



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella spp.*”**

Realizado por:

KARINA ALEXANDRA PARRA HARO

Director del proyecto:

JUAN CARLOS NAVARRO CASTRO, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 30 de septiembre de 2021

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, KARINA ALEXANDRA PARRA HARO, con cédula de identidad # 172258086-5, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

172258086-5

**INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella spp.***

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella spp.*”**

Realizado por:

KARINA ALEXANDRA PARRA HARO

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

JUAN CARLOS NAVARRO

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Navarro', with a horizontal line underneath.

FIRMA

**INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.**

PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

LINO ARISQUETA HERRANZ

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 30 de septiembre de 2021

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

El presente Trabajo de Fin de Carrera ha sido realizado dentro del Programa de investigación de la Universidad Internacional SEK denominado:

Salud Global

y bajo el proyecto de investigación aprobado por la dirección de investigación, titulado:

PROYECTO P011617-2

Ecoepidemiología *in silico* de enfermedades emergentes.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

DEDICATORIA

A los hombres y mujeres de ciencia, quienes a través de la investigación labran el camino para el desarrollo sostenible de la sociedad, el medio ambiente y las especies que habitan en el mundo.

A las personas que han pasado mucho tiempo buscando su rumbo, sigan soñando. En el camino encontrarán gente que impulsará e inspirará su potencial. El tiempo no es limitante, nunca es demasiado tarde.

A mi mamá, Marcia, quien me enseñó que el compromiso y el amor con la familia y amigos también es necesario. Por creer en mí y darme la oportunidad de escoger mi dirección.

A mi abue, María Fabiola. Por ser mi ancla cuando sentí que iba a naufragar. Sin duda, su vida me ha inspirado para convertirme en una profesional que buscará el camino de la generosidad y el bien común.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Internacional SEK quienes me abrieron sus puertas para continuar mi formación. A mis maestros, de los cuales he aprendido más allá de lo académico.

Al Instituto de investigación en Zoonosis-CIZ por acogerme y compartir conmigo herramientas y conocimiento para la realización de esta investigación.

A mis tutores; Juan Carlos Navarro y Elizabeth Minda, porque me ilusionaron y me dieron la oportunidad de participar en este proyecto. Espero tener su misma chispa y curiosidad para seguir investigando. Toda mi admiración siempre.

A mi familia, quienes me han visto crecer, por su apoyo y amor infinito. Por ser el lugar seguro al que siempre puedo regresar.

A mis muchachos; Gabriel, Aldo, Cris, Anita y César. Porque en medio de todas las vicisitudes, han sido risas, compañía y apoyo incondicional.

A mis chicos; Pablo y Leonardo. Quienes me han cuidado de la manera más especial; mientras me encontraba. Por sostenerme todo este tiempo y su completa fe en mi potencial.

A mis amigos, la familia que escogí; Stefi, Dome, Kate, Bryan, Kevin. De quienes he aprendido constancia, amor y resiliencia para caminar en la vida.

A mis mejores amigas, mis hermanas; Evi, Moni, Nadi y Eri. Quienes me han ayudado a mantener los pies sobre la tierra, con quienes he aprendido el valor del trabajo en la ciencia y el arte; en busca de un propósito. Porque su amistad me ha hecho crecer en todos los sentidos.

**INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.**

Para someter a:

To be submitted:

**INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.**

Karina Parra^{1,2}, Elizabeth Minda-Aluisa^{2*}, Maritza Celi², Juan Carlos Navarro^{3 *}

¹Facultad de Ingeniarías y Ciencias Aplicadas, Universidad Internacional SEK, Quito, Ecuador.

²Instituto de Investigación en Zoonosis - CIZ, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

³Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK, Quito, Ecuador.

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

Juan Carlos Navarro, juan.navarro@uisek.edu.ec

Universidad Internacional SEK,

Quito, Ecuador.

Título corto o running title: “Información filogenética de los genes *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b”

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Brucella* que pueden infectar a especies de animales silvestres o domésticas siendo de importancia a nivel mundial por el impacto económico de la enfermedad en las zonas pecuarias y las infecciones zoonóticas que se convierten en un problema de Salud Pública en países ganaderos y en vías de desarrollo. La enfermedad es endémica en el Ecuador sin embargo no se ha realizado un estudio de variabilidad genética de las especies circulantes mediante métodos filogenéticos moleculares, que complementando con la investigación sobre la prevalencia de *Brucella* puede proporcionar información importante para encontrar mecanismos para el diseño de estrategias de control de la enfermedad. El objetivo de la investigación fue analizar la información filogenética de tres marcadores moleculares (*bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b), e inferir patrones evolutivos para determinar su utilidad en la identificación del género y sus variedades, así como su epidemiología molecular, utilizando un banco de muestras animales y humanas almacenadas en el cepario del Instituto de Investigación en Zoonosis – CIZ de distintas provincias del Ecuador en los años 2008 al 2017. Se aplicó un diagnóstico molecular preeliminar por PCR Bruce-ladder descartando las muestras no conservadas. De un total de 65 muestras válidas 60 correspondían a *B. abortus* y cinco a *B. canis* en las que se aplicó una PCR para los genes *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b para luego secuenciar los amplicones. Las secuencias fueron alineadas en una matriz con la cual se realizó análisis filogenético por el software MEGA 10. Se construyeron árboles mediante optimización por Máxima Parsimonia con algoritmo de barridos de ramas para obtener islas de árboles con TBR (Tree Bisection and Reconnection) y remuestreos de matrices con 500 pseudoreplicas de Bootstrap, comparadas con secuencias recogidas de genBank (NCBI). Mediante las topologías se comprobó la capacidad del gen *bcs*p31 para el diagnóstico del género *Brucella* por su secuencia altamente conservada, el gen *omp*2b probablemente sufre una recombinación o alta variabilidad porque no se encontró una estructuración filogenética, mientras que su par *omp*2a presentó una estructuración filogenética con clados definidos y apoyados acorde con especies filogenéticas que presentan polimorfismos de nucleótidos importantes para establecer patrones evolutivos.

Palabras clave: brucelosis, *omp*2a, *omp*2b, *bcs*p31, filogenia, PCR, bioinformática, diagnóstico molecular.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcsp31*, *omp2a* y *omp2b* EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

ABSTRACT

Brucellosis is a disease caused by bacteria of the genus *Brucella* that can infect species of wild or domestic animals, being of worldwide importance due to the economic impact of the disease in livestock areas and zoonotic infections that become a public health problem in developing countries. The disease is endemic in Ecuador, however, a study of genetic variability of the circulating species has not been carried out by means of molecular phylogenetic methods, which complementing with the information on the prevalence of *Brucella* can provide important information to find mechanisms for the design of strategies of disease control. The objective of the research was to analyze the phylogenetic information of three molecular markers (*bcsp31*, *omp2a* and *omp2b*), and infer evolutionary patterns to determine their usefulness in the identification of the genus and its varieties as well as its molecular epidemiology, using a bank of animal samples and humans stored in the stock of the Zoonosis Research Institute - CIZ from different provinces of Ecuador in the years 2008 to 2017. A preliminary molecular diagnosis was applied by Bruce-ladder PCR, discarding the non-conserved samples. With a total of 65 valid samples, 60 corresponded to *B. abortus* and five to *B. canis* in which a PCR was applied for the *bcsp31*, *omp2a* and *omp2b* genes to then sequence the amplicons. The sequences were aligned in a matrix with which phylogenetic analysis was performed with the MEGA 10 software. Trees were built by optimization by Maximum Parsimony with Tree Bisection and Reconnection branch swapping (TBR) and matrix resampling with 500 Bootstrap pseudo-replicates and compared with sequences collected from genBank (NCBI). By means of the topologies, the useful of the *bcsp31* gene for the diagnosis of the genus *Brucella* was verified due to its highly conserved sequence, the *omp2b* gene probably undergoes recombination or presents high variability because a phylogenetic structuring was not found, while its *omp2a* pair presented a phylogenetic structuring with defined and supported clades according to phylogenetic species that present important nucleotide polymorphisms to establish evolutionary patterns.

Keywords: brucellosis, *omp2a*, *omp2b*, *bcsp31*, phylogeny, PCR, bioinformatics, molecular diagnosis.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad causada por una bacteria cocobacilo gram-negativa, etiológicamente *Brucella* spp. aerobio estricto, no móvil, no capsulado y no esporulado (Olsen and Palmer 2014). Miembro de la familia Brucellaceae, orden Rizobiales en la subdivisión α -2 de las Proteobacterias (Percin 2013). Infecta a un hospedero animal o humano introduciéndose en las células fagocíticas mononucleares (Elfaki, Alaidan, and Al-Hokail 2015; Georgios Pappas et al. 2005). Es la causa de abortos, orquitis e infertilidad en animales de granja, también influye en la morbilidad humana causando la llamada fiebre ondulante, artritis, espondilitis, endocarditis, osteomielitis y abscesos (Elfaki, Alaidan, and Al-Hokail 2015; de Figueiredo et al. 2015).

Descubierta por primera vez en 1887 por David Bruce, es causante de la brucelosis, enfermedad zoonótica emergente ampliamente distribuida en el mundo (Elfaki, Alaidan, and Al-Hokail 2015; Spickler 2018). Hasta ahora están descritas 13 especies, relacionadas habitualmente con el hospedero tanto en animales domésticos como en animales salvajes; se conoce a *B. melitensis* en ovejas, cabras y camellos, *B. abortus* en bovinos, búfalos, yak y camellos. *B. suis* en porcinos domésticos (biovar 1 y 3), caribú, reno (biovar 4) y jabalí (biovar 2), *B. ovis* en ovejas y venados, *B. canis* en perros *B. ceti* en cetáceos, *B. pinnipedialis* en pinnípedos (focas, lobos marinos), *B. neotomae* en rata del desierto, *B. microti* en topillo (roedor), *B. papionis* en babuinos, *B. vulpis* zorro rojo, las llamadas “atypical” *Brucella* sin hospedador establecido pero encontrada en ranas y *B. inopinata* aislado de un implante mamario infectado en una mujer (Elfaki, Alaidan, and Al-Hokail 2015; Pappas 2010; Spickler 2018; Wang et al. 2016; Whatmore et al. 2014; Guzmán-Verri et al. 2019).

Esta bacteria reside principalmente en el hígado, bazo, útero, corazón, el cerebro y la médula ósea (Mantur et al. 2006). La vía principal de transmisión es el contacto con membranas

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

mucosas o fluidos de animales infectados incluyendo sus derivados o puede a transferirse a través de objetos contaminados (fómites) (Amjadi et al. 2019; Georgios Pappas et al. 2005).

La diferencia de especies de *Brucella* está ligada a los patrones evolutivos de su hospedador y su entorno, sin embargo, la correlación está sujeta a cambios que ocasionan el salto del organismo de una orden de mamíferos a otra, como el caso de *B. melitensis* y *B. abortus* encontradas en humanos (Moreno 2014). Las personas en riesgo se relacionan con la exposición ocupacional; por trabajo directo con animales de granja, empacadoras de carne y derivados, personal que trabaja en camales, el personal de laboratorio que trabaja con la bacteria, así como las personas que consumen productos lácteos no pasteurizados como la leche y el queso blando (CDC 2012; ECDC 2016).

Ya que afecta a animales domésticos y humanos es considerada un problema de salud pública por la OMS, OIE y FAO (Moreno, Cloeckert, and Moriyón 2002; WHO 2020), ocasionando el declive de ingresos económicos por la pérdida de cabezas de ganado y el rechazo de derivados presuntamente contaminados, afectando las inversiones económicas del sector pecuario en los países en vías de desarrollo (Amro et al. 2021; Spickler 2018). Es endémica en varias áreas geográficas, de mayor incidencia donde no se han implementado o carecen de programas efectivos de salud pública y sanidad animal (CDC 2012; Zinsstag et al. 2007) que conlleva a un escaso seguimiento y estudio de la enfermedad ocasionando un inadecuado control de contagios, estimando que la tasa puede ser 25 veces mayor de la que se encuentra declarada, por falta de notificación o un mal diagnóstico (Poulsen et al. 2014). El problema es agravado por la comercialización de productos alimenticios en mercados informales, ya que las normas adecuadas de salud y su cumplimiento son evadidas antes de llegar al consumidor (Franc et al. 2018).

La brucelosis en humanos es producida en mayor proporción por *B. melitensis* en el continente Europeo y *B. abortus* en el continente Americano, no ha sido erradicada por lo contrario

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

se encuentra reemergiendo y modificando su endemismo en los últimos años (G. Pappas et al. 2006). El Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades reportó 346 casos de brucelosis en humanos dentro de la Unión Europea entre el 2010 al 2014. En el Medio Oriente, del 2014 al 2017, aumentó en zonas rurales vinculada con condiciones socioeconómicas bajas como Yemen, Irán y Siria, sin embargo alrededor del 40% no se reportaron, debido a los altos costos de laboratorio y tratamiento de la enfermedad (Nejad et al. 2020).

En América Latina y México *B. abortus* representa al 61% de casos, estimando las pérdidas anuales en 600 millones de dólares (Acha and Szyfres 2005; Román-Cárdenas and Luna-Herrera 2017). En el Ecuador, se conocieron un total de 45 casos la brucelosis humana durante el año 2019, a causa de la especie *B. abortus* biotipo 1 y 4 (Ministerio de Salud Pública del Ecuador 2020; Ron et al. 2013).

Dentro del ganado hubo casos de brucelosis por *B. abortus* tipo 1, en provincias con mayor producción pecuaria como: Pichincha (2.207), Carchi (993), Cotopaxi (585), Manabí (588) y Loja (6.916) (Rodríguez-Hidalgo et al. 2015; Román-Cárdenas and Luna-Herrera 2017). Ocasionando pérdidas económicas de hasta 493.70 USD por cabeza de ganado y 110.19 UDS por hacienda (Escobar 2011) incidiendo en la inversión en asistencia técnica, alimentación y sanidad (Alvear et al. 2018).

La atención frente a la brucelosis requiere pruebas de diagnóstico confiables, para determinar la especie y biovars que causan la enfermedad, el cultivo y aislamiento bacteriano son indicadas por la OMS y OIE como *gold estándar* (Spickler 2018), no obstante, la bacteria del género *Brucella* es de crecimiento lento, por lo que la recuperación del microorganismo es baja (Percin 2013; Spickler 2018). En consecuencia, se han diseñado pruebas moleculares como la

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para identificar y genotipificar a *Brucella* spp.. en conjunto con la reducción de costes y tiempo de diagnóstico (Kumar et al. 2019).

Se usan amplicaciones convencionales, como el caso de *IS*711 (Clavareau et al. 1998) que identifica una secuencia de inserción a lo largo del genoma de *Brucella*, única en el género bacteriano (B. J. Bricker and Halling 1994), por lo que se ha utilizado como principal diana para su identificación, sin embargo esta no aporta información sobre especies o biovariedades, por lo cual se opta por PCR tipo multiplex como el AMOS-PCR (Betsy J Bricker et al. 2003) para identificar *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis*. Aunque proporciona más información, se encuentra limitada pues no identifica a todo el género bacteriano, por lo que una de las alternativas es otra PCR multiplex denominada Bruce-ladder (García-Yoldi et al. 2006; Ignacio López-Goñi et al. 2011), donde se incluye la identificación de 6 especies terrestres y las dos especies marinas de *Brucella* además de cepas vacunales S19, RB51 y Rev. 1.

Uno de los genes objetivo que se ha utilizado en mayor proporción para la identificación específica del género *Brucella* ha sido la proteína de superficie celular *bcps*31; un gen ubicado en el cromosoma I que codifica una proteínas de 329 aminoácidos (Imaoka et al. 2007). Otros genes diana se utilizan para identificación de género y especie son las proteínas de membrana externa (*omp*), *omp*2b, *omp*2a y *omp*25/31 (Axel Cloeckert et al. 1996; Ficht et al. 1989), *16SrRNA* entre otros (Kumar et al. 2019; Yu and Nielsen 2010).

De manera particular *omp*2a-b y *bcs*p31 son genes que codifican proteínas componentes importantes de la membrana externa de *Brucella* y son altamente inmunogénicas que desencadenan una respuesta de inmunidad humoral y celular en el huésped (Imtiaz et al., 2018; Kim et al., 2017) que fueron estudiadas en un principio por la necesidad para el desarrollo de vacunas y el

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

diagnóstico de la enfermedad, sin embargo, se ha podido recabar información importante para la tipificación molecular de las especies y algunas biovariedades (Axel Cloeckaert et al. 1996).

En el locus *omp*2 se codifica una de las proteínas de superficie más importantes, *omp* de 36 kDa desde *B. abortus* por primera vez, se compone de dos genes orientados en direcciones opuestas que se relacionan entre sí *omp*2a y *omp*2b, se encuentran separados por 900 bp, donde *omp*2b fue el único en expresarse, al menos en *B. abortus* (Ficht et al. 1989). Son genes altamente homólogos los cuales varían en sustituciones de nucleótidos, pequeñas inserciones y deleciones (Ficht et al. 1996) a partir de esta premisa en estudios posteriores se encontró que las especies de *Brucella* tienen una copia de *omp*2a y *omp*2b, en contraste con *B. ovis* donde se encontró dos copias de *omp*2a y ninguna de *omp*2b (Smith and Ficht 1990). El análisis de algunos de estos genes ha generado similares relaciones evolutivas comparadas con la filogenia de un genoma completo, como el trabajo propuesto por Tanaka et al. (1997) que apoyó la división del género en la especies clásicas (Tanaka et al. 1977).

Determinar la variabilidad genética, ayudará a develar la situación de la enfermedad en sitios denominados ganaderos dentro de ciertas zonas geográficas en el país, esta enfermedad zoonótica ha creado consecuencias de importancia epidemiológica para el manejo y el impacto en la salud pública. Nuestro objetivo fue analizar la información filogenética de tres marcadores moleculares (*bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b), inferir los patrones evolutivos de cada gen y determinar su utilidad en la identificación del género, especies y variedades a partir de muestras animales y humanas obtenidas de distintas provincias del Ecuador en los años 2008 al 2017 almacenadas en el cepario del Instituto de Investigación en Zoonosis - CIZ.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se utilizaron muestras de ADN bacteriano obtenidas de hospedadores animales y humanos entre los años 2008 al 2017 del banco de muestras del Instituto de Zoonosis-CIZ de la Universidad Central del Ecuador. Un total de 74 muestras obtenidas de bovinos, caninos y humanos, de las provincias del Carchi, Imbabura, Santo Domingo de los Tsáchilas, Pichincha y Guayas, a partir de un grupo almacenado a -20°C en ultracongelación, y en el otro mediante una extracción de ADN a partir de suspensiones de 2 - 3 colonias bacterianas que se encontraban en 500 µL de agua destilada estéril, inactivadas.

Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo basado en Chelex®-100 de Nishiguchi et al., (2002) y Al-Ajlan et al., (2011) modificado, donde se tomó la suspensión de colonias sometiéndolas a una primera centrifugación a 2000 g por 10 min y se eliminó el sobrenadante, el pellet obtenido se resuspendió en 200 µL de Buffer TE, luego se añadió 100 µL de Chelex®-100 al 10%, 3 µL de Proteinasa K (20 mg/µL) y 30 µL de SDS 10%. Luego se realizaron incubaciones; a 56°C por 1 hora, 100°C por 10 min y 70°C por 20 min. Posteriormente, se sometió a una última centrifugación a 1300 g por 5 min, finalmente el sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo de 1.5 mL; estas muestras fueron almacenadas -20°C en ultracongelación hasta su posterior uso.

Diagnóstico molecular previo por PCR IS711 y Bruce-ladder

Parte de las muestras de ADN bacteriano de *Brucella* spp. se almacenaron un largo tiempo, por esa razón se tomó las 74 muestras para comprobar la integridad del producto aplicando los métodos PCR IS711 y Bruce-ladder.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

La PCR-IS711 con los primers IS6501 (F) GATAGAAGGCTTGAAGCT TGC GGAC y IS6501 (R) ACGCCGGTGTATGGGAAAGGCTTTT identifica el gen *IS711* de 260 bp y permite determinar si el ADN bacteriano pertenece al género *Brucella* (Clavareau et al. 1998). El proceso de termociclado para la obtención de amplicones se dio a un volumen final de 20 µL; con una concentración 1X de buffer, 0.2 mM de dNTPs, 1.5mM de MgCl₂, 1 µM de cada primer, 5% de DMSO, 2.5U/100µL de Taq, con un volumen de 2 µL de ADN y agua ultrapura. De acuerdo con el siguiente programa; denaturación inicial 94°C por 5 minutos, luego 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 min, hibridación a 62°C por 1 min y extensión de 72°C por 45 seg y posteriormente la extensión final a 72°C por 10 minutos. Para visualizar el resultado se utilizó electroforesis en gel de agarosa 2%, usando bromuro de etidio como revelador, a 100 voltios por 15 minutos y el gel se observó en un transiluminador.

PCR Bruce-ladder se trata de un multiplex, que identifica seis especies del género *Brucella* spp. y tres cepas vacunales (García-Yoldi et al. 2006; I López-Goñi et al. 2008). Se usó 1X de buffer, 0.4 mM dNTPs, 4 mM de MgCl₂, 1.5U/25µL de Taq en conjunto con ocho pares de cebadores especificados por García-Yoldi et al. (2006) modificado cantidades como se muestra en la Tabla 1 y agua ultrapura, para un volumen final de 25 µL. El proceso de termociclado para la obtención de amplicones se hizo con el siguiente programa; denaturación inicial 95°C por 7 minutos, luego 25 ciclos de denaturación a 95°C por 35 seg, hibridación a 64°C por 45 seg y extensión de 72°C por 3 min y posteriormente la extensión final a 72°C por 6 minutos. Para visualizar el resultado se utilizó electroforesis en gel de agarosa 2%, usando bromuro de etidio como revelador, a 100 voltios por 30 minutos y el gel se observó en el transiluminador.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

Tabla 1. Primers para Bruce-ladder tomado de (García-Yoldi et al. 2006)

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño de aplicón (bp)	Cantidad (µL)
a1 (BMEI0998f)	ATC CTA TTG CCC CGA TAA GG	1682	0.5
a2 (BMEI0997r)	GCT TCG CAT TTT CAC TGT AGC		
b1(BMEI0535f)	GCG CAT TCT TCG GTT ATG AA	450 (1320)	0.3
b2 (BMEI0536r)	CGC AGG CGA AAA CAG CTA TAA		
c1 (BMEII0843f)	TTT ACA CAG GCA ATC CAG CA	1071	0.3
c2 (BMEII0844r)	GCG TCC AGT TGT TGT TGA TG		
d1(BMEI1436f)	ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT	794	0.3
d2 (BMEI1435r)	TTT ATC CAT CGC CCT GTC AC		
e1(BMEII0428f)	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG	587	0.3
e2 (BMEII0428r)	AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG		
f1(BR0953f)	GGA ACA CTA CGC CAC CTT GT	272	0.3
f2(BR0953r)	GAT GGA GCA AAC GCT GAA G		
g1(BMEI0752f)	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C	218	0.5
g2(BMEI0752r)	GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA		
h1(BMEII0987f)	CGC AGA CAG TGA CCA TCA AA	152	0.3
h2(BMEII0987r)	GTA TTC AGC CCC CGT TAC CT		

Obtención de secuencias problema

Luego de establecer un banco de muestras válidas (65), se realizó tres PCR convencionales para obtener secuencias de *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b, con los protocolos a continuación: para *bcs*31 se utilizaron los cebadores B4 (F) TGGCTCGGTTGCCAATATCAA y B5 (R) CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG para obtener un amplicón de 223bp (Mitka et al. 2007). El proceso de termociclado se hizo con un volumen final de 25 µL con las especificaciones en el master mix dadas por Mitka et al (2007) con 1X de buffer, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1 µM de cada cebador, 3U/100 µL de Taq, 5% de DMSO, con 2 µL de ADN y agua ultrapura, con el siguiente programa de termociclado; denaturación inicial 94°C por 3 minutos, luego 30 ciclos

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

de denaturación a 94°C por 30 seg, hibridación a 60°C por 30 seg y extensión de 72°C por 30 seg y posteriormente la extensión final a 72°C por 10 minutos.

Respecto a *omp*2a se usaron los primers 2aA (F) GGCTATTCAAAATTCTGGCG y 2aB (R) ATCGATTCTCACGCTTTCGT para el target objetivo de 1100 bp (A. Cloeckert et al. 1995). El máster mix se modificó y realizó de acuerdo con lo descrito por Cloeckert et al (1995) con 1X de buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1 µM de cada cebador, 3U/100 µL de Taq, 5% de DMSO, con 2 µL de ADN y agua ultrapura, para un volumen final de 25mL con un proceso de termociclado de la siguiente manera; denaturación inicial 94°C por 5 minutos, luego 35 ciclos; de denaturación a 94°C por 30 seg, hibridación a 50°C por 2 min y extensión de 72°C por 3 min. Posteriormente la extensión final a 72°C por 7 minutos.

Para *omp*2b se manejó los primers 2bA (F) CCTTCAGCCAAATCAGAATG y 2bB (R) GGTCAGCATAAAAAGCAAGC para obtener la secuencia de 1200 bp (A. Cloeckert et al. 1995). El máster mix estuvo compuesta por 1X de buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1 µM de cada cebador, 3U/100 µL de Taq, 5% de DMSO, con 2 µL de ADN y agua ultrapura, para un volumen final de 25mL. El proceso de termociclado se dará de la siguiente forma; denaturación inicial 94°C por 5 minutos, luego 35 ciclos; de denaturación a 94°C por 45 seg, hibridación a 58°C por 1 min y extensión de 72°C por 1 min. Posteriormente la extensión final a 72°C por 7 minutos. El volumen final utilizado será de 25 mL siguiendo el protocolo modificado a partir de Cloeckert et al (1995).

Todos los amplicones fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, usando bromuro de etidio como revelador, a 100 voltios por 40 minutos y el gel se observaron las bandas positivas mediante en un fotorevelador.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

Análisis filogenéticos

Las secuencias de amplicones provenientes de MacroGen (Geumcheon-gu, Seúl) fueron examinadas con el software MEGA 10 (Kumar, Stecher, and Tamura 2015), para obtener secuencias consenso a partir de cada par de primers utilizados y obtener el contig respectivo. En los casos de no obtener secuencias limpias y confiables mayoritariamente con un primer forward o reverse, se utilizaron directamente las secuencias del primer de mejor resolución.

Las secuencias de cada gen fueron ordenadas en matrices y alineadas mediante ClustalW (MEGAX) para la búsqueda de homologías posicionales. Una vez alineadas se procedió a realizar un análisis de Parsimonia Máxima (MP) de forma que se obtengan las relaciones evolutivas entre las secuencias de las muestras con 100 adiciones al azar de taxa y caracteres (pares de bases), algoritmo de barridos de ramas para obtener islas de árboles con TBR (Tree Bisection and Reconnection) y remuestreos de matrices con 500 pseudoreplicas de bootstrap (Felsenstein 1985) para el apoyo de clados o grupos formados que se muestran en porcentajes sobre el 100% en las bases de los clados.

Para la verificación de porcentajes de divergencia intra e interclados y secuencias se y se realizó el cálculo de distancias mediante una matriz de distancias por el método de p-distance. Se utilizaron secuencias de grupos hermanos y externos y especies de referencia obtenidas de la base de datos genbank-NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los códigos de acceso y especies/secuencias utilizadas se muestran en los anexos 2, 3 y 4. Se enraizaron los árboles con grupos externos (Carpenter 1999) para definir la serie de transformación de caracteres de secuencias ancestrales a secuencias derivadas.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diagnóstico molecular y secuencias problema

En el Anexo 1 se establece las cepas que fueron identificadas mediante IS711 con un total de 65 muestras de ADN bacteriano perteneciente a *Brucella* spp. que representan un 88% del total analizadas al principio de la investigación. Con Bruce-ladder se logró identificar 60 muestras correspondientes a *B. abortus* y cinco con el patrón específico para *B. canis*, obtenidas de las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas: en haciendas ganaderas, muestras humanas provenientes del Hospital Vozandes en Quito, y muestras caninas de clínicas veterinarias. En la Tabla 2 se observa el número de muestras de *B. abortus* y *B. canis* identificadas por Bruce-ladder de acuerdo con el hospedador y su procedencia.

Tabla 2. Procedencia y hospedador de las muestras utilizadas para el análisis molecular y filogenético.

Especie	Hospedador	Procedencia	n
<i>B. abortus</i>	Bovino	Leche	20
	Bovino	Ganglios/hígado/bazo	30
	Humano	Sangre	7
	Humano	Semen	1
	Canino	Útero	1
	Canino	Amígdala	1
<i>B. canis</i>	Canino	Testículo	2
	Canino	Semen	1
	Canino	Desconocido	2

Las muestras descartadas pudieron haber estado dañadas en el proceso de congelar y descongelar para su evaluación, aunque el producto de ADN se encuentre en un tampón, los niveles de resistencia de enlaces tienden a ser bajos y se rompen con facilidad como lo menciona Chung et al. (2017) comprometiendo la integridad de la muestra.

La historia evolutiva de *Brucella* spp. se ha estimado por diversos marcadores moleculares para algunas regiones cromosómicas de la bacteria, que han servido para la identificación de la

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcp31*, *omp2a* y *omp2b* EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

especie y biovariedades (Yu and Nielsen 2010), sin embargo se ha querido establecer una construcción filogenética a través de otros genes como el *omp2a* y *omp2b*; que producen una proteína de membrana, que se relacionan estrechamente con la virulencia de la bacteria y el gen *bcp31* considerado un marcador conservado que codifica una proteína antigénica periplasmática (Betsy J. Bricker 2002; Kumar et al. 2019).

Filogenia Gen *bcp31*

Específicamente *bcp31* se ha usado en la detección del género *Brucella* a partir de muestras sanguíneas, de suero o de leche sin pasar por el crecimiento de la bacteria dentro del laboratorio (Satei et al. 2020), sin embargo no se ha realizado un estudio que procure una evaluación del gen como posible indicador de la historia evolutiva del género.

El árbol filogenético obtenido a partir de este gen (Figura 1) incluye 68 secuencias de nucleótidos: compuesta de 63 propias y cinco obtenidas de GenBank (Anexos 1 y 4). Se dedujo mediante el método de máxima parsimonia. Con un índice de consistencia de 0.96 (96% de homologías). El árbol más parsimonioso no muestra una estructuración filogenética concordante con la clasificación de especies, ubicándose *B. melitensis* y *B. canis* dentro de los clados de *B. abortus* y en forma parafilética.

Con el gen *bcp31* no fue posible tener un muestreo más diverso de secuencias en genbank debido a la poca disponibilidad a nivel específico con este marcador. Sin embargo, la ausencia de estructuración filogenética apoya la tesis de Kumar et al. (2019), quienes señalan que al ser una secuencia muy conservada el polimorfismo de nucleótidos entre especies no es suficiente, así mismo Bricker et al. (1988) ratifica esta característica para todas las especies y biovars, sin embargo, no se expresa en *B. ovis*. Con la investigación realizada por Da Costa et al. (1996) además se pudo establecer que solamente una cepa de *Ochrobactrum* daba positivo a la reacción, en

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp2a* y *omp2b* EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

comparación a las demás bacterias estudiadas de la misma familia, sustentando la premisa de gen conservado para el género *Brucella*.

Filogenia Genes omp2a y omp2b

Estos genes descritos por primera vez por Ficht et al. (1989), son homólogos, se encuentran en sentido contrario en hebras opuestas, dispuestos cabeza con cabeza y cada uno codifica una proteína de membrana de aproximadamente 36kDa (1200 bp), además Bricker (2002) establece que las secuencias son conservadas, pero poseen importantes polimorfismos lo que ayudará a la identificación de especies del género *Brucella*.

Para el análisis de estos locus se logró obtener secuencias limpias con los cebadores reverse en ambos genes (*omp2aB* y *omp2bB*), lo que sugiere que trabaja mejor que su par forward en este set de primers, no se ha evaluado esta distonía, sin embargo en este trabajo se los utiliza para la construcción de árboles filogenéticos ya que en ensayos realizados por Bricker (2002) que menciona que trabaja adecuadamente en la diferenciación de especies de *Brucella* con el método de PCR.

Posterior a la supresión de las regiones de baja calidad en las secuencias obtenidas por *omp2a*, se obtuvo una matriz de 63 muestras validadas como propias (Anexo 1) y 17 obtenidas de GenBank (Anexo 2), con un total de 80 secuencias (80 x 665 bp). El árbol obtenido bajo el método de Máxima Parsimonia (Figura 2), resultó con un índice de consistencia de 0.81 (81% de homologías).

La hipótesis del gen *omp2a* muestra un árbol estructurado concordante con clados monofiléticos como lo establece Ficht et al. (1996) que representan especies filogenéticas bien definidas con apoyos de bootstrap de 70% en promedio y que permite identificar molecularmente las especies, adicionalmente corregir errores de identificación del Bruce-ladder y de rotulación-identificación de secuencias del genbank.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

El árbol enraizado con *Ochrobactrum anthropi* como outgroup (referencia), muestra una topología que leída de lo más ancestral o externo a lo derivado o interno: *B suis* como especie más externa, aunque con menos del 50% de apoyo (bootstrap), luego un clado monofilético con (*B papionis* + *B cetis*) + *B ovis* todos con apoyo entre 69-71%. Luego en la topología se ubica el clado con *B microti* (*B pinnipedialis*) + *B canis* en lo más interno, apoyado externamente con un 69% incluyendo una secuencia erróneamente identificada como *B suis* (Alemania) ya que según establece Pappas et al. (2010) *B. suis* y *B. canis* son especies que se encuentran íntimamente relacionadas, por su evolución al tiempo en el mismo ambiente. Por otra parte, Guzmán-Verri et al. (2019) describe que se consideraba a la especie canina como una biovariedad de *B. suis* o una especie atípica, sin embargo, se empezaron a encontrar casos en humanos y perros que no habían tenido contacto directo con algún hospedero preferencial de *B. suis*, sabiendo que las muestras eran provenientes de veterinarias en la provincia de Pichincha, no se establece una infección por especie atípica y se relacionan estrechamente con la secuencia proveniente de Estados Unidos (U26439) que confirma la especie estudiada.

Luego se observa al clado monofilético con *B melitensis* + *B abortus* como grupos hermanos y mostrando a *B abortus* como la especie más derivada del grupo *Brucella* spp, incluyendo una secuencia de *B ovis* de China erróneamente identificada ya que como lo describe Percin (2013), esta especie es poco o nada virulenta y solo ha encontrado en su hospedero de preferencia (ovejas y carneros). Los clados taxonómicos están coloreados en la Fig. 2 para su fácil visualización, así como las secuencias que deben ser corregidas en su identificación.

En el caso de *B. pinnipedialis* y *B. ceti* debido a que son especies marinas, se podría pensar que deberían pertenecer al mismo clado, monofiléticas. Sin embargo, Moreno et al. (2002) establece que las especies de *Brucella* de hospederos marinos tienen un alto polimorfismo en el locus *omp*2a y *omp*2b en comparación con las especies de hospederos terrestres, entonces su

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

posición parafilética, está justificada. Sugiriendo que los hospedadores cetáceos y pinnípedos está ampliamente distribuido, esta diversidad se observa en la Fig. 2.

En un tercer nivel de identificación molecular después de un primer acercamiento con Blast y luego mediante la construcción filogenética, se calcularon los porcentajes de divergencia intra e inter-especies mediante p-distance no corregida, que resultaron de la siguiente forma: entre *B. abortus* y *B. canis* 2%; *B. abortus* y *B. ceti* 7%; *B. abortus* y *B. suis* 3%; *B. abortus* y *B. ovis* 3%; *B. abortus* y *B. pinnipedialis* 2%; *B. abortus* y *B. papionis* 12%, y entre *B. abortus* y *B. melitensis* de 2%. De esta forma la divergencia inter-especie varía entre 2 y 12%, las especies cercanas entre 2 a 3% especies más alejadas en un 7% y las más distantes evolutivamente en un 12%. La divergencia intra-especie se pudo calcular con secuencias de *B. abortus* y *B. canis* la cual fue de 0.1%.

En resumen, se diferencian nueve grupos dispuestos en clados (Figura 2), que incluye *Brucella suis* [(*Brucella papionis* + *Brucella ceti*) + *Brucella ovis*] + [(*Brucella microti* + *Brucella pinnipedialis* + *Brucella canis*)] + [(*Brucella melitensis* + *Brucella abortus*)], estableciendo una estructuración evidente, en la que se que revela una topología semejante a lo mencionado por Pappas et al. (2010).

Asimismo, para la construcción del árbol filogenético con el gen *omp*2b se realizó la supresión de las regiones de baja calidad en las secuencias obtenidas, adquiriendo una matriz de 57 muestras validadas como propias (Anexo 1) y 17 obtenidas de GenBank (Anexo 2), con un total de 74 secuencias (74 x 650 bp). El árbol resultante de Máxima Parsimonia (Figura 3), mostró un índice de consistencia de 0.90 (90% de homologías).

La hipótesis filogenética con *omp*2b muestra parafilia entre dos clados de abortus, el primero se relaciona con una divergencia del 0% con la muestra *B. abortus* (KT304795) de Iran, mientras que el segundo clado tiene una relación parafilética con el grupo de *B. canis*, *B. suis*

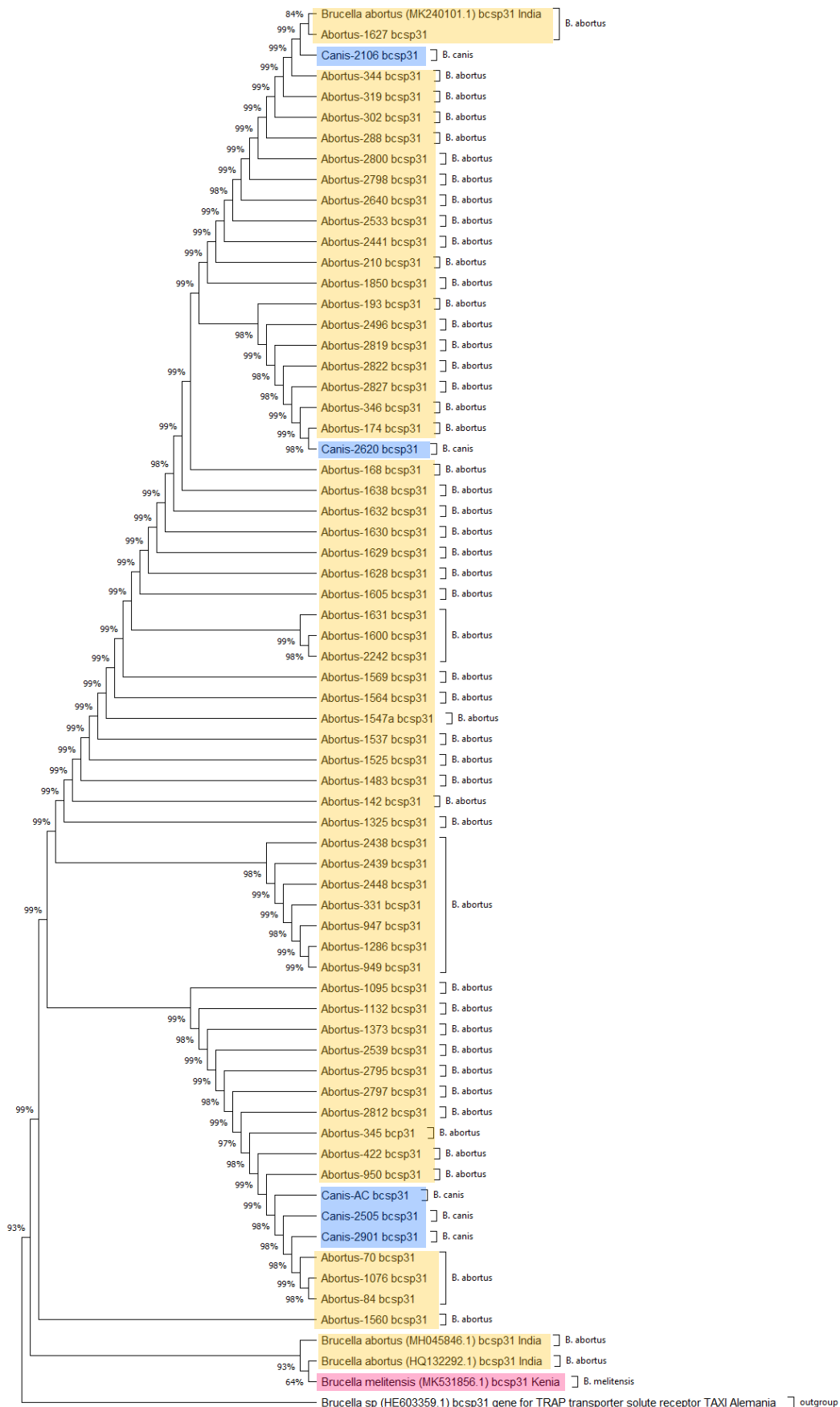
INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

(AY903265), *B. ovis* (AF268035) y *B. papionis* (KJ510541) interactúa con especies que no corresponden de acuerdo a lo expuesto por Pappas et al. (2010). No se observa una estructuración taxonómica como en *omp*2a, con una mezcla de secuencias de distintas especies en los clados. Esta mezcla podría ser indicador de recombinación en este gen o de una alta variabilidad, lo que permitiría usar este gen para un análisis evolutivo a nivel intra específico y determinación de variantes. Además, la divergencia calculada inter-especie resultó como sigue: entre *B. abortus* y *B. canis* de 4%, *B. abortus* y *B. ceti* de 7%, *B. abortus* y *B. suis* de 28%, *B. abortus* y *B. ovis* de 2%, *B. abortus* y *B. pinnipedialis* de 6%, *B. abortus* y *B. papionis* de 3%, *B. abortus* y *B. melitensis* de 56% apoyando la hipótesis de alta variabilidad al tener valores entre 2 y 56%

Es importante que la investigación que se ha realizado en el Ecuador sobre la prevalencia de *Brucella*, se complemente con herramientas bioinformáticas, de esta manera acceder a la información acerca de esta enfermedad zoonótica a nivel mundial, que es el punto de partida para la vigilar y controlar con mayor eficacia la enfermedad.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

Figura 1. Árbol filogenético de *Brucella* spp. mediante el gen *bcs*31. Máxima parsimonia.



INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcbp31*, *omp2a* y *omp2b* EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

Figura 2. Árbol filogenético de *Brucella* spp. mediante el gen Omp2a (reverse). Máxima parsimonia.

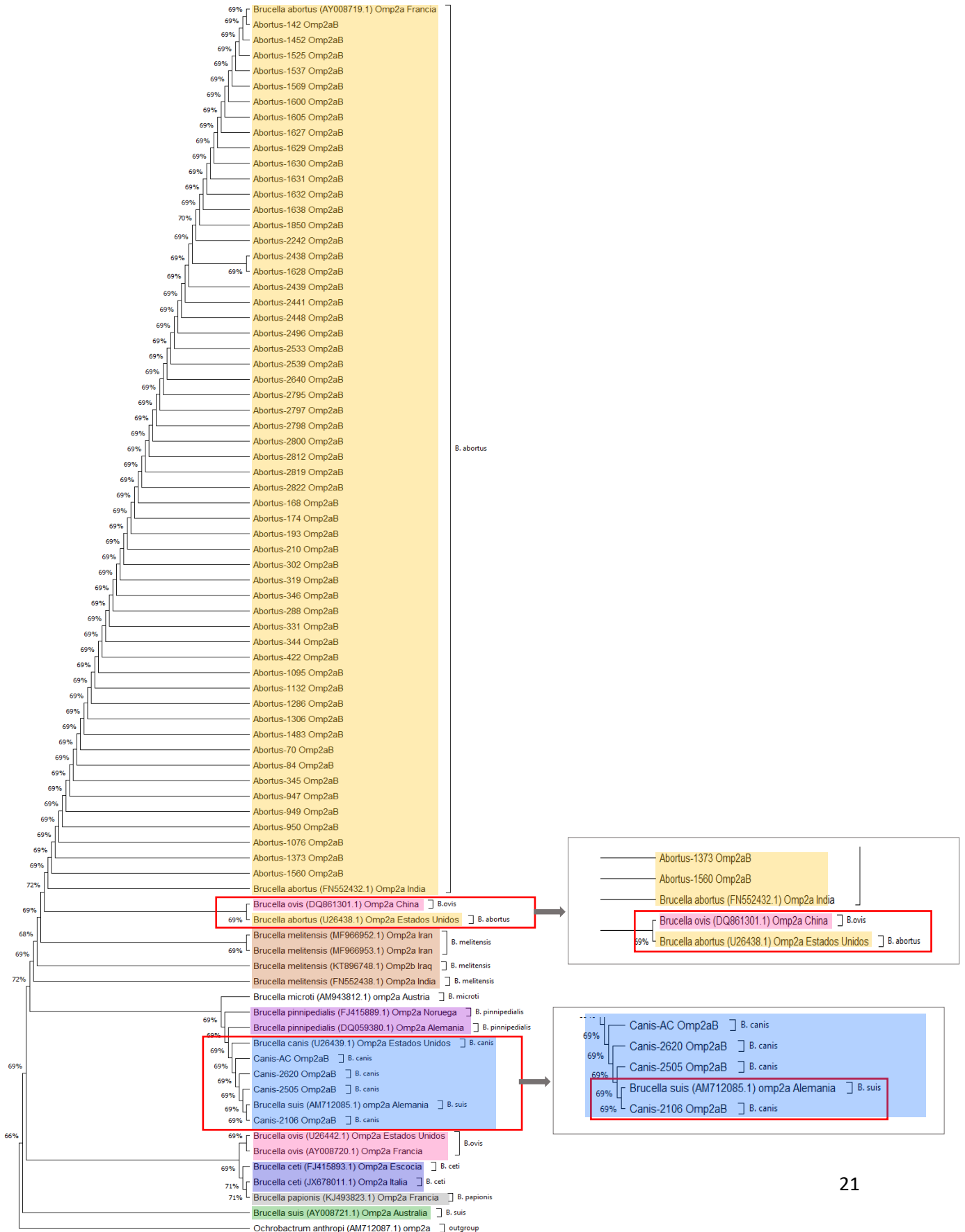


Figura 3. Árbol filogenético de *Brucella* spp. mediante el gen Omp2b (reverse). Máxima parsimonia.



INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcp31*, *omp2a* y *omp2b* EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

CONCLUSIONES

Se logró establecer la capacidad del gen *bcp31* para el diagnóstico del género *Brucella* por su secuencia altamente conservada, lo que podría dar inicio a nuevos estudios para el establecimiento de protocolos en el estudio general del patógeno en el Ecuador.

Los genes *omp2a* y *omp2b* son conservados pero tienen polimorfismo de nucleótidos importante para el establecimiento de patrones evolutivos.

Se evidenció que *omp2b* probablemente sufre de recombinación o una alta variabilidad ya que no se encontró una estructuración filogenética y mezcla de secuencias en los clados no estructurados y poca utilidad para fines diagnósticos de especies. Sin embargo, puede ser de utilidad para los estudios de evolución y de variantes intra especie.

Con el gen *omp2a* que presentó clados definidos y apoyados acorde con especies filogenéticas, que al ser analizadas, se pudo observar que se mantienen patrones evolutivos del género, con las modificaciones más recientes, como la de que ubica a *B. pinnipedialis* en un clado diferente respecto a *B. ceti*, sugiriendo orígenes independientes entre especies marino-mamíferas.

RECOMENDACIONES

Pasos siguientes en esta investigación deben apuntar a identificar las mutaciones/sinapomorfías de los clados específicos para la comprender los cambios a nivel aminocídico/proteína que pueden estar asociados a la especificidad por hospedadores (*omp2a*).

Utilizar *bcp31* como identificador de *Brucella* spp por su carácter conservado.

Evaluar el gen *omp2a* para el estudio de las especies, su evolución y saltos de hospedadores así como variantes de patogenicidad.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

Evaluar el gen *omp*2b en procesos de recombinación, utilidad en análisis intra especie, evolución y variantes. Verificar secuencia a secuencia estas características comparando *omp*2a y *omp*2b.

BIBLIOGRAFÍA

- Acha, Pedro N., and Boris Szyfres. 2005. "Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes Al Hombre." *Revista Española de Salud Pública* 79(3): 423–423.
- Alba, Patricia et al. 2013. "The Presence of *Brucella* Ceti ST26 in a Striped Dolphin (*Stenella Coeruleoalba*) with Meningoencephalitis from the Mediterranean Sea." *Veterinary Microbiology* 164(1–2): 158–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.023>.
- Alvear, Edgar et al. 2018. "Evaluación De Las Pérdidas Económicas Causadas Por Brucelosis Bovina En Las Comunidades De Chaguarpata Y Launag En El Cantón Chunchi Provincia De Chimborazo-Ecuador." *Escuela Superior Politécnica De Chimborazo*: 48. <https://www.eumed.net/rev/oel/2018/08/perdidas-economicas-brucelosisbovina.html>.
- Amjadi, Omolbanin et al. 2019. "A Review of the Immunopathogenesis of Brucellosis." *Infectious Diseases* 51(5): 321–33. <https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1568545>.
- Amro, Ahmad, Badeeha Mansoor, Omar Hamarsheh, and Diaa Hjaija. 2021. "Recent Trends in Human Brucellosis in the West Bank, Palestine." *International Journal of Infectious Diseases* 106: 308–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.04.037>.
- Bahmani, Nasrin et al. 2017. "Comparison of PCR-RFLP and PFGE for Determining the Clonality of *Brucella* Isolates from Human and Livestock Specimens." *Saudi Journal of Biological Sciences* 26(2): 256–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.017>.
- Bricker, B. J., and S. M. Halling. 1994. "Differentiation of *Brucella* Abortus Bv. 1, 2, and 4, *Brucella* Melitensis, *Brucella* Ovis, and *Brucella* Suis Bv. 1 by PCR." *Journal of Clinical Microbiology* 32(11): 2660–66.
- Bricker, Betsy J, Darla R Ewalt, Steven C Olsen, and Allen E Jensen. 2003. "Evaluation of the *Brucella* Abortus Species – Specific Polymerase Chain Reaction Assay , an Improved Version of the *Brucella* AMOS Polymerase Chain Reaction Assay for Cattle." 378(2003):

**INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.**

374–78.

CDC. 2012. “Brucellosis-Areas at Risk.” <https://www.cdc.gov/brucellosis/index.html>.

Clavareau, Chantal et al. 1998. “Phenotypic and Molecular Characterization of a *Brucella* Strain Isolated from a Minke Whale (*Balaenoptera Acutorostrata*).” *Microbiology* 144(12): 3267–73.

Cloeckaert, A., J. M. Verger, M. Grayon, and O. Gerpinet. 1995. “Restriction Site Polymorphism of the Genes Encoding the Major 25 KDa and 36 KDa Outer-Membrane Proteins of *Brucella*.” *Microbiology* 141(9): 2111–21.

Cloeckaert, Axel, Jean Michel Verger, Maggy Grayon, and Nieves Vizcaíno. 1996. “Molecular and Immunological Characterization of the Major Outer Membrane Proteins of *Brucella*.” *FEMS Microbiology Letters* 145(1): 1–8.

ECDC. 2016. *Brucellosis - Informe Epidemiológico Anual, 2016 [Datos de 2014]*. Stockholm.

Elfaki, Mohamed G., Alwaleed Abdullah Alaidan, and Abdullah Abdulrahman Al-Hokail. 2015. “Host Response to *Brucella* Infection: Review and Future Perspective.” *The Journal of Infection in Developing Countries* 9(07): 697–701.
<https://jidc.org/index.php/journal/article/view/26230118>.

Escobar, Francisco. 2011. “Incidencia-Prevalencia y Plan de Control de Brucelosis Bovina En Hatos Lecheros de La Sierra Norte Ecuatoriana.” *Tesis Doctoral, Universidad Politécnica del Chimborazo*: 1–101.

Ferrão-Beck, Lénia et al. 2006. “Development of a Multiplex PCR Assay for Polymorphism Analysis of *Brucella* Suis Biovars Causing Brucellosis in Swine.” *Veterinary Microbiology* 115(1–3): 269–77.

Ficht, T. A., S. W. Bearden, B. A. Sowa, and L. G. Adams. 1989. “DNA Sequence and Expression of the 36-Kilodalton Outer Membrane Protein Gene of *Brucella Abortus*.” *Infection and Immunity* 57(11): 3281–91.

Ficht, T. A., H. S. Husseinen, J. Derr, and S. W. Bearden. 1996. “Species-Specific Sequences at the *Omp*2 Locus of *Brucella* Type Strains.” *International Journal of Systematic Bacteriology* 46(1): 329–31.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

- de Figueiredo, Paul et al. 2015. "Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis." *The American Journal of Pathology* 185(6): 1505–17.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.003>.
- Franc, K. A., R. C. Krecek, B. N. Häsler, and A. M. Arenas-Gamboa. 2018. "Brucellosis Remains a Neglected Disease in the Developing World: A Call for Interdisciplinary Action." *BMC Public Health* 18(1): 1–9.
- García-Yoldi, David et al. 2006. "Multiplex PCR Assay for the Identification and Differentiation of All *Brucella* Species and the Vaccine Strains *Brucella* Abortus S19 and RB51 and *Brucella* Melitensis Rev1." *Clinical Chemistry* 52(4): 779–81.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.062596>.
- Golshani, Maryam, Nafise Vaeznia, Mehdi Sahmani, and Saeid Bouzari. 2016. "In Silico Analysis of *Brucella* Abortus Omp2b and in Vitro Expression of SOmp2b ." *Clinical and Experimental Vaccine Research* 5(1): 75.
- Imaoka, Koichi et al. 2007. "Simultaneous Detection of the Genus *Brucella* by Combinatorial PCR." *Japanese Journal of Infectious Diseases* 60(2–3): 137–39.
- Kumar, Vinay et al. 2019. "PCR Based Molecular Diagnostic Assays for Brucellosis: A Review." *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8(02): 2666–81.
- López-Goñi, I et al. 2008. "Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-Ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains." *Journal of Clinical Microbiology* 46(10): 3484 LP – 3487. <http://jcm.asm.org/content/46/10/3484.abstract>.
- López-Goñi, Ignacio et al. 2011. "New Bruce-Ladder Multiplex PCR Assay for the Biovar Typing of *Brucella* Suis and the Discrimination of *Brucella* Suis and *Brucella* Canis." *Veterinary Microbiology* 154(1–2): 152–55.
- Mantur, Basappa G. et al. 2006. "Protean Clinical Manifestations and Diagnostic Challenges of Human Brucellosis in Adults: 16 Years' Experience in an Endemic Area." *Journal of Medical Microbiology* 55(7): 897–903.
- Maquart, Marianne, Michel S. Zygmunt, and Axel Cloeckaert. 2009. "Marine Mammal *Brucella* Isolates with Different Genomic Characteristics Display a Differential Response When Infecting Human Macrophages in Culture." *Microbes and Infection* 11(3): 361–66.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*p31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2008.12.012>.

- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. 2020. “Gaceta Epidemiológica.” *Secretaría Nacional de Vigilancia de la Salud Pública, Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica* SE01-24.
- Mitka, Stella et al. 2007. “Evaluation of Different PCR Assays for Early Detection of Acute and Relapsing Brucellosis in Humans in Comparison with Conventional Methods.” *Journal of Clinical Microbiology* 45(4): 1211–18.
- Moreno, Edgardo. 2014. “Retrospective and Prospective Perspectives on Zoonotic Brucellosis.” *Frontiers in Microbiology* 5(MAY): 1–18.
- Moreno, Edgardo, Axel Cloeckert, and Ignacio Moriyón. 2002. “Brucella Evolution and Taxonomy.” *Veterinary Microbiology* 90(1–4): 209–27.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113502002109>.
- Nejad, Ramin Bagheri et al. 2020. “Brucellosis in the Middle East: Current Situation and a Pathway Forward.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14(5): 1–17.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008071>.
- Olsen, S. C., and M. V. Palmer. 2014. “Advancement of Knowledge of Brucella Over the Past 50 Years.” *Veterinary Pathology* 51(6): 1076–89.
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985814540545>.
- Pappas, G., P. Panagopoulou, L. Christou, and N. Akritidis. 2006. “Brucella as a Biological Weapon.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(19–20): 2229–36.
- Pappas, Georgios. 2010. “The Changing Brucella Ecology: Novel Reservoirs, New Threats.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 36(SUPPL. 1): S8–11.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.013>.
- Pappas, Georgios, Nikolaos Akritidis, Mile Bosilkovski, and Epameinondas Tsianos. 2005. “Review Article: Brucellosis.” *The New England Journal of Medicines* 11(3): 369–73.
- Paquet, J. Y. et al. 2001. “Molecular, Antigenic, and Functional Analyses of Omp2b Porin Size Variants of Brucella Spp.” *Journal of Bacteriology* 183(16): 4839–47.
- Percin, Duygu. 2013. “Microbiology of Brucella.” *Recent Patents on Anti-Infective Drug*

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcsp31*, *omp2a* y *omp2b* EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella spp.*

Discovery 8(1): 13–17.

<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1574-891X&volume=8&issue=1&spage=13>.

Poulsen, Keith P. et al. 2014. “Brucellosis in Dairy Cattle and Goats in Northern Ecuador.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 90(4): 712–15.

Prenger-Berninghoff, E. et al. 2008. “Incidence of Brucella Species in Marine Mammals of the German North Sea.” *Diseases of Aquatic Organisms* 81(1): 65–71.

Rodríguez-Hidalgo, Richar Ivan et al. 2015. “Circulating Strains of Brucella Abortus in Cattle in Santo Domingo de Los Tsáchilas Province - Ecuador.” *Frontiers in Public Health* 3(MAR): 1–5.

Román-Cárdenas, F., and J. Luna-Herrera. 2017. “Revisión Actualizada de La Epidemiología de Brucelosis (Brucella Abortus, Brucella Mellitensis, Brucella Suis, Brucella Canis) En El Ecuador y El Mundo.” *Centro de Biotecnología* 6(December 2017): 82–93.
<http://revistas.unl.edu.ec/index.php/biotecnologia/article/view/342/309>.

Ron, Lenin et al. 2013. “Spatio-Temporal Clusters of Incident Human Brucellosis Cases in Ecuador.” *Spatial and Spatio-temporal Epidemiology* 5(1): 1–10.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.sste.2013.02.001>.

Satei, Esmat et al. 2020. “Molecular Survey of BCSP31 and IS711 Using PCR Assays in Detection of Brucella Spp. in Raw Milk.” *Meta Gene* 24(February): 100683.
<https://doi.org/10.1016/j.mgene.2020.100683>.

Scholz, Holger C. et al. 2008. “Brucella Microti Sp. Nov., Isolated from the Common Vole Microtus Arvalis.” *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 58(2): 375–82.
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.65356-0>.

Scholz, Holger Christian et al. 2009. “Isolation of Brucella Microti from Mandibular Lymph Nodes of Red Foxes, Vulpes Vulpes, in Lower Austria.” *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 9(2): 153–55.

Smith, Laurie D., and Thomas A. Ficht. 1990. “Pathogenesis of Brucella.” *Critical Reviews in Microbiology* 17(3): 209–30.

**INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.**

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408419009105726>.

- Spickler, Anna Rovid. 2018. "Brucellosis Reference Guide." *The Center for Food Security and Public Health*: 1–14. <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf>.
- Tanaka, S et al. 1977. "Chemo-Taxonomical Studies on Fatty Acids of 'Brucella' Species." *Ann Sclavo* 1: 67–82.
- Wainaina, Martin et al. 2020. "Detection of Brucella Spp. in Raw Milk from Various Livestock Species Raised under Pastoral Production Systems in Isiolo and Marsabit Counties, Northern Kenya." *Tropical Animal Health and Production* 52(6): 3537–44.
- Wang, Yuanzhi et al. 2016. "The Complete Genome of Brucella Suis 019 Provides Insights on Cross-Species Infection." *Genes* 7(2).
- Whatmore, Adrian M. et al. 2014. "Brucella Papionis Sp. Nov., Isolated from Baboons (Papio Spp.)." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 4120–28.
- WHO. 2020. "Brucellosis." *Health topics*. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/brucellosis>.
- Yu, Wei Ling, and Klaus Nielsen. 2010. "Review of Detection of Brucella Spp. by Polymerase Chain Reaction." *Croatian Medical Journal* 51(3): 306–13.
- Zinsstag, Jakob et al. 2007. "Human Benefits of Animal Interventions for Zoonosis Control." *Emerging Infectious Diseases* 13(4): 527–31.
- www.cdc.gov/eid%0Ahttp://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L46525097%5Cnhttp://www.cdc.gov/eid/content/13/4/pdfs/527.pdf%5Cnhttp://sfx.metabib.ch/sfx_locator?sid=EMBASE&issn=10806040&id=doi:&atitle=Human+benefits+of+animal+.

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

1. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de datos de cepas estudiadas.

	Código	Código filogenia			Especie	Hospedero	Procedencia
		bcs 31	Omp2a (Reverse)	Omp2b (Reverse)			
1	168	Abortus-168-bcs31	Abortus-168-Omp2aB	Abortus-168-Omp2b	Abortus	Bovino/leche	Nono
2	174	Abortus-174-bcs31	Abortus-174-Omp2aB	Abortus-174-Omp2b	Abortus	Bovino/leche	Nono
3	193	Abortus-193-bcs31	Abortus-193-Omp2aB	—	Abortus	Bovino/leche	Aychapicho
4	210	Abortus-210-bcs31	Abortus-210-Omp2aB	—	Abortus	Bovino/leche	Marcelo Ibarra
5	302	Abortus-302-bcs31	Abortus-302-Omp2aB	—	Abortus	Bovino	Hacienda Cortijo de Solanda (Perros)
6	319	Abortus-319-bcs31	Abortus-319-Omp2aB	Abortus-319-Omp2b	Abortus	Bovino/leche	Vacas positivas Zona Norte
7	346	Abortus-346-bcs31	Abortus-346-Omp2aB	Abortus-346-Omp2b	Abortus	Bovino/ Hemocultivo (HVQ)	Tumba grande (SAN GABRIEL)
8	288	Abortus-288-bcs31	Abortus-288-Omp2aB	Abortus-288-Omp2b	Abortus	Bovino/11	NONO positivas a Asc Hoslstein
9	331	Abortus-331-bcs31	Abortus-331-Omp2aB	Abortus-331-Omp2b	Abortus	Bovino/32	Amiga Julio (Verónica Torres) Pillaro
10	344	Abortus-344-bcs31	Abortus-344-Omp2aB	Abortus-344-Omp2b	Abortus	Bovino/56	Amiga Julio (Verónica Torres) Pillaro
11	422	Abortus-422-bcs31	Abortus-422-Omp2aB	Abortus-422-Omp2b	Abortus	Bovino/leche	Aychapicho
12	1095	Abortus-1095-bcs31	Abortus-1095-Omp2aB	Abortus-1095-Omp2b	Abortus	Bovino/leche	Santa Marta de Cuba - Carchi Sr Muñoz
13	1132	Abortus-1132-bcs31	Abortus-1132-Omp2aB	Abortus-1132-Omp2b	Abortus	Bovino/leche	Lloa Nicolas Sotomayor Hacienda arrendada
14	1286	Abortus-1286-bcs31	Abortus-1286-Omp2aB	Abortus-1286-Omp2b	Abortus	Bovino/leche	Santo Domingo- encuesta Nacional
15	1306	----	Abortus-1306-Omp2aB	Abortus-1306-Omp2b	Abortus	Bovino/leche	Santo Domingo- encuesta Nacional
16	1325	Abortus-1325-bcs31	----	Abortus-1325-Omp2b	Abortus	Bovino/leche	Guayas- encuesta Nacional
17	1483	Abortus-1483-bcs31	Abortus-1483-Omp2aB	Abortus-1483-Omp2b	Abortus	Bovino/ ganglio linf- supra	Richar_Sto. Domingo

**INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.**

18	70	Abortus-70-bcs31	Abortus-70-Omp2aB	Abortus-70-Omp2b	Abortus	Canino/ P2-útero	Machachi Francisco B
19	84	Abortus-84-bcs31	Abortus-84-Omp2aB	Abortus-84-Omp2b	Abortus	Canino/ P4-amígdala	Machachi Francisco B
20	345	Abortus-345-bcs31	Abortus-345-Omp2aB	Abortus-345-Omp2b	Abortus	Humano/ Hemocultivo	HVQ JORGE ORBE (SAN GABRIEL)
21	947	Abortus-947-bcs31	Abortus-947-Omp2aB	Abortus-947-Omp2b	Abortus	Humano/ Hemocultivo	HVQ Maria Sanguano CMQ
22	949	Abortus-949-bcs31	Abortus-949-Omp2aB	Abortus-949-Omp2b	Abortus	Humano/ Semen	HVQ Mario Muñoz (Carchi)
23	950	Abortus-950-bcs31	Abortus-950-Omp2aB	Abortus-950-Omp2b	Abortus	Humano/ Hemocultivo	HVQ Gurtavo Chapi (Carchi)
24	1076	Abortus-1076-bcs31	Abortus-1076-Omp2aB	Abortus-1076-Omp2b	Abortus	Humano/ Hemocultivo	Jorge Ron Roman CIZ
25	1373	Abortus-1373-bcs31	Abortus-1373-Omp2aB	Abortus-1373-Omp2b	Abortus	Humano/ Cepa	Hospital Voz Andes Quito A3
26	1560	Abortus-1560-bcs31	Abortus-1560-Omp2aB	Abortus-1560-Omp2b	Abortus	Humano	Elizabeth/ Gracia Norris
27	142	Abortus-142-bcs31	Abortus-142-Omp2aB	Abortus-142-Omp2b	Abortus	Bovino/leche	Marcelo Ibarra
28	1452	____	Abortus-1452-Omp2aB	Abortus-1452-Omp2b	Abortus	Bovino/ ganglio linf-supra	Marlon_Tesis_Carchi
29	1525	Abortus-1525-bcs31	Abortus-1525-Omp2aB	Abortus-1525-Omp2b	Abortus	Bovino/ ganglio linf-supra	Pablo_Tesis_Ibarra
30	1537	Abortus-1537-bcs31	Abortus-1537-Omp2aB	____	Abortus	Bovino/ ganglio linf-supra	Marlon_Tesis_Carchi
31	1547	Abortus-1547-bcs31	____	Abortus-1547-Omp2b	Abortus	Bovino/ ganglio linf-supra	Richar_Sto. Domingo
32	1564	Abortus-1564-bcs31	____	Abortus-1564-Omp2b	Abortus	Bovino/ Hígado	Proyecto Brucelosis-Machachi
33	1569	Abortus-1569-bcs31	Abortus-1569-Omp2aB	____	Abortus	Bovino/ Ganglio	Proyecto Brucelosis-Machachi
34	1600	Abortus-1600-bcs31	Abortus-1600-Omp2aB	Abortus-1600-Omp2b	Abortus	Bovino/ hígado-bazo-ganglio	Proyecto Brucelosis-Machachi
35	1605	Abortus-1605-bcs31	Abortus-1605-Omp2aB	Abortus-1605-Omp2b	Abortus	Bovino/ hígado-bazo-ganglio	Proyecto Brucelosis-Machachi
36	1627	Abortus-1627-bcs31	Abortus-1627-Omp2aB	Abortus-1627-Omp2b	Abortus	Bovino/ hígado-bazo-ganglio	Proyecto Brucelosis-Machachi
37	1628	Abortus-1628-bcs31	Abortus-1628-Omp2aB	Abortus-1628-Omp2b	Abortus	Bovino/ hígado-bazo-ganglio	Proyecto Brucelosis-Machachi

**INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.**

38	1629	Abortus-1629-bcsp31	Abortus-1629-Omp2aB	Abortus-1629-Omp2b	Abortus	Bovino/ hígado-bazo-ganglio	Proyecto Brucelosis-Machachi
39	1630	Abortus-1630-bcsp31	Abortus-1630-Omp2aB	Abortus-1630-Omp2b	Abortus	Bovino/ hígado-bazo-ganglio	Proyecto Brucelosis-Machachi
40	1631	Abortus-1631-bcsp31	Abortus-1631-Omp2aB	_----_	Abortus	Bovino/ leche	Lic. Maritza Celi
41	1632	Abortus-1632-bcsp31	Abortus-1632-Omp2aB	Abortus-1632-Omp2b	Abortus	Bovino/ leche	Lic. Maritza Celi
42	1638	Abortus-1638-bcsp31	Abortus-1638-Omp2aB	Abortus-1638-Omp2b	Abortus	Bovino/ hígado-bazo-ganglio	Proyecto Brucelosis-Machachi
43	1850	Abortus-1850-bcsp31	Abortus-1850-Omp2aB	Abortus-1850-Omp2b	Abortus	Bovino/ leche	Lic. Maritza Celi
44	2106	Canis-2106-bcsp31	Canis-2106-Omp2aB	Canis-2106-Omp2b	Canis	Canino/testículo	Cumbaya-Clinica veterinaria
45	2242	Abortus-2242-bcsp31	Abortus-2242-Omp2aB	Abortus-2242-Omp2b	Abortus	Porcino/ Hígado	Proyecto Brucelosis-Atuntaqui
46	2438	Abortus-2438-bcsp31	Abortus-2438-Omp2aB	Abortus-2438-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Agrocalidad Ltga.-Pastocalle-Aliaga
47	2439	Abortus-2439-bcsp31	Abortus-2439-Omp2aB	_----_	Abortus	Bovino/ Ganglios	Agrocalidad Ltga.-Pastocalle-Aliaga
48	2441	Abortus-2441-bcsp31	Abortus-2441-Omp2aB	Abortus-2441-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Agrocalidad Ltga.-Pastocalle-Aliaga
49	2448	Abortus-2448-bcsp31	Abortus-2448-Omp2aB	Abortus-2448-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Agrocalidad Ltga.-Pastocalle-Aliaga
50	2496	Abortus-2496-bcsp31	Abortus-2496-Omp2aB	Abortus-2496-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Agrocalidad Cayambe- Hda. Santa Susana
51	2505	Canis-2505-bcsp31	Canis-2505-Omp2aB	Canis-2505-Omp2b	Canis	Canino/testículo	
52	2533	Abortus-2533-bcsp31	Abortus-2533-Omp2aB	Abortus-2533-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Agrocalidad Machachi-Sta.Rosa de Taguachi
53	2539	Abortus-2539-bcsp31	Abortus-2539-Omp2aB	Abortus-2539-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Agrocalidad Esmeraldas-San Mateo Hda.Angela Teresa
54	2620	Canis-2620-bcsp31	Canis-2620-Omp2aB	Canis-2620-Omp2b	Canis	Canino/semén	Clinica veterinaria

**INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.**

55	2640	Abortus-2640-bcsp31	Abortus-2640-Omp2aB	Abortus-2640-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Agrocalidad Cayambe, Vinicio de la Cruz
56	2795	Abortus-2795-bcsp31	Abortus-2795-Omp2aB	Abortus-2795-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Pintag-Ubillus
57	2797	Abortus-2797-bcsp31	Abortus-2797-Omp2aB	Abortus-2797-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Pintag-Ubillus
58	2798	Abortus-2798-bcsp31	Abortus-2798-Omp2aB	Abortus-2798-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Pintag-Ubillus
59	2800	Abortus-2800-bcsp31	Abortus-2800-Omp2aB	Abortus-2800-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Pintag-Ubillus
60	2812	Abortus-2812-bcsp31	Abortus-2812-Omp2aB	___----	Abortus	Bovino/ Ganglios	Pintag-Ubillus
61	2819	Abortus-2819-bcsp31	Abortus-2819-Omp2aB	Abortus-2819-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Pintag-Ubillus
62	2822	Abortus-2822-bcsp31	Abortus-2822-Omp2aB	Abortus-2822-Omp2b	Abortus	Bovino/ Ganglios	Pintag-Ubillus
63	2827	Abortus-2827-bcsp31	Abortus-2827-Omp2aB	Abortus-2827-Omp2b	Abortus	Bovino/ leche	Yanayacu (curso)
64	2901	Canis-2901-bcsp31	Canis-2901-Omp2aB	Canis-2901-Omp2b	Canis	Canino	
65	AC	Canis-AC-bcsp31	Canis-AC-Omp2aB	Canis-AC-Omp2b	Canis		
TOTAL		63	62	57			

**INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs*31, *omp*2a y *omp*2b EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.**

Anexo 2. Secuencias GenBank para Omp2a.

Género	Especie	Origen	Huésped	Código de adhesión	Autor
<i>Brucella</i>	<i>ceti</i>	Toscana - Italia	delfín rayado (Ganglios)	JX678011	Alba et al., 2013
		Escocia	Delfín común	FJ415893	Maquart, Zygmunt, and Cloeckaert, 2009
<i>Brucella</i>	<i>suis</i>	Alemania		AM712085	Scholz et al. 2008
		Australia	Roedor salvaje	AY008721	Paquet et al. 2001
<i>Brucella</i>	<i>ovis</i>	Francia	Carnero de campo	AY008720	Paquet et al. 2001
		China		DQ861301	Wang, Y. et al. 2006
<i>Brucella</i>	<i>microti</i>	Austria	Zorro común	AM943812	Holger Christian Scholz et al. 2009
<i>Brucella</i>	<i>pinnipedialis</i>	Alemania	Foca común	DQ059380	Prenger-Berninghoff et al. 2008
		Noruega	Foca encapuchada	FJ415889	Maquart, Zygmunt, and Cloeckaert, 2009
<i>Brucella</i>	<i>abortus</i>	Francia	Cepa de vacuna	AY008719	Paquet et al. 2001
		India	Búfalo silvestre	FN552432	Vivekananda, M., 2009
		Estados Unidos	Toro	U26438	Ficht et al. 1996
<i>Brucella</i>	<i>papionis</i>	Francia	babuino (utero)	KJ493823	Whatmore et al. 2014
<i>Brucella</i>	<i>canis</i>	Estados Unidos	Perro domestico	U26439	Ficht et al. 1996
<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>	India	Hombre (sangre)	FN552438	Vivekananda, M., 2009
		Iraq	Cabra (secreción)	KT896748	Talib, S.M., 2015
		Irán	Hombre	MF966952	Bahmani et al. 2017
		Irán	Oveja	MF966953	Bahmani et al. 2017

INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcs31*, *omp2a* y *omp2b* EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.

Anexo 3. Secuencias GenBank para Omp2b.

Género	Especie	Origen	Huésped	Código de adhesión	Autor
<i>Brucella</i>	<i>ceti</i>	Toscana - Italia	delfín rayado (Ganglios)	JX678012	Alba et al., 2013
		Escocia	Delfín común	FJ415894	Maquart, Zygmunt, and Cloeckaert, 2009
<i>Brucella</i>	<i>suis</i>	Estados Unidos	Humano	AY903265	Ferrão-Beck et al. 2006
		China	Cerdo	AY989888	Bu,Z et al.,2005
<i>Brucella</i>	<i>ovis</i>	Francia	Carnero de campo	AF268035	Paquet et al. 2001
		China	Oveja	EF534310	Wang et al. 2016
<i>Brucella</i>	<i>sp.</i>	India		KC847060	Patil, M.R. et al., 2013
<i>Brucella</i>	<i>pinnipedialis</i>	Alemania	Foca común	DQ059381	Prenger-Berninghoff et al. 2008
		Noruega	Foca encapuchada	FJ415890	Maquart, Zygmunt, and Cloeckaert, 2009
<i>Brucella</i>	<i>abortus</i>	China	Hombre (sangre)	MG356792	Wang et al., 2017
		India	Cepa de vacuna	KC847058	Patil,M. R. et al., 2013
		Irán	Colección microbiana	KT304795	Golshani et al. 2016
<i>Brucella</i>	<i>papionis</i>	Francia	babuino (utero)	KJ510541	Whatmore et al. 2014
<i>Brucella</i>	<i>canis</i>	Estados Unidos	Perro domestico	U26439	Ficht et al. 1996
<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>	China		AY989891	Bu, Z. et al., 2005
		Iraq	Cabra (secreción vaginal)	KT896746	Talib, S.M., 2015

**INFORMACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES *bcbp31*, *omp2a* y *omp2b* EN EL
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Brucella* spp.**

Anexo 4. Secuencias GenBank para *bcbp31*.

Género	Especie	Origen	Huésped	Código de adhesión	Autor
<i>Brucella</i>	<i>abortus</i>	India	Ganado (leche)	MH045846	Thorat,V.D. et al., 2018
		India	Vaca (fluido vaginal)	HQ132292	Londhe,S.P. et al., 2010
		India	Humano (sangre)	MK240101	Jindal,P. and Singh,B.B., 2018
<i>Brucella</i>	<i>sp.</i>	Alemania		HE603359	Eisenberg,T. et al., 2011
<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>	Kenia	Cabra (leche)	MK531856	Wainaina et al. 2020