



ORIGINAL

Caracterización de la variabilidad genética de cepas de campo de *Brucella canis* aisladas en Antioquia



Juana L. Vidal Arboleda^{a,*}, Luisa F. Ortiz Roman^b y Martha Olivera Angel^b

^a Grupo Vericel, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^b Grupo Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Recibido el 3 de agosto de 2016; aceptado el 12 de julio de 2017

Disponible en Internet el 24 de diciembre de 2017

PALABRAS CLAVE

Inserciones;
Delecciones;
Indels;
Reloj molecular

Resumen *Brucella canis*, un patógeno intracelular facultativo, es responsable de la brucelosis canina, una enfermedad zoonótica que afecta a los caninos y al hombre. En los primeros causa abortos y fallas reproductivas; en el ser humano genera síntomas inespecíficos. En el año 2005 se demostró la presencia de *B. canis* en Antioquia (Colombia). Las cepas halladas se identificaron como tipo 2. La secuenciación del genoma completo de una cepa de campo denominada *Brucella canis* str. Oliveri mostró indels específicos de especie; a partir de estos se buscó conocer características genómicas de las cepas de *B. canis* aisladas y establecer relaciones filogenéticas, así como el tiempo de divergencia de la cepa Oliveri. Se realizó PCR convencional y secuenciación de 30 cepas de campo, se identificaron 5 indels reconocidos en *B. canis* str. Oliveri, se empleó ADN de *Brucella suis*, *Brucella melitensis* y cepas vacunales de *Brucella abortus* como controles. Se determinó que las cepas de campo estudiadas comparten 4 de los 5 indels de la cepa Oliveri, lo que indica la presencia de más de una cepa de *B. canis* circulando en la región. El análisis filogenético se realizó con 24 cepas de *Brucella* mediante secuencias concatenadas de genes marcadores de especie. Se probó la hipótesis del reloj molecular y adicionalmente se realizó test de tasas relativas de Tajima. De esta manera se demostró que la cepa Oliveri, al igual que las otras cepas de *B. canis* analizadas, divergen de *B. suis*. Se rechazó la hipótesis del reloj molecular entre las especies de *Brucella* y se demostró una tasa de evolución y una distancia genética similar entre las cepas de *B. canis*.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: luifernanda@gmail.com (J.L. Vidal Arboleda).

KEYWORDS

Insertions;
Deletions;
Indel events;
Molecular clock

Characterization of the genetic variability of field strains of *Brucella canis* isolated in Antioquia

Abstract *Brucella canis* is a facultative intracellular pathogen responsible for canine brucellosis, a zoonotic disease that affects canines, causing abortions and reproductive failure; and the production of non-specific symptoms in humans. In 2005 the presence of *B. canis* in Antioquia was demonstrated and the strains were identified as type 2. The sequencing of the genome of a field strain denoted *Brucella canis* str. Oliveri, showed species-specific indel events, which led us to investigate the genomic characteristics of the *B. canis* strain isolated and to establish the phylogenetic relationships and the divergence time of *B. canis* str. Oliveri. Conventional PCR sequencing was performed in 30 field strains identifying 5 indel events recognized in *B. canis* str. Oliveri. ADN from *Brucella suis*, *Brucella melitensis* and vaccine strains from *Brucella abortus* were used as control, and it was determined that all of the studied field strains shared 4 out of the 5 indels of the sequenced Oliveri strain, indicating the presence of more than one strain circulating in the region. Phylogenetic analysis was performed with 24 strains of *Brucella* using concatenated sequences of genetic markers for species differentiation. The molecular clock hypothesis and Tajima's relative rate test were tested, showing that the Oliveri strain, similarly to other canis species, diverged from *B. suis*. The molecular clock hypothesis between *Brucella* species was rejected and an evolution rate and a similar genetic distance between the *B. canis* were demonstrated.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Brucella canis, un patógeno intracelular facultativo, es responsable de la brucelosis canina, una enfermedad zoonótica que afecta a los caninos y que causa abortos y fallas reproductivas en las hembras, y orquitis y epididimitis en los machos². En el humano se puede presentar la infección y producir cuadros clínicos leves, asintomáticos o graves^{22,24,47}.

En Colombia se ha observado una seropositividad en caninos de entre el 1,49 y el 27,7, y fue del 9,1% en humanos^{9,17,33,36}.

Hasta ahora, el análisis realizado a 30 cepas de *B. canis* aisladas de animales infectados demostró que las cepas circulantes son *B. canis* tipo 2³⁵. Se secuenció el genoma completo de una de las cepas aisladas de campo denominada *Brucella canis* str. Oliveri (HG803175.1-HG803176.1). En dicha cepa se reconocieron inserciones y deleciones específicas de especie, que se encuentran vinculadas con la síntesis de diferentes proteínas, algunas encargadas del transporte de nutrientes y aminoácidos, otras ribosomales y epimerasas, y algunas sin función conocida⁴¹. Tales cambios se pueden relacionar con la adaptación de la bacteria a su hospedero y al ambiente, con pérdida de material genético o producción de polimorfismos genéticos.

Para analizar la evolución del género *Brucella* se han desarrollado múltiples análisis filogenéticos. Existe consenso en separar en un clado las especies *Brucella melitensis* y *Brucella abortus*; otro clado está formado por las especies marinas, y se encuentra más relacionado con *Brucella neotomae*; otro clado lo conforman las especies *Brucella suis* y *B. canis*^{14,29}. Se ha reconocido a *Brucella ovis* como la especie más ancestral de todas, y se ha planteado que el

contagio inicial de cerdos, cabras y ganado vacuno se originó del contacto con ovejas infectadas, de 86.000 a 296.000 años atrás¹⁶.

B. canis siempre se ha encontrado formando parte del clado donde se halla *B. suis*, con altas similitudes, lo que en ocasiones llevó a diagnósticos errados (al considerar a esta como un miembro de la especie *suis*)¹⁹. Sobre la base de estos hallazgos se buscó conocer la filogenia y el ancestro evolutivo de la cepa de *B. canis* str. Oliveri en comparación con otras cepas de *B. canis* y con otras especies reconocidas dentro del género; además, se buscó determinar si esta es la única cepa que se encuentra circulando en toda la región, lo cual podría facilitar el desarrollo de estudios en epidemiología molecular de la bacteria.

Materiales y métodos

Para observar si las deleciones e inserciones reportadas en la cepa *B. canis* str. Oliveri estaban o no presentes en las 30 cepas de campo de *B. canis* reunidas, la metodología empleada fue la que se describe a continuación.

Cepas bacterianas

Las cepas fueron provistas por el grupo de investigación Biogénesis de la Universidad de Antioquia (Colombia) y confirmadas como *B. canis* por el Instituto Malbrán (Argentina); todas ellas fueron conservadas a -70°C .

La activación de las cepas se realizó en 5 ml de caldo tripticosa soja, con incubación a 37°C durante 24 h. Desde allí fueron repicadas en agar tripticosa soja e incubadas a 37°C durante 36-48 h. Se realizó confirmación de la pureza de las cepas por medio de coloración de Gram. Adicionalmente se

utilizaron como cepas control para la realización de los diferentes análisis las cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51, ADN de *B. melitensis* 16M y ADN de *B. suis* 1330.

Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de 30 cepas de campo de *B. canis* identificadas previamente por hemocultivo, PCR punto final y 2- β -mercaptoetanol (2ME-RSAT)⁹. Como controles se utilizó ADN de *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51, *B. melitensis* 16M y *B. suis* 1330. La extracción de ADN se realizó siguiendo el método conocido como *boiling prep*³⁵. Brevemente, se tomaron 5 colonias de cada cepa, se resuspendieron en alícuotas de 0,5 ml de PBS estéril, posteriormente fueron llevadas a ebullición por 10 min y luego fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se usó para la realización de la PCR.

Selección de cebadores

Se diseñó un set de 5 pares de cebadores que permitieran determinar las inserciones y deleciones identificadas previamente en la cepa de *B. canis* str. Oliveri. En la [tabla 1](#) se presentan los cebadores seleccionados y los productos de la PCR *in silico*.

Amplificación por PCR

La PCR se desarrolló según lo reportado por Ortiz et al.³⁵. La amplificación se realizó en un termociclador PTC 200 (Perkin-Elmer Inc., San José, CA, EE. UU.). Como control negativo se utilizó agua destilada y como control positivo la cepa Oliveri de *B. canis*. Los productos de PCR fueron observados por electroforesis en gel de agarosa al 1% con 0,001 μ g/ml de bromuro de etidio, y visualizados con la ayuda de un transiluminador de luz UV (Transilluminator Mini Benchtop Model M-10E, UVP, Upland, CA, EE. UU.).

Secuenciación de los productos de PCR

La secuenciación de los productos de PCR se realizó por medio de un secuenciador automático 3730XL (www.macrogen.com). Los resultados obtenidos fueron revisados a partir de los cromatogramas y se compararon por medio de alineamientos en el programa Mega 6 con la secuencia de la cepa Oliveri.

Selección de secuencias para el análisis filogenético

Para conocer la filogenia y el ancestro evolutivo de la cepa *B. canis* str. Oliveri se utilizaron secuencias concatenadas de genes usados como marcadores de especies en *Brucella* spp. ([tabla 2](#)).

Reconstrucción filogenética

Se realizaron alineamientos de las secuencias escogidas utilizando el algoritmo ClustalW para ADN. Para evaluar

la calidad del alineamiento se tuvo en cuenta la distancia genética promedio medida con el programa Mega 6. El árbol filogenético se estableció usando los métodos de *neighbor-joining*, máxima parsimonia y máxima verosimilitud¹⁶. Usando ModelTest³⁸ se seleccionó el mejor modelo de sustitución, utilizado para los análisis *neighbor-joining* y máxima verosimilitud. Las búsquedas heurísticas en máxima parsimonia y máxima verosimilitud se realizaron con el algoritmo *subtree pruning and regrafting*. En todos los análisis se realizó una medición del soporte de rama por medio de un *bootstrap* de 10.000 réplicas.

Reloj molecular y test de tasas relativas de Tajima

Por medio del programa Mega 6 se realizaron pruebas de hipótesis de reloj molecular con las secuencias concatenadas de los genes usados como marcadores de especies de *Brucella*.

Para probar la hipótesis del reloj molecular, primero se realizó un árbol con el modelo de sustitución más adecuado; asimismo, se comparó la cepa *B. canis* str. Oliveri con las diferentes especies de *Brucella*, empleando en ese análisis el *likelihood ratio test* con un nivel de confianza del 95%. Igualmente, se realizó el test de tasa relativa de Tajima entre *B. canis* str. Oliveri y *B. canis* ATCC 23365, utilizando como *outgroup* *B. suis* 1330. Se empleó la cepa *B. canis* ATCC 23365 porque al realizar la comparación de distancia genética entre dicha cepa y la cepa *B. canis* HSK A5214 (segunda cepa secuenciada de *B. canis*, aislada directamente de la sangre de un perro infectado en la República de Corea) aquella fue 0.

Resultados

Se encontró que las 30 cepas de campo analizadas compartían con la cepa *B. canis* str. Oliveri 4 de las 5 deleciones e inserciones que dicha cepa exhibe.

Deleciones

Entre las deleciones compartidas se determinó una de 358 pb en el gen BR0510, relacionada con una epimerasa, lo cual derivó en un amplificado de 498 pb, a diferencia de lo encontrado en las demás especies evaluadas, las cuales presentaron un amplificado de 856 pb.

Se encontró una segunda deleción de 297 pb en las 30 cepas de *B. canis*, relacionada con la enzima N-acetiltransferasa (BR0725); las demás especies de *Brucella* analizadas presentaron un tamaño de amplificado de 788 pb, datos corroborados al realizar la secuenciación de los productos de PCR.

Hubo una última deleción de 218 pb, reportada como la única exclusiva de la cepa Oliveri⁴¹. Esta deleción se relaciona con un ARN de transferencia de ácido glutámico (ARNt-Glu). Al observar los amplificados generados a partir de esta PCR demostró que no todas las cepas de campo analizadas compartían el mismo tamaño de amplificado con la cepa Oliveri ([fig. 1](#)): de las 30 cepas analizadas solo 5 presentaban el mismo tamaño de amplificado, mientras que las 25 restantes presentaron un tamaño de amplificado mayor,

Tabla 1 Cebadores empleados para el análisis de las deleciones e inserciones observadas en la cepa *Brucella canis* str. Oliveri

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tamaño productos de PCR <i>in silico</i>	
		<i>B. canis</i>	Otras especies de <i>Brucella</i>
BR0510	F: GTTCGGTAGTGCCGCTTTTC R: TCTCGGCGATTCCGGAAGCC	498 pb	856 pb
BR0725	F: AGCAGTTCACCGAGCTTAAG R: TCTATGCGAAGCCCGAGCTT	491 pb	788 pb
BR1846	F: GCAATTTTGCGCAGCTATTA R: GTGAAAATAGGCAAGTTATT	871 pb	<i>B. abortus</i> : 556 pb <i>B. ceti</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. ovis</i> : 429-493 pb <i>B. microti</i> : 1.060 pb <i>B. suis</i> : 682 pb
BR0485	F: CCCCAAAAAAGCCGCAACTA R: CGCGCTCCCCATAGCATTG	286 pb	<i>B. suis</i> , <i>B. pinnipedialis</i> , <i>B. ceti</i> : 226 pb <i>B. abortus</i> : 166 pb <i>B. melitensis</i> , <i>B. ovis</i> : no amplifica
ARNt-Glu	F: ATAGACGGAAACACAGCAGGCT R: TTGCAGACTTGCTTACAGACATGC	296 pb	<i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. canis</i> : 514 pb <i>B. ceti</i> , <i>B. ovis</i> : 292 pb

Tabla 2 Genes usados como marcadores de especie

Genes <i>housekeeping</i>	Función	Bibliografía
<i>glk</i>	Glucocinasa	
<i>trpE</i>	Antranilato sintasa	
<i>cobQ</i>	Ácido cobirínico sintasa	
<i>aroA</i>	3-fosfo-shikimato-1-carboxivinil transferasa	Kim et al. ¹⁸ , Tiller et al. ⁴³
<i>dnaK</i>	Chaperona	y Valdezate et al. ⁴⁵
<i>gap</i>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	
<i>gyrB</i>	ADN girasa subunidad β	
<i>rpoB</i>	Subunidad β de ARN polimerasa	
Proteínas	Función	Bibliografía
<i>omp2a</i> , <i>omp2b</i> , <i>omp25</i> , <i>omp31</i>	Proteínas de membrana implicadas en la virulencia de la bacteria	Ortega et al. ³⁴ , Paulsen et al. ³⁷ y Wattiau et al. ⁵⁰

similar al reportado en las demás cepas de *B. canis* y en las otras especies de *Brucella* analizadas.

Inserciones

Se evaluó primero la inserción (BR1846) de 189 pb con respecto a *B. suis*, relacionada con un antirrepresor de profagos y compartida entre la cepa de *B. canis* str. Oliveri y todas las cepas de campo estudiadas, con un amplificado de 871 pb, que difirió del de las especies *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* (556, 430 y 682 pb, respectivamente).

Una segunda inserción presente en todas las cepas de *B. canis* (denominada BR0485) conforma una proteína hipotética; esta inserción genera una diferencia de 60 pb al comparar con *B. suis* y con *B. melitensis*, especie que no presentó amplificado en el ensayo realizado *in silico*

previamente. Sin embargo, cuando se comparó con las cepas vacunales de *B. abortus*, se observó una diferencia de 120 pb a favor de *B. canis*.

Variabilidad interespecie

Con el propósito de diferenciar las especies a partir de las características halladas en la secuenciación de los productos amplificados (inserciones y deleciones), se realizaron árboles filogenéticos luego de efectuar el alineamiento de las cepas. De los árboles generados se presenta el árbol dado a partir del alineamiento del gen BR1846, un árbol sin raíz generado por el método de *neighbor joining* con el modelo de sustitución de Jukes y Cantor y 1.000 réplicas de *bootstrap*, que muestra diferenciación en clados de cada una de las especies analizadas, pero a la vez demuestra la cercanía entre *B. canis* y *B. suis*^{48,52}, y la alta similitud entre las

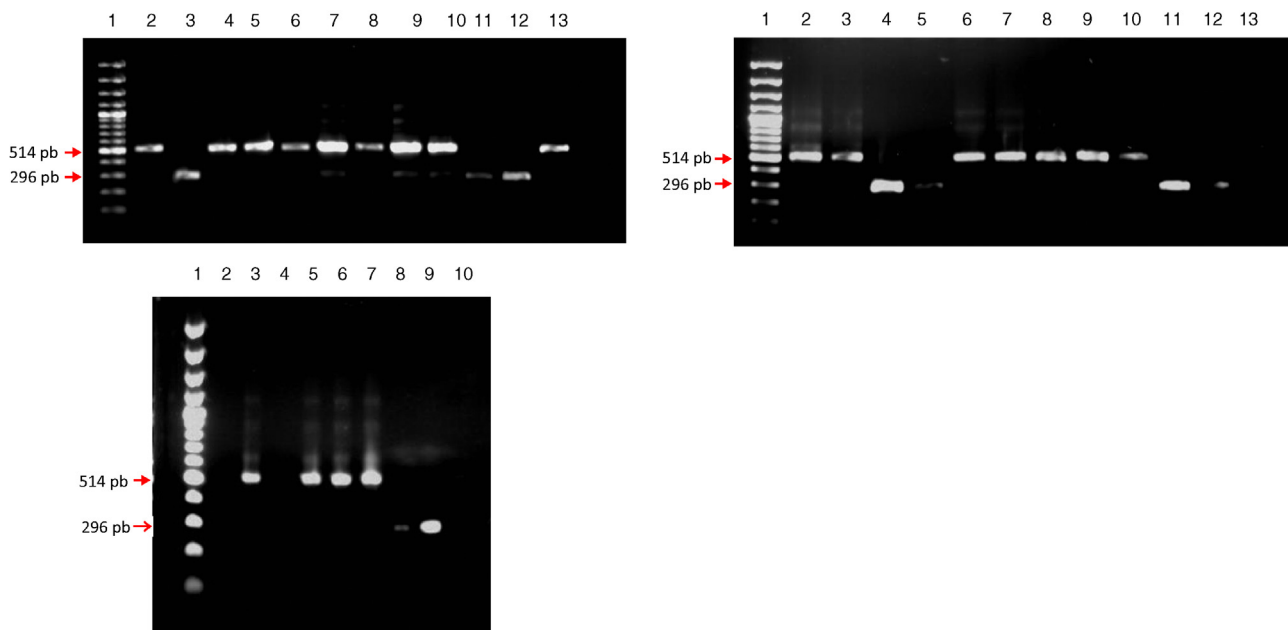


Figura 1 Amplificación por PCR de ARNt-GLU, visualizado en gel de agarosa al 1%. A. Calle 1) Marcador de peso molecular 100 bp; calle 2) cepa 1; calle 3) cepa 2; calle 4) cepa 3; calle 5) cepa 4; calle 6) cepa 5; calle 7) cepa 6; calle 8) cepa 7; calle 9) cepa 8; calle 10) cepa 9; calle 11) cepa 10; calle 12) cepa 11; calle 13) control negativo. B. Calle 1) Marcador de peso molecular; calle 2) cepa 12; calle 3) cepa 13; calle 4) cepa 14; calle 5) cepa 14; calle 6) cepa 16; calle 7) cepa 17; calle 8) cepa 18; calle 9) cepa 19; calle 10) cepa vacunal S19; calle 11) control positivo; calle 13) control negativo; calle 14) *B. canis* str. Oliveri. C. calle 1) Marcador de peso molecular; calle 3) cepa vacunal RB51. Calle 5) *B. melitensis* 16M; calle 6) *B. suis* 1330; calle 7) *B. suis* bv1; calle 9) control positivo; calle 10) control negativo.

cepas de campo de *B. canis* y la cepa Oliveri previamente secuenciada (fig. 2).

Análisis filogenético a partir de genes *housekeeping*

Cuando se realizó la comparación entre los genes *housekeeping* reportados para *Brucella* spp., se observó que de las 24 cepas de *Brucella*, incluyendo la Oliveri, con *Ochrobactrum anthropi* como grupo externo, 1.053 sitios informativos fueron encontrados por parsimonia; de estos, 467 eran informativos solo entre las diferentes especies de *Brucella*.

De los métodos de análisis, el que presentó una mejor topología y soporte de rama fue el corrido con *neighbor-joining* con Tamura-Nei 93 (TN93) y un *bootstrap* de 10.000 (fig. 3).

Reloj molecular y tasas relativas de Tajima

La distancia genética entre las cepas de *B. canis* ATCC 23365 y la cepa HSK A52141 fue igual a 0; las cepas ATCC 23365 y Oliveri también presentaron una divergencia simultánea ($p > 0,05$).

Discusión

En el presente estudio se encontró que las cepas de campo de *B. canis* estudiadas, todas ellas aisladas de muestras clínicas obtenidas en la región de Antioquia (Colombia), comparten con *B. canis* str. Oliveri 4 de los 5 indels analizados, lo que se relaciona con algunas ventajas para la bacteria desde

el punto de vista de la transferencia horizontal de genes⁴⁹ (resistencia en el ambiente y pobre respuesta inmune^{15,40}) y con algunas desventajas, entre ellas, una mayor sensibilidad a medicamentos (como los aminoglucósidos^{24,27}), e implicaciones desde el punto de vista de la patogenicidad y la sobrevivencia intracelular^{6,15,20}.

Dentro de las inserciones compartidas se observó una vinculada con un antirrepresor de profagos relacionado con la transferencia horizontal de genes, algunos de los cuales codifican el sistema de secreción tipo IV y los lipopolisacáridos. Particularmente, en este estudio se observó una variabilidad interespecie (fig. 2), lo que evidenciaría su empleo como marcador de especie. Asimismo, la presencia de esta inserción podría facilitar la interacción de *B. canis* con otras especies bacterianas y favorecer así el desarrollo intracelular y la transferencia de genes, algunos posiblemente relacionados con la virulencia⁴⁹.

Otra inserción compartida entre las cepas de campo estudiadas y *B. canis* str. Oliveri corresponde a una proteína hipotética, dado que en la actualidad no tiene una función definida. Sin embargo, empleando el servidor Phyre 2 se realizó una predicción de la estructura y la función de esta proteína y se encontró a nivel estructural un 59% de hélices alfa y un 6% de láminas beta. Algunos estudios refieren que este tipo de proteínas podrían participar como proteínas de unión a ADN¹; de igual manera, cuando se realizó la predicción en cuanto a su función, se encontraron diferentes dominios relacionados con proteínas de unión a ADN en otros organismos. Sería importante analizar el papel que cumple esta proteína dentro de la sobrevivencia de la bacteria en el hospedero.

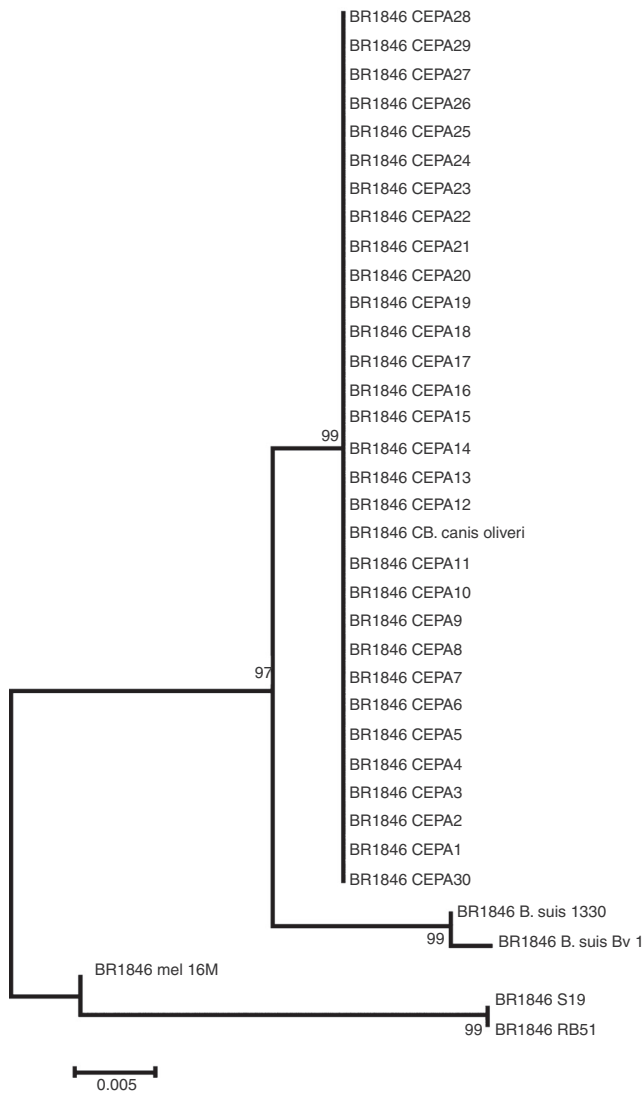


Figura 2 Árbol generado a partir del gen BR1846, incluyendo 34 secuencias de 4 especies. El árbol se construyó utilizando el método de distancia de *neighbor-joining*, con el modelo de sustitución de Jukes y Cantor y un soporte de rama de 10.000 réplicas.

En relación con las deleciones, se observó que 2 de ellas (BR0510 y BR0725) son compartidas entre todas las cepas de campo analizadas.

Una de las deleciones corresponde a una epimerasa a la cual se le han atribuido características funcionales en la biosíntesis de hidratos de carbono de superficie, del antígeno O y del core del lipopolisacárido⁷, relacionándose con las características fenotípicas de las colonias rugosas observadas en todas las cepas de campo analizadas^{32,53}. Además, se ha reportado que puede generar variaciones desde el punto de vista de la antigenicidad, debido a que el antígeno O es un factor importante en la patogenicidad de *Brucella* en el humano, siendo una posible explicación de su menor virulencia comparada con las especies de *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis*^{15,40}; de ahí que a nivel mundial se cuente con una menor cantidad de reportes de brucelosis canina en humanos^{6,10,21,24,33}.

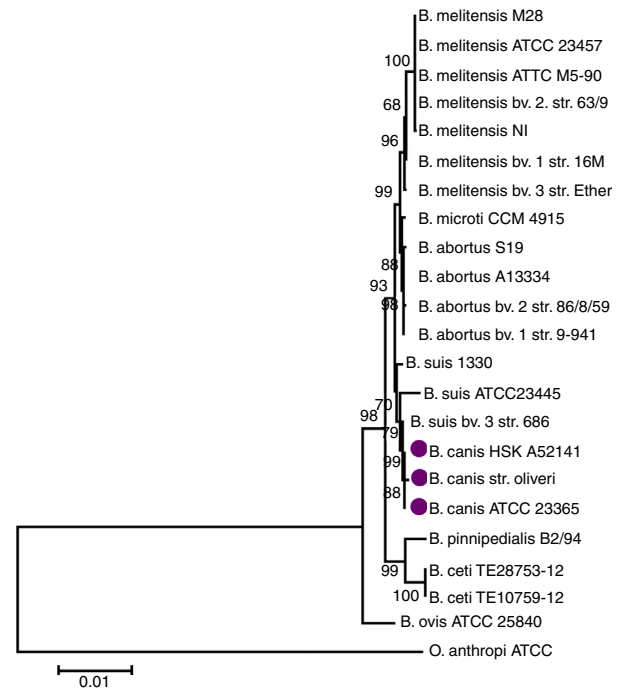


Figura 3 Árbol enraizado del género *Brucella*, incluyendo 23 secuencias de 9 especies. El árbol se construyó utilizando el método de distancia de *neighbor-joining*, con el modelo de sustitución de Tamura-Nei y un soporte de rama de 10.000 réplicas, utilizando la especie *Ochrobactrum anthropi* como *outgroup*.

Asimismo, otra segunda deleción encontrada en las cepas de campo estudiadas y compartida con *B. canis* str. Oliveri se ubicó en el gen que codifica una N-acetiltransferasa, la cual forma parte de una superfamilia de proteínas encargadas de impedir la acción de los aminoglucósidos^{26,28,39,44}, antibióticos empleados en el tratamiento de la brucelosis tanto en humanos como en animales^{11,12,26}. Los resultados observados en este estudio podrían indicar que esta deleción haría a las cepas de *B. canis* más sensibles al tratamiento con estos antibióticos^{3,25,30}. Además, esta superfamilia se encuentra relacionada con la regulación de la transcripción, la traducción de señales⁸, el metabolismo, la respuesta al estrés y la degradación proteica⁴⁶, lo que las torna de gran importancia y valor biológico; de ahí que esta deleción, además de indicar una posible sensibilidad antibiótica, podría generar otro tipo de reacciones desfavorables en la bacteria, como una menor tolerancia al estrés, o posibles alteraciones en su actividad enzimática²³.

La última deleción analizada, de 218 pb, fue descrita en estudios previos como exclusiva de la cepa Oliveri⁴¹ y se relaciona con un ARNt-Glu⁴¹, específico para transportar este ácido hacia el ribosoma en preparación para la síntesis de proteínas. Actúa en primer lugar como activador enzimático y luego como sustrato en el proceso de aminoacilación⁴². Se ha reportado que algunos ARNt tienen un rol importante en algunas rutas metabólicas, como es el caso del ARNt-Glu, empleado por plantas, arqueas y bacterias para la síntesis de tetrapirroles, como la clorofila, la vitamina B₁₂ y las hemoproteínas presentes en organismos fotosintéticos e involucradas tanto en la fotosíntesis como en la respiración.

Algunos investigadores han reportado este tipo de proteínas en algunas bacterias quimiotrópicas, como es el caso de *B. abortus* y *B. melitensis*³¹. Se ha descrito que en bacterias no fotosintéticas, la absorción de la energía lumínica mediante moléculas fotosensibilizadoras, como tetrapirroles, puede generar efectos deletéreos en ácidos nucleicos y proteínas a través de la liberación de especies reactivas del oxígeno, que son tóxicas para la célula y llevan a su muerte¹³. En *B. abortus* se han descrito proteínas sensoras de luz (fotorreceptores) que les permiten desarrollar una respuesta adaptativa a este factor de estrés, haciendo que absorban la luz a través de cromóforos y, de esta forma, resisten tanto el daño fotooxidativo como el del ADN por la presencia de tetrapirroles^{13,20,51}.

De las 30 cepas de campo estudiadas, solo 5 presentaron esta delección, lo que evidencia una relación con *B. canis* str. Oliveri (fig. 1). Es posible que las que poseen el ARNt-Glu presenten una mayor sobrevida no solo en el medio ambiente, sino en el interior de macrófagos, como se ha reportado en otras especies, entre ellas, *B. abortus*^{13,20,51}. Se requiere el desarrollo de estudios complementarios sobre la expresión de los genes LOV en las cepas de campo de *B. canis* ARNt glu estudiadas y comparar si la presencia de ARNt-Glu y de dominios LOV estimula no solo la sobrevida en el medio ambiente, sino también la virulencia de la bacteria en términos de sobrevida intracelular.

Los análisis filogenéticos realizados (fig. 3), incluyendo *O. anthropi* como grupo externo, arrojaron algunos resultados acordes con las filogenias reportadas por otros autores, las que sitúan a *B. ovis* como el primer linaje en dividirse del resto de las especies de *Brucella* y la reconocen como la especie basal^{14,16}.

En consonancia con lo ya reportado, *B. suis* es la especie que presenta una mayor diversidad genética en las cepas estudiadas¹⁶; la cepa 1330 es la primera en divergir, seguida por *B. suis* ATCC 23445, que presenta la rama más distante, mientras que *B. suis* bv. 3 se halla más cercana a las cepas de *B. canis*, formando parte de este mismo clado, con una menor divergencia¹⁶.

B. abortus y *B. melitensis* se ubican como especies hermanas, cada una de ellas monofilética. *Brucella microti* aparece más cercana al clado de *B. abortus*, en contraposición con lo reportado por Audic et al.⁵, quienes demuestran una mayor cercanía de esta especie a *O. anthropi*⁴. Dentro del clado formado por *B. abortus* se observa una diversidad genética mínima entre las cepas, mientras que las cepas de *B. melitensis* presentan una divergencia mayor; se corrobora de este modo lo ya reportado por Foster et al.¹⁶. Las cepas acuáticas *Brucella pinnipedialis* y *Brucella ceti* se encuentran formando parte del mismo clado y separadas de las cepas terrestres, de manera similar a lo reportado por Audic et al.⁴, quienes emplearon genes ortólogos.

Dentro de las cepas de *B. canis* se presentó una distancia genética entre las cepas ATCC 23365 y la cepa HSK A52141 igual a 0; además, a partir del test de tasas relativas de Tajima, las cepas ATCC 23365 y Oliveri aparecen con una divergencia simultánea ($p > 0,05$), lo que indica que las 2 secuencias evolucionaron al mismo ritmo desde que se separaron de su ancestro común más reciente²⁷. A partir de estos resultados, y luego del rechazo de la prueba de hipótesis de reloj molecular, se puede afirmar que la tasa

de evolución entre todas las ramas del árbol generado a partir de las especies de *Brucella* no es la misma, y solo se pueden corroborar relojes locales entre algunas especies, como *B. suis* y *B. canis*.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que en la región de Antioquia (Colombia) se encuentran circulando otras cepas de *B. canis*, aparte de la mencionada *B. canis* str. Oliveri. En adición a esto, la variabilidad interespecie presentada a partir de la inserción BR1846 podría servir como marcador entre las especies de este género bacteriano. Asimismo, este estudio permite confirmar que todas las cepas de *B. canis* divergieron a partir de *B. suis*.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

El presente trabajo fue financiado por el proyecto CODI 2014-750.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en peligro la validez de los resultados presentados.

Agradecimientos

Los autores quieren manifestar sus agradecimientos a la Universidad de Antioquia.

Bibliografía

1. Acosta-Viana KY, Zavala-Castro JE. Proteínas de unión a DNA. *Rev Biomed.* 1996;7:163–72.
2. Ardoino S, Baruta D, Toso R. Brucelosis canina. *Cien Vet.* 2006;8:50–61.
3. Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, Colmenero JD, Corbel MJ, Falagas ME, Memish ZA, Roushan MR, Rubinstein E, Sipsas NV. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: The Ioannina recommendations. *PLoS Med.* 2007;4:e317.
4. Audic S, Lescot M, Claverie JM, Cloeckeaert A, Zygmunt MS. The genome sequence of *Brucella pinnipedialis* B2/94 sheds light on the evolutionary history of the genus *Brucella*. *BMC Evol Biol.* 2011;11:200.
5. Audic S, Lescot M, Claverie J-M, Scholz HC. *Brucella microti*: The genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics.* 2009;10:352.

6. Breve I. Endocarditis por *Brucella canis*: primer caso documentado en un paciente adulto en Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2013;45:50–3.
7. Canals R, Jiménez N, Vilches S, Regué M, Merino S, Tomás JM. Role of Gne and GalE in the virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O34. *J Bacteriol.* 2007;189:540–50.
8. Cao W, Bao C, Padalko E, Lowenstein CJ. Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling. *J Exp Med.* 2008;205:1491–503.
9. Castrillón-Salazar L, Giraldo-Echeverri CA, Sánchez-Jiménez MM, Olivera-Angel M. Factors associated with *Brucella canis* seropositivity in kennels of two regions of Antioquia, Colombia. *Cad Saude Publica.* 2013;29:1955–73.
10. Dentinger CM, Jacob K, Lee LV, Mendez HA, Chotikanatis K, McDonough PL, Chico DM, De BK, Tiller R, Traxler R, Campagnolo ER, Schmitt D, Guerra MA, Slavinski SA. Human *Brucella canis* infection and subsequent laboratory exposures associated with a puppy, New York City, 2012. *Zoonoses Public Health.* 2015;62:407–14.
11. Deshmukh A, Hagen F, Al Sharabasi O, Abraham M, Wilson G, Doiphode S, Al Maslamani M, Meis JF. *In vitro* antimicrobial susceptibility testing of human *Brucella melitensis* isolates from Qatar between 2014–2015. *BMC Microbiol.* 2015;15:121.
12. Dieste-Pérez L, Fraile L, de Miguel M, Barberán M, Blasco J, Muñoz P. Studies on a suitable antibiotic therapy for treating swine brucellosis. *J Vet Pharmacol Ther.* 2015;38:357–64.
13. Elías-Arnanz M, Padmanabhan S, Murillo FJ. Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14:128–35.
14. Ficht T. *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiol.* 2010;5:859–66.
15. Foster JT, Beckstrom-Sternberg SM, Pearson T, Beckstrom-Sternberg JS, Chain PS, Roberto FF, Hnath J, Brettin T, Keim P. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. *J Bacteriol.* 2009;191:2864–70.
16. Giraldo Echeverri CA, Ruiz Cortés ZT, Olivera Ángel M. *Brucella canis* en Medellín (Colombia), un problema actual. *Rev UDCA Actual Divulg Cient.* 2009;12.
17. Jiménez de Bagüés MP, Terraza A, Gross A, Dornand J. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: Relationship to virulence. *Infect Immun.* 2004;72:2429–33.
18. Kim SG, Kim YH, Chae MJ, Kim JW, Lee YJ. Real-time PCR assay based glyceraldehydes 3-phosphate gene for identification of *Brucella* sp. *J Anim Vet Adv.* 2010;9:2315–20.
19. López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Barquero-Calvo E, Guzmán-Verrí C, Albert D, Garin-Bastuji B. New Bruce ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet Microbiol.* 2011;154:152–5.
20. Losi A, Gärtner W. Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors. *Photochem Photobiol Sci.* 2008;7:1168–78.
21. Lucero N, Corazza R, Almuzara M, Reynes E, Escobar G, Boeri E, Ayala S. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. *Epidemiol Infect.* 2010;138:280–5.
22. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Jacob N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol.* 2005;54:457–61.
23. Ma Q, Wood TK. Protein acetylation in prokaryotes increases stress resistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;410:846–51.
24. Marzetti S, Carranza C, Roncallo M, Escobar GI, Lucero NE. Recent trends in human *Brucella canis* infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013;36:55–61.
25. Mateu-de-Antonio E, Martín M. *In vitro* efficacy of several antimicrobial combinations against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs. *Vet Microbiol.* 1995;45:1–10.
26. Maurin M, Raoult D. Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2977–86.
27. Milstein U. Estudio de la velocidad de evolución molecular en tripanosomátidos [tesis de grado]. Uruguay: Universidad de la República; 2013.
28. Miró E, Grünbaum F, Gómez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist.* 2013;19:94–9.
29. Moreno E, Cloeckaert A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol.* 2002;90:209–27.
30. Morley S, Eccleston C, Williams A. Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of cognitive behaviour therapy and behaviour therapy for chronic pain in adults, excluding headache. *Pain.* 1999;80:1–13.
31. Moser J, Schubert WD, Beier V, Bringemeier I, Jahn D, Heinz DW. V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO J.* 2001;20:6583–90.
32. Nielsen K, Yu W. Serological diagnosis of brucellosis. *Prilozi.* 2010;31:65–89.
33. Olivera M, Di-Lorenzo C. Aislamiento de *Brucella canis* en un humano conviviente con caninos infectados. Informe de un caso. *Colomb Med.* 2009;40:218–20.
34. Ortega M, Valdezate S, Sáez-Nieto JA. Diversidad genética de *Brucella* en España. *SEM@foro.* 2013;55:38–44 [On-line; consultado 7 Sep 2015]. Disponible en: https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/55/14_Brucella.55.pdf https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/55/14_Brucella.55.pdf
35. Ortiz LF, Muskus C, Sánchez MM, Olivera M. Identification of *Brucella canis* Group 2 in Colombian kennels. *Rev Colom Cienc Pecua.* 2012;25:615–9.
36. Pardo A, Pérez C, Góngora A, Gómez L, Moreno A. Encuesta exploratoria de infección por *Brucella canis* en perros de Villavicencio-Colombia. *Revista MVZ Cordoba.* 2009;14:1690–6.
37. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:13148–53.
38. Posada D, Crandall KA. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14:817–8.
39. Rather P, Munayyer H, Mann P, Hare R, Miller G, Shaw K. Genetic analysis of bacterial acetyltransferases: Identification of amino acids determining the specificities of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase Ib and IIa proteins. *J Bacteriol.* 1992;174:3196–203.
40. Rittig MG, Kaufmann A, Robins A, Shaw B, Sprenger H, Gemsa D, Foulongne V, Rouot B, Dornand J. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 2003;74:1045–55.
41. Sánchez-Jiménez MM, Isaza JP, Alzate JF, Olivera-Angel M. Comparison of *Brucella canis* genomes isolated from different countries shows multiple variable regions. *Genomics.* 2015;106:43–51.
42. Sekine S, Shichiri M, Bernier S, Chênevert R, Lapointe J, Yokoyama S. Structural bases of transfer RNA-dependent amino acid recognition and activation by glutamyl-tRNA synthetase. *Structure.* 2006;14:1791–9.
43. Tiller RV, Gee JE, Frace MA, Taylor TK, Setubal JC, Hoffmaster AR, De BK. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:5837–45.

44. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:430–50.
45. Valdezate S, Navarro A, Villalón P, Carrasco G, Saéz-Nieto JA. Epidemiological and phylogenetic analysis of Spanish human *Brucella melitensis* strains by multiple-locus variable-number tandem-repeat typing, hypervariable octameric oligonucleotide fingerprinting, and *rpoB* typing. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2734–40.
46. Van Noort V, Seebacher J, Bader S, Mohammed S, Vonkova I, Betts MJ, Kühner S, Kumar R, Maier T, O’Flaherty M. Cross-talk between phosphorylation and lysine acetylation in a genome-reduced bacterium. *Mol Syst Biol.* 2012;8:571.
47. Wallach JC, Giambartolomei GH, Baldi PC, Fossati CA. Human infection with M-strain of *Brucella canis*. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:146–8.
48. Wattam AR, Foster JT, Mane SP, Beckstrom-Sternberg SM, Beckstrom-Sternberg JM, Dickerman AW, Keim P, Pearson T, Shukla M, Ward DV. Comparative phylogenomics and evolution of the *Brucellae* reveal a path to virulence. *J Bacteriol.* 2014;196:920–30.
49. Wattam AR, Williams KP, Snyder EE, Almeida NF, Shukla M, Dickerman A, Crasta O, Kenyon R, Lu J, Shallom J. Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *J Bacteriol.* 2009;191:3569–79.
50. Wattiau P, Whatmore AM, van Hessche M, Godfroid J, Fretin D. Nucleotide polymorphism-based single-tube test for robust molecular identification of all currently described *Brucella* species. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:6674–9.
51. West AH, Stock AM. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci.* 2001;26:369–76.
52. Zhong Z, Wang Y, Xu J, Chen Y, Ke Y, Zhou X, Yuan X, Zhou D, Yang Y, Yang R. Parallel gene loss and acquisition among strains of different *Brucella* species and biovars. *J Microbiol.* 2012;50:567–74.
53. Zygmunt MS, Blasco JM, Letesson JJ, Cloeckeaert A, Moriyón I. DNA polymorphism analysis of *Brucella* lipopolysaccharide genes reveals marked differences in O-polysaccharide biosynthetic genes between smooth and rough *Brucella* species and novel species-specific markers. *BMC Microbiol.* 2009;9:92.