovariedades Croatas que, si bien coinciden microbiológicamente con las biovariedades 2 y 3 de referencia, presentan algunos marcadores moleculares considerados como característicos de *B. suis* biovar 1. Discordancias similares, utilizando genes de proteínas de membrana externa de *Brucella*, han sido descritos también por otros autores (Zygmunt *et al.*, 2005).

Por otro lado, la prueba AMOS-*Ery* parece ser específica para descartar las cepas Ibéricas de biovariedad 1, pero no lo es para las cepas Croatas, ya que resulta en el mismo patrón para las biovariedades 1 y 3. Con este marcador molecular no se han descrito hasta el momento discrepancias, por lo que la explicación podría residir en que algunas cepas de la biovar 1 pueden crecer en medios conteniendo fucsina y tipificarse erróneamente como biovar 3. De hecho, se han descrito cepas de *B. abortus* biovar 4 (Alton *et al.*, 1988) y de *B. melitensis* biovar 3 (Verger, comunicación personal) que no crecen en fucsina, cuando el crecimiento en este colorante se considera característico de estas biovariedades.

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que tanto las cepas Ibéricas como las Croatas presentan polimorfismos característicos que las hacen diferentes entre sí y distintas de las cepas consideradas como referencia. Esto cuestiona si las cepas de referencia de *B. suis* son representativas de sus diferentes biovariedades y cuestionan, a su vez, la validez de las técnicas microbiológicas clásicas de tipificación de *B. suis*.

AGRADECIMIENTOS

Las cepas Portuguesas utilizadas en este estudio fueron amablemente cedidas por Ana Cristina Ribeiro Alves Ferreira (C.N.B de Lisboa, Portugal) y las Croatas por Zeljko Cvetnic (I.V.C de Zagreb, Croacia). Las muestras de jabalí Españolas fueron remitidas por Christian Gortázar (Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC de Ciudad Real). Este trabajo ha sido financiado parcialmente por la UE (proyecto QLK2-CT 2002-00918), la Red Temática de Investigación Cooperativa del Instituto Carlos III (Brucelosis G03/204) y las ayudas para el Grupo Consolidado de Investigación en Brucelosis del Gobierno de Aragón.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alton G.G. et al. 1988, "*Techniques for the Brucellosis Laboratory*" INRA, Paris, France

Bricker B.J. y S.M. Halling. 1994. *J. Clin. Microbiol.*, 32(11): 2660-66.

CloECKaert A. et al. 1995. *Microbiology*, 141(Part 9): 2111-21.

Godfroid J. 2002. *Rev. Scien. Tech.*, 21(2): 277-86.

Muñoz P.M. et al. 2003, I.T.E.A. Vol. extra N° 24, Tomo I: 417-419.

Ocampo A. et al. *Vet. Microbiol.* (Aceptado, en prensa).

Vizcaíno N. et al. 1997, *Microbiology*, 143(Part 9): 2913-21.

Zygmunt M. et al. *Cost 845 Action Meeting*, Lisbon 6-7 de Mayo de 2004.