

Sumario

Detección de casos humanos de brucelosis producidos por *Brucella abortus* biovar 3 181

Estado de las Enfermedades de Declaración Obligatoria 183

Resultados de la declaración al Sistema de Información Microbiológica 191

Detección de casos humanos de brucelosis producidos por *Brucella abortus* biovar 3

S. Valdezate Ramos^{1,2}, A. Navarro Riaza¹, V. Rubio López¹, B. Garin-Bastuji³, D. Albert³, P. Hernández García⁴, P. M. Alonso Pérez⁵ y J. A. Saéz-Nieto¹.

¹ Departamento de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

² Unidad de Alertas y Emergencias, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

³ Laboratorio Europeo y OIE/FAO de Referencia para Brucelosis, 94706 Maisons-Alfort, France

⁴ Servicio de Microbiología, Hospital de San Pedro Alcántara, Cáceres, España.

⁵ Servicio de Microbiología, Hospital Xeral-Calde, Lugo, España.

Introducción

La brucelosis constituye una de las zoonosis más importantes en España, en otros países de la Unión Europea, en países mediterráneos y del Centro y Sur de América¹. Durante el período 2000-2005 se notificaron 4.550 casos de brucelosis procedentes de las diferentes regiones españolas²⁻³, alcanzándose mayores tasas de infección en Andalucía, Extremadura y Castilla-La Mancha²⁻³. Afortunadamente, el número de casos humanos se ha reducido drásticamente, como consecuencia de las medidas instauradas en salud animal y en higiene alimentaria³.

El principal agente etiológico de la brucelosis humana en nuestro país lo constituye *Brucella melitensis*, siendo responsable del 97,5% de los casos notificados². De forma análoga, sucede en otros países europeos y de la cuenca mediterránea¹, con abundancia de ganado ovino y caprino. A diferencia de otras áreas, como Estados Unidos, donde en el pasado predominaba *B. abortus*.

Desde 1997, se han recibido en el laboratorio de Taxonomía del Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología (CNM) del Instituto de Salud Carlos III, aislamientos de *Brucella* spp. procedentes de toda la geografía española para su identificación. Esta identificación de especie ha sido realizada con éxito mediante la técnica de AMOS-PCR⁴ en todos los aislamientos recibidos durante el período 1997-2003. Dicha técnica, basada en el polimorfismo en tamaño de la secuencia de inserción IS711, permite la identificación de todas las biovariedades de *B. melitensis*, de las biova-

riedades 1, 2 y 4 de *B. abortus*, la biovariedad 1 de *B. suis*, y de *B. ovis*. Sin embargo, cinco aislamientos de *Brucella* recibidos durante el año 2004-2005 no pudieron identificarse mediante esta técnica.

Con el objetivo de identificar a nivel de especie estos aislamientos e investigar su posible relación filogenética se estudiaron diferentes genes (16S rRNA, *gyrA*, *parC* and *rpoB*)⁵, se aplicó la tipificación mediante secuencias repetidas en tándem o HOOOF-prints «Hypervariable octameric oligonucleotide fingerprint profiles»⁷, y la identificación convencional⁶.

Características demográficas y clínicas de los pacientes

Durante un período de 11 meses, se obtuvieron 4 aislamientos de *Brucella* spp. procedentes de los hemocultivos de cuatro varones (rango de edad de 24-59 años) que presentaban síndrome febril con artralgia y mialgia, ubicados en Coria (Cáceres), y 1 aislamiento de un varón de 48 años con orquiepididimitis localizado en Lugo. En el diagnóstico inicial, se aplicaron las técnicas serológicas de SAT y el Coombs anti-*Brucella* (Chromatest, Linear Chemicals, Barcelona, España) obteniéndose unos títulos que oscilaban de 1/2560 a 1/320 y de 1/5120 a 1/250, respectivamente.

Identificación molecular

La secuenciación del gen 16S rRNA, indicó la presencia de una secuencia común a las 5 cepas, presentando una similitud del 99% con secuencias de *B. abortus*.

tus y *B. melitensis* 16M depositadas en el GenBank (www.ncbi.nlm.gov/blast/Blast). Este hecho, confirmó la identificación a nivel de género, pero no supuso un avance en la identificación de especie.

Dada la naturaleza conservadora del gen 16S rRNA entre bacterias de especies relacionadas se procedió a estudiar *gyrA* y *parC*, genes codificantes de las proteínas topoisomerasas II y IV (subunidad A), implicadas en estudios de identificación y filogenia para otros géneros bacterianos. En las cinco cepas en estudio se observó: secuencias idénticas entre sí para *gyrA* y *parC*; cambio en *gyrA*, detectado también en *B. suis* y *B. abortus* biovar 1; cambio de aminoácido en *parC*, detectado en *B. abortus* biovar 1 (posición 2600-valina). Este polimorfismo especie-específico nos orientó hacia la identificación de las 5 cepas estudiadas como *B. abortus*.

A continuación se secuenció en las 5 cepas un fragmento de la subunidad b de la RNA polimerasa, el gen *rpoB*, relacionado con la identificación de especies y biovariedades de *Brucella*⁵. Estas cepas mostraron idéntica secuencia entre sí, detectándose 3 sustituciones: 243-GAC, 268-ACT marcador especie-específico de *B. abortus*⁵ y 340-GAA.

La existencia del biovar 7 en *B. abortus* ha sido cuestionada durante muchos años. Se ha demostrado que este biovar está constituido por una población mixta de biovar 3 y biovar 5 (JM Verger y B. Garin-Bastuji, resultados no publicados). Por lo que se procedió a su estudio en el Laboratorio Europeo para la Referencia de Brucelosis (Maisons-Alfort, Francia). La pruebas de biotípica: requerimiento de CO₂, producción de H₂S, la aglutinación con el antisuero policlonal mono-específico anti-A y no aglutinación con el suero anti-M, crecimiento en presencia de tionina y fuchsina básica, identificaron las cinco cepas como *B. abortus* biovariedad 3⁶.

Estudio clonal mediante HOOF-prints

Debido a que las cinco cepas de *B. abortus* biovariedad 3, compartían idénticas secuencias de los genes 16S rDNA, *gyrA*, *parC* y *rpoB*, se analizaron sus genotipos mediante la técnica de HOOF-prints⁷⁻⁸. El número de repeticiones en tandem, alelos, para cada uno de los 8 loci estudiados fueron identificados, asignándose a cada cepa un perfil específico. Se detectaron cinco clones diferentes (Info-Quest, UPGMA, Applied-Maths), responsables de los casos humanos de brucelosis, tal como se indica en la figura. Es destacable, que las

cepas procedentes de Coria (Cacéres) presentaban idénticos alelos en los loci 2, 3, 4 y 6, con una similitud genética >40%. Esto indicaría que estos clones, aunque diferentes, compartirían un ancestro común ubicado en esa área geográfica.

Conclusión

B. melitensis es el único agente responsable de la brucelosis humana identificado en nuestro laboratorio durante un período de diez años. Las cinco cepas caracterizadas constituyen los primeros casos humanos de *B. abortus* biovar 3 identificados en nuestro laboratorio. El análisis de los genes *parC* (codon 2600-Val) y *rpoB* (268-ACG) permitió la identificación de las cepas a nivel de especie como *B. abortus*. Sin embargo, la identificación a nivel de biovariedad se alcanzó mediante los métodos fenotípicos convencionales (biovariedad 3). La caracterización de sus genotipos permitió descartar la diseminación reciente de un clon único de *B. abortus* biovar 3 como responsable de los casos de brucelosis humana.

Bibliografía

1. Pappas G, Akrtidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. N Engl J Med. 2005; 352: 2325-36.
2. Sánchez-Serrano LP, Ordoñez P, Díaz MO, Torres A. Vigilancia de la brucelosis. Bol Epidemiol Semanal. 2004; 12: 209-20.
3. Servicio de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. España. Año 2005. Bol Epidemiol Semanal. 2006; 14(17): 193-204
4. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv.1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv.1 by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 2660-6.
5. Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R. Molecular characterization of the *rpoB* gene in *Brucella* species: new potential molecular markers for genotyping. Microb Infect 2006; 8(3): 860-5.
6. Alton, GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the Brucellosis Laboratory, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1988.
7. Bricker BJ, Ewalt DR, Halling SM. *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). BMC Microbiol 2005; 11: 3-15.
8. Valdezate S, Cervera I, Hernandez P, Navarro A, Saéz-Nieto J.A. Characterization of human brucellosis outbreaks and sporadic cases by the use of HOOF variable number tandem repeats Clin Microbiol & Infection. 2007; 13: 887-92.

Figura 1

Análisis filogenético de los perfiles HOOF-prints de las cepas de *B. abortus* biovar 3 y de las cepas de referencia *Brucella*

