

Genotipos de aislados de campo de *Brucella abortus* de distintas regiones geográficas de Chile[#]

Genotypes of *Brucella abortus* field isolates from different geographical regions of Chile

M Mancilla^a, M Villarroel^b, ME Saldías^b, J Soto^b, AM Zárrega^{a*}

^aInstituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

^bServicio Agrícola y Ganadero, SAG, Chile.

SUMMARY

Bovine brucellosis is an endemic, zoonotic disease of high economic impact. The genetic identification of the prevalent *Brucella abortus* strains, the pathogen, is key to pursue further epidemiological strategies for disease control. The insertion sequence IS711 has been used as genetic marker to differentiate among *Brucella* species, members of the same specie and within the same biovar. We have analyzed the IS711-RFLP pattern for 46 *B. abortus* isolates, collected during the period of 1997-2005 from 16 different geographical areas of Chile. All isolates were previously identified by conventional techniques as *B. abortus* biovar 1. Of these, 87% shared the same IS711 DNA profile, while an 8.7 % corresponded to the pattern of RB51 vaccine strain. We report the finding of two new strains, not differentiated by AMOS PCR, which showed unreported patterns of IS711-RFLP.

Palabras clave: *Brucella abortus*, genotipificación, PCR AMOS, IS711.

Key words: *Brucella abortus*, genotyping, AMOS PCR, IS711.

INTRODUCCION

Las bacterias pertenecientes al género *Brucella* son responsables de una de las más importantes infecciones zoonóticas a nivel mundial, causante de aborto infeccioso en animales y de la enfermedad febril en humanos, también conocida como fiebre ondulante. Este patógeno se caracteriza por ser un bacilo gram negativo, intracelular facultativo, capaz de infectar al macrófago del hospedero en los cuales se multiplica y disemina en forma sistémica (Gorvel y Moreno 2002). La brucelosis animal es un problema sanitario que genera graves pérdidas económicas y limita el comercio internacional pecuario. En países desarrollados como Australia y Reino Unido se ha logrado erradicar la enfermedad aplicando estrictas medidas de control e higiene (Boschiroli y col 2001). Sin embargo, aún se presenta en forma endémica y con importante impacto económico en Africa, Medio Oriente, Asia, algunos países del Mediterráneo y Sudamérica¹. En Chile, la enfermedad está diseminada en todas las regiones productoras de ganado bovino, ubicándose preferentemente entre las VII y X Regiones, siendo esta última donde se concentra la mayor masa ganadera (Lopetegui 2005, Rivera y col 2002).

A la fecha, se conocen seis especies de *Brucella*, de las cuales sólo *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. canis* son zoonóticas y se transmiten directa o indirectamente a los humanos por el bovino, cabra, cerdo y perro, respectivamente. Para la situación sanitaria bovina, la brucelosis más relevante es la producida por *Brucella abortus*. Las estrategias de control contemplan la inmunización con la cepa vacuna RB51. Esta cepa presenta la ventaja de no interferir con el diagnóstico serológico, a diferencia de la cepa S19, utilizada con anterioridad, la cual induce la aparición de anticuerpos en suero y en leche (Ramírez y col 2002, Rivera y col 2002). Se han reportado casos esporádicos de brucelosis, incluyendo zoonosis (Villarroel y col 2000, Ashford y col 2004, Moriyon y col 2004), los cuales se han asociado al uso de la cepa vacuna RB51 (Ewalt y Bricker 2000). Ambas vacunas se distinguen mediante ensayos de susceptibilidad de los cutivos utilizando eritritol para la cepa S19 y rifampicina para la cepa RB51 (Bricker y Halling 1995).

En los últimos años se han descrito varias estrategias moleculares para la identificación y diferenciación entre biovares y especies del género *Brucella* (Bricker 2002). Entre estas, la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena o PCR denominado AMOS (Bricker y Halling 1994) permite diferenciar entre *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis*. Esta metodología ha sido modificada para distinguir además entre las cepas de *B. abortus* 2308 y la cepa vacuna RB51 (Bricker y Halling 1995, Ewalt y Bricker 2000). En este trabajo se utilizó el análisis de

Aceptado: 26.09.2007.

[#] Financiamiento DID-UACH D-2005-17 y FONDEF D02I1111.

* Casilla 567, Valdivia, Chile; anamariazarraga@uach.cl

¹ http://www.unav.es/microbiol/pagina_8.html

fingerprint IS711 o IS711-RFLP para discriminar entre cepas chilenas del género *Brucella* agrupadas en un mismo biovar (Marianelli y col 2003, Ocampo-Sosa y col 2005). El polimorfismo reportado a la fecha respecto al número de copias de esta secuencia y su distribución en el genoma de *Brucella* le otorga mayor capacidad discriminatoria a este marcador genético frente al PCR dirigido a loci conservados para cada especie. Los resultados indican una baja variabilidad genética en la población chilena de *B. abortus*, identificándose dos perfiles nuevos de IS711-RFLP para esta especie, no descritos previamente.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS Y EXTRACCION DE ADN GENOMICO

Se estudiaron 46 aislados de campo, 21 recuperados de muestras de leche y 25 de restos fetales, provenientes de cinco regiones y 16 localidades de Chile, recolectados entre 1997-2005 (cuadro 1). Estos aislados, junto con las cepas de referencia 544 y vacunas S19 y RB51, se obtuvieron del Laboratorio Central del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) Lo Aguirre, Santiago, y del Laboratorio Regional de Osorno. La cepa 2308 se obtuvo de la Universidad de Concepción. Las bacterias fueron cultivadas a 37 °C durante 48-72 h en agar *Brucella* (BBL, Beckton-Dickinson), en condiciones de microaerofilia generadas con el kit Genbag (Biomerieux) y mantenidas a -70 °C, en glicerol 20%.

Todos los aislados fueron previamente tipificados como *B. abortus* biovar 1 utilizando criterios bioquímicos, serológicos, susceptibilidad a antibióticos y fagos. Para la extracción de ADN genómico, las bacterias fueron recolectadas desde placas de agar *Brucella*, se lisaron por tratamiento con lisozima-SDS-proteinasas K (Sambrook y col 1989) seguido de extracción con solventes orgánicos para remover posibles interferentes. Finalmente, el ADN fue precipitado con isopropanol, lavado con etanol, resuspendido en agua y mantenido a -20 °C. Previo a la cuantificación espectrofotométrica, las muestras se trataron por 1 h a 37 °C con RNasa libre de DNasa (10 µg/ml). Una estrategia alternativa de extracción consistió en la inactivación por calor (80 °C por 30 min) de una suspensión de bacterias en suero fisiológico, seguida de centrifugación y recuperación del sobrenadante, la cual se utilizó como templado de la reacción de PCR.

PCR AMOS

El test de PCR AMOS se utilizó para la identificación de las cepas (Bricker y Halling 1994, Bricker y Halling 1995). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo 0,2 µM de cada partidor (de 5' a 3': BA, GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC; IS711, TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT; RB51, CCCCAGGAAGATATGCTTCGATCC; Eri-1, GCGCCGCGAAGAACTTATCAA; Eri-2,

CGCCATGTTAGCGGCGGTGA) 2,5 µl de buffer 10x de enzima, 2 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen), y 10 ng de ADN. El programa de amplificación comenzó con una etapa de desnaturación a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturación a 95 °C por 1 min, apareamiento a 60 °C 1 min y extensión a 72 °C por 2 min, para finalizar con un ciclo de extensión a 72 °C por 7 min (termociclador, GeneAmp 9700, Applied Biosystem). Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio, 0,5 µg/ml sobre pantalla transiluminadora UV. Las imágenes se capturaron con sistema de fotodocumentación (Kodak 1D, versión 1.0, Kodak).

IS711-RFLP

Este procedimiento se realizó de acuerdo al protocolo descrito previamente (Ocampo-Sosa y col 2005), con algunas modificaciones. El ADN genómico de cada aislado (1-2 µg) fue digerido toda la noche a 37 °C con las enzimas de restricción *Ava*I y *Cla*I (Fermentas). Los fragmentos de restricción se resolvieron en geles de agarosa al 1,0% y se transfirieron por capilaridad, en condiciones alcalinas por 16 hrs a temperatura ambiente a membranas de nylon (GeneScreen, GeneLab). Posteriormente, el ADN se fijó a la membrana por calor a 80 °C por 30 min. La sonda de 967 bp, conteniendo el elemento IS711, fue generada por PCR usando como templado el ADN genómico de la cepa vacuna *B. abortus* RB51. La mezcla de reacción (50 µl) consistió de 0,2 µM de cada partidor (711u, CACAAGACTGCGTTGCCGACAGA; 711d, CATATGATGGGACCAAACACCTAGGG), 5,0 µl de buffer 10x de enzima, 2 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 10 ng de ADN genómico bacteriano. El programa de amplificación se inició denaturando el ADN a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturación a 95 °C por 1 min, apareamiento a 60 °C, extensión a 72 °C por 1 min para finalizar con un ciclo de extensión a 72° por 5 min. La sonda se purificó a partir de geles de agarosa, utilizando el kit QIAEXII, siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). Como marcador de masa molecular, se utilizó el estándar de ADN fago λ/HindIII (Fermentas) marcado con biotina. El ADN transferido fue hibridado con un µg de sonda biotinilada (kit Bio-Nick, Invitrogen) e incubado a 42 °C por 2 h en equipo para hibridación (Hybridiser, HB-1D, Techne), previo bloqueo por 3 h con solución de prehibridación conteniendo ADN de espermio de salmón a 100 µg/ml (Invitrogen). Posteriormente, la señal de hibridación fue revelada por quimioluminiscencia utilizando el kit DNA Detector, siguiendo las instrucciones del fabricante (KPL). La señal de hibridación se registró en film de autorradiografía por exposición durante 30 min a temperatura ambiente. Para la determinación de los distintos tipos de perfiles o clusters de IS711-RFLP, las

Cuadro 1. Antecedentes de los aislados de *Brucella abortus* utilizados en este estudio. Código: numeración arbitraria interna. Año: año de aislamiento. Muestra: origen biológico del aislado. Localidad y Región: zonas geográficas de origen de los aislados.Information on *Brucella abortus* isolates used in this study. Código: arbitrary identification number. Año: year of isolation. Muestra: isolate biological source. Localidad and Región: geographical origin of the isolates

Código	Año	Muestra	Localidad	Región
B01	2004	Leche	Talagante	RM
B02	2004	Leche	Talagante	RM
B03	2004	Leche	Talagante	RM
B04	2004	Leche	Talagante	RM
B05	2004	Leche	Talagante	RM
B06	2004	Leche	Talagante	RM
B07	2005	Feto	Osorno	X
B08	2005	Feto	Puyehue	X
B10	2005	Feto	Puerto Montt	X
B11	2004	Feto	Río Negro	X
B12	2004	Leche	Río Bueno	X
B13	1999	Feto	Río Bueno	X
B14	2000	Feto	Ultima Esperanza	XII
B15	2000	Feto	Puerto Octay	X
B16	2002	Feto	Osorno	X
B17	2003	Leche	San Carlos	VIII
B18	2004	Leche	Puerto Montt	X
B19	2004	Leche	Puerto Octay	X
B20	2003	Leche	San Carlos	VIII
B21	2004	Leche	Freire	IX
B22	2004	Leche	La Unión	X
B23	2003	Leche	San Carlos	VIII
B24	2004	Leche	Puerto Octay	X
B25	2003	Leche	Río Negro	X
B26	2003	Leche	Bulnes	VIII
B27	2003	Leche	Bulnes	VIII
B28	2003	Leche	Río Negro	X
B29	2003	Leche	San Carlos	VIII
B30	2004	Leche	Puerto Octay	X
B31	1997	Feto	Paillaco	X
B32	1997	Feto	Osorno	X
B33	1997	Feto	Tacamo	X
B34	1997	Feto	Río Bueno	X
B35	1997	Feto	Purranque	X
B36	1997	Feto	Valdivia	X
B37	1997	Feto	Puerto Montt	X
B38	1997	Feto	Purranque	X
B39	1997	Feto	Purranque	X
B40	1997	Feto	Puerto Montt	X
B41	1997	Feto	Río Negro	X
B42	1997	Feto	Puyehue	X
B43	1998	Feto	Río Bueno	X
B45	1998	Feto	Osorno	X
B46	1998	Feto	Purranque	X
B47	1998	Feto	Río Negro	X
B48	1998	Feto	Río Negro	X

imágenes de los films fueron capturadas por sistema de fotodocumentación y analizadas con el programa Gelcompar II (versión 3.5, Applied Maths), utilizando el algoritmo de comparación UPGMA, modo bandas diferentes con una tolerancia ajustada al 1,5%.

RESULTADOS Y DISCUSION

Existe una amplia gama de métodos moleculares descritos para la tipificación de especies del género *Brucella*. Algunos se aplican para la identificación de género, los cuales son elegibles preferentemente para el diagnóstico de brucelosis humana y en microbiología de alimentos (Bricker 2002). Sin embargo, para establecer las causas de brotes y diseminación de la enfermedad es importante establecer la identidad de las variantes genéticas de la especie *Brucella*, ya que todas las cepas patógenas de este género son potencialmente diseminadoras (Bricker 2004). En Chile, los programas de vigilancia y control están dirigidos a erradicar las infecciones causadas por *B. abortus*, única especie identificada a la fecha como agente etiológico de los casos de brucelosis bovina. El programa nacional utiliza la cepa RB51 como vacuna, acompañada de la aplicación de adecuadas prácticas de manejo del rebaño, observándose una prevalencia informada de *B. abortus* en los rebaños del país de un 1% (Lopetegui 2005).

En este estudio, la identidad del ADN genómico de todos los aislados de campo fue confirmada por PCR AMOS. Los aislados de *B. abortus*, independiente del tipo de muestra, origen y localización geográfica (cuadro 1), generaron una banda de 498 bp, característica de esta especie (figura 1, sección c). Todos los aislados presentaron además un producto de amplificación de 178 bp, correspondiente a la amplificación del locus *ery*. En el grupo en estudio no se encontraron perfiles coincidentes con el de la cepa S19, cuyo genoma presenta una delección de 702 bp que comprende este locus. Los aislados de *B. abortus* B07, B08, B42 y B43, resistentes a rifampicina, mostraron una banda adicional de 364 bp, perfil concordante con el de las cepas de referencia 2308 y RB51. Para discriminar entre las cepas de *B. abortus*, se utilizó la técnica IS711-RFLP (figura 1, sección b). El tamaño de los fragmentos conteniendo la secuencia IS711 osciló entre 1,1-7,2 kb. (figura 1*). Cada fragmento contiene una copia del IS711, dado que esta secuencia carece de sitios de corte para las enzimas de restricción *AvaI* y *ClaI*. El análisis con el programa Gelcompar II agrupó los perfiles en cuatro grupos sin incluir la cepa 2308 (figura 1, sección a). El perfil encontrado en la mayoría de los aislados de *B. abortus* coincide con el de la cepa de referencia 544 biovar 1 (arbitrariamente designado perfil C). Este perfil se caracteriza por la presencia de siete copias de IS711, concordando con el número de copias encontrado en el genoma anotado de *B. abortus*. Las cepas de origen de estos perfiles se aislaron de muestras de leche y restos fetales de las Regiones Metropolitana y XII (n = 40). Cabe destacar que la cepa de *B. abortus* biovar

1 fue responsable del 85% de los casos de brucelosis en EE.UU el año 2003 (Bricker 2004). Los aislados B07, B08, B42 y B43 presentaron el segundo genotipo más frecuente caracterizado por la presencia de 8 copias de IS711 (genotipo D), coincidiendo con el de la cepa vacuna RB51. Estos aislados se obtuvieron a partir de muestras de restos fetales de bovinos provenientes de la X Región. Este perfil se diferencia de la cepa 2308 por la presencia de una copia adicional de IS711, localizada en un fragmento de restricción de 1,5 kb. Destacan de este estudio los aislados B12 y B16, obtenidos a partir de leche y restos fetales de muestras de la X Región. La figura 2 muestra los distintos perfiles IS711 identificados, representativos de las cepas chilenas. Las cepas cuyos perfiles se indican en los carriles 1 y 2 corresponden a las cepas B16 (perfil A) y B12 (perfil B). Estas cepas presentaron repetidamente perfiles únicos no descritos previamente. El genoma de estas cepas es concordante con el genotipo C mayoritario, excepto por la presencia de una copia de IS711 contenida en un fragmento de restricción de tamaño 6,6 kb para la cepa B12 y de 5,5 kb en la cepa B16 (figura 2, carriles B y A, respectivamente). Se puede especular que estas nuevas variantes genéticas serían el resultado de eventos de transposición replicativa recientes, ya que no tenemos conocimiento que se hayan reportado con anterioridad. Cabe destacar que la cepa B16 es fenotípicamente distinta al resto ya que carece de la actividad ureasa. La posibilidad de que la secuencia IS711 presente en la banda adicional esté interfiriendo directa o indirectamente en la expresión de esta enzima multimérica, ureasa, (Sangari y col 2007) está siendo investigada. De acuerdo a los antecedentes de origen de las muestras, las cepas B12 y B16 parecieran no estar asociadas a diferencias en la capacidad patogénica respecto a la cepa silvestre.

En conclusión, los 46 aislados de *B. abortus* biovar 1 incluidas en este estudio se agruparon en cuatro perfiles IS711 distintos. **Grupo 1:** genotipo C, de mayor abundancia (87%), caracterizado por siete copias de IS711, idéntico al perfil de la cepa 544. **Grupo 2:** perfil caracterizado por presentar ocho copias de IS711 (genotipo D). Este es el segundo genotipo en abundancia (8,7%) e incluye a la cepa RB51, la cual deriva de la cepa 2308 (Vemulapalli y col 1999). **Grupo 3:** genotipo A correspondiente a la cepa B16 (n = 1) con ocho copias de IS711. **Grupo 4:** representado por el genotipo B que identifica a la cepa B12 (n = 1) con ocho copias de IS711. La técnica de RFLP-IS711, a diferencias de la técnica de PCR AMOS, discriminó entre cepas de *B. abortus*, a pesar de la limitada diversidad genética reportada para estas bacterias (Vizcaino y col 2000, Gandara y col 2001). La homogeneidad genética observada en la mayoría de los aislados (perfil C) indica la necesidad de complementar estos estudios utilizando las secuencias VNTR (Número Variable de Repeticiones en Tandem) para el género *Brucella* (Bricker y col 2003, Le Fleche y col 2006) como blanco génico. La naturaleza multilocus de estas secuencias entrega una visión más

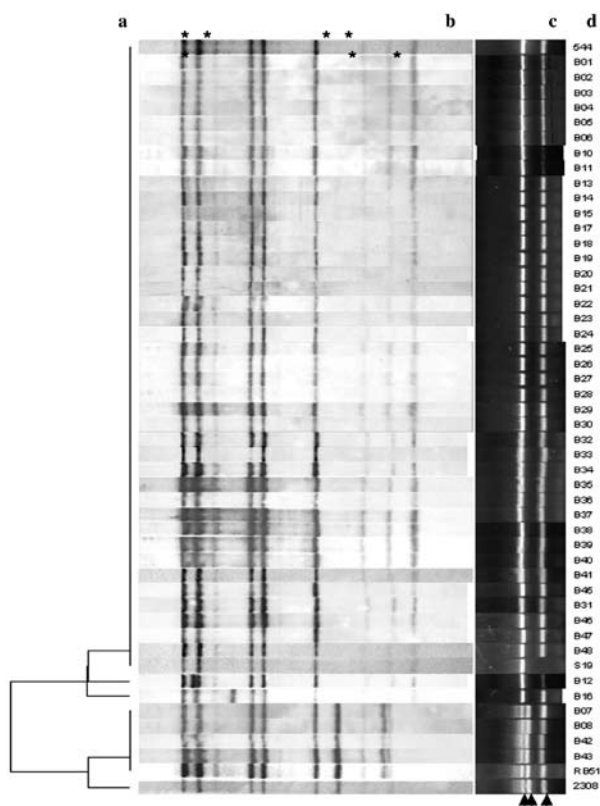


Figura 1. Caracterización genética de aislados chilenos de *B. abortus*.

a, Dendrograma; b, patrones de IS711-RFLP, (*) : fragmentos IS711; c, PCR AMOS abreviado; Flechas, productos de PCR 498, 364 y 178 pares de bases, de izquierda a derecha; d, código de cada aislado. Cepas de referencia de *B. abortus* biovar 1: 544, 2308, S19 y RB51.

Genetic characterization of Chilean *Brucella abortus* isolates. a, Dendrogram; b, IS711-RFLP patterns, (*) : IS711 fragments; c, Abbreviated AMOS PCR; Arrows (left to right): PCR products 498, 364 and 178 base pairs; d, Isolate identification number; *B. abortus* biovar 1 reference strains: 544, 2308, S19 and RB51.

precisa sobre la frecuencia y distribución geográfica de las variantes genéticas de *B. abortus*, requisito indispensable para trazar las rutas de diseminación del patógeno y diferenciar episodios de infección exógena de brotes de la enfermedad.

RESUMEN

La brucelosis bovina es una enfermedad zoonótica, endémica de alto impacto económico. La identificación genética de las cepas prevalentes de *Brucella abortus*, el patógeno, es clave para establecer estrategias epidemiológicas de control de la enfermedad. La secuencia de inserción IS711 ha sido utilizada como un marcador genético para diferenciar entre especies de *Brucella*, miembros de una misma especie y dentro de un mismo biovar. Hemos analizado los perfiles de IS711-RFLP de 46 aislados de *B. abortus*, recolectados durante el periodo 1997-2005, provenientes de 16 áreas geográficas diferentes de Chile. Todos los aislados fueron previamente identificados como *B. abortus* biovar 1, utilizando las técnicas convencionales. De estos, el 87% compartieron el mismo perfil de IS711-RFLP, mientras que el 8,7% correspondió al patrón de la cepa vacuna RB51. En este trabajo se informa el hallazgo

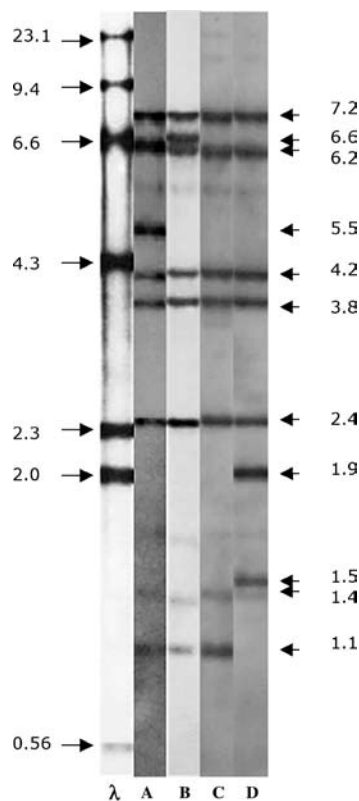


Figura 2. Perfiles IS711-RFLP representativos de cepas chilenas de *B. abortus*. λ : marcador ADN fago.

Representative IS711-RFLP patterns of Chilean *B. abortus* strains. λ : biotinylated Lambda phage/HindIII DNA as marker. Scale in kilobases. Lane A: B16 strain. Lane B: B12 strain. Lane C: 544 strain. Lane D: RB51 strain.

de dos cepas indistinguibles por PCR AMOS con perfiles nuevos de IS711-RFLP, no reportados previamente.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Angel Oñate por facilitarnos la cepa 2308. A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología, CONICYT, la cual otorgó beca de postgrado al Sr. Marcos Mancilla.

REFERENCIAS

- Ashford DA, J di Pietra, J Lingappa, C Woods, H Noll, B Neville, R Weyant, SL Bragg, RA Spiegel, J Tappero, BA Perkins. 2004. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine* 22, 3435-3439.
- Boschirolu ML, V Foulongne, D O'Callaghan. 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 4, 58-64.
- Bricker BJ, SM Halling. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 32, 2660-2666.
- Bricker BJ, SM Halling. 1995. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 33, 1640-1642.
- Bricker BJ. 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol* 90, 435-446.

- Bricker BJ, DR Ewalt, SM Halling. 2003. *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol* 3, 15.
- Bricker BJ. 2004. Molecular diagnostics of animal brucellosis: A review of PCR-based assays and approaches. In: Lopez-Goni I, I Moriyon (eds). *Brucella: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Bioscience, Pamplona, España, Pp 25-51.
- Ewalt DR, BJ Bricker. 2000. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J Clin Microbiol* 38, 3085-3086.
- Gandara B, AL Merino, MA Rogel, E Martinez-Romero. 2001. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 39, 235-240.
- Gorvel JP, E Moreno. 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 90, 281-297.
- Le Fleche P, I Jacques, M Grayon, S Al Dahouk, P Bouchon, F Denoeud, K Nockler, H Neubauer, LA Guilloteau, G Vergnaud. 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol* 6, 9.
- Lopetegui P. 2005. Avances de la erradicación de la brucelosis bovina en Chile. Boletín Veterinario Oficial, BVO N°3. Servicio Agrícola y Ganadero, Santiago, Chile, Pp 1-14.
- Marianelli C, G La Rosa, F Ciuchini, M Muscillo, P Pasquali, R Adone. 2003. Genetic diversity at alkB locus in *Brucella abortus*. *J Vet Med B* 50, 494-499.
- Moriyon I, MJ Grillo, D Monreal, D Gonzalez, C Marin, I Lopez-Goni, RC Mainar-Jaime, E Moreno, JM Blasco. 2004. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res* 35, 1-38.
- Ocampo-Sosa AA, J Aguero-Balbin, JM Garcia-Lobo. 2005. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet Microbiol* 110, 41-51.
- Ramírez M, S Ernst, F Elvinger, A Rivera, C Rosenfeld. 2002. Respuesta serológica y tiempo de saneamiento en rebaños bovinos vacunados con Cepa 19 o Cepa RB-51; X Región, Chile. *Arch Med Vet* 34, 213-220.
- Rivera SA, MC Ramirez, IP Lopetegui. 2002. Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile. *Vet Microbiol* 90, 45-53.
- Sambrook J, E Fritsch, T Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sangari FJ, A Seoane, MC Rodriguez, J Aguero, JM Garcia Lobo. 2007. Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infect Immun* 75, 774-780.
- Vemulapalli R, JR McQuiston, GG Schurig, N Sriranganathan, SM Halling, SM Boyle. 1999. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 760-764.
- Villaruel M, M Grell, R Sáenz. 2000. Reporte de primer caso humano de aislamiento y tipificación de *Brucella abortus* RB51. *Arch Med Vet* 32, 89-91.
- Vizcaino N, A Cloeckert, J Verger, M Grayon, L Fernandez-Lago. 2000. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect* 2, 1089-1100.