

## **Análisis *in silico* de los genes del operón *virB* de *Brucella canis* aisladas de caninos de criaderos en el área metropolitana del Valle de Aburrá (Antioquia, Colombia)**

*In silico* analysis of *virB* operon genes in *Brucella canis* isolated from canine kennels in the metropolitan area of the Aburrá Valley (Antioquia, Colombia)

Juan Jacobo de la Cuesta-Zuluaga\*§, Natalia Andrea Guarín-Moreno†§,  
Miryan Margot Sánchez-Jiménez\*, Martha Olivera-Angel‡ ||

### RESUMEN

La brucelosis canina es una enfermedad zoonótica causada por *Brucella canis*. El establecimiento del nicho replicativo de la bacteria es mediado por proteínas secretadas mediante el sistema de secreción tipo IV, el cual es codificado por el operón *virB*. La caracterización de dichos genes ha sido evaluada en otras especies del género, pero pocos estudios han sido llevados a cabo en *B. canis*.

Se reporta la evaluación de las secuencias nucleotídicas de los genes *virB* en siete aislamientos obtenidos de criaderos en el área metropolitana del Valle de Aburrá, en Antioquia, Colombia. Las secuencias fueron obtenidas de un estudio previo y fueron comparadas con secuencias de otras especies de *Brucella* disponibles públicamente, mediante análisis de alineamientos múltiples y métodos filogenéticos. Todas las secuencias de los aislamientos nativos evaluados fueron diferentes entre sí, incluso aquellas pertenecientes a un mismo criadero, lo que puede indicar la presencia de múltiples clones bacterianos circulando en el medio de estudio o variaciones de la bacteria intra hospedero.

### PALABRAS CLAVES

*Brucella canis*, brucelosis canina, factores de virulencia, genes bacterianos, zoonosis.

### ABSTRACT

Canine brucellosis is a zoonotic disease caused by *Brucella canis*. The establishment of intracellular replicative niches of *B. canis* is mediated by proteins secreted by the type IV secretion system, which is encoded by the *virB* operon. The characterization of such genes has been conducted in other species of the genus, but few in *B. canis*.

We report the evaluation of the nucleotide sequences of the *virB* genes in seven isolates obtained from kennels in the metropolitan area of Aburrá Valley in Antioquia, Colombia. Sequences were obtained

from a previous study and were compared with publicly available sequences from other *Brucella* strains using multiple alignment analysis and phylogenetic methods. All sequences of the native isolates tested were different from one another, even those belonging to the same kennel, which may indicate the presence of multiple bacterial clones circulating in the studied area or variations in the bacteria intra host.

### KEY WORDS

*Brucella canis*, canine brucellosis, virulence factors, bacterial genes, zoonosis.

\*Grupo Veriel, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. †Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Colegio Mayor de Antioquia. ‡Grupo Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. §Ambos autores contribuyeron por igual en la preparación del presente artículo. || Contacto: [martha.olivera@udea.edu.co](mailto:martha.olivera@udea.edu.co) Recepción: 05-22-2014. Aceptación: 07-21-2014.

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica de amplia distribución a nivel mundial, causada por organismos del género *Brucella*.<sup>1</sup> La brucelosis canina es una enfermedad que afecta principalmente el sistema reproductivo de los animales infectados, siendo causal de abortos.<sup>2,3</sup> Es transmitida a humanos desde caninos infectados, los cuales se consideran verdaderos reservorios de la enfermedad, por contacto con secreciones del perro como mucosas, semen, leche o descargas vaginales.<sup>4</sup> La enfermedad en el humano presenta un amplio espectro de síntomas, aunque en general se caracteriza por fiebres continuas o irregulares de duración variable, pérdida de peso, debilidad y dolor generalizado.

*B. canis* infecta la célula hospedera, principalmente macrófagos o células dendríticas, al ser fagocitadas, y establecen su nicho replicativo en ellas.<sup>5-7</sup> El sistema de secreción tipo IV (SST4) de *Brucella* es de crucial importancia durante las primeras etapas de infección a las células presentadoras de antígeno. Las proteínas secretadas por tal vía actúan como perturbadoras de las vías de transducción de señales,<sup>8</sup> requiriéndose durante el establecimiento del nicho intracelular.<sup>9</sup> Los genes del sistema de secreción tipo IV se ubican en el operón *virB*<sup>10</sup> que contiene 12 marcos abiertos de lectura.

Aunque existen diversos estudios acerca del SST4 en *Brucella*, pocos han sido llevados a cabo en *B. canis*. En el presente estudio se reporta el análisis *in silico* de los genes del operón *virB* de *B. canis* en aislamientos nativos obtenidos del área metropolitana del Valle de Aburrá.

## METODOLOGÍA

### OBTENCIÓN DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

Las secuencias nucleotídicas fueron obtenidas de un estudio previo, el cual demostró por medio de PCR, la presencia del operón *virB* en aislamientos nativos de *B. canis* del área metropolitana del Valle de Aburrá.<sup>11</sup> De las 36 cepas utilizadas en dicho estudio, se escogieron 7 aislamientos bacterianos obtenidos de 5 criaderos caninos de diferentes sitios del área Metropolitana del Valle de Aburrá (Tabla 1); como referencia, se utilizó la cepa M- (cepa menos mucoide de *B. canis*, usada en diagnóstico serológico). En todas las cepas un fragmento de cada gen del operón fue evaluado.

**Tabla 1.** Distribución geográfica y por criaderos de los aislamientos nativos de *B. canis* analizados.

Cepa	Criadero	Ubicación
2	1	Medellín
38	2	Bello
90, 110, 116	3	Medellín
122	4	Copacabana
166	5	Medellín

Además de las secuencias obtenidas de los aislamientos de *B. canis*, las cepas de referencia *B. canis* ATCC 23365 (Taxonomy id: 483179), *B. canis* HSK A52141 (Taxonomy id: 1104321)<sup>12</sup> y *B. suis* 1330 (Taxonomy id: 204722)<sup>13</sup> fueron evaluadas mediante PCR *in silico* (<http://insilico.ehu.es>)<sup>14</sup> con el fin de obtener el fragmento correspondiente a cada gen, usando primers reportados previamente.<sup>11</sup> Los amplicones obtenidos *in silico* fueron confirmados por medio de BLAST contra la base de datos *nr*.<sup>15</sup>

### ANÁLISIS DE SECUENCIAS Y CONSTRUCCIÓN DEL CLADOGRAMA

Las secuencias en formato FASTA fueron ingresadas en el software BioEdit v7.1.3<sup>16</sup> y alineadas usando ClustalW<sup>17</sup> con el objetivo de determinar diferencias entre ellas. El alineamiento fue visualizado en Unipro UGENE.<sup>18</sup> Se construyó un cladograma para algunos de los genes *virB* mediante Neighbor-Joining,<sup>19</sup> usando la matriz p como modelo de sustitución en MEGA 5,<sup>20</sup> con 1.000 iteraciones de bootstrap. Debido al pequeño tamaño de los fragmentos, se utilizó una concatenación con las secuencias de los amplicones de los genes *virB* 1, 3, 4, 5, 7, 8 y 11 (Tabla 2) obtenidas por PCR y secuenciación para los aislamientos nativos y la cepa M, y por PCR *in silico* para *B. canis* ATCC 23365, *B. canis* HSK A52141 y *B. suis* 1330 para la construcción del cladograma.

## RESULTADOS

Como resultado de la evaluación de las secuencias de cepas de campo y de referencia mediante alineamientos múltiples usando ClustalW, se encontró que existe gran similitud entre los aislamientos de diferentes criaderos, y a su vez, de éstas con las secuencias de otras especies del género *Brucella*. A pesar de lo anterior, se hallaron varia-

Tabla 2. Alineamiento múltiple de los amplicones concatenados de los genes *virB* 1, 3, 4, 5, 7, 8 y 11.

Table with 3 columns: Identifier (e.g., B.canis\_str\_Oliveri\_iss\_110), Nucleotide sequence, and another Identifier (e.g., B.canis\_str\_Oliveri\_iss\_110). The table contains multiple rows of alignment data for various genes across different samples.

Continúa en la siguiente página.

**Continuación de la Tabla 2.** Alineamiento múltiple de los amplicones concatenados de los genes *virB* 1, 3, 4, 5, 7, 8 y 11.

<i>B.canis_str_Oliveri_iss_110</i>	CCGGCAAGGAAGGCCGTTGGCGACAA-AAGCGAGGATTGCTCCGACATC 744	<i>B.canis_str_Oliveri_iss_110</i>	CGAACGGAATTTCTGCATCAGCGCTTTCATCAGTGTGGTTCGCTGAT 1077
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_122</i>	CCGGCAAGGAAGGCCG-TGGCGACAA-AAGCAAGGATTACCTCCGACATC 745	<i>B.canis_str_Oliveri_iss_122</i>	CGAACGGAATTTCTGCATCAGCGCTTTCATCAGTGTGGTTCGCAAGGG 1083
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_166</i>	CCGGCAAGGAAGGCCG-TGGCGACAA-AAGCAAGGATTACCTCCGACATC 746	<i>B.canis_str_Oliveri_iss_166</i>	CGAACGGAATTTCTGCATCAGCGCTTTCATCAGTGTGGTTCGCAAG 1086
<i>B.canis_ATCC_23365</i>	CCGGCAAGGAAGGCCG-TGGCGACAA-AAGCAAGGATTACCTCCGACATC 745	<i>B.canis_ATCC_23365</i>	CGAACGGAATTTCTGCATCAGCGCTTTCATCAGTGTGGTTCGCTGA- 1086
<i>B.canis_HSK_A52141</i>	CCGGCAAGGAAGGCCG-TGGCGACAA-AAGCAAGGATTACCTCCGACATC 745	<i>B.canis_HSK_A52141</i>	CGAACGGAATTTCTGCATCAGCGCTTTCATCAGTGTGGTTCGCTGA- 1086
<i>B.suis_1330</i>	CCGGCAAGGAAGGCCG-TGGCGACAA-AAGCAAGGATTACCTCCGACATC 745	<i>B.suis_1330</i>	CGAACGGAATTTCTGCATCAGCGCTTTCATCAGTGTGGTTCGCTGA- 1086
<i>B.canis_str_M-</i>	CCGGCAAGGAAGGCCG-TGGCGACAA-AAGCAAGGATTACCTCCGACATC 745	<i>B.canis_str_M-</i>	CGAACGGAATTTCTGCATCAGCGCTTTCATCAGTGTGGTTCGCAAGAA 1081
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_116</i>	CCGGCAAGGAAGGCCG-TGGCGACAA-AAGCAAGGATTACCTCCGACATC 745	<i>B.canis_str_Oliveri_iss_116</i>	CGAACGGAATTTCTGCATCAGCGCTTTCATCAGTGTGGTTCGCTGA- 1086
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_90</i>	CCGGCAAGGAAGGCCG-TGGCGACAA-AAGCAAGGATTACCTCCGACATC 744	<i>B.canis_str_Oliveri_iss_90</i>	CGAACGGAATTTCTGCATCAGCGCTTTCATCAGTGTGGTTCGCTGA- 1083
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_38</i>	CCGGCAAGGAAGGCCG-TGGCGACAA-AAGCAAGGATTACCTCCGACATC 740	<i>B.canis_str_Oliveri_iss_38</i>	CGAACGGAATTTCTGCATCAGCGCTTTCATCAGTGTGGTTCGCAAGGA 1076
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_110</i>	AAAGAGGATTGACGATTGGTAGCCAATGTTGGCGATCCAGTGCCTGT 794	<i>B.canis_str_Oliveri_iss_110</i>	CCCCAAGTCGCGGGGACGACGATCACCCCTTCAAGCACCTTTCAA- 1124
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_122</i>	AAAGAGGATTGACGATTGGTAGCCAATGTTGGCGATCCAGTGCCTGT 795	<i>B.canis_str_Oliveri_iss_122</i>	CCCCAAA-CGCGGGGACGACGATCACCCCTTCAAGCACCTTTCAA- 1129
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_166</i>	AAAGAGGATTGACGATTGGTAGCCAATGTTGGCGATCCAGTGCCTGT 796	<i>B.canis_str_Oliveri_iss_166</i>	CCCCAAA-AGCGGGGACGACGATCACCCCTTCAAGCACCTTTCAA- 1132
<i>B.canis_ATCC_23365</i>	AAAGAGGATTGACGATTGGTAGCCAATGTTGGCGATCCAGTGCCTGT 795	<i>B.canis_ATCC_23365</i>	TCCCGTCTCGCGGGGACGACGATCACCCCTTCAAGCACCTTTCAA- 1133
<i>B.canis_HSK_A52141</i>	AAAGAGGATTGACGATTGGTAGCCAATGTTGGCGATCCAGTGCCTGT 795	<i>B.canis_HSK_A52141</i>	TCCCGTCTCGCGGGGACGACGATCACCCCTTCAAGCACCTTTCAA- 1133
<i>B.suis_1330</i>	AAAGAGGATTGACGATTGGTAGCCAATGTTGGCGATCCAGTGCCTGT 795	<i>B.suis_1330</i>	TCCCGTCTCGCGGGGACGACGATCACCCCTTCAAGCACCTTTCAA- 1133
<i>B.canis_str_M-</i>	AAAGAGGATTGACGATTGGTAGCCAATGTTGGCGATCCAGTGCCTGT 795	<i>B.canis_str_M-</i>	TCAAGGTCGCGGGGACGACGATCACCCCTTCAAGCACCTTTCAA- 1128
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_116</i>	AAAGAGGATTGACGATTGGTAGCCAATGTTGGCGATCCAGTGCCTGT 795	<i>B.canis_str_Oliveri_iss_116</i>	TCCCGTCTCGCGGGGACGACGATCACCCCTTCAAGCACCTTTCAA- 1133
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_90</i>	AAAGAGGATTGACGATTGGTAGCCAATGTTGGCGATCCAGTGCCTGT 794	<i>B.canis_str_Oliveri_iss_90</i>	TCAAACTCGCAAGCAAGCAGATCACCCCTTCAAGCACCTTTCAAG 1131
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_38</i>	AAAGAGGATTGACGATTGGTAGCCAATGTTGGCGATCCAGTGCCTGT 790	<i>B.canis_str_Oliveri_iss_38</i>	AAGGGAATCAGGCGGACGACTCTCACCTTTCAAGZ----- 1113
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_110</i>	TTCCGCTCACCCGCC-TGCTGGGGCGCTT-GC-GCTTCA---CACGT 838		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_122</i>	TTCCGCT-TACCCCCCTTCTTCCGCCCCCT-GTC-GCCTTATCCCCCCC 842		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_166</i>	TTCCGCTCACCCGGTC-TGCTGGCGGGCTTTTGCTGCTTCG-CAAAGAA 844		
<i>B.canis_ATCC_23365</i>	TTCCGCTCACCCGGTC-TGCTGGCGGGCTTTTGCTGCTTCG-CAAAGCG 843		
<i>B.canis_HSK_A52141</i>	TTCCGCTCACCCGGTC-TGCTGGCGGGCTTTTGCTGCTTCG-CAAAGCG 843		
<i>B.suis_1330</i>	TTCCGCTCACCCGGTC-TGCTGGCGGGCTTTTGCTGCTTCG-CAAAGCG 843		
<i>B.canis_str_M-</i>	TTCCGCTCACCCGGTC-TGCTGGCGGGCTTTTGCTGCTTCG-CAAAGCG 843		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_116</i>	TTCCGCT-TACCCGGTC-TGCTGGCGGGCTTTTGCTTCTTCG-CAAAGCG 842		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_90</i>	TTCCGCT-TACCCGGTC-TGCTGGCGGGCTTTTGCTGCTTCG-CAAAGCG 841		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_38</i>	TTCCGCTCACCCAGGT-TGCTGGGGCGGGCTTTCG-GCTTCA--CAAGCA 836		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_110</i>	CCCCGTGCCGATGCCCTTGG--GGTCGG-ACGTTGCGATCG--TAAATTA 883		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_122</i>	CCCCGTGCCGATGCCCTTGGCGCTTCCG-ACATTGCTTTCGATCGGTTA 891		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_166</i>	CACCGTGCCGATGCCCTTGGGA-GTTCGA-ACAACGCTTACGA--TCGTTA 890		
<i>B.canis_ATCC_23365</i>	CACCGTGCCGATGCCCTT-GCCGTTCCGACGATGCTTACGA--TCGTTA 890		
<i>B.canis_HSK_A52141</i>	CACCGTGCCGATGCCCTT-GCCGTTCCGACGATGCTTACGA--TCGTTA 890		
<i>B.suis_1330</i>	CACCGTGCCGATGCCCTT-GCCGTTCCGACGATGCTTACGA--TCGTTA 890		
<i>B.canis_str_M-</i>	CACCGTGCCGATGCCCTT-GCCGTTCCG-ACGATGCTTACGA--TCGTTA 889		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_116</i>	CACCGTGCCGATGCCCTTGGCGTTCCGACGATGCTTACGA--TCGTTA 890		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_90</i>	CACCGTGCCGATGCCCTT-GCCGTTCCGACGATGCTTACGA--TCGTTA 888		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_38</i>	C-CCGTGCCGATGCCCTT-GCCGTTCCG-CGATGCTT-CGA--TCGTTA 879		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_110</i>	CCGATGTGGCGAC--TTTGAGCCATATCTTTGTTCTGGTGGTGGTTTT 930		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_122</i>	CCGATGTGGCGAC--TTTGAGCCATATCTTTGTT---GGTGGTTTT 934		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_166</i>	CCGATGTGGCGACA--TTTGAGCCATATCTTTGTTGATGGTGGTTTT 938		
<i>B.canis_ATCC_23365</i>	CCGATGTGGCGACA--TTTGAGCCATATCTTGTCAAGTGGTGGTTTT 938		
<i>B.canis_HSK_A52141</i>	CCGATGTGGCGACA--TTTGAGCCATATCTTGTCAAGTGGTGGTTTT 938		
<i>B.suis_1330</i>	CCGATGTGGCGACA--TTTGAGCCATATCTTGTCAAGTGGTGGTTTT 938		
<i>B.canis_str_M-</i>	CCGATGTGGCGACA--TTTGAGCCATATCTTGTGATGGTGGTTTT 937		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_116</i>	CCGATGTGGCGACA--TTTGAGCCATATCTTTGTTGATGGTGGTTTT 939		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_90</i>	CCGATGTGGCGACA--TTTGAGCCATATCTTTGTTGATGGTGGTTTT 936		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_38</i>	CCGATGTGGCGACGAATTTGAGCCATATCTTTGTA-TGTGGTGGTTTT 928		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_110</i>	CTTCTTCTTCCGCTTCGCTCACTTCTAACG--GTGG-CGTGGTTCGGATG 977		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_122</i>	CTTCTTCTTCCGCTTCGCTCAGAGAAGAGAAAGGGG-CGTGGTTCGGATG 983		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_166</i>	CTTCTTCTTCCGCTTCGCTCGCTGCTAAGCG-GTGG-CGTGGTTCGGATG 986		
<i>B.canis_ATCC_23365</i>	CTTCTTCTTCCGCTTCGCTCGGATAAAACAG-GTGGACGTGGTTCGGATG 987		
<i>B.canis_HSK_A52141</i>	CTTCTTCTTCCGCTTCGCTCGGATAAAACAG-GTGGACGTGGTTCGGATG 987		
<i>B.suis_1330</i>	CTTCTTCTTCCGCTTCGCTCGGATAAAACAG-GTGGACGTGGTTCGGATG 987		
<i>B.canis_str_M-</i>	CTTCTTCTTCCGCTTCGCTCGCATAA--TG-GTGG-CGTGGTTCGGATG 981		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_116</i>	CTTCTTCTTCCGCTTCGCTCAGCTGCAACT-GTGG-CGTGGTTCGGATG 987		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_90</i>	CTTCTTCTTCCGCTTCGCTCGAAGGAGAAGCGGTG-CGTGGTTCGGATG 984		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_38</i>	CTTCTTCTTCCGCTTCGCTCGAAGGACTT-CGTGG-CGTGGTTCGGATG 976		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_110</i>	GTCGGGCAAGAACAACCTCCGGTACGCTCTCGATGGTATCAGGCGCTGAT 1027		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_122</i>	GTCGGGCAAGAACAACCTCCGGTACGCTCTCGATGGTATCAGGCGCTGAT 1033		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_166</i>	GTCGGGCAAGAACAACCTCCGGTACGCTCTCGATGGTATCAGGCGCTGAT 1036		
<i>B.canis_ATCC_23365</i>	GTCGGGCAAGAACAACCTCCGGTACGCTCTCGATGGTATCAGGCGCTGAT 1037		
<i>B.canis_HSK_A52141</i>	GTCGGGCAAGAACAACCTCCGGTACGCTCTCGATGGTATCAGGCGCTGAT 1037		
<i>B.suis_1330</i>	GTCGGGCAAGAACAACCTCCGGTACGCTCTCGATGGTATCAGGCGCTGAT 1037		
<i>B.canis_str_M-</i>	GTCGGGCAAGAACAACCTCCGGTACGCTCTCGATGGTATCAGGCGCTGAT 1031		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_116</i>	GTCGGGCAAGAACAACCTCCGGTACGCTCTCGATGGTATCAGGCGCTGAT 1037		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_90</i>	GTCGGGCAAGAACAACCTCCGGTACGCTCTCGATGGTATCAGGCGCTGAT 1034		
<i>B.canis_str_Oliveri_iss_38</i>	GTCGGGCAAGAACAACCTCCGGTACGCTCTCGATGGTATCAGGCGCTGAT 1026		

ciones de un único nucleótido en las secuencias de los genes *virB* 1, 2, 4, 6, 7, 9 y 10 entre las cepas analizadas. Además, en los genes *virB* 3, 5, 8, 11 y 12 se encontraron cambios en fragmentos de múltiples pares de bases.

Al contrastar las secuencias entre los distintos criaderos, se encontró que los 7 aislamientos nativos presentan polimorfismos (Tabla 3). Cabe resaltar que no se pudo identificar que hubiese dos o más criaderos con la misma cepa, presentándose incluso variaciones entre cepas obtenidas de un mismo criadero.

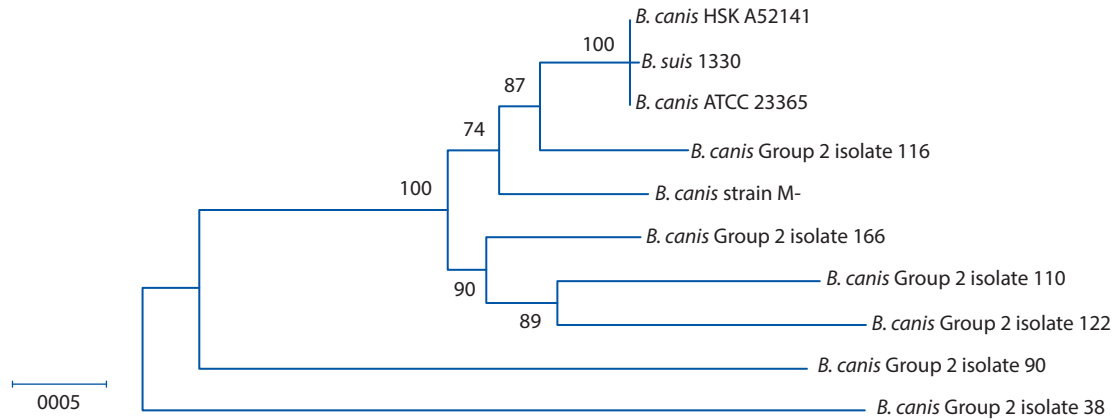
En la Figura 1 se muestra el cladograma realizado con base en el constructo de las secuencias de los genes *virB*. Las cepas de *B. canis* ATCC 23365 y HSK A52141 y *B. suis* 1330 se agruparon en un solo clado, como es de esperarse debido a la alta similitud que existe entre estas especies. Sin embargo, no se presentó agrupamiento de los aislamientos nativos en un solo clado; de hecho, los aislamientos obtenidos de un solo criadero no agruparon juntos, lo que podría sugerir la presencia de más de un clon de *B. canis* circulante.

## DISCUSIÓN

Diversos estudios han establecido la importancia del SST4 de *B. canis* en su proceso infeccioso y como potencial blanco terapéutico.<sup>21,22</sup> Las proteínas *VirB* han sido estudiadas como potenciales blancos para vacunas,<sup>23</sup> debido al papel que tienen en el proceso de secreción de proteínas que ayudan a instalar el nicho infeccioso de la bacteria y al carácter antigénico de algunas de ellas,<sup>24</sup> lo que demuestra la necesidad de ca-

**Tabla 3.** Distancia P de las secuencias concatenadas entre cada una de las cepas de *Brucella canis* y *Brucella suis*.

Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>B. canis</i> str Oliveri isolate 38									
2 <i>B. canis</i> str Oliveri isolate 90	0,105								
3 <i>B. canis</i> str Oliveri isolate 110	0,101	0,100							
4 <i>B. canis</i> str Oliveri isolate 116	0,088	0,076	0,040						
5 <i>B. canis</i> str Oliveri isolate 122	0,099	0,097	0,042	0,040					
6 <i>B. canis</i> str Oliveri isolate 166	0,087	0,081	0,041	0,025	0,039				
7 <i>B. canis</i> str M-	0,086	0,077	0,053	0,022	0,046	0,031			
8 <i>B. canis</i> ATCC 23365	0,093	0,074	0,043	0,014	0,038	0,029	0,019		
9 <i>B. canis</i> HSK A52141	0,093	0,074	0,043	0,014	0,038	0,029	0,019	0,000	
10 <i>B. suis</i> 1330	0,093	0,074	0,043	0,014	0,038	0,029	0,019	0,000	0,000



**Figura 1.** Cladograma construido a partir de las secuencias de los amplicones de *virB* 1, 3, 4, 5, 7, 8 y 11. Los aislamientos colombianos corresponden a *B. canis* Group 2.

racterizar dichos factores de virulencia en cepas colombianas, las cuales apenas comienzan a ser descritas.<sup>25</sup>

Los resultados obtenidos sugieren la presencia de varios clones de *B. canis* circulantes en el área metropolitana del Valle de Aburrá, pues se detectaron variaciones en la secuencia nucleotídica entre los 7 aislamientos estudiados. Los aislamientos 90, 110 y 116 fueron obtenidos de un mismo criadero y, sin embargo, mostraron diferencias entre ellos, lo que se evidencia en el cladograma, donde no se agruparon juntos. Dicho criadero presentó una alta frecuencia de infección por *B. canis* en perros, asociada a pobres condiciones higiénicas;<sup>26</sup> en estudios previos se determinó que este criadero tiene altos factores de riesgo para la infección

por *B. canis* y allí la bacteria fue aislada de un humano conviviente.<sup>27</sup> En un estudio realizado por Gyuranecz *et al.*<sup>28</sup> se encontraron variaciones en el material genético de la bacteria aislada de un mismo hospedero a partir de muestras clínicas obtenidas de diferentes sitios anatómicos, lo que indica variación intra hospedero de la bacteria que podría deberse a los cambios que sufre ésta con el fin de adaptarse al ambiente y resistir la acción del sistema inmune del hospedero.

Al analizar las secuencias, llama la atención que se presenten variaciones entre cepas de un mismo criadero mientras que dos cepas (110 y 122) aisladas de criaderos diferentes posean alta similitud. Esto podría indicar la diseminación de la infección entre criaderos en nuestro

medio, sustentado por algunas prácticas reproductivas utilizadas en los criaderos como el préstamo de caninos para cruzar con los de otros criaderos, o usar semen sin exigir la realización y el resultado negativo de la prueba serológica 2ME-PARP, que detecta anticuerpos contra *Brucella canis* en suero; sin embargo, en algunos casos la prueba puede tener resultado negativa debido a que el canino se encuentra en la fase aguda de la infección y no tiene anticuerpos aún, pero está bacterémico y puede transmitir la infección a través del contacto sexual.

No obstante la alta similitud hallada entre las especies y cepas evaluadas, diversos estudios han demostrado que la regulación de la expresión del operón *virB* difiere entre especies,<sup>9,30,31</sup> por lo que la caracterización de las diferencias en fragmentos génicos de los factores de virulencia podría ser la base de posteriores estudios que asocien las características de virulencia de las distintas cepas con dichos cambios. Los fragmentos analizados no corresponden a los genes completos ni a regiones funcionales específicas, razón por la cual no es posible especular sobre el efecto de los polimorfismos sobre la función proteica. Es necesario tener en cuenta que el presente estudio es una primera aproximación a partir de la cual se sientan las bases para estudios más amplios, en los cuales se considere una población mayor de muestras obtenidas de caninos infectados, los cuales permitirían dilucidar con certeza si los polimorfismos hallados son polimorfismos de un solo nucleótido e inserciones-delecciones, o si son mutaciones aleatorias en la población.

A pesar de los resultados obtenidos en este trabajo, el pequeño tamaño muestral no permite concluir con respecto al número de clones circulantes en el área metropolitana del Valle de Aburrá. Estudios de otro tipo, como genotipificación basada en marcadores informativos o secuenciamiento de genomas completos, darán una mejor idea sobre la clonalidad de los aislamientos. El establecimiento de la relación clonal entre los aislamientos estudiados puede realizarse también mediante una prueba de subtipificación molecular, ya sea por número variable de repeticiones en tándem (VNTR)<sup>29</sup> o electroforesis de campo pulsado (PFGE).

## CONCLUSIÓN

Los genes del operón *virB* de *B. canis* de los criaderos evaluados en este trabajo presentan diferencias

que sugieren que no hay un solo clon de la bacteria circulando en el área de estudio; a pesar de esto, la evidencia no es suficiente y se requerirían pruebas de tipificación molecular para asegurarlo.

Este análisis debería complementarse con análisis a nivel de la secuencia de aminoácidos identificando regiones o dominios críticos presentes en estas proteínas o proponer la aplicación de estudios estructurales *in silico*, para identificar diferencias funcionales en las proteínas codificadas por el operón *virB*.

## FINANCIACIÓN

Este proyecto fue financiado por fondos de la estrategia de sostenibilidad 2013-2014 del grupo Biogénesis - Vericel Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran ningún conflicto de intereses.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la estrategia de sostenibilidad 2013-2014 del grupo Biogénesis - Vericel y a la Unidad de Diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Dean AS, Crump L, Greter H, Schelling E, Zinsstag J.** Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1865.
2. **Hollett RB.** Canine brucellosis: outbreaks and compliance. *Theriogenology* 2006; 66:575-87.
3. **Makloski CL.** Canine brucellosis management. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011; 41:1209-19.
4. **Lucero N, Corazza R, Almuzara M, Reynes E, Escobar G, Boeri E, et al.** Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. *Epidemiol Infect* 2010; 138:280-5.
5. **Paixão TA, Roux CM, den Hartigh AB, Sankaran-Walters S, Dandekar S, Santos RL, et al.** Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type

- IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. *Infect Immun* 2009; 77:4197-208.
6. **Jimenez de Bagues M-P, Maria-Pilar JDB, Dudal S, Dornand J, Gross A.** Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clin Immunol* 2005; 114:227-38.
  7. **Den Hartigh AB, Rolán HG, de Jong MF, Tsolis RM.** *VirB3* to *VirB6* and *VirB8* to *VirB11*, but not *VirB7*, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. *J Bacteriol* 2008; 190: 4427-36.
  8. **Lacerda TLS, Salcedo SP, Gorvel J-P.** *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16:45-51.
  9. **Rambow-Larsen A a, Petersen EM, Gourley CR, Splitter G a.** *Brucella* regulators: self-control in a hostile environment. *Trends Microbiol* 2009; 17:371-7.
  10. **Delpino MV, Comerci DJ, Wagner MA, Eschenbrenner M, Mujer CV, Ugalde RA, et al.** Differential composition of culture supernatants from wild-type *Brucella abortus* and its isogenic *virB* mutants. *Arch Microbiol* 2009; 191:571-81.
  11. **De la Cuesta-Zuluaga JJ, Sánchez-Jiménez MM, Martínez-Garro J, Olivera-Angel M.** Identification of the *virB* operon genes encoding the type IV secretion system, in Colombian *Brucella canis* isolates. *Vet Microbiol* 2013; 163:196-9.
  12. **Kim J-S, Jeong W, Jeoung H-Y, Song J-Y, Kim H, Beak J-H, et al.** Complete genome sequence of *Brucella canis* strain HSK A52141, isolated from the blood of an infected dog. *J Bacteriol* 2012; 194:5134.
  13. **Tae H, Shallom S, Settlage R, Preston D, Adams LG, Garner HR.** Revised genome sequence of *Brucella suis* 1330. *J Bacteriol* 2011; 193:6410.
  14. **Bikandi J, San Millán R, Rementería A, Garaizar J.** *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics* 2004; 20:798-9.
  15. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-10.
  16. **Hall T.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41:95-8.
  17. **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:4673-80.
  18. **Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M.** Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 2012; 28:1166-7.
  19. **Saitou N, Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4:406-25.
  20. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 2011.
  21. **Rajashekara G, Eskra L, Mathison A, Petersen E, Yu Q, Harms J, et al.** *Brucella*: functional genomics and host-pathogen interactions. *Anim Health Res Rev* 2006; 7:1-11.
  22. **Paschos A, den Hartigh A, Smith MA, Atluri VL, Sivanesan D, Tsolis RM, et al.** An *in vivo* high-throughput screening approach targeting the type IV secretion system component *VirB8* identified inhibitors of *Brucella abortus* 2308 proliferation. *Infect Immun* 2011; 79:1033-43.
  23. **Palomares-Resendiz E, Arellano-Reynoso B, Hernández-Castro R, Tenorio-Gutiérrez V, Salas-Téllez E, Suárez-Güemes F, et al.** Immunogenic response of *Brucella canis virB10* and *virB11* mutants in a murine model. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2:35.
  24. **Rolán HG, den Hartigh AB, Kahl-McDonagh M, Ficht T, Adams LG, Tsolis RM.** *VirB12* is a serological marker of *Brucella* infection in experimental and natural hosts. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:208-14.
  25. **Ortiz LF, Muskus C, Sánchez MM, Olivera M.** Identification of *Brucella canis* Group 2 in colombian kennels. *Rev Colomb Ciencias Pecu* 2012; 25: 615-9.
  26. **Castrillón Salazar L, Giraldo Echeverri CA, Sánchez Jiménez MM, Olivera-Angel M.** Factores asociados con la seropositividad a *B. canis*, en criaderos caninos de dos regiones de Antioquia. *Cad Saude Publica* 2013.
  27. **Olivera M, Di Lorenzo C.** Aislamiento de *Brucella canis* en un humano conviviente con caninos infectados. Informe de un caso 2009; 40: 218-21.
  28. **Gyuranecz M, Rannals BD, Allen CA, Jánosi S, Keim PS, Foster JT.** Within-host evolution of *Brucella canis* during a canine brucellosis outbreak in a kennel. *BMC Vet Res* 2013; 9:76.
  29. **Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP.** Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol* 2007; 7:34.
  30. **Carle A, Höppner C, Ahmed Aly K, Yuan Q, den Dulk-Ras A, Vergunst A, et al.** The *Brucella suis* type IV secretion system assembles in the cell envelope of the heterologous host *Agrobacterium tumefaciens* and increases *IncQ* plasmid pLS1 recipient competence. *Infect Immun* 2006; 74:108-17.
  31. **Rouot B, Alvarez-Martinez M, Marius C, Menanteau P, Guilloteau L, Boigegrain R, et al.** Production of the Type IV Secretion System Differs among *Brucella* Species as Revealed with *VirB5*- and *VirB8*-Specific Antisera. *Infect Immun* 2003; 71:1075-82.