

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNICA

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Brucella* spp
EN LOBOS MARINOS DEL GOLFO DE CALIFORNIA
(*Zalophus californianus*)

T E S I S

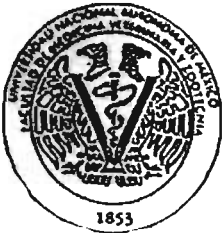
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

OSVALDO LÓPEZ DÍAZ

ASESORES:

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ
MVZ. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ
DR. DULCE MA. BROUSSET HERNÁNDEZ JÁUREGUI



MÉXICO, D.F.

2005

m345280



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Analizado y la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a digitalizar en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: OSVALDO LÓPEZ DÍAZ

FECHA: 13.06.2005

FIRMA: 

Percibo lo secreto, lo oculto:
¡Oh vosotros los señores!
Así somos,
somos mortales,
de cuatro en cuatro nosotros los hombres,
todos habremos de irnos,
todos habremos de morir en la tierra...
Como una pintura
nos iremos borrando.
Como una flor,
nos iremos secando
aquí sobre la tierra.
Como vestidura de plumaje de ave zaguán,
de la preciosa ave de cuello de hule,
nos iremos acabando...
Meditadlo señores,
águilas y jaguares,
aunque fuerais de jade,
aunque fuerais de oro,
también allá iréis,
al lugar de los descarnados.
Tendremos que desaparecer,
nadie habrá de quedar.

Nezahualcoyotl

“Al final de los caminos continuas conmigo y sólo puedo agradecerte el destino que me marcas”

Dedico este trabajo a:

Esther: por darme todo lo que un hijo puede esperar, amor y apoyo incondicional, no lo hubiera logrado sin tu ejemplo de fortaleza y tenacidad.

Alejandro: por enseñarme compromiso en mi trabajo e inculcarme honestidad así como amor a mis raíces.

Juan, Julio y Karina: por enseñarme a mantener mis convicciones y estar a mi lado.

Irene: por enseñarme que amar es darse hasta que no quede nada, sigues en mí...

Todos los amigos que crecieron conmigo e hicieron, hacen y disfrutan música, ustedes también forman parte de mí.

Mi agradecimiento a ti:

Cobra, Emú, Gamo, León y Oso por permitirme entrar en tu trabajo cotidiano
y sobre todo por mostrarme la excelente persona que eres.

Itzel: por todo el apoyo brindado y por abrirme las puertas de patología.

Ignacio: existen personas a las que nunca terminas de agradecerles
todo lo que han hecho por tí, sólo puedo decirte mil gracias por todo el cariño.

Javier: por ser faro incondicional cuando me equivoco,
cuando pierdo el control y sobre todo cuando duele, lo demás ya lo sabes...

José Luis: por hacer de mis zapatos, los tuyos y por estar siempre conmigo.

Elena, Mirna y Salomé: por recordarme que cuando ya no aguantas,
es cuando más ganas hay que echarle, sin esperar recompensa.

Adolfo, Alfredo, Antonio, Elsa, Elvia, Estela, Ema, Francis y Mauricio
por toda la ayuda brindada a nivel personal y laboral.

Héctor: por ser un hermano más.

Daniel: por ser amigo,
por enseñarme otra perspectiva de la ciencia
y también por ser mi asesor.

Dulce: por el apoyo brindado para la realización de este trabajo
y por permitirme trabajar un poco para la fauna silvestre en vida libre.

Antonio V: por abrir las puertas del laboratorio de microbiología molecular,
para fomentar la excelencia profesional, sin dejar de lado la excelencia personal.

A los miembros de mi jurado:

Arturo Rivera, Carlos González, Gustavo García y Marcela Figueroa
por su tiempo y por sus valiosas aportaciones para que
este trabajo se realizará lo mejor posible.

A toda la gente que se me escapa
y que por falta de espacio no es posible mencionar gracias a todos.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MATERIAL Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS	65

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1	25
FIGURA 2	34
FIGURA 3	36
TABLA 1	39
FIGURA 4 - 6	46 - 48
FIGURA 7	49
TABLA 2	50
FIGURA 8 - 9	52 - 53
TABLA 3 - 4	54 - 56

RESUMEN

LÓPEZ DÍAZ OSVALDO. Determinación de *Brucella* spp en la población de lobos marinos del Golfo de California (*Zalophus californianus*). (Bajo la dirección de: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, MVZ Daniel Martínez Gómez, Dr. Dulce Ma. Brousset Hernández Jáuregui).

La brucelosis es una enfermedad que afecta a un gran número de mamíferos terrestres y marinos, generando problemas reproductivos. Dado lo anterior se realizó un monitoreo en lobos marinos del Golfo de California, los cuales se encuentran en peligro de extinción. La determinación de la presencia de este microorganismo en la población se realizó por métodos de diagnóstico directos e indirectos. Para la realización de este trabajo se analizaron 186 sueros por el método de enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) empleando proteínas de membrana externa y lipopolisacárido de *Brucella* como antígeno de captura, en estos ensayos no se detectaron anticuerpos contra este microorganismo. Por otra parte, 61 muestras de sangre completa fueron sembradas en medio bifásico Ruíz Castañeda e incubadas durante tres semanas sin presentar crecimiento. Finalmente 39 muestras de ADN obtenidas de sangre completa de lobo marino, fueron analizadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de ADN de *Brucella* spp. sin presentar amplificación. Los resultados negativos obtenidos en las diferentes pruebas realizadas y la ausencia de indicadores de fallas reproductivas y lesiones patológicas sugerentes a una infección por *Brucella* en la zona muestran que esta población de lobos marinos del Golfo de California no presentan evidencia de una infección por *Brucella* spp.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una zoonosis de importancia mundial, producida por microorganismos del género *Brucella* spp, un grupo de parásitos intracelulares facultativos de varios mamíferos, incluyendo el hombre. Hasta hace algunos años se encontraban registradas sólo seis especies dentro de este género; *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae*, las cuales se han clasificado con base en su afinidad hacia un hospedero y variaciones fenotípicas. Recientemente, con el aislamiento de nuevas especies a partir de mamíferos marinos, el número de especies en este género podría aumentar a ocho al agregarse *B. cetaceae* y *B. pinnipediae*.^{1, 2, 3}

En el hombre, la brucelosis también llamada Fiebre de Malta, se presenta como una enfermedad grave, con una fase septicémica aguda seguida por un estadio crónico que puede prolongarse muchos años y puede llegar a afectar diversos órganos y tejidos. En los animales domésticos, la brucelosis representa un problema económico importante, debido a los abortos y problemas de infertilidad que genera.^{1, 3, 4}

El aislamiento es la prueba diagnóstica inequívoca de la brucelosis. Para el aislamiento de *Brucella* spp se requieren medios enriquecidos, en los cuales su crecimiento es en forma de colonias pequeñas, convexas y lisas, evidentes hasta las 72 horas. Estas colonias son translúcidas, con una tonalidad azul claro cuando se observan a contraluz. En la selección de medios de cultivo para el aislamiento a

partir de muestras de animales, se debe de considerar que el microorganismo está adaptado a un hábitat intracelular y sus requerimientos nutricionales son complejos. Algunas cepas han sido cultivadas en medios sintéticos compuestos por 18 aminoácidos, vitaminas, sales y glucosa. Por otra parte, también debe de considerarse que varios componentes del medio de cultivo pueden tener efectos tóxicos durante el primoaislamiento, por ejemplo, pueden liberarse niveles tóxicos de azufre a partir de los aminoácidos azufrados por lo cual es necesario que otros componentes del medio neutralicen estos efectos tóxicos para permitir el crecimiento de *Brucella* spp.⁵

Las muestras obtenidas de fuentes animales o humanas se inoculan generalmente en medios enriquecidos como agar sangre o agar *Brucella* (AB) adicionado con suero, una vez logrado el aislamiento las colonias pueden ser sembradas en medios básicos como triple azúcar-hierro (TSA), AB y Luria Bertani. En la actualidad se dispone de medios selectivos adicionados con antibióticos debido a que algunas muestras de campo suelen tener contaminación de hongos y bacterias de crecimiento rápido, las cuales pueden impedir el crecimiento de *Brucella* spp. Un ejemplo de este tipo de medios es el Thayer-Martin modificado y el Farrel este último es el más usado para el aislamiento selectivo de *Brucella* spp, aunque es necesario considerar que el crecimiento de *B. ovis* es inhibido en este medio. Dentro de las pruebas rutinarias para la identificación de *Brucella* spp se encuentran la tinción de Stamp, la cual es una modificación de Ziehl-Neelsen con verde de malaquita, con esta tinción, *Brucella* spp adquiere una coloración roja sobre un fondo verde, color del que quedan

teñidos otros elementos celulares. Las pruebas bioquímicas que ponen en evidencia la actividad de las enzimas oxidasa y ureasa, la utilización de carbohidratos y la producción de ácido o gas los cuales no son producidos en cantidades suficientes como para aprovechar estas pruebas en su clasificación así también como la diferenciación de las seis especies reconocidas del género *Brucella* mediante la lisis por los bacteriófagos Tb, Wb, Iz y R/C. ⁶

Cabe señalar que algunas especies en el género *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*), están divididas en biovariedades en función de cuatro pruebas complementarias: la exigencia de CO₂ para su crecimiento, la producción de H₂S, la sensibilidad a la tionina, fucsina básica y safranina y la aglutinación por sueros monoespecíficos anti-A y anti-M. ⁴

PATOGENIA

El conocer la interacción hospedero-parásito es de vital importancia para establecer los mecanismos más adecuados en el diagnóstico y control, lo que hace necesario el estudio de los mecanismos de patogenicidad de las bacterias. Actualmente se realizan diferentes trabajos, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, con el fin de conocer los mecanismos involucrados en la infección por *Brucella* spp. Algunos de estos trabajos están enfocados en conocer los eventos que suceden para la sobrevivencia dentro de los fagocitos mononucleares, los cuales son células capacitadas para internar, destruir y presentar microorganismos invasores. En éstas células, *Brucella* spp utiliza diferentes mecanismos de evasión, por

ejemplo impide la unión del fagosoma con el lisosoma y resiste las enzimas lisosomales y los productos reactivos de oxígeno.^{4,7,8}

Estudios realizados en neutrófilos de bovinos, han demostrado que la presencia de guanosin-monofosfato de adenina en las cepas virulentas de *B. abortus*, se asocia con la inhibición de la degranulación y la subsecuente liberación de enzimas lisosomales, además de que el sistema mieloperoxidasa presenta alteraciones en su funcionamiento.^{7,8}

La brucelosis se origina en condiciones naturales comúnmente, tras la ingestión de *Brucella* spp patógena eliminada por animales infectados, otras rutas de infección son la inhalación, la exposición conjuntival y el contacto a través de la piel. Siguiendo a la ingestión y penetración a través de las mucosas, las bacterias son fagocitadas por los macrófagos. Estudios de tráfico intracelular muestran que la bacteria es introducida por medio de la activación de GTPasas pequeñas de la subfamilia Rho y por el reclutamiento moderado de filamentos de actina, los cuales forman un arreglo que permite la entrada del agente.^{1,2,4,5,6,9,10,11}

En las primeras etapas de la infección, el microorganismo es expuesto a los mecanismos de defensa inespecíficos del hospedador, como la fijación del complemento. La propagación de *Brucella* spp hacia los linfonodos genera una bacteremia⁸ en tejidos como la ubre, en los cuales la bacteria continua replicándose, ocasionando una inflamación aguda, que origina que el microorganismo se excrete en la leche en grandes cantidades.⁵

Los microorganismos del género *Brucella* spp tienen una alta afinidad por los órganos reproductivos. En las vacas esto se asocia con la gestación y con la producción de un compuesto natural en el útero, denominado eritritol. De aquí algunos de los signos clínicos clásicos de la brucelosis son aborto después del quinto mes de gestación, retención placentaria, metritis e infertilidad temporal. En el caso de los animales domésticos, es la infección placentaria la que origina el aborto. No obstante que ya se conoce este dato, el mecanismo del aborto aún no se ha descrito, se sugiere que la endotoxina de *Brucella* spp promueve la producción de cortisol fetal, ésto deprime la producción de progesterona e incrementa la síntesis de estrógenos por la placenta. Esta respuesta hormonal se encuentra asociada con el incremento en la producción de prostaglandina 2 alfa por el endometrio resultando en la falta de irrigación y expulsión prematura del feto y la placenta. ¹²

La patogénesis en machos es generalmente similar a la de la hembra, sólo que en machos los órganos reproductivos infectados son las vesículas seminales y los testículos, desarrollándose orquitis y epididimitis. En este caso el número de microorganismos excretados en el semen varía entre machos y entre del mismo animal, llegándose a observar entre 100-50,000 bacterias por mililitro. Las concentraciones de microorganismos más altas se presentan durante la fase aguda de la enfermedad; después la excreción puede reducirse completamente. ^{1,}

2, 4, 5, 6, 9

Otras lesiones en casos crónicos pueden ser higromas, pequeños granulomas y abscesos. Existe variación en la aparición y grado de los signos después de la exposición, debidos a factores como la respuesta vacunal, la edad, estado gestacional, dosis de exposición y la virulencia de la bacteria.^{1, 5, 6, 9}

ESTRUCTURA BACTERIANA

La pared celular de las bacterias Gram negativas se encuentra formada por una membrana externa y un espacio periplasmático intermedio. Este último contiene una gran variedad de enzimas, entre ellas muchas que detoxifican agentes nocivos procedentes del medio, proteínas relacionadas con el transporte de nutrimentos, varias de las enzimas sobre las que actúan los antibióticos β -lactámicos y como componente estructuralmente más importante, la mureína o peptidoglucano, responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria.⁴

La membrana externa por su parte contiene distribuidos en forma asimétrica, fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS). La asimetría en la distribución de LPS, junto con sus propiedades y las de las proteínas de la membrana externa, denominadas, porinas, que forman poros en la membrana externa, hacen que funcione como una barrera de permeabilidad frente a muchos solutos hidrofílicos e hidrofóbicos.^{4,13}

Si bien la pared celular de *Brucella* spp se adapta al modelo antes descrito, su membrana externa presenta algunas diferencias con la de las enterobacterias,

por ejemplo, es relativamente permeable a agentes hidrófobos como los colorantes, detergentes y sales biliares, con diferencias entre especies y biotipos que se reflejan en las técnicas bacteriológicas de tipificación. Un aspecto importante de esta pared celular es la resistencia que muestra a péptidos catiónicos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales, también a otros policationes bactericidas como la polimixina B.^{14, 15}

Además en la membrana externa de *Brucella* spp se puede encontrar fosfoditil-colina no presente en las enterobacterias. Es posible que la presencia de este lípido se relacione con la tinción positiva de *Brucella* spp por el método de Stamp.⁴

En el LPS también se presentan diferencias importantes, este compuesto consta de una parte glucolípida (lípido A), insertada en la membrana externa y por lo tanto no expuesta en la superficie y otra parte polisacáridica dirigida hacia el exterior. Esta última se divide a su vez en dos secciones: el núcleo y la cadena O.

Existen especies rugosas de *Brucella* (*B. ovis*, *B. canis*) que de forma natural carecen de la cadena O y otras que sí la poseen (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*).⁴ De acuerdo a esta característica, la morfología colonial de las especies lisas presenta diferencias con las de las especies rugosas, cuando son teñidas con cristal violeta. Además de que las células rugosas aglutinan en solución de acriflavina al 1%, mientras que las lisas no lo hacen.^{16, 17}

Se ha reportado que el lípido A de *Brucella* spp. es químicamente distinto al de las enterobacterias y está formado por un disacárido de diaminoglucosa sustituido con β -hidroxiácidos y otros ácidos de cadena larga. A esta composición diferente se debe que algunas de las actividades del LPS de *Brucella* spp relacionada con la endotoxicidad, como la pirogenicidad, la activación del sistema de complemento y la producción de interferón, no sean tan evidentes en comparación con las producidas por enterobacterias.^{17, 18, 19, 20}

Parte importante en la biotipificación del género *Brucella* es la referente a la tipificación del antígeno somático. Los estudios realizados por Baucheron y Cloeckert al comparar LPS de 31 aislamientos provenientes de mamíferos marinos reportan un fenotipo liso con predominancia del antígeno A en todas las cepas.²¹⁻²⁴

En el biotipo 1 de *B. abortus* el único enlace presente en la cadena O es el A 1,2 y en *B. melitensis* biotipo1 hay un enlace A 1,3 por cada cuatro enlaces A1,2. Por lo tanto, en la cadena O del primero de estos biotipos hay trechos de más de cinco azúcares con el mismo enlace, ausente en el primero. Esto genera tres tipos básicos de epitopes, según confirman los estudios con anticuerpos monoclonales: el A por "*abortus*", el M por "*melitensis*" y el C por "común".²¹ En una respuesta policlonal se producen anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con varios de ellos con diferentes afinidades. Lo anterior explica porqué, en el diagnóstico serológico, es irrelevante el origen (*B. abortus* o *B. melitensis*)

del antígeno y porque no es posible distinguir el serotipo (AC, MC O AMC) infectante.^{17, 22}

La cadena O contiene los epitopes relevantes en el diagnóstico serológico cuando se emplean pruebas que detectan anticuerpos frente al LPS-S (todas aquellas que emplean suspensiones celulares o extractos que contienen LPS-S). Por esto, la generalidad de las pruebas serológicas detectan anticuerpos frente al LPS-S. La cadena O está compuesta de un solo tipo de azúcar, la N-formilperosamina, sin ramificaciones.⁴ Existen varias bacterias Gram negativas que poseen también derivados de la perosamina en su LPS como *Salmonella* del grupo N O:3, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157 y *Yersinia enterocolitica* O:9 esta última posee una cadena O similar a la de *B. abortus*, con N-formilperosamina en enlaces A 1,2. lo que hace que su reacción cruzada sea la más intensa y hay que tomarla en cuenta en el diagnóstico en áreas en la exista tal serotipo.^{17, 23} Además de la cadena O del LPS, *Brucella* spp contiene un segundo polisacárido habitualmente llamado hapteno nativo. Salvo en la unión al núcleo del LPS, el hapteno nativo es químicamente idéntico a la cadena O.^{17, 24}

Como en otras bacterias Gram negativas, la membrana externa de *Brucella* spp contiene varias proteínas (OMP), las cuales han sido clasificadas mediante su peso cuantificado en kilodaltones (kDa).¹³

Grupo 1 : entre 88 y 94 kDa relacionadas con funciones de biosíntesis de la propia envoltura. Grupo 2 : entre 36 y 38 kDa los genes *omp2a* y *omp2b* codifican

para proteínas con funciones de porinas, pero sólo en gen *omp2b* parece expresarse *in vitro*. Grupo 3 : 25 y 31 kDa codificadas en los genes *omp25* y *omp31*. *Brucella abortus* no expresa el gen *omp31*.

En la envoltura de *Brucella* spp existen varias lipoproteínas de bajo peso molecular; se conocen los genes de tres de ellas (*omp10*, *omp 16*, *omp19*). También se ha descrito una lipoproteína de peso molecular entre 9 y 8 kDa unida covalentemente al péptidoglucano.¹³

Existen diferencias en los perfiles proteínicos de la membrana externa de las distintas especies de *Brucella* spp. La más característica afecta a porciones relativas de los grupos 2 y 3. La mayoría de las proteínas presentan epitopes en la superficie de *B. abortus* y *B. melitensis*, pero su grado de exposición es menor que en los mutantes R o que en *B. ovis*.^{4, 13, 25}

Al utilizar varias OMP como antígeno en pruebas serológicas diagnósticas en estudios con *Yersinia pseudotuberculosis*, *Chlamydomphila* y *Salmonella*, se observó que éstas proveen una alta sensibilidad y especificidad ya que participan en la presentación de la respuesta inmune y en la patogenia de la enfermedad de manera significativa.²⁶ En estudios *in vitro*, algunas proteínas citosólicas y LPS de *Brucella* spp presentan reactividad cruzada con al menos tres alfa proteobacterias: *Agrobacterium*, *Sinorhizobium* y *Ochrobactrum*, que en condiciones naturales no son patogénicas para el hombre, ni para los animales, por lo cual no se consideran relevantes en la interferencia diagnóstica por pruebas serológicas.^{27, 28, 29}

La reciente caracterización de 5 nuevos miembros del grupo 3 de proteínas de membrana externa (OMP) de la familia de *Brucella* spp aporta herramientas para la posible identificación e incorporación de nuevas especies a este género así como la generación de inmunizaciones óptimas contra *Brucella*.^{13, 30}

BRUCELOSIS EN FAUNA SILVESTRE

En animales silvestres la brucelosis afecta a varias especies de rumiantes por ejemplo dromedarios (*Camelus dromedarius*) y camellos (*Camelus bactracinus*), fueron infectados por *Brucella* spp al estar en contacto con pequeños rumiantes infectados. Se han reportado casos al oeste de Asia, Mongolia y África, en donde ocasionó abortos, con excreción del microorganismo en descargas vaginales, orina y leche. La brucelosis se ha presentado también en llamas y otros pequeños camélidos en países de América del Sur.⁵

En áreas árticas de Alaska, Canadá y Rusia la brucelosis es endémica en el caribú y en el reno domesticado (*Rangifer tarandus*). Búfalos (*Bison bison*), antílopes y yaks son susceptibles también a la brucelosis y se han identificado anticuerpos en bóvidos africanos como antílopes eland, impalas, gacelas entre otros.^{5,32} En Australia, Estados Unidos y Europa el cerdo feral ha presentado infección por *Brucella suis*. Los zorros son susceptibles también a *Brucella* ocasionándoles abortos.⁵ La liebre europea (*Lepus europeus*) es susceptible a la infección, especialmente con *Brucella suis* biotipo 2 y en algunas ocasiones transmite la enfermedad a animales domésticos, especialmente cerdos.³² Ratras,

ratones y felinos generalmente resisten la infección natural, sin embargo, la rata del desierto (*Neotoma lepida*) es susceptible a la infección por *Brucella neotomae*.

5, 32

BRUCELOSIS EN MAMÍFEROS MARINOS

En los últimos años el aislamiento y tipificación de nuevas cepas de *Brucella* obtenidas en exámenes postmortem de mamíferos marinos, en las costas del hemisferio Norte alrededor de Escocia, Inglaterra, Noruega, Rusia, Zonas Árticas de Canadá, mar Mediterráneo y línea costera del pacífico de Estados Unidos han generado preocupación al ampliar el número de especies afectadas por esta bacteria; que como sucede en mamíferos terrestres, pudiera ocasionar problemas reproductivos.^{33, 34} No existen reportes de mamíferos marinos vivos que presenten signología de una infección por *Brucella* spp.^{31, 35}

El primer reporte de infecciones por *Brucella* spp en mamíferos marinos aparece en 1994³³ después del aislamiento y caracterización de la bacteria en varios cetáceos y pinípedos encallados en los mares del hemisferio norte; focas comunes (*Phoca vitulina*), delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*), ballenas minke (*Balaenoptera acutorostrata*) y sirénidos como vaquitas marinas provenientes de vida libre al Norte de Estados Unidos y Escocia³⁶. Estas especies han presentado lesiones macroscópicas y microscópicas sugerentes a infecciones ocasionadas por este agente etiológico.^{33, 36} y los aislamientos

obtenidos de órganos como bazo, hígado, pulmón, piel, testículos y útero, han permitido indagar acerca de las características de estas nuevas especies.³⁶

A través de diversos estudios de tipificación bacteriana a nivel molecular como la hibridación ADN-ADN o las referentes a tipificación fenotípica y fagotipificación, se ha demostrado que existen variaciones entre las seis especies conocidas dentro del género *Brucella* y las cepas obtenidas de mamíferos marinos.^{13, 37} Claverau y Verger, reportaron una relación mayor al 90% entre los aislamientos obtenidos de mamíferos marinos y algunas especies de *Brucella* previamente identificadas y caracterizadas³⁸; sin embargo, la ribotipificación, en un patrón de corte con la enzima *HindIII*, no presenta semejanza alguna con las especies ya conocidas. La presencia de la IS711 corriente abajo del gen *bp26* y la presencia de una doble copia de los genes *omp2a* y *omp2b* son factores relevantes.^{39, 40, 41}

Existen algunas diferencias en la tipificación fenotípica de los aislamientos de *Brucella* de distintas especies de mamíferos marinos con respecto a sus requerimientos de CO₂, la utilización de diferentes substratos (L-alanina, L-asparagina y D-galactosa) y fagotipificación por Tb, Wb, IZ y Fi. Por el contrario, el crecimiento en medios que contienen fucsina, safranina y tionina, así como la producción positiva de ureasa y H₂S, en todas las cepas analizadas muestran cierta homología con las seis especies de *Brucella* conocidas.³⁷

Los aislamientos de mamíferos marinos antes mencionados fueron obtenidos a partir de más de un tejido provenientes de 6 de 21 animales muestreados. Múltiples aislamientos del mismo animal muestran resultados idénticos para cada una de las pruebas. Todos los aislamientos presentan las siguientes características comunes típicas del género *Brucella*: cocobacilos gram negativos, no móviles, ureasa positivos. Crecimiento aerobio y después de 3 a 7 días de incubación a 37°C en 10% de CO₂ se observan el crecimiento de colonias convexas de bordes completos y superficie lisa y brillante sobre el agar.³⁷

Sobre las pruebas usadas para diferenciar especies y biovariedades, todos los aislamientos presentan las siguientes características comunes: no producen H₂S y crecen en presencia de fucsina básica (20 µg ml⁻¹), tionina (20 µg ml⁻¹), y safranina O (100 µg ml⁻¹). Los aislamientos provenientes de fócidos fueron distintos de otros en su requerimiento del 10% de CO₂. Estos aislamientos producen colonias pequeñas.³⁷

En todos los aislamientos con L-glutamato, D-ribosa y D-Xylosa se incrementó la reducción de tetrazolium. La respuesta para D-galactosa, meso-eritritol y urocanate varió entre aislamientos pero son consistentes con los obtenidos de los mismos hospederos. Estos perfiles metabólicos fueron distintos pero no tan relevantes para reconocer a distintas especies del género *Brucella* spp.³⁷

Ninguno de los aislamientos fueron lisados por los fagos R/C, aunque todos fueron lisados por los fagos Bk₂ y con mayor proporción por Iz. La lisis por fagos Wb y Fi fue menos frecuentes y generalmente más débil en estos aislamientos. El fago Tb lisó a los aislamientos de las focas de puerto (*Cystophora cristata*) y en delfines listados (*Stenella caeruleoalba*).³⁷

En las pruebas de aglutinación en placa todos los aislamientos aglutinaron con el antisuero monoespecífico A y mediante el antisuero monoespecífico M; ninguno de estos antígenos fueron aglutinados mediante antisuero monoespecífico R o Acriflavina al 0.1 %.^{16, 36}

En investigaciones recientes con grupos de ballenas minke (*Balaenoptera acutorostrata*), al Oeste del Pacífico Norte, se han reportado entre 9 y 50% de positividad en la detección de anticuerpos contra *Brucella*, así como un intervalo de entre el 5 al 50% de cambios patológicos en los órganos reproductivos de las ballenas, sugerentes a infecciones ocasionadas por *Brucella*.⁴² En oso polar (*Ursus maritimus*), principal depredador de mamíferos marinos, se ha detectado una seroprevalencia del 5.4% a la presencia de anticuerpos contra *Brucella*.^{25, 43}

La inoculación endovenosa de *Brucella*, proveniente de aislamientos de focas de puerto (*Cystophora cristata*), en cabras y ovejas gestantes, generó abortos; mientras que al inocular por vía conjuntival *Brucella*, aislada de marsopas (*Phocoena phocoena*), foca común (*Phoca vitulina*) y delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) provenientes de Escocia, los animales permanecieron

seronegativos, carentes de signología y sin presentar abortos.³³ En investigaciones recientes se reportan casos de *Brucella* en humanos relacionados a nivel laboral con mamíferos marinos. Estos trabajadores presentaron la sintomatología característica de la brucelosis además de existir evidencia de una relación entre la infección por *Brucella* proveniente de mamíferos marinos y los granulomas intracerebrales causados por una neurobrucelosis en estos pacientes.
44, 45

ECOSISTEMAS MARINOS

La salud de los ecosistemas marinos es un concepto nuevo y poco definido, debido a la enorme diversidad biológica albergada por los océanos y a los estudios ecológicos escasos los cuales limitan nuestra habilidad para definir el bienestar de este ecosistema. Un ecosistema saludable es aquel que se mantiene estable o el cual no va en decremento en cuanto a su abundancia de especies y diversidad y donde no puede observarse una degradación ambiental por los frecuentes eventos de contaminación o cosechas no sustentables. Estos ecosistemas no presentan frecuentemente enfermedades o intoxicaciones emergentes o reemergentes con implicaciones negativas para el humano y la salud de la vida silvestre, los cuales son indicadores o especies claves para evaluar el deterioro del ecosistema.⁵⁰

Los ecosistemas marinos experimentan múltiples estresores simultáneos, los cuales afectan claramente la salud de los vertebrados marinos. En algunas ocasiones, la pérdida del hábitat es aparente en todo el mundo, en áreas costeras

desarrolladas, las especies marinas tienden a concentrarse en pequeñas áreas para comer, aparearse, anidar y salir de su espacio vital haciéndolos más susceptibles ante el hombre, la explotación pesquera, agentes infecciosos, la floración de algas y contaminantes del medio ambiente.^{50, 51}

El tamaño de los océanos hace imposible evaluar el estado de salud del ambiente marino en su totalidad. La investigación científica adecuada y los programas de monitoreo, son necesarios para una escala de evaluación del presente y el futuro de la salud de estos frágiles ecosistemas.⁵⁰

Recientemente, los eventos de mortalidad que involucran a varias especies de vertebrados en los diversos niveles tróficos pueden ser usados para medir la salud de los océanos. Los mamíferos marinos, particularmente, son especies indicadoras al ser habitantes obligados de estos ecosistemas, pudiendo servir como centinelas en disturbios que reflejan cambios en la salud del ambiente costero. Ellos representan grupos de animales clave para monitorear la salud del ecosistema marino, siendo una especie que ocupa el nivel más alto en la cadena alimenticia.^{50, 51} Además, algunas especies animales y vegetales tienden a acumular lípidos solubles o contaminantes ambientales, los cuales reflejan la salud del ecosistema marinos.^{50, 51, 52}

La evolución de las especies relaciona a algunos grupos de mamíferos terrestres con los mamíferos marinos y ésto hace posible el desarrollo de pruebas diagnósticas e inmunoensayos aplicables a especies marinas además de los

conocimientos adquiridos en cetáceos, pinnípedos, sirénidos y otras especies marinas cautivas que permiten designar y desarrollar técnicas para el muestreo y evaluación.^{50, 51}

Las relaciones causa-efecto de los niveles de contaminantes persistentes, los efectos de calentamiento y otros directamente relacionados con procesos de enfermedad, tales como fallas reproductivas o inmunosupresión incrementan la susceptibilidad a infecciones en poblaciones de mamíferos marinos y deben ser interpretados con precaución.^{50, 51}

La consanguinidad, el estrés, la diversidad genética y la contaminación del ecosistema por químicos y toxinas pueden alterar la susceptibilidad de las especies hospedadoras y limitar la habilidad de éstas, disminuyendo la resistencia a enfermedades, lo que las vuelve más susceptibles e incrementa la mortalidad durante brotes de enfermedades.^{50, 51, 52}

La salud de los mamíferos marinos y los programas de respuesta al varamiento son utilizados para facilitar y diseminar datos de referencia sobre la tendencia de salud en poblaciones de mamíferos marinos y correlacionar la salud de éstos con los parámetros ambientales y coordinar respuestas efectivas para eventos de mortalidad inusual.^{42, 50, 51} El muestreo hematológico, parasitológico, sérico, histológico y microbiológico de los mamíferos marinos varados o cautivos apoya en la identificación de la causa de muerte en problemas de salud en poblaciones libres.^{50, 51, 52}

Un número importante de patógenos que pueden causar epizootias en mamíferos marinos han sido identificados inicialmente en mamíferos marinos varados. Para los problemas de salud en estas poblaciones libres, los mamíferos marinos varados pueden fungir como centinelas de la salud de poblaciones de pinnípedos salvajes.⁵²

LOBO MARINO DE CALIFORNIA (*Zalophus californianus*)

El lobo marino de California (*Zalophus californianus*) pertenece a la orden carnívora, suborden Pinnipedia, familia Otariidae, su distribución geográfica abarca desde las islas de Vancouver en Canadá hasta Nayarit (al Oeste de México).^{53, 54, 55}

La población estimada va de los 204 000 a los 214 000 individuos. Los parámetros morfométricos de los machos adultos van de entre 2 a 2.5 m de longitud corporal con un peso entre 200 a 400 Kg y son generalmente de color café oscuro presentando un punteado de coloración tenue evidente en la cabeza cerca del extremo alto de la cresta sagital sobre el cráneo, las hembras adultas miden entre 1.5 a 2 m de longitud con un peso entre 50 a 110 Kg.^{54, 56}

El lobo marino de California es esencialmente un animal costero, al cual es difícil encontrarlo mas allá de 16 Km lejos de su lobera; manteniendo su mayor actividad por la mañana o por la noche.^{53, 54, 55}

Su locomoción va desde un movimiento relajado hasta el galopeo en superficies lisas, utilizando sus aletas las cuales le permiten un desplazamiento terrestre o acuático; al nadar, frecuentemente brincan sobre el agua formando arcos superficiales para después sumergirse nuevamente, reportándose grupos de 5 a 20 individuos juveniles los cuales nadan en línea uno tras otro.^{53, 54, 55}

La dieta del *Zalophus californianus* consiste principalmente en cefalópodos y pequeños peces. Su jerarquía de dominancia está basada primordialmente en el tamaño sin embargo se consideran individuos altamente gregarios apareándose principalmente sobre terreno abierto.^{53, 54, 55}

Su comportamiento reproductivo es una poliginia territorial. La gestación es de aproximadamente 11 meses, incluyendo una implantación retardada de aproximadamente 3 meses. Las hembras llegan a su sitio de parición uno o dos días antes del parto, lo que ocurre a mediados de mayo e inicios de junio naciendo una cría por parto, aunque en cautiverio se reportan partos gemelares con una frecuencia de 1:1 (hembras:machos). El peso aproximado al nacimiento es de 6 Kg y 75 cm de longitud corporal manteniéndose al menos un año en lactación.^{53, 54, 55} Durante este tiempo las hembras hacen viajes para alimentarse con una duración de aproximadamente dos días y regresen a sus loberas para amamantar a sus crías.^{53, 54, 55}

La madurez sexual de los individuos se presenta a los 9 años en machos, pero el acceso a las hembras depende en gran medida de su capacidad para defender un territorio, el cual es indispensable para la reproducción. En las hembras se alcanza entre los 6 y 8 años. La longevidad estimada es entre 18 y 22 años.^{57, 58, 59}

Resultados de estudios postmortem en lobos marinos del Golfo de California arrojan resultados de las principales causas de muerte como las infecciones parasitarias pulmonares y entéricas, trastornos gastrointestinales ocasionados por *E.coli*, desnutrición, leptospirosis, neumonías bacterianas y bronconeumonías por aspiración. Existiendo también reportes acerca de la presencia de enfermedades vesiculares y de la enfermedad del edema.⁵⁸ Los estudios relacionados en esta misma población con *Leptospira*, muestran que los anticuerpos contra *Leptospira interrogans* presentan diferencia por colonia, causados posiblemente por diferencias en la presencia de reservorios vertebrados en las islas y en las presas consumidas por *Zalophus californianus*.⁶⁰

Un estudio sobre la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp en lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) en el Golfo de California, utilizando diversas pruebas diagnósticas para *Brucella* spp en ganado muestra resultados positivos en la prueba de tarjeta con dos diferentes concentraciones al 3% y al 8%, fijación de complemento y ELISA indirecto con LPS. Los resultados obtenidos muestran una incidencia alta (5.4%) con dos de las pruebas empleadas.⁶¹ Estos resultados son pioneros en la investigación epidemiológica de *Brucella* spp en

lobos marinos del Golfo de California, sin embargo no son concluyentes debido a que se emplearon pruebas estandarizadas para el diagnóstico de brucelosis bovina (pruebas de tarjeta) y solo se evaluó la respuesta inmune dejándose de lado la detección del agente, ya sea por métodos de aislamiento o técnicas moleculares.

En el presente trabajo se emplearon técnicas serológicas (ELISA con LPS y OMP) para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp así como medios especiales para el aislamiento y métodos moleculares de mayor sensibilidad y especificidad como la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El empleo de estas técnicas permite conocer con mayor exactitud la presencia de *Brucella* spp.

El monitoreo constante de este agente en la población de lobos marinos del Golfo de California se vuelve indispensable para la prevención y control de brotes emergentes o reemergentes los cuales puedan ocasionar un desequilibrio en el ecosistema y en la estabilidad biológica de la especie.⁵⁰

HIPÓTESIS

No existen elementos que sugieran una infección por *Brucella* spp en lobos marinos del Golfo de California (*Zalophus californianus*).

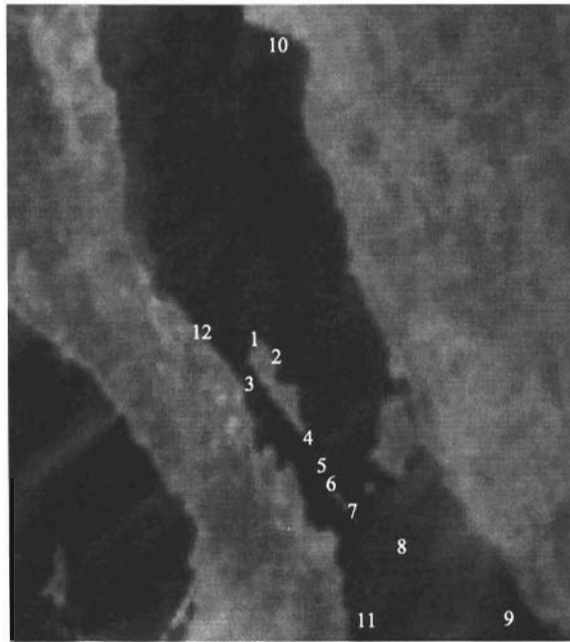
OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante pruebas directas e indirectas de diagnóstico, la presencia de una posible infección por *Brucella* spp en lobos marinos del Golfo de California (*Zalophus californianus*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Población en estudio. La localización geográfica de la población de lobos marinos de California analizada en este trabajo es el Golfo de California, entre los 20 y 30° Norte y los 112 y 118 ° Oeste. Delimitándose por los estados de Baja California y Baja California Sur hacia el oeste y Sonora, Sinaloa, Nayarit y parte de Jalisco hacia el este (Figura 1).⁶⁰

FIGURA 1. LOCALIZACIÓN DE LOBERAS REPRODUCTIVAS EN EL GOLFO DE CALIFORNIA



1. Granito
2. Cantiles
3. Machos
4. Lobos
5. Rasito
6. Partido
7. San Esteban
8. San Pedro Mártir
9. San Pedro Nolasco
10. San Jorge
11. Islotes
12. Consagrada

Muestras biológicas.

Sueros. Se utilizaron 186 sueros de crías de lobos marinos del Golfo de California (*Zalophus californianus*) de aproximadamente 2 meses de edad y algunos adultos reproductivos, obtenidos mediante contención física en los años 1995, 1997, 2002 y 2004. También fueron utilizadas 39 muestras de sangre completa con EDTA y 61 muestras de sangre completa para hemocultivos obtenidos en el año 2004.

Las muestras biológicas analizadas fueron colectadas durante la temporada reproductiva (julio – agosto) en distintos años en las siguientes islas: Consagrada, Lobos, Los Cantiles, Islotes San Jorge, San Ignacio, San Pedro Nolasco, San Pedro Mártir, San Esteban, El rasito, El partido y El granito.

Cepas. Para la obtención de antígenos empleados en la técnicas serológicas se utilizaron una cepa de *B. melitensis* biotipo 1 y la cepa 19 de *B. abortus* las cuales fueron cultivadas en agar *Brucella* y caldo *Brucella* respectivamente.

Obtención de proteínas de la membrana externa (OMP). Los cultivos de *Brucella melitensis* fueron recolectados en 500 ml de una solución amortiguadora de fosfatos (1.9 mM NaH_2PO_4 , 8.1 Mm Na_2HPO_4 , 154 Mm NaCl). La solución obtenida fue inactivada a 65°C durante 60 min, en baño María, posteriormente fue sonificado en un homogenizador ultrasonico (Cole parmer,® California. EUA) 5 ciclos de 6 seg por 9 seg de descanso a una amplitud del 40% y

un tono del 35% para centrifugar (Centrifuga Beckman® L8-80 California. EUA) a 6000 xg a 4 °C durante 15 m. La pastilla fue resuspendida en 10 ml de una solución con inhibidores de proteasas (SIP) (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM PMSF, 0.1 mM TLCK) con 5% de triton X100 e incubado a 37°C durante 2 h. Al finalizar el tiempo de incubación se centrifugó a 6000 xg a 4°C durante 15 m recuperando el sobrenadante para centrifugarlo a 15000 xg a 4 °C durante 30 m. La pastilla obtenida fue suspendida en 10 ml de una solución inhibidora de proteasas (SIP) y se repitió el protocolo de centrifugación, la pastilla fue suspendida en 500 µl de SIP almacenándose a –80°C hasta su uso.⁴⁶

Obtención de lipopolisacárido de la membrana externa (LPS). Dos matraces con 500 ml de caldo Brucella fueron inoculados con *B. abortus* y se incubaron en agitación constante a 37°C durante 72 h, al término de este tiempo el cultivo se centrifugó a 5000 xg durante 20 m, desechando el sobrenadante. La pastilla se pesó y se le agregó agua bidestilada estéril, en una proporción de 1g 3.3 ml. Esta suspensión se homogenizó, esterilizándose a 121 °C, 15 lb por 15 m, después se centrifugo a 12000 xg durante 15 m. El sobrenadante se precipitó con 3 volúmenes de etanol al 95 % a 4°C con agitación durante 18 h. Al término de este tiempo se centrifugo a 45000 xg a 5 °C durante 15 minutos, colectándose la pastilla en 50 µl de etanol, esta pastilla se centrifugó a temperatura alta con vacío en un equipo SAVANT® SC110 (Nueva York. EUA). Después el pellet fue pesado y resuspendido en agua bidestilada estéril. Finalmente se agregó proteinasa K y

se incubó a 37 °C durante 4 h y almacenándose en congelación a –80°C hasta su utilización.

Cuantificación de proteínas. La determinación de la concentración de proteína se realizó mediante el método de Bradford utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. El método de Bradford consiste en comparar el valor de absorbancia obtenido en una curva de calibración, preparada con albúmina sérica bovina (ASB) con el valor de absorbancia obtenido de la muestra problema. Este método fue ajustado para realizarse a concentraciones de 1, 2, 4, 6, 8, 10 µg/ml de ASB, incluyéndose agua bidestilada como solución blanco. Las lecturas que se obtuvieron en la curva de calibración, fueron utilizadas para calcular la concentración de la muestra problema.⁴⁶

Hidrólisis de proteínas de membrana externa de *Brucella melitensis* . Previo a su cuantificación las proteínas se hidrolizaron en la siguiente forma: 30 µl de muestra de proteína se le agregó 1 ml de ácido tricloroacético al 5% y se incubó 10 m en hielo. Después la pastilla se resuspendió en 1 ml de hidróxido de sodio 0.4 N homogenizándolo con ayuda de un vortex.⁴⁶

Geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS). Se utilizó una cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN II, BIO-RAD® California. EUA), para electroforesis vertical. Los geles separadores fueron preparados al 12% de poliacrilamida en 0.375 M Tris, pH 8.8 y los geles concentradores a 4% de poliacrilamida en 0.125 M Tris, pH 6.8. Las proteínas fueron hervidas, 5 m previo a su separación electroforética, con 20 µl amortiguador de muestra (25 mM tris, pH 6.8, 10% SDS, 1 % betamercapto-etanol, 15 % glicerol, 0.005% azul de bromofenol). La cantidad de proteínas utilizada por pozo fue de aproximadamente 40 µg. Las muestras de OMP de *Brucella melitensis* fueron separadas por electroforesis a 75 volts durante 4 h y los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. En el caso del LPS de *B. abortus*, se emplearon también a 75 volts durante 4 h y los geles se tiñeron con nitrato de plata (Ag NO₃).⁴⁶

Tratamiento de desnaturalización parcial del antígeno previo a su fijación en las placas. Una alícuota de OMP con 130 µg, se le adicionó 1 µl betamercapto-etanol, 10 µl SDS al 10% Y 39 µl de SIP y se hirvió durante 5 m en baño María, después se realizaron las diluciones correspondientes con PBS 7.2 para fijar la proteína en las placas.⁴⁶

Unión del antígeno a la fase sólida. Para la fijación del antígeno a la fase sólida, se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (NUNC® California. EUA), para lectura colorimétrica. Las OMP, fueron diluidas con PBS pH 7.2 para obtener una concentración final de proteínas (ag) a 2

µg/pozo. Sólo este antígeno fue sometido al tratamiento de desnaturalización parcial previo a su fijación en las microplacas. En el caso de la fijación del LPS a la fase sólida, se utilizó también PBS pH 7.2 para obtener una concentración final de LPS de 1.5 µg por pozo. Para obtener una menor variación, la línea periférica de pozos no fue utilizada. El antígeno se fijó colocando 100 µl de la solución de antígeno correspondiente e incubando las placas a temperatura ambiente durante 24 h. Al término de éste tiempo las placas se lavaron en un lavador de microplacas (Immunowash 1250 BIO-RAD® California. EUA) por tres ocasiones con 250 µl/pozo de PBS-Tween (10 mM PBS, pH 7.2 0.05% de Tween 20). Para bloquear las placas se agregaron 200 µl de una solución de albúmina al 1% a cada pozo dejándose incubar a temperatura ambiente durante 2 h, para finalmente lavar después durante tres ocasiones con PBS-Tween.⁴⁶

Realización de la técnica de ELISA (OMP y LPS). Se realizaron diluciones triples seriadas a partir de 1/50 y hasta 1/12150 con un volumen final de 100 µl, se cubrió y se incubó a 37°C durante 2 h. La placa se lavó tres ocasiones con 250 µl/pozo de PBS-Tween. El conjugado utilizado fue 0.5 µg/ml de proteína G con peroxidasa. La placa se incubó a 37 °C durante 1 h. Las placas se lavaron tres ocasiones con 250 µl/pozo de PBS-Tween, en un lavador de microplacas. Al término del lavado se preparó la solución sustrato-cromógeno con 10 ml de solución citrato (0.2M fosfato de sodio, 0.1 M ácido cítrico), 1.5 mg de cromógeno (Acido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic- ABTS-), 1 µl de H₂O₂. Se adicionaron 100 µl de solución sustrato-cromógeno por pozo con una micropipeta

multicanal, se incubó a temperatura ambiente en oscuridad, durante 10, 20 y 30 m. determinándose la absorbancia (DO) con un lector de microplacas (3550 BIO-RAD® California. EUA), a una longitud de onda de 405 nm. Cada placa contó con su control positivo, control negativo y blanco.⁴⁶

Extracción de ADN de sangre de lobos marinos del Golfo de California. Se tomaron 5 ml de sangre con anticoagulante para centrifugarla a 2500 xg durante 10 m, después de esto se recuperó el paquete blanco con un tubo capilar y se transfirió a un tubo de 1.5 ml. A estas células se les agregó solución de lisis (agua estéril, 0.5 % de triton X 100, 20 µg/ml de proteinasa K), dejándose incubar a 37° C por 15 minutos. Después de esto se agregó fenol:cloroformo en proporción 1:1 y se centrifugó a 10000 xg durante 5 m, recuperándose el sobrenadante. Al sobrenadante se le agregó 1/10 del volumen total de acetato de sodio 3M pH 6.0 y 2 ½ volúmenes etanol al 100% frío. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 12000 xg durante 12 m. El pellet final fue resuspendido en tris-EDTA 10:1.

Realización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ADN de *Brucella* spp en muestras sanguíneas.

Los iniciadores empleados fueron 5-ACGCAGTCAGACGTTGCCTAT-3, y 5-GAGGCTGAAAGATGGTGCG-3. Estos iniciadores amplifican una región de la proteína de 31 kDa de *Brucella*, la cual ha sido reportada como altamente

conservada en éste género. La PCR se realizó en grupos de 10 muestras, para lo cual se preparó una solución de con 50 µl de Buffer 10X (Marca Altaenzymes), 60 µl de MgCl₂ 50 mM (marca Altaenzymes), 270 µl de agua estéril, 30 µl de DNTPS 10 mM, 20 µl de cada uno de los iniciadores y 25 UI de taq polimerasa (marca Altaenzymes). Después de homogenizarse se hicieron 10 alícuotas de 45 µl a las cuales se les agregó 2 µl de ADN de lobo marino. Cada grupo de 10 muestras contó con su control positivo (ADN de *B. melitensis*) y control negativo (agua estéril). Las condiciones del ciclo de PCR empleadas fueron: una desnaturalización inicial de 94°C durante 5m y 30 ciclos de 94 °C durante 1m, 52 °C durante 1m y 72 °C durante 1m, con una extensión final de 72°C durante 4m, hasta concluir con 4°C. realizándose en un termociclador (TECHNE® FTGRADZD Cambridge. Inglaterra) Para la observación de los productos de amplificación, las muestras se colocaron en geles de azarosa al 0.8%, para realizar una electroforesis a 85 volts durante 30 m en una cámara horizontal para electroforesis (GIBCO® BRL HORIZON 58 California. EUA). Estos geles fueron teñidos con bromuro de etidio.

Aislamiento de *Brucella* en medio bifásico Ruiz Castañeda. Se elaboraron medios bifásicos para hemocultivo de acuerdo al protocolo descrito por Ruiz Castañeda.⁶² Brevemente 5 ml de sangre fueron inoculados en cada botella y homogenizados. Estas botellas fueron incubadas a 37°C por tres semanas realizando diariamente una inspección y homogenización. Al término de este tiempo las botellas sin crecimiento fueron desechadas.

Análisis estadístico. Los resultados en las lecturas de densidad óptica de la prueba de ELISA, con OMP y LPS como antígeno de captura fueron analizados mediante análisis de varianza $P \leq 0.05$.⁴⁸

RESULTADOS

Obtención de proteínas de la membrana externa de *Brucella melitensis*. Con el fin de obtener dos antígenos distintos, útiles en las pruebas de ELISA se extrajeron lipopolisacáridos y OMP de *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* respectivamente de acuerdo a las metodologías antes descritas. Las proteínas de la membrana externa extraídas fueron visualizadas a través de electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes, teñidos con azul de Coomasie. El perfil electroforético obtenido consistió de varias bandas de proteínas de entre ellas; 14 se aprecian bien definidas (Figura 2). Estas proteínas podrían ubicarse dentro de algunos de los grupos de la clasificación propuesta para OMP de *Brucella* spp por ejemplo dos de ellas, con pesos aproximados de 81.2 y de 97.7 kDa; se podrían ubicar dentro del grupo 1, de igual forma las bandas de aproximadamente 33.1 y 39.8 kDa, las cuales se observan bien definidas, se podrían clasificar como pertenecientes al grupo 2. Finalmente las bandas de 25.7 y 32.3 kDa podrían ubicarse dentro del grupo 3. Trabajos previos realizados por nuestro grupo han mostrado la utilidad de estas proteínas como antígeno captura en las pruebas de ELISA (Figura 2).

Una vez obtenido el perfil electroforético de las OMP y comprobándose su integridad, éstas fueron cuantificadas por el método de Bradford, la concentración obtenida fue de 8.051 µg/µl. Estas proteínas fueron conservadas en congelación a -80°C hasta su utilización.⁴⁶

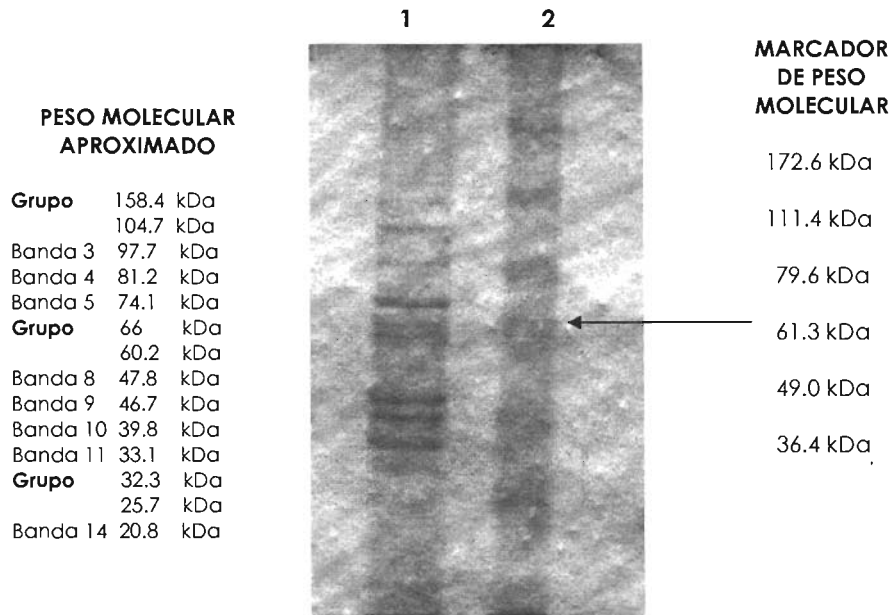


Figura 2: Foto de un gel de poliacrilamida al 12% en donde se observan en el carril 1 las proteínas de la membrana externa de *Brucella melitensis* utilizada como antígeno en este trabajo. En el carril 2 se muestra el marcador de peso molecular (BENCHMARK).

Obtención de lipopolisacárido (LPS) de *Brucella abortus*. El segundo antígeno empleado en las pruebas de ELISA, fue el LPS, dado su carácter altamente inmunogénico, Este mismo antígeno es empleado en otras pruebas serológicas para el diagnóstico de brucelosis. El LPS de *B. abortus* fue obtenido de acuerdo a la metodología antes descrita⁴⁶ y fue visualizado también mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes; la tinción empleada en este caso fue nitrato de plata. En el gel se observó una banda difusa que va desde los 40 hasta los 75 kDa lo cual corresponde a lo descrito para el LPS de *Brucella* spp (Figura 3). Con la finalidad de verificar la pureza del LPS, una muestra no fue tratada con proteinasa K, como se aprecia en la fotografía (Figura 3, carril 2), en esta muestra es posible observar todavía bandas de proteínas, mismas que no se observaron cuando la muestra es tratada con proteinasa K (Figura 3, carril 1 y 3). El LPS obtenido con esta metodología fue deshidratado y pesado para su uso posterior como antígeno de captura en la prueba de ELISA.

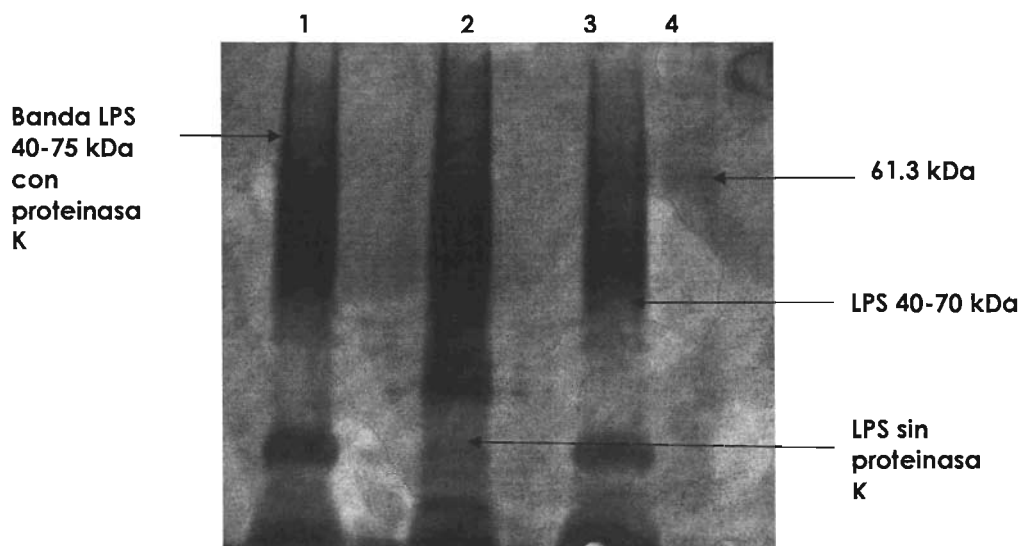


Figura 3: Foto de un gel de poliacrilamida al 12% en donde se observa en los carriles 1 y 3 el LPS de *Brucella abortus* tratado con proteinasa K. En el carril 2 el LPS de *Brucella abortus* sin tratamiento con proteinasa K; en este carril se pueden apreciar varias bandas de proteínas. En el carril 4 el Marcador de peso molecular (BENCHMARK).

ELISA con sueros de lobos marinos. Una vez obtenidos los antígenos para el ELISA indirecto, se procedió a fijarlos en las placas, a las concentraciones antes descritas. Previo a la evaluación de los sueros de los lobos marinos, estas placas fueron evaluadas con grupos de caprinos positivos al aislamiento de *Brucella* y animales negativos, mediante las pruebas serológicas convencionales (aglutinación y fijación de complemento) provenientes de un hato caprino libre de brucelosis. Estos mismos sueros fueron empleados como controles en cada una de las placas donde se evaluaron los sueros de los lobos marinos. En la primera parte de esta evaluación, las lecturas obtenidas con los sueros control muestran una curva donde en diluciones muy bajas o muy altas es posible observar que los grupos control tienden a formar un solo grupo, sin embargo en diluciones intermedias es posible establecer a estos animales como dos grupos distintos (Figura 4). Lo cual es útil para establecer si la existencia de anticuerpos en la población de estudio es significativo para establecer la presencia o exposición al agente estudiado. En cada una de estas diluciones se realizó la prueba de hipótesis:

$$H_0 \ A = B$$

$$H_a \ A \neq B$$

Donde: A corresponde a las lecturas obtenidas con los animales positivos y B corresponde a las lecturas de los animales negativos.

Los resultados obtenidos en los grupo control implican un rechazo de la hipótesis nula, confirmando la hipótesis alterna $A \neq B$ con una significancia de $T=0.05$.

Debido a que el segundo anticuerpo empleado en el ELISA con los sueros fue proteína G unida a peroxidasa. Este mismo ensayo se realizó con esta proteína obteniéndose los mismos resultados (Figura 5).

Cuando el antígeno utilizado fue LPS, los resultados obtenidos fueron los mismos (dato no mostrado). De acuerdo a lo anterior, las lecturas quedaron establecidas en las diluciones 1/150 y 1/450, para ambos antígenos (OMP y LPS) con un tiempo de lectura de 20 m y con las condiciones de antígeno y cromógeno sustrato especificadas en material y métodos.

Una vez establecidas las condiciones de la prueba de ELISA con OMP de *B. melitensis* y LPS de *B. abortus* como antígenos de captura, se continuó con el análisis de los 186 sueros de lobos marinos de las loberas antes mencionadas (Tabla 1). En cada placa se analizaron 8 sueros de lobo marino junto con un suero control positivo, un suero control negativo y un blanco.

Las lecturas obtenidas con estos sueros en el ELISA-OMP y ELISA-LPS se mostraron por debajo de las obtenidas para los animales control positivo, de tal forma que la prueba de hipótesis confirmó que no existían elementos para

considerar en esta población la presencia significativa de anticuerpos contra *Brucella spp* (Figura 6). Es decir, no se puede suponer la presencia de una infección activa en esta población, este hecho está correlacionado con la epidemiología descrita en la zona.

TABLA 1. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA CON PME Y LPS DE *Brucella spp*. OBTENIDOS CON SUEROS DE LOBOS MARINOS DEL GOLFO DE CALIFORNIA

ISLA	SUERO	ELISA PME	ELISA LPS
SAN ESTEBAN	1-95	NEGATIVO	NEGATIVO
	2-95	NEGATIVO	NEGATIVO
SAN JORGE	3-95	NEGATIVO	NEGATIVO
	4-95	NEGATIVO	NEGATIVO
	5-95	NEGATIVO	NEGATIVO
	6-95	NEGATIVO	NEGATIVO
	7-95	NEGATIVO	NEGATIVO
	8-95	NEGATIVO	NEGATIVO
LOS CANTILES	9-95	NEGATIVO	NEGATIVO
ISLOTES	1-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	2-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	3-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	4-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	5-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	6-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	7-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	8-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	9-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	10-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	11-97	NEGATIVO	NEGATIVO

TABLA 1. Continuación

ISLA	SUERO	ELISA PME*	ELISA LPS*
ISLOTES	12-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	13-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	14-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	15-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	16-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	17-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	18-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	19-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	20-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	21-97	NEGATIVO	NEGATIVO
	22-97	NEGATIVO	NEGATIVO
ISLOTES	1-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	2-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	3-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	4-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	5-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	6-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	7-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	8-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	9-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	10-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	11-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	12-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	13-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	14-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	15-02	NEGATIVO	NEGATIVO

TABLA 1. Continuación

ISLA	SUERO	ELISA PME	ELISA LPS
SAN IGNACIO	16-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	17-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	18-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	19-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	20-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	21-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	22-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	23-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	24-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	25-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	26-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	27-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	28-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	29-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	30-02	NEGATIVO	NEGATIVO
SAN PEDRO NOLASCO	31-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	32-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	33-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	34-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	35-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	36-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	37-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	38-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	39-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	40-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	41-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	42-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	43-02	NEGATIVO	NEGATIVO

TABLA 1. Continuación

ISLA	SUERO	ELISA PME	ELISA LPS
SAN PEDRO MÁRTIR	44-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	45-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	46-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	47-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	48-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	49-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	50-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	51-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	52-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	53-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	54-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	55-02	NEGATIVO	NEGATIVO
SAN ESTEBAN	56-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	57-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	58-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	59-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	60-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	61-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	62-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	63-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	64-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	65-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	66-02	NEGATIVO	NEGATIVO
EL RASITO	67-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	68-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	69-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	70-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	71-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	72-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	73-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	74-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	75-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	76-02	NEGATIVO	NEGATIVO

TABLA 1. Continuación

ISLA	SUERO	ELISA PME	ELISA LPS
EL PARTIDO	77-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	78-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	79-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	80-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	81-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	82-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	83-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	84-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	85-02	NEGATIVO	NEGATIVO
EL GRANITO	86-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	87-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	88-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	89-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	90-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	91-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	92-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	93-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	94-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	95-02	NEGATIVO	NEGATIVO
LOS CANTILES	96-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	97-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	98-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	99-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	100-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	101-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	102-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	103-02	NEGATIVO	NEGATIVO
EL PARTIDO	77-03	NEGATIVO	NEGATIVO
	78-03	NEGATIVO	NEGATIVO
	79-03	NEGATIVO	NEGATIVO
	80-03	NEGATIVO	NEGATIVO
	81-03	NEGATIVO	NEGATIVO
	82-03	NEGATIVO	NEGATIVO
	83-03	NEGATIVO	NEGATIVO
	84-03	NEGATIVO	NEGATIVO
	85-03	NEGATIVO	NEGATIVO

TABLA 1. Continuación

ISLA	SUERO	ELISA PME	ELISA LPS
CONSAGRADA	114-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	115-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	116-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	117-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	118-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	119-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	120-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	121-02	NEGATIVO	NEGATIVO
	122-02	NEGATIVO	NEGATIVO
LOBOS	01-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	02-04	NEGATIVO	NEGATIVO
LOS CANTILES	03-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	04-04	NEGATIVO	NEGATIVO
EL GRANITO	05-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	06-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	07-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	08-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	09-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	10-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	11-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	12-04	NEGATIVO	NEGATIVO
ISLOTES	13-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	14-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	15-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	16-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	17-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	18-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	19-04	NEGATIVO	NEGATIVO

TABLA 1. Continuación

SAN ESTEBAN	20-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	21-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	22-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	23-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	24-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	25-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	26-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	27-04	NEGATIVO	NEGATIVO
SAN JORGE	28-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	29-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	30-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	31-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	32-04	NEGATIVO	NEGATIVO
	33-04	NEGATIVO	NEGATIVO

* Los resultados negativos representan valores de absorbancia inferiores a los obtenidos con los controles positivos, los cuales en la prueba de hipótesis mostraron una diferencia significativa con estos últimos $P \leq 0.05$.

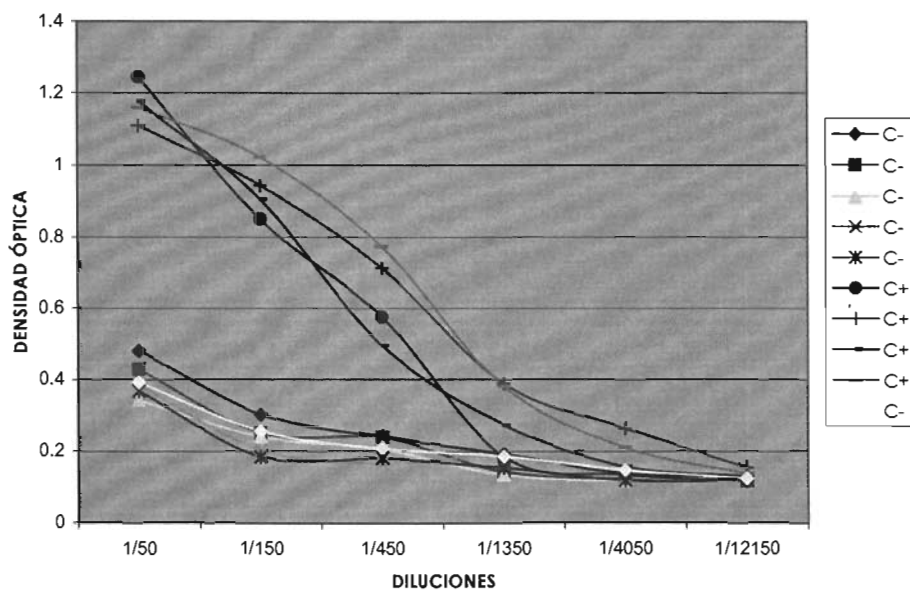


Figura 4. Valores de absorbancia obtenidos en la prueba de ELISA utilizando OMP como antígeno de captura e IgG caprino como anticuerpo secundario. Se muestra el comportamiento de los sueros controles positivos (C+) y controles negativos (C-); observándose la separación de ambas poblaciones.

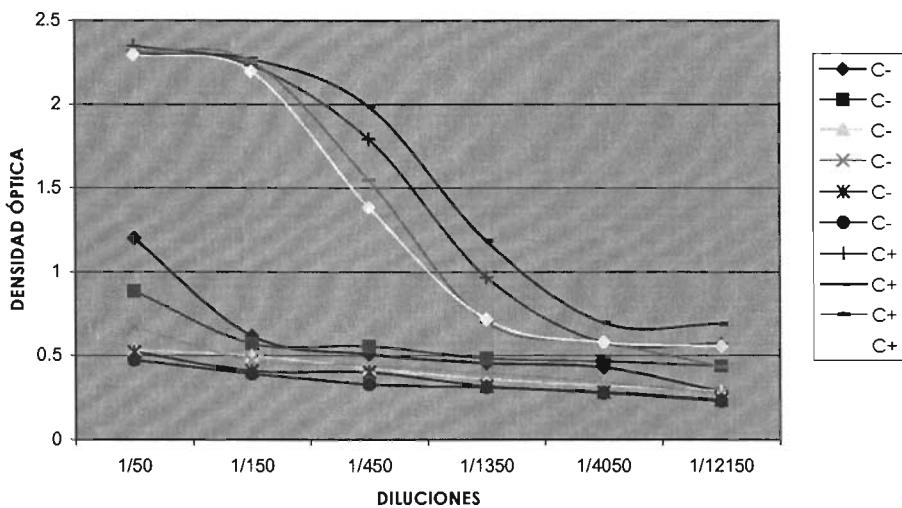


Figura 5. Valores de absorbancia obtenidos en la prueba de ELISA utilizando OMP como antígeno de captura y proteína G como anticuerpo secundario. Se muestra el comportamiento de los sueros controles positivos (C+) y controles negativos (C-); observándose la separación de ambas poblaciones.

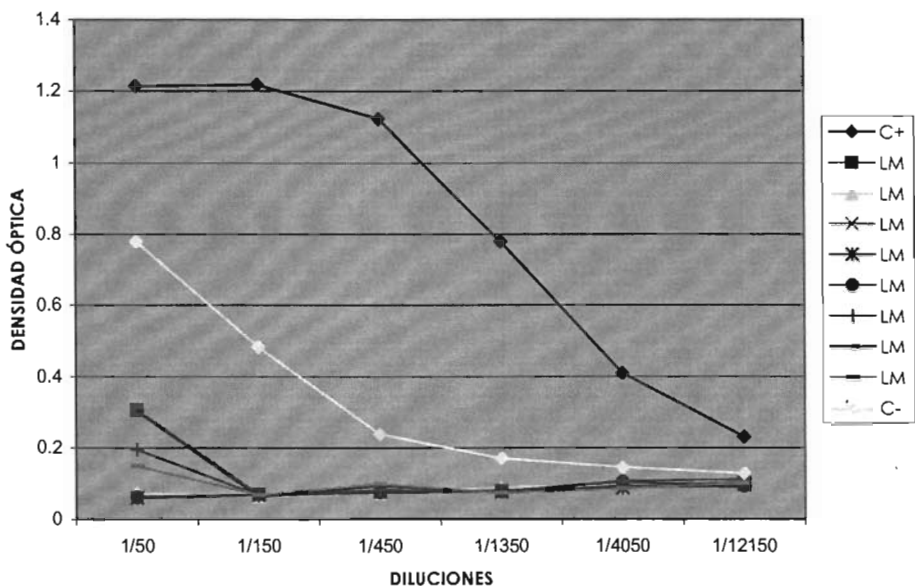


Figura 6. Valores de absorbancia obtenidos en la pruebas de ELISA utilizando LPS como antígeno de captura y proteína G como anticuerpo secundario. Se muestra el comportamiento de los sueros controles positivos (C+) y controles negativos (C-); observándose la separación de ambas poblaciones.

Hemocultivo en medio bifásico (Ruíz Castañeda) Para establecer la presencia de un agente en una población, no se consideró suficiente la evidencia serológica, por lo que se intentó el aislamiento a partir de 61 muestras clínicas (sangre completa) de lobos marinos obtenidas en el año 2004 de las loberas: San Jorge, San Esteban, El Granito, Los Cantiles, Islotes, Lobos, Rasito, Machos y El Partido, para lo cual se utilizaron medios bifásicos (ver figura 3) empleados en el aislamiento de *Brucella* spp. a partir de muestras sanguíneas. En estos medios se agregaron 5 ml de sangre completa de lobo marino asegurándose que la sangre se homogenizara con el medio líquido. Los medios inoculados fueron incubados a 37°C durante tres semanas, realizándose una inspección diaria, durante todo este tiempo sólo un hemocultivo presentó crecimiento el cual fue identificado como un contaminante, los otros cultivos no presentaron ningún tipo de crecimiento considerándose negativos (Tabla 2).



Figura 7: Fotografía de un medio bifásico inoculado con 5 ml. de sangre de lobo marino, en donde se aprecia ausencia de crecimiento bacteriano tanto en el medio líquido como en el medio sólido.

TABLA 2. RESULTADOS DE HEMOCULTIVOS EN MEDIOS BIFÁSICOS *

ISLA	MUESTRA	RESULTADO*	ISLA	MUESTRA	RESULTADO *
LOBOS	LC-1	NEGATIVO	EL GRANITO	GM-3	NEGATIVO
	LM-3	NEGATIVO		GM-4	NEGATIVO
	LM-2	NEGATIVO		GM-1	NEGATIVO
	LM-1	NEGATIVO		GC-3	NEGATIVO
	LP-2	NEGATIVO		GM-2	NEGATIVO
					GM-5
EL RASITO	1	NEGATIVO		GC-4	NEGATIVO
	2	NEGATIVO		X1	NEGATIVO
	3	NEGATIVO		X2	NEGATIVO
	4	NEGATIVO		X3	NEGATIVO
	5	NEGATIVO		X4	NEGATIVO
				X5	NEGATIVO
MACHOS	1	NEGATIVO		X6	NEGATIVO
	2	NEGATIVO			
	3	NEGATIVO	ISLOTES	IM-4	NEGATIVO
	NEGATIVO	IM-1		NEGATIVO	
LOS CANTILES	CC-1	NEGATIVO		IC-3	NEGATIVO
	CM-1	NEGATIVO		IC-2	NEGATIVO
				IM-3	NEGATIVO
SAN ESTEBAN	SEM-3	NEGATIVO		IM-2	NEGATIVO
	SEC-1	NEGATIVO		IC-1	NEGATIVO
	SEM-1	NEGATIVO		IM-2A	NEGATIVO
	SEM-4	NEGATIVO		IM-2B	NEGATIVO
	SEM-2	NEGATIVO		IC-2A	NEGATIVO
	SEC-2	NEGATIVO		IC-1A	NEGATIVO
				IM-4A	NEGATIVO
SAN JORGE	JM-4	NEGATIVO			
	JC-3B	NEGATIVO	EL PARTIDO	N1	NEGATIVO
	JM-2	NEGATIVO		N2	NEGATIVO
	JC-1	NEGATIVO		N3	NEGATIVO
	JM-3	NEGATIVO		N4	NEGATIVO
	JM-1	NEGATIVO		N5	NEGATIVO
	JM-5	NEGATIVO			
	BM	NEGATIVO			

*Negativo fue considerado al no presentarse crecimiento en el medio, después de tres semanas de incubación a 37°C.

Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para confirmar los resultados obtenidos en el aislamiento se realizó la prueba de PCR. En esta prueba se utilizó ADN extraído a partir del paquete blanco de 39 muestras de sangre con EDTA de lobos marinos de las loberas: San Jorge, El Granito, El Rasito, San Esteban, Islotes, El Partido, Lobos y Cantiles. El propósito de utilizar el paquete blanco fue evidenciar la presencia del microorganismo en estos animales ya que de existir una infección activa por *Brucella* spp. uno de los sitios de replicación de este microorganismo serían los macrófagos y la PCR, al ser una prueba de alta especificidad, detectaría la presencia de este agente en la población de lobos marinos estudiada en este trabajo.

Previo a la realización de la técnica de PCR, cada una de las extracciones de ADN del paquete blanco de los lobos marinos, fueron visualizadas a través de electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Los resultados obtenidos muestran distintas cantidades de ADN en cada una de las extracciones (Figura 8).

Posteriormente se procedió a realizar la técnica de PCR, cada ensayo contó con un control positivo (ADN de *Brucella melitensis*) y un control negativo (H₂O estéril). Las reacciones de PCR fueron visualizadas mediante electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio. Los resultados obtenidos muestran sólo el producto amplificado del control positivo y la ausencia de amplificaciones en las muestras de lobos marinos (Figura 9 y tabla 3). Estos

resultados concuerdan con lo obtenido en las pruebas serológicas y de aislamiento, por lo cual se puede concluir que la población de lobos marinos estudiada no presenta evidencia que indique el contacto con éste microorganismo (ver tabla 4).



Figura 8: Gel de agarosa al 0.8% en donde se observan en el carril 1 el marcador λ HindIII (Invitrogene) y en los siguientes carriles, el ADN extraído del paquete blanco de la sangre de los lobos marinos.

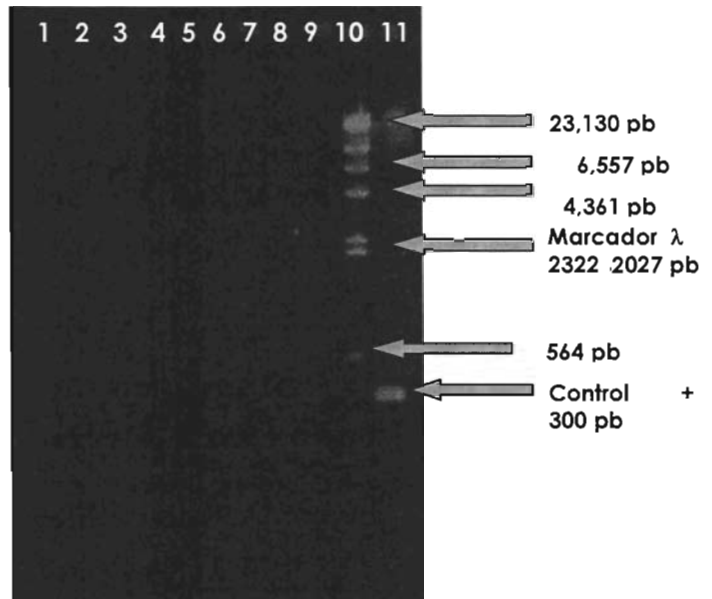


Figura 9: Gel de agarosa al 0.8 % en donde se observan los resultados obtenidos en la prueba de PCR. En el carril 1 control negativo (sin amplificación), carriles 2 al 9 ADN de lobos marinos (sin amplificación de ADN de *Brucella* spp.), carril 10 marcador λ Hind III y carril 11 control positivo (amplificación de un producto de 300 pb).

TABLA 3. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE ADN DE *Brucella* spp.

ISLA	MUESTRA	RESULTADO	ISLA	MUESTRA	RESULTADO
		*			*
LOBOS	LM-1	NEGATIVO	EL GRANITO	GM-3	NEGATIVO
	LM-2	NEGATIVO		GM-4	NEGATIVO
	LM-3	NEGATIVO		GM-1	NEGATIVO
			GC-3	NEGATIVO	
EL RASITO	1	NEGATIVO		GM-2	NEGATIVO
	2	NEGATIVO		GM-5	NEGATIVO
				GC-4	NEGATIVO
LOS CANTILES	CC-1	NEGATIVO		X1	NEGATIVO
	CM-1	NEGATIVO		X2	NEGATIVO
				X3	NEGATIVO
SAN ESTEBAN	SEM-3	NEGATIVO			
	SEC-1	NEGATIVO	ISLOTES	IM-4	NEGATIVO
SEM-1	NEGATIVO	IM-1		NEGATIVO	
SEM-4	NEGATIVO	IC-3		NEGATIVO	
SEM-2	NEGATIVO	IC-2		NEGATIVO	
SEC-2	NEGATIVO	IM-3		NEGATIVO	
SEC-4	NEGATIVO	IM-2		NEGATIVO	
SAN JORGE	JM-4	NEGATIVO	EL PARTIDO	N1	NEGATIVO
	JC-3B	NEGATIVO		N2	NEGATIVO
	JM-2	NEGATIVO			
	JC-1	NEGATIVO			
	JM-3	NEGATIVO			
	JM-1	NEGATIVO			
	JM-5	NEGATIVO			

*Negativo se consideró la muestra que no presento amplificación.

TABLA 4. RESULTADOS COMPARATIVOS DE LAS MUESTRAS EN LAS DISTINTAS PRUEBAS REALIZADAS.

IDENTIFICACIÓN	PCR	CULTIVO	ELISA OMP ¹	MEDIA OMP NEG ²	MEDIA OMP POS ³	ELISA LPS ⁴	MEDIA LPS NEG ⁵	MEDIA LPS POS ⁶
GC-4	-	-	.169 .346	.669 .544	1.44 1.36	.068 .077	.510 .434	1.116 1.044
JM-3	-	-	.139 .136	.669 .544	1.44 1.36	.149 .159	.510 .434	1.116 1.044
SEM-4 0.1	-	-	.340 .193	.669 .544	1.44 1.36	.082 .101	.510 .434	1.116 1.044
GM-4	-	-	.256 .312	.669 .544	1.44 1.36	.302 .221	.510 .434	1.116 1.044
LM-1	-	-	.468 .355	.669 .544	1.44 1.36	.083 .082	.510 .434	1.116 1.044
SEC-1 1.0	-	-	.295 .180	.669 .544	1.44 1.36	.108 .096	.510 .434	1.116 1.044
IM-1 0.1	-	-	.282 .383	.669 .544	1.44 1.36	.187 .170	.510 .434	1.116 1.044
IC-1 0.1	-	-	.171 .288	.669 .544	1.44 1.36	.100 .122	.510 .434	1.116 1.044
IC-2 1.0	-	-	.459 .412	.669 .544	1.44 1.36	.101 .124	.510 .434	1.116 1.044
GM-2	-	-	.292 .531	.669 .544	1.44 1.36	.325 .231	.510 .434	1.116 1.044
SEM-2 0.1	-	-	.466 .330	.669 .544	1.44 1.36	.087 .093	.510 .434	1.116 1.044
LM-3	-	-	.136 .31	.669 .544	1.44 1.36	.071 .084	.510 .434	1.116 1.044

TABLA 4. Continuación.

IDENTIFICACIÓN	PCR	CULTIVO	ELISA OMP ¹	MEDIA OMP NEG ²	MEDIA OMP POS ³	ELISA LPS ⁴	MEDIA LPS NEG ⁵	MEDIA LPS POS ⁶
IM-2 0.1	-	-	.333	.669	1.44	0.1	510	1.116
			.373	.544	1.36	.122	.434	1.044
3C-3	-	-	.403	.669	1.44	.130	510	1.116
			.366	.544	1.36	.188	.434	1.044
SEM-1 0.1	-	-	.554	.669	1.44	.198	510	1.116
			.541	.544	1.36	.195	.434	1.044
GC-3	-	-	.157	.669	1.44	.105	510	1.116
			.214	.544	1.36	.118	.434	1.044
IC-3 1.0	-	-	.152	.669	1.44	.110	510	1.116
			.411	.544	1.36	.136	.434	1.044
SEM-3 0.1	-	-	.427	.669	1.44	.093	510	1.116
			.233	.544	1.36	.095	.434	1.044
GM-3	-	-	.273	.669	1.44	.183	510	1.116
			.306	.544	1.36	.164	.434	1.044
GM-1	-	-	.290	.669	1.44	.189	510	1.116
			.433	.544	1.36	.203	.434	1.044
GM-3	-	-	.201	.669	1.44	.103	510	1.116
			.301	.544	1.36	.109	.434	1.044
JM-1	-	-	.315	.669	1.44	.185	510	1.116
			.236	.544	1.36	.213	.434	1.044
IM-4 0.1	-	-	.387	.669	1.44	.196	510	1.116
			.348	.544	1.36	.185	.434	1.044
JM-4	-	-	.119	.669	1.44	.150	510	1.116
			.153	.544	1.36	.180	.434	1.044
CC-1	-	-	.124	.669	1.44	.070	510	1.116
			.338	.544	1.36	.096	.434	1.044
CM-1 0.1	-	-	.381	.669	1.44	.164	510	1.116
			.343	.544	1.36	.128	.434	1.044

1. Resultados de valores de absorbancia de la muestra de lobo marino con OMP como antígeno de captura
2. Media de valores de absorbancia de los controles negativos con OMP como antígeno de captura
3. Media de valores de absorbancia de los controles positivos con OMP como antígeno de captura
4. Resultados de valores de absorbancia de la muestra de lobo marino con LPS como antígeno de captura
5. Media de valores de absorbancia de los controles negativos con LPS como antígeno de captura
6. Media de valores de absorbancia de los controles positivos con LPS como antígeno de captura

Los valores de absorbancia fueron analizados con las diluciones 1/150 y 1/450

DISCUSIÓN

En este trabajo se emplearon cuatro técnicas para la determinación de elementos que sugirieran el contacto de lobos marinos del Golfo de California con *Brucella* spp. Las pruebas empleadas para este estudio fueron ELISA con OMP y ELISA con LPS como antígenos de captura así como el aislamiento en medios bifásicos y la PCR. La mayor parte de las muestras corresponden a crías debido a que es difícil la contención química de ésta especie, en animales adultos y representa un riesgo para el animal, debido a los periodos de apnea prolongados, aún así en ocasiones fue posible la toma de muestras de adultos jóvenes. Esto, lejos de ser un inconveniente fue de utilidad dado que, tomando como referencia el sistema inmunológico de mamíferos terrestres, en el que las crías obtienen una inmunidad temprana hacia agentes infecciosos como *Brucella* spp al ingerir el calostro de la madre, el cual es rico en anticuerpos y considerando que la presencia de anticuerpos es detectable a partir de los primeros ocho a quince días de edad. Se puede asumir que es posible detectar anticuerpos contra *Brucella* spp en crías de lobo marino, las cuales pueden o no presentar la enfermedad, además de ser un indicador indirecto del estado inmunológico de la madre, de individuos adultos y por ende de la población.⁵⁰ En este trabajo se obtuvieron resultados negativos en la determinación de anticuerpos contra *Brucella* spp utilizando como antígenos de captura OMP y LPS, lo cual nos muestra la ausencia de hallazgos serológicos que indiquen la presencia de este microorganismo en la población de lobos marinos del Golfo de California.

Debido a la carencia de información sobre la inmunología en ésta especie, las técnicas diagnósticas empleadas en algunos trabajos se han traspolado de las elaboradas para animales domésticos terrestres. Estas técnicas fueron utilizadas para determinar la presencia de *Brucella* spp en crías de lobos marinos del Golfo de California. En un trabajo previo en el año 2002, se reportó la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp en otros individuos pertenecientes a la población de lobos marinos del Golfo de California. Además en este estudio previo en lobos marinos, sólo se evaluó la respuesta inmune de los individuos hacia un sólo antígeno, el LPS. Este dato es distinto a lo que se esperaba debido a que la situación geográfica en estos animales funciona como una barrera física para el contacto de ésta población con individuos migratorios, los cuales pudieran ser los principales vectores de *Brucella* spp, además, por la actividad natatoria de los lobos marinos, que tienden a ser animales costeros, no migratorios y por lo general no se alejan más de 30 Km. de su lobera, el contacto queda aun más restringido a sólo algunas especies de la zona, lo que dificulta la vía de entrada del agente.

El uso de un solo antígeno de captura (LPS) en las pruebas de diagnóstico empleadas puede dar falsos positivos debido a sus reacciones cruzadas, por lo tanto los resultados obtenidos con el trabajo citado no pueden ser concluyentes y un diagnóstico bajo éstas condiciones se vuelve prematuro. Además se debe de considerar que el aislamiento del microorganismo en lobos marinos del Golfo de California vivos, ya sean portadores asintomáticos o enfermos, es la única prueba

concluyente que permite establecer la presencia de *Brucella* spp en la población y así determinar la susceptibilidad de éstos individuos.

Brucella spp, puede ser excretado en la leche materna, la cual puede infectar a las crías y en el caso de no cursar con un proceso activo, los anticuerpos de memoria, se transmitirían a la cría y generarían un indicador de la presencia de este agente en el individuo y por lo tanto en la población.

Existen diversas pruebas para el diagnóstico de brucelosis, las cuales de manera general pueden ser clasificadas como directas e indirectas: las pruebas directas son aquellas que demuestran la presencia del agente, como son el aislamiento y la PCR. El aislamiento en el medio de cultivo Farrel, que es un medio selectivo con 85% de sensibilidad para el aislamiento de *Brucella* spp a partir de muestras de órganos, es el más utilizado; otro medio de cultivo utilizado para el aislamiento de éste agente es el medio bifásico ^{1, 2, 4, 5, 6, 61}. En este trabajo se realizaron 61 hemocultivos en medios bifásicos, un medio ampliamente probado para el aislamiento de *Brucella* spp en humanos. En estos hemocultivos de lobos marinos no se observó ningún crecimiento bacteriano, aún cuando el medio se incubó durante mayor tiempo del requerido para el crecimiento de *Brucella* spp, lo que indica que no existe la presencia de éste microorganismo en sangre de éstos individuos.

Otra técnica diagnóstica directa empleada en este trabajo fue la PCR. Esta técnica es muy específica, ya que solamente amplifica fragmentos de ADN limitados por los iniciadores y da lugar a un fragmento de tamaño determinado, sin importar si hay otro tipo de ADN presente.^{1, 2, 4, 5, 6, 7, 16, 40} En este trabajo se usó esta técnica, para detectar ADN de *Brucella* spp obtenido a partir de leucocitos de lobos marinos, lo que permite determinar la presencia de *Brucella* spp con una alta sensibilidad y especificidad, además de requerir una cantidad mínima de muestra para su identificación. Los iniciadores en este trabajo fueron diseñados para amplificar una parte del gen *omp31* presente en todas las especies de *Brucella* spp, aún cuando en algunas no se exprese, tal es el caso de *B. abortus*. Se analizaron 39 muestras de ADN sin detectar amplificación alguna. Los resultados obtenidos en las pruebas directas (aislamiento y PCR), indican la ausencia de este microorganismo en las muestras analizadas.

El uso de técnicas indirectas como ELISA con OMP, LPS o hapteno nativo como antígeno de captura para evidenciar anticuerpos contra *Brucella* spp ha mostrado una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98% como método de diagnóstico para la brucelosis en rumiantes y en un gran número de especies silvestres, incluyendo mamíferos marinos. Esta prueba, de mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas convencionales como la prueba de tarjeta, rivanol y fijación de complemento disminuye en gran medida los sesgos de estas pruebas y brinda resultados más confiables.^{1, 2, 4, 5, 6, 16, 42, 46, 47, 48} Los estudios relacionados con la caracterización de *Brucella* spp en mamíferos marinos muestran que los antígenos generados a partir de *B. melitensis* y *B. abortus* son útiles para detectar

inmunoglobulinas séricas contra este agente en mamíferos marinos obteniéndose resultados confiables.^{24, 37, 38, 39, 40, 41, 42}

Si bien existen reacciones cruzadas con los LPS provenientes de bacterias como *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp, *Vibrio cholerae* el empleo de OMP permite un diagnóstico más preciso aunque presenta reactividad cruzada con *Onchrobacterium anthropi*, *Rhizobium leguminosarum*, *Agrobacterium tumefaciens*, entre otras; sin embargo éstas bacterias no son un riesgo como patógeno para los mamíferos.^{18, 27, 28, 29} En este trabajo se empleó la prueba de ELISA para el análisis de sueros de lobos marinos con LPS como antígeno de captura y se obtuvieron resultados negativos. Ésto significa la ausencia de elementos para sugerir la presencia de una reacción cruzada con cualquiera de los organismos antes mencionados. Por otra parte, el uso de OMP como antígeno de captura provee de una prueba adicional con alta especificidad, que elimina la incertidumbre generada por las reacciones cruzadas con algunos de los microorganismos antes mencionados, lo que confirma los resultados obtenidos de la prueba de ELISA con LPS. Los sueros de lobos marinos del Golfo de California evaluados en este trabajo, también se mantuvieron dentro del grupo negativo al ser analizados por medio de ELISA con OMP, lo que confirmó la inexistencia de anticuerpos contra *Brucella* spp o posibles reacciones cruzadas contra otros microorganismos que pudieran ocasionar sesgos en las pruebas.

Un aspecto importante a considerar en las pruebas de ELISA, es la dilución del suero en la cual se interpretan los resultados es decir al tener diluciones

extremadamente pequeñas o diluciones extremadamente altas, la especificidad de la prueba se reduce lo cual ocasiona que los valores resultantes tengan poca confiabilidad. Para evitar este sesgo en la prueba, lo más conveniente fue la utilización de diluciones y titulaciones que no fueran extremadamente bajas o extremadamente altas, tomando como modelo las pruebas diagnósticas previamente estandarizadas para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp. en otras especies como animales domésticos, rumiantes silvestres e incluso el hombre.⁴⁶⁻⁴⁹ En este trabajo, para una detección específica de anticuerpos contra *Brucella* spp se realizaron diluciones seriadas con los sueros control positivo, control negativo y sueros de lobos marinos. El análisis de los resultados obtenidos mediante ELISA, con estas diluciones, permitió establecer las condiciones en las cuales los sueros controles positivos y los sueros controles negativos se comportaron como dos poblaciones distintas.

La evaluación de los resultados obtenidos en las cuatro pruebas empleadas en este trabajo permite afirmar que no existen indicios de la presencia de *Brucella* spp en la población de lobos marinos del Golfo de California (*Zalophus californianus*) muestreada. Con estos resultados se muestra que en los sueros estudiados no existían anticuerpos contra *Brucella* spp. Esto corrobora los resultados obtenidos en el aislamiento y la PCR.

El monitoreo constante y con las técnicas empleadas en este trabajo proveen una panorámica certera acerca de la situación actual de éste agente en la población de lobos marinos del Golfo de California. Lo anterior no se debe dejar de

lado para poder prever situaciones emergentes, las cuales puedan generar un desequilibrio en la estabilidad poblacional de la especie y del medio ambiente además de que pudieran funcionar como un vector más en la infección en el hombre.⁴⁴

Este trabajo aporta información importante sobre el estado actual de la brucelosis en mamíferos marinos del Golfo de California sin embargo un monitoreo constante de esta poblaciones será necesario en el futuro. Un mayor número de animales analizados siempre aportará valores de prevalencia e incidencia mucho más reales, aunque se debe de considerar que el monitoreo indiscriminado, con pruebas diagnósticas limitadas, podría generar valores falsos con interpretaciones dudosas al no tener suficientes elementos que comprueben la presencia de éste agente o la presentación de un brote de brucelosis en la población de lobos marinos del golfo de California.

CONCLUSIONES

1. No se encontraron evidencias experimentales que sugieran una infección activa por *Brucella* spp en la población de lobos marinos del Golfo de California (*Zalophus californianus*).
2. Se estandarizaron dos ensayos de ELISA con proteínas de la membrana externa de *Brucella melitensis* y lipopolisacaridos de *Brucella abortus* como antígeno de captura para la detección de anticuerpos séricos contra *Brucella* spp en lobos marinos del Golfo de California (*Zalophus californianus*).

REFERENCIAS

1. Corbel M J, MacMillan A P. Brucellosis. In: Collier L, Topley and Wilson editors. Microbiology and microbial infections. 9th ed. Vol III Gran Bretaña: Arnold, 1998.
2. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Manual de microbiología médica. 4ª ed. México (D.F.): Manual Moderno, 1970.
3. Moreno E, Cloerkaert A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. Vet Microbiol 2002; 90: 209-227.
4. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B. Diagnóstico de brucelosis animal. México D.F. SAGARPA, 2001.
5. Joklik W, Willett H, Amos B, Wilfert C. Zinsser Microbiology. 20th ed. Connecticut USA: Appleton and lange, 1992.
6. Bernard D D, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg H. Microbiology. 4a ed. Philadelphia, Pensilvania: Lippincott Company, 1990.

7. Sangari F, Agüero J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. *Microbiologia Sem* 1996; 12: 207-218.
8. Gee J M, Kovach M E, Grippe V K, Hagijs S, Walker J V, Elzer P H, Roop R M. Role of catalase in the virulence of *Brucella melitensis* in pregnant goats. *Vet Microbiol* 2004; 102: 111-115.
9. De Bagües Jiménez MP, Terraza A, Gross A, Dornand J. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp. relationship to virulence. *Infect. Immun* 2004; 72: 2429-2433.
10. Pizarro-Cerda J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege J, Gorvel J. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun* 1998: 2387-2392.
11. Gorvel J, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 2388 2002;1-17.
12. Rhyan J, Gidlewski T, Roffe T, Aune K, Philo M L, Ewalt R D. Pathology of brucellosis in bison from Yellowstone National Park. *Journal of Wildlife Diseases* 2001; 37: 101-109.

13. Vizcaíno C A, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp. : past, present; future. *Vet Microbiol* 2002; 90: 229-247.
14. Eisenschenk F C, Houle J, Hoffmann M. Serum sensitivity of field isolates and laboratory strains of *Brucella abortus*. *Am j Vet. Res.* 1995 ; 12: 1592-1598.
15. Ficht T. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet Microbiol* 2003; 2516: 1-11.
16. Alton G G, Jones L, Pites D E. Laboratory techniques in brucellosis. 2a ed. Geneva. WHO, 1975.
17. Hoffmann M, Houle J. Failure of *Brucella abortus* Lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1983; 5: 65-76.
18. Betz S, Isliker H. Antibody-independent interactions between *Escherichia coli* J5 and human complement components. *The journal of immunology* 1981; 127: 1748-1752.

19. Loos M, Weltek B, Thensen R, Opferkuch W. Antibody-independent interaction of the first component of complement with gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* 1978; 22: 5-9.
20. Hoffmann Marker E, Kellogg Lee W, Houle Joan J. Inhibition of complement-mediated killing of *Brucella abortus* by fluid-phase immunoglobulins. *Am J Vet Res* 1994; Vol 55: 810-814.
21. Eisenschenk F, Houle J, Hoffmann E. Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Vet. Microbiol.* 1999; 68: 235-244.
22. Oliveira S C, Soeurt N, Splitter G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet Microbiol* 2399, 2002:1-8.
23. Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid D, Mills S, Finlay B. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *The EMBO Journal* 1996; 15: 2613-2624.
24. Baucheron S, Grayon M, Zygmunt M, Cloeckert A. Lipopolysaccharide heterogeneity in *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Research in Microbiology* 2002; 153: 277-280.

25. Boj R, Moriyón I, Blasco J, Gamazo CD, Díaz R. Antibody response to *Brucella ovis* outer membrane proteins in ovine brucellosis. *Infect. Immun.* Feb 1990: 489-494.
26. Gómez M, Moriyón I, Alonso B, Riezu J, Díaz R. Serological response to the outer membrane lipoprotein in animal brucellosis. *Infect. Immun.* 1988: 716-718.
27. Delpino M, Fossati A, Baldi C. Occurrence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between *Brucella* and other alpha-proteobacteria. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004:868-873.
28. Cloeckaert a, Tibor A, Zygmunt M. Brucella outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* July 1999: 627-629.
29. Ugalde R. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes and infection* 1999; 1: 1211-1219.
30. Salhi I, Boigegrain R A, Machold J, Weise C, Cloeckaert A, Rouot B. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infect. Immun.* 2003;71: 4326-4332.

31. Blasco J M. Estado actual de la brucelosis bovina en España. Programa Bovis. Madrid: Luzán 5.1994.
32. Godfroid J. Brucellosis in wildlife. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz; 2002; 21: 277-286.
33. Foster G, MacMillan A, Godfroid J, Howie F, Ross H M, Cloeckert A, *et al.* A review of *Brucella* sp. Infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. Vet. Microbiol. 2002; 90: 563-580.
34. 50 Th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference: 1997 November 8-9: Chicago EUA.
35. Brucellosis 2003 International Research Conference: 2003 Septiembre 15-17: Pamplona Spain: University of Navarra.
36. Maratea J, Ewalt D, Frasca S, Dunn L, De Guise S, Szkudlarek L, *et al.* Evidence of *Brucella* sp. Infection in marine mammals stranded along the coast of southern New England. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 2003; 34: 256-261.
37. Jahans K, Foster G, Broughton E. The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. Vet Microbiol 1997; 57: 373-382.

38. Clavareau C, Wellemans V, Walravens K, Tryland M, Verger J, Grayon M, *et al.* Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a mink whale (*Balaenoptera acutorostrata*). Microbiology 1998; 144: 3267-3273.
39. Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O. An IS711 element downstream of the *bp26* gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2000; 835-839
40. Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O, Boumedine K. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification test. Microbes and Infection 2003; 5: 593-602.
41. Vizcaino N, Caro P, Cloeckaert A, Fernández L. DNA polymorphism in the *omp25/omp31* family of *Brucella* spp. : identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. Microbes and infection 2004; 6: 821-834.
42. Ohishi K, Zenitani R, Bando T, Goto Y, Uchida K, Maruyama T. Pathological and serological evidence of *Brucella*-infection in baleen whales (*Mysticeti*) in the western North Pacific. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 2003; 26: 125-136.

43. Tryland M. Zoonoses of arctic marine mammals. *Infect Dis Rev* 2000; 2: 55-64.
44. Sohn A, Probert W, Glaser C, Gupta N, Bollen A, Wong J, *et al.* Human neurobrucellosis with Intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9: 485-488.
45. González L, Patterson A, Reid R, Foster G, Barberán M, Blasco J, *et al.* Chronic meningoencephalitis associated with *Brucella* sp. Infection in live-stranded striped dolphins (*Stenella Coeruleoalba*). *J. Comp. Path.* 2002; 126: 147-152.
46. Martínez D. Desarrollo y estandarización de un inmunoensayo enzimático indirecto como método de diagnóstico para la brucelosis caprina utilizando proteínas de la membrana externa de *Brucella melitensis*. (Tesis de licenciatura). México D.F. : UNAM 1998.
47. Sanchez J M, Cambra M. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. Serie técnica No 7. 2ª ed. París Francia: OIE, 1987.
48. Kurstak E. Enzyme Immunodiagnosis.. Orlando, Florida. Academic Press 1986.

49. Harlow E, Lane D. Antibodies a Laboratory manual. New York. Cold spring Harbor Laboratory, 1998.
50. Aguirre A A, Ostfeld R S, Tabor G M, House C, Pearl M C. Conservation Medicine. Ecological health in Practice. New York. Oxford University Press 2002.
51. Elorriaga F R. Concentración de metales en pelo de crías de lobo marino de California (*Zalophus californianus*, LESSON 1828) En ocho colonias del golfo de California. Tesis de licenciatura. México D.F. : UNAM 2002.
52. Emerging and other Comunicable Disease, Surveillance and Control. WHO (serial on line) 2004. disponible en: URL: <http://www.who.int/wmc>
53. Leslie A, Dierauf. Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation. Washington, D.C. CRC press, 1990.
54. Nowak R M. Walker's Mammals of the World. 6a ed. Vol II. Baltimore and London. The Johns Hopkins University Press, 1999.
55. Auriol Gamboa, D. 1993. Biodiversidad y estado actual de los mamíferos marinos en México. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat: 397-412.

56. Fowler M E. Zoo and Wild Animal Medicine. 2a ed. Denver, Colorado. Sponsored by Morris Animal Foundation, 1986.
57. Carreta J, Muto M M, Barlow J, Baker J, Forney K A, Lowry M. U.S. Pacific marine mammals stock assessments: 2002. NOAA Seattle. EUA.
58. Acevedo K, De la cueva H, Gulland F, Auriolos D, Arellano F, Suarez F. Evidence of *leptospira interrogans* infection in california sea lion pups from the Gulf of California. Journal of Wildlife Disease 2003; 39: 145-151.
59. Acevedo K A. El lobo marino de California (*Zalophus californianus californianus*) en el Golfo de California: Hallazgos patológicos Tesis de licenciatura. México D.F. FMVZ-UNAM 1999.
60. Acevedo K A. Índice de leptospirosis en crías de *Zalophus californianus californianus* en siete colonias reproductivas del Golfo de California durante la temporada reproductiva del 2000. Tesis de maestría. Ensenada Baja California, México: CICESE 2001.
61. Mena R. Presencia de Anticuerpos contra *Brucella* spp en lobos marinos (*Zalophus californianus californianus*) en el Golfo de California, México. Tesis de licenciatura. México D.F. FMVZ-UNAM 2002.

62. Ruiz C M. Laboratory diagnosis of brucellosis in man. Bull WHO. NY. 1961, 24:73-84.