



CONSEJO NACIONAL
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA

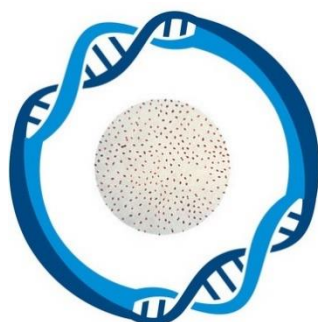
Con el apoyo de:



Fondo para la Excelencia de la
Educación y la Investigación



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN - FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
PROGRAMA PROCIENCIA - PROYECTO ASOCIATIVO PINV15-377
“Genotipificación de cepas de *Brucella spp.* en cultivos aislados de rumiantes en el
Paraguay.”



APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA EN EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS
EN RUMIANTES

Castro Rojas, Liz Aurora

San Lorenzo, 2020.



CONSEJO NACIONAL
**DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA**



PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Con el apoyo de:



Fondo para la Excelencia de la
Educación y la Investigación



“La presente publicación ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”.

“Este proyecto es cofinanciado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT con recursos del FEEI”

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN RUMIANTES

Castro Rojas, Liz Aurora

Investigadora en formación Proyecto PINV15-377
Departamento Reproducción Animal y Genética
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de Asunción

1. BRUCELOSIS

La brucelosis es una enfermedad de distribución mundial producida por bacterias facultativas intracelulares, gram negativas, que afecta a diferentes especies de animales domésticas y silvestres, así como al ser humano causadas por especies del género *Brucella*¹⁻². El género *Brucella* forma parte de la familia *Brucellaceae*, que a su vez forma parte del orden *Rhizobiales*, en la clase *Alphaproteobacteria*. Presenta una estrecha relación genética con ciertos agentes patógenos de las plantas y simbiontes de los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium*, así como con agentes patógenos de animales (*Bartonella*) y bacterias oportunistas o del suelo (*Ochrobactrum*)³.

La evidencia genética e inmunológica indica que todos los miembros del género *Brucella* están estrechamente relacionados. Sin embargo, teniendo en cuenta que existen diferencias relevantes entre las principales variantes en cuanto al tipo de hospedador, a la epidemiología y variaciones moleculares a nivel genómico, el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas, Subcomité de Taxonomía de *Brucella*, adoptó en 2005 una decisión firme sobre el retorno a las posiciones anteriores a 1986 en lo relativo a la taxonomía de *Brucella*; la consecuencia de ese posicionamiento es la reprobación de las seis especies tipo de *Brucella* con sus biovariedades reconocidas. Los nombres clásicos relacionadas con las seis especies tipo de *Brucella* están publicados en las Listas Autorizadas de Nombres de Bacterias de 1980, y las cepas típicas designadas aparecen asociadas a esos nombres publicados y validados: *Brucella abortus*, *B. melitensis*,

B. suis, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*. Las tres primeras se subdividen en biovariedades en bases a sus características de cultivo y serológicas, existiendo siete biovariedades (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9) para *B. abortus*, tres (1, 2 y 3) en *B. melitensis* y cinco (1, 2, 3, 4 y 5) en *B. suis*³.

En este material, nos centraremos en las especies de *Brucella* que afectan a los bovinos, ovinos y caprinos.

1.1. Brucelosis bovina

La infección por *Brucella* en ganado bovino suele estar causada por biovariedades (bv.) de *Brucella abortus*. En algunos países, sobre todo del sur de Europa, África y Asia occidental, en los que el ganado bovino se cría en estrecha relación con ganado ovino o caprino, la infección también puede deberse a *B. melitensis*. En ocasiones, *B. suis* puede causar una infección crónica de la glándula mamaria del ganado bovino, pero no se ha observado que cause aborto ni que se transmita a otros animales³.

Esta enfermedad suele ser asintomática en animales de corta edad y en hembras no gestantes. Tras la infección por *B. abortus* o *B. melitensis*, las hembras adultas gestantes presentan placentitis, que suele dar lugar a aborto entre el quinto y el noveno mes de gestación. Incluso en ausencia de aborto, en la placenta, los líquidos fetales y las secreciones vaginales se produce una profusa excreción del microorganismo. La glándula mamaria y los ganglios linfáticos relacionados también pueden resultar infectados, y es posible que se excreten microorganismos con la leche. Las siguientes gestaciones suelen llegar a término, pero la infección uterina y mamaria reaparece, con cantidades bajas de microorganismos tanto en los productos del parto como en la leche. En las infecciones agudas, el microorganismo se encuentra presente en la mayoría de ganglios linfáticos principales del organismo. Los bovinos macho adultos pueden presentar orquitis/epididimitis y la brucelosis puede ser una causa de infertilidad en ambos sexos. Los higromas, que suelen afectar a las articulaciones de las extremidades, son un signo frecuente en caso de brucelosis en algunos países tropicales y pueden ser el único indicador manifiesto de infección; el líquido de los higromas suele estar infectado por *Brucella*³.

1.2. Brucelosis ovina y caprina

La infección por *Brucella* en ovejas y cabras (excepto la infección por *B. ovis*) está causada principalmente por las biovariedades de *B. melitensis*. En ovejas y cabras se han observado infecciones esporádicas causadas por *B. abortus* o *B. suis*, pero estos casos son extremadamente infrecuentes. La infección por *B. melitensis* en ovejas y cabras es muy similar a la infección por *B. abortus* en ganado bovino. En la mayoría de los casos, las vías principales de transmisión de *Brucella* son la placenta, los líquidos fetales y las secreciones vaginales expulsadas por las ovejas y cabras infectadas, ya sea al abortar o al parir a término. La expulsión de *Brucella* también es frecuente en las secreciones de la ubre y en el semen, y puede aislarse *Brucella* de distintos tejidos, como los ganglios linfáticos de la cabeza, el bazo y los órganos asociados a la reproducción (útero, epidídimo y testículos), así como de lesiones artríticas³.

En cuanto a la *Brucella ovis*, infecta al ganado ovino causando lesiones genitales (epididimitis y orquiepididimitis) e infertilidad en los carneros, placentitis, abortos e infertilidad en las ovejas y un aumento de la mortalidad perinatal en los corderos. *Brucella ovis* suele excretarse con el esperma de los carneros infectados. La transmisión venérea pasiva a través de la oveja parece ser la vía de infección más frecuente, aunque también es muy frecuente la transmisión entre carneros. En los sistemas de producción semiextensivos, los carneros suelen alojarse juntos. Por lo tanto, la transmisión directa entre carneros durante los periodos no reproductivos es bastante frecuente y se ha sugerido que tiene lugar mediante varias vías, como la monta anal y, con mayor frecuencia, a través de contacto oro-genital (lamido de prepucio). Las ovejas infectadas pueden excretar *B. ovis* con las secreciones vaginales y la leche y, por lo tanto, la transmisión de oveja a carnero y de oveja en lactación a cordero también podrían ser mecanismos de infección importantes. Así, las ovejas deben considerarse relevantes en la epidemiología de esta infección, y ello debe tenerse en cuenta para erradicar de forma efectiva *B. ovis* de los rebaños infectados⁴.

Las especies *B. abortus* y *B. melitensis*, representan un riesgo potencial para la salud pública, no así *B. ovis*.

1.3. Prevención de Brucelosis bovina, ovina y caprina.

La vacunación con cepas de *B. abortus* vivas atenuadas ha sido eficaz para prevenir las infecciones por *B. abortus* en el ganado vacuno. Hasta hace poco tiempo, la cepa 19 (S19), una cepa lisa natural suave y atenuada de *B. abortus*, se había utilizado como vacuna para la brucelosis bovina. Similar a las cepas virulentas de *B. abortus*, el lipopolisacárido de S19 también contiene la cadena lateral O, que es responsable de una respuesta de anticuerpos inmunodominantes después de la vacunación o infección con cepas de campo. La vacunación con S19 suele causar la aparición de un título serológico transitorio de anticuerpos contra el antígeno de *Brucella O* y, en algunos bovinos vacunados, estos títulos de anticuerpos persisten. Por lo tanto, al menos en unos pocos casos, las técnicas serológicas convencionales no pueden utilizarse para distinguir claramente el ganado infectado en el campo del vacuno vacunado con S19. La cepa de vacuna de *B. abortus* RB51 es un mutante estable, rugoso y atenuado que se derivó de la cepa 2308, una cepa suave y virulenta de *B. abortus*. La vacuna RB51 fue aprobado en los Estados Unidos en 1996 para su uso como vacuna para el ganado, reemplazando a S19. Dado que el lipopolisacárido de *B. abortus* RB51 carece de cadena lateral O, los anticuerpos inducidos por la vacunación con esta cepa no interfieren con la serología convencional⁵.

La cepa viva atenuada *B. melitensis* Rev.1 se considera la mejor vacuna disponible para la profilaxis de la brucelosis en ovejas y cabras. Actualmente, la identificación de la cepa Rev.1 se realiza fenotípicamente por tres características inusuales en comparación con los aislados de campo de *B. melitensis* de tipo salvaje: crecimiento lento y colonias pequeñas en medio de agar, resistencia a la estreptomycinina e inhibición por penicilina. La vacunación subcutánea induce respuestas serológicas duraderas, causa interferencias fuertes con las pruebas serológicas y no debe recomendarse para su uso en programas de erradicación combinados³. Sin embargo, con la secuenciación de la cepa 16 M de *B. melitensis*, se pudo desarrollar en el 2002, una prueba molecular específica basada en la detección de mutaciones en el gen que codifica la proteína ribosómica S12, *rpsL*, en cepas vacunales Rev.1, facilitando la identificación de cepas vacunales aplicando técnicas de biología molecular, ya que las pruebas fenotípicas que se utilizan actualmente requieren mucho tiempo y solo las realizan laboratorios de referencia expertos⁶.

2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional y tiempo real, constituyen métodos adecuados para la detección e identificación de *Brucella spp.* Pese al alto grado de homología del ADN dentro del género *Brucella*, se han desarrollado varios métodos moleculares que permiten, hasta cierto punto, la diferenciación entre especies de *Brucella* y algunas de sus biovariedades, como la PCR, el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción ampliados mediante PCR (RFLP) y la transferencia Southern. También se ha desarrollado una electroforesis en gel de campo pulsante que permite la diferenciación entre varias especies de *Brucella*⁷.

Mediante el empleo de la PCR puede biotipificarse *Brucella* y pueden diferenciarse las cepas vacunales de cepas de campo, sin embargo la PCR se ha validado poco para el diagnóstico primario³.

La primera prueba de PCR múltiple específica de especie para la diferenciación de *Brucella* fue descrita por Bricker y Halling. La prueba, denominada PCR AMOS (*abortus-melitensis-ovis-suis*), se basaba en el polimorfismo resultante de la localización específica de especie, de la secuencia de inserción IS711 en el cromosoma de *Brucella* e incluía cinco cebadores oligonucleótidos que podían identificar, sin diferenciarlas, las biovariedades 1, 2 y 4 de *B. abortus*, pero no las biovariedades 3, 5, 6 y 9 de *B. abortus*. Con el tiempo, se han introducido modificaciones de la prueba para mejorar el rendimiento, y se han incorporado otros cebadores específicos de cepa para la identificación de las cepas vacunales de *B. abortus* y de otras biovariedades y especies. Se ha propuesto una nueva prueba de PCR múltiple (Bruce-ladder) para la identificación rápida y en un solo paso de *Brucella*. La principal ventaja de esta prueba respecto a las PCR descritas previamente es que permite identificar y diferenciar en un solo paso la mayoría de especies de *Brucella*, así como las cepas vacunales *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51. Además, mediante esta nueva PCR múltiple se pueden detectar las biovariedades 3, 5, 6 y 9 de *B. abortus*³.

Recientemente se han descrito otros procedimientos que permiten la identificación de todas las especies de *Brucella*, biovariedades de *B. suis* y cepas vacunales basados en la

discriminación por polimorfismo de nucleótido único (SNP) mediante la extensión de cebador, PCR en tiempo real o la reacción en cadena de la ligasa. Estas pruebas son rápidas, sencillas e inequívocas y, al basarse en un análisis filogenético robusto, ayudan a garantizar la especificidad de especie/biovariedad de los marcadores que se utilizan³.

También se han descrito otros métodos que pueden añadir información epidemiológica útil. Se trata de un esquema de secuenciación multilocus y de varios esquemas de tipificación basados en la utilización de análisis de repeticiones en tándem de un número variable de locus múltiples (MLVA). Dependiendo de los marcadores concretos escogidos, estos métodos permiten diferenciar las cepas a nivel de especie o incluso subclasificarlas pudiendo llegar a obtener información epidemiológica útil a nivel de subespecie³.

2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

2.1.1. Conceptos generales

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) fue desarrollada en el año 1983 por Kary Mullis. La PCR ha revolucionado la biología molecular y es en la actualidad una de las técnicas moleculares más utilizadas⁸⁻⁹.

El objetivo de esta técnica consiste es la amplificación *in vitro* enzimática de manera cíclica. Pudiendo ser directa a partir de un gen o un fragmento de Ácido Desoxirribonucleico (ADN), o indirecta de una ARN (Ácido Ribonucleico) a través de su ADN complementario o cADN, a partir de muestras de diversas fuentes¹⁰.

El proceso completo de una PCR convencional (Figura 1), incluye tres pasos, *antes de la PCR*, consiste en la extracción de los ácidos nucleicos utilizando kits comerciales o protocolos tradicionales, *durante la PCR*, preparación de la mezcla de reacción y amplificación que incluyen ciclos con etapas de desnaturalización, hibridación y extensión y *después de la PCR*, basado en el revelado de los productos de amplificación en gel de agarosa¹¹.

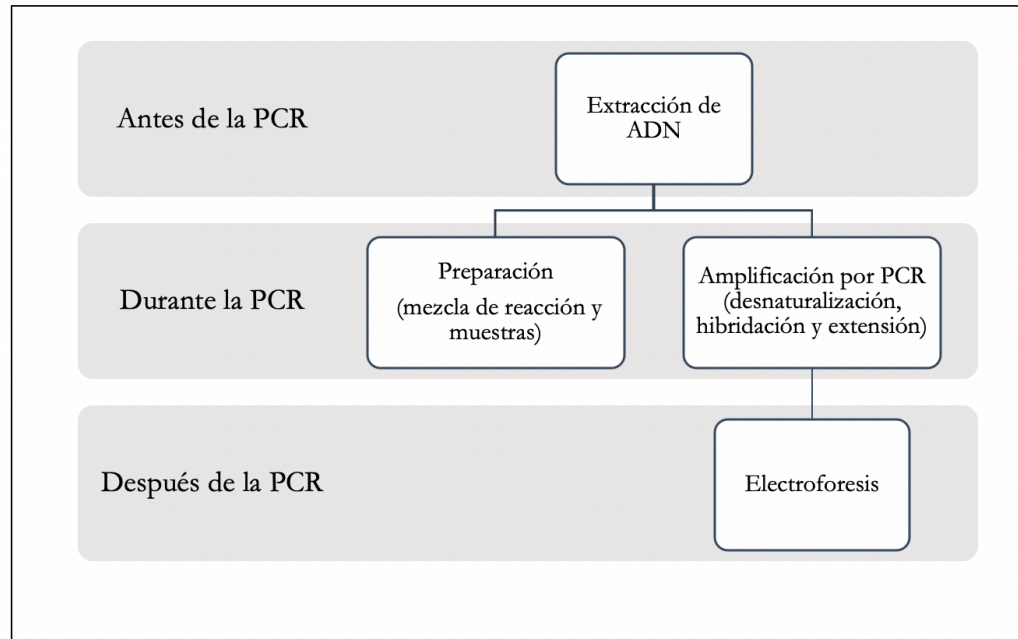


Figura 1. Esquema de los pasos de la técnica de PCR.

A su vez, cada ciclo de PCR consta de tres etapas, desnaturalización, hibridación y extensión, que se repiten de forma cíclica con variaciones en la cantidad de ciclos (entre 20 y 40), tiempo (de 1,5 a 5 minutos)¹⁰ y temperatura (95 °C y 60°C). A continuación, se describe que ocurre en cada etapa:

- (1) Desnaturalización: las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de Guanina y Citosina (G-C) es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de Adenina y Timina (A-T). Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso¹².

- (2) Hibridación: los cebadores se alinean al extremo 3' del templado o ADN molde previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-cebador, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura de melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60°C. Si el diseño de los cebadores es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente¹².
- (3) Extensión: en esta etapa, la Taq polimerasa (enzima) actúa sobre el complejo templado-cebador y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agregando desoxirribonucleótidos trifosforados (dNTP's) complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador¹².

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente en el caso de una PCR convencional, los amplicones deben ser visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa (Figura 2). La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser Tris Acetato EDTA (TAE) o TBE (Tris Borato EDTA). En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique. Generalmente el porcentaje al que se prepara el gel es al 1,2% aunque, dependiendo del tamaño de las moléculas, puede ser de hasta el 2%. Otro ingrediente que se agrega al gel es un compuesto conocido como bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Es esencial la utilización de un marcador de peso molecular o de tamaño que permite

tener una referencia de los tamaños del ADN en las muestras¹². Algunos de los más utilizados son: Lambda 1 kb ladder (Fermentas), GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas), y ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII*¹³.

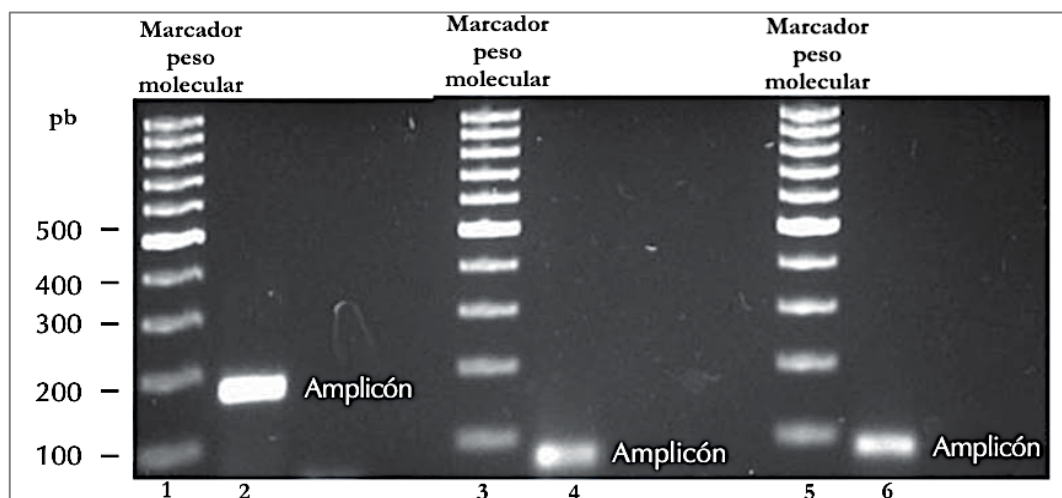


Figura 2. Imagen de un gel de agarosa. Los productos de PCR o amplicones están representados por bandas blancas. El carril 1, 3 y 5 corresponden al marcador de peso molecular de 1kb con un número de pares de bases (pb). El carril 2, 4 y 6, son productos de amplificación.

2.2. Pasos de la PCR para la detección molecular de *Brucella spp.*

2.2.1. Extracción de ADN de *Brucella spp.* a partir de aislamiento microbiológico.

Cualquier método aceptado de purificación de ADN sería adecuado. Sin embargo, un método simple y eficaz consiste en seleccionar una colonia y, utilizando un asa de siembra estéril, transferir las bacterias a 100 μ L de agua de grado PCR. Se debe hervir la suspensión bacteriana durante un mínimo de 5 minutos para matar a las bacterias y facilitar la lisis de la mayor parte de las mismas, permitiendo la obtención del ADN que será utilizado como molde en la reacción⁵.

2.2.2. Secuencias de cebadores o iniciadores para identificación de género, especies y cepas de vacuales de *Brucella*.

Los cebadores, oligonucleótidos, iniciadores o primers (inglés): son secuencias de ADN de cadena sencilla cortas, generalmente sintéticos, de 18 a 20 nucleótidos de longitud. Sus secuencias han de ser complementarias, uno de ellos complementario al extremo 5' de una cadena del ADN molde que hay que amplificar y el otro complementario al extremo 3' de la cadena opuesta de ADN molde, se denominan según la dirección con sentido o directo (*Forward*) y antisentido o inverso (*Reverse*). Es necesario que el cebador hibride con el ADN molde, para permitir el inicio de la reacción de extensión por parte de la enzima Taq polimerasa. Es necesario conocer las secuencias de los extremos para poder amplificar la región de ADN molde⁹⁻¹⁰. La información sobre las secuencias de los cebadores puede obtenerse mediante revisión de bases de datos, publicaciones científicas e inclusive puede diseñarse nuevos cebadores. En la Tabla 1, se describen algunos de los cebadores utilizados para la detección molecular del género, especies y cepas vacuales de *Brucella* mediante la técnica de PCR convencional

Tabla 1. Identificación, nombre, secuencia de cebadores y tamaño del amplicón.

| Identificación | Nombre | Secuencia de cebadores de 5' a 3' | Producto de amplificación | Ref. |
|--------------------------------|-----------------------------|---|---------------------------|------|
| Género <i>Brucella</i> | <i>BSCP31</i> | B4: TGGCTCGGTTGCCAATATCAA B5: CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG | 223 pb | 14 |
| <i>B. abortus</i> [*] | <i>eryC-eryD</i> | S19 -1: TTGGCGGCAAGTCCGTCGGT S19-2: CCCAGAAGCGAGACGAAACG | 361 pb 1063 pb | 1 |
| <i>B. abortus</i> RB51 | <i>whoA</i> <i>IS711</i> | Primer-1: TTAAGCGCTGATGCCATTTCC TTCAC Primer-2: TTTAGTTTGCCGTAATATAGGTCTAGAACCTGTC Primer-3: GCCAACCAACCCAAATGCTCACAA | 900 pb 1300 pb | 6 |
| <i>B. melitensis</i> | <i>IS711</i> | F: TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT R: -AAA TCGCGTCCTTGCTGGTCTGA | 731 pb | 15 |
| <i>B. melitensis</i> ** | <i>rpsLA</i> | F: GAGGGCTGACTCCGAATTTG R: ACGCTTCTCTGCCTTATGGC | 510 pb | 7 |
| <i>B. ovis</i> | | F: GCCTA CGCTGAAACTTGCTTTTG R: ATCCCC CCATCACCATAACCGAAG | 228 pb | 16 |

*Actualmente existen una gran cantidad de cebadores, fueron seleccionados algunos para la elaboración de este material.

**Permite la diferenciación de cepas de campo de cepa vacunal S19.

***Se utiliza con enzimas de restricción *Nal*.

2.2.3. Preparación de las muestras

Previo a la amplificación existe una fase de preparación de la mezcla de reacción debe realizarse dentro de una cabina de bioseguridad para evitar la contaminación de los reactivos. Dicha mezcla debe contener agua de calidad molecular, buffer, Cloruro de Magnesio (MgCl₂), desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP's), cebadores y enzima Taq ADN polimerasa. Se alícuota 20 µL, 25 µL o 50 µL en microtubos de 0,2 mL, para posteriormente realizar la carga del ADN molde, fuera de la cabina de seguridad. En la Tabla 2, se detalla cada reactivos, volumen y concentraciones.

Tabla 2. Reactivos, volúmenes y concentraciones finales usados para una reacción estándar de PCR.

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final | Volumen ** | Área **** |
|--------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------|
| Agua | n/a | n/a | 20,12 μL | Blanca |
| Buffer | 10X | 1X | 2,5 μL | |
| MgCl ₂ | 50 mM | 1,5 mM | 0,75 μL | |
| dNTP's | 10 mM | 100 μM | 0,25 μL | |
| Cebadores * | 20 μM | 0,1 μM | 0,13 μL | |
| Taq ADN polimerasa | 5 U/ μL | 1-2,5 U | 0,25 μL | Gris |
| ADN molde | | 10 ng. | 1 μL *** | |

*El calculo de la cantidad de cebadores debe realizar según la cantidad a utilizar, en este caso se utilizó un par de cebadores.

** Volumen calculado para una muestra de 25 μL .

***El volumen del ADN templado puede variar de 1 μL a 5 μL .

****Área donde se realiza la preparación de la mezcla de reacción y la carga del ADN molde.

En cualquier PCR es muy importante utilizar siempre un control negativo, un tubo que contenga todos los reactivos menos el ADN molde, para poder monitorear posibles contaminaciones¹¹.

También es recomendable usar un control positivo, que consiste en una muestra que sabemos amplifica sin problemas bajo las condiciones establecidas. Este control es muy útil para asegurarnos que los reactivos ocupados se encuentran en condiciones apropiadas¹¹.

A continuación se detallará cada una de las mezclas de reacción según los cebadores descritos en la Tabla 1.

Género *Brucella* spp.

Las muestras fueron testeadas en 20 μL de la mezcla de reacción que contenía 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCL pH 8,4, 1mM MgCl₂, 100 $\mu\text{L ml}^{-1}$ gelatina, 200 μM de cada dNTP's, 500 nM de cada par de cebadores y 0,5 unidades de Taq polimerasa (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Connecticut)¹⁴.

Brucella abortus.

La mezcla de reacción tanto para diferencias cepas testigo de cepas vacunales se realizó en un volumen total de 50 μL que contenía 1 X buffer de PCR, 1mM de MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP's, 1 μM de cada cebador y 2 unidades de Taq Polimerasa¹.

Cepa vacunal de *B. abortus* RB51.

El volume total fue de 25 μL , conteniendo 0,5 μM de cada cebador en Ready-To-Go PCR⁶.

Brucella mellitensis.

La mezcla de reacción contenía 25 μL de agua libre de nucleasas, 12,5 mL de 2X PCR master mix (Fermentas, USA), 100 nM de cada cebador y 1 mg DNA molde¹⁵.

Cepa vacunal de *B. mellitensis* Rev 1.

El volumen total de la mezcla de reacción fue de 100 μL que contenía 0,1% Triton X-100 (1X PCR buffer, Promega), 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP's, a 1 μM de cada cebador y 5 unidades de *Taq* DNA polymerase (Promega) y 100 ng de ADN genómico⁷.

Brucella ovis.

La mezcla de reacción fue de 31 μL , conteniendo 22 μL of PCR supermix (Invitrogen) con 1,65 mM MgCl_2 , suplementado con 50 mM MgCl_2 , 25 mM de cada cebador y 200-500 ng de ADN molde¹⁶.

2.2.4. Amplificación por PCR

Incluyen ciclos, y en cada ciclo se realiza sucesivos etapas de desnaturalización, hibridación y extensión (*véase página 7-8*), generalmente estas etapas se repiten entre 25 y 35 veces, dentro de equipo llamado termociclador, el cuál es programado según la cantidad de ciclos, temperatura y tiempo de duración.

Las condiciones de amplificación para cada cebador descrito anteriormente, se detallan a continuación.

Género *Brucella* spp.

El termociclador fue programado con una etapa inicial de desnaturalización a 93°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 90°C, hibridación 60°C y extensión a 72°C. Y extensión final a 72°C por 10 minutos¹⁴.

Brucella abortus.

Los ciclos de reacción para la PCR fueron, etapa inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación 59°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Y extensión final a 72°C por 2 minutos¹.

Cepa vacunal de *B. abortus* RB51.

Las condiciones de amplificación fueron de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C, hibridación a 62°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1,5 minutos⁶.

Brucella mellitensis.

El perfil de la PCR fue realizado en un termociclador (iCycler, Bio-Rad, USA), con las siguientes condiciones, desnaturalización inicial a 95°C, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 64°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos. Y una extensión final a 72°C por 7 minutos¹⁵.

Cepa vacunal de *B. mellitensis* Rev 1.

La temperatura de ciclado para la amplificación fue programada en un termociclador (iCycler Biorad) siendo las siguientes, desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 55°C por 45 segundos y extensión a 70°C por 45 segundos. Y extensión final a 70°C por 10 minutos⁷.

Brucella ovis.

Los parámetros del ciclado fueron de una etapa inicial de desnaturalización a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minutos. Y extensión final a 72°C por 6 minutos¹⁶.

2.2.5. Revelado de los productos en gel de agarosa

La manera más común de evaluar si se logró una amplificación exitosa es a través de la visualización del fragmento amplificado mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida (*véase página 8*) se recomienda cargar el 50% del volumen del control negativo con el objetivo de visualizar cualquier amplificación que nos pueda dar indicio de una probable contaminación de los reactivos de PCR. En caso de que no haya producto amplificado o que éste tenga un bajo rendimiento, se recomienda cambiar las condiciones de la PCR (temperatura y concentraciones de los reactivos), así como supervisar el correcto funcionamiento del termociclador¹¹.

En las siguientes figuras se visualizará el gel correspondiente al amplicón de cada gen o fragmento. En toda electroforesis debe utilizarse marcador de peso molecular o tamaño (*véase página 9*).

Género *Brucella* spp.

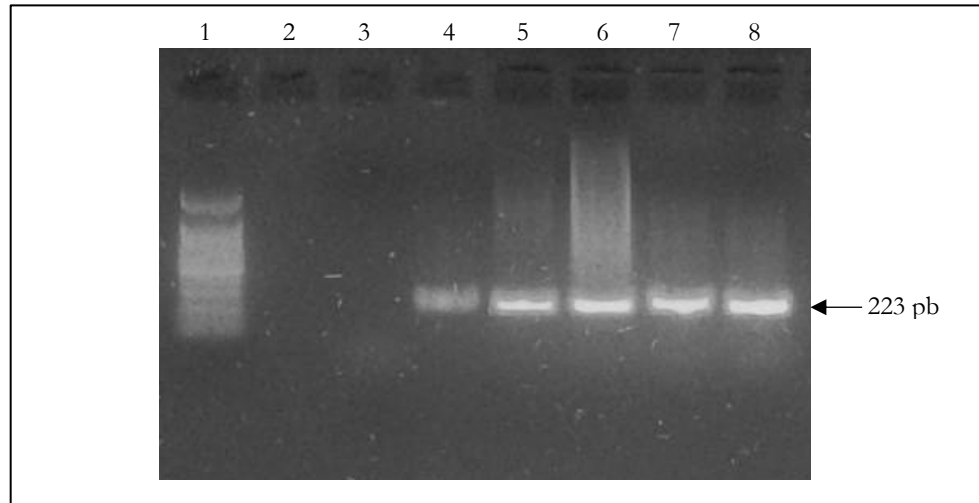


Figura 3. Productos de PCR visualizados en gel de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio. Carril (1): marcador de peso molecular de 1kb , Carril (2): vacío, Carril (3): control negativo, Carriles (4), (5), (6), (7) y (8): muestras positivas a *Brucella* spp. Con la flecha se señala el producto característico de 223 pb. amplificado a partir del gen BSCP3.

Brucella abortus.

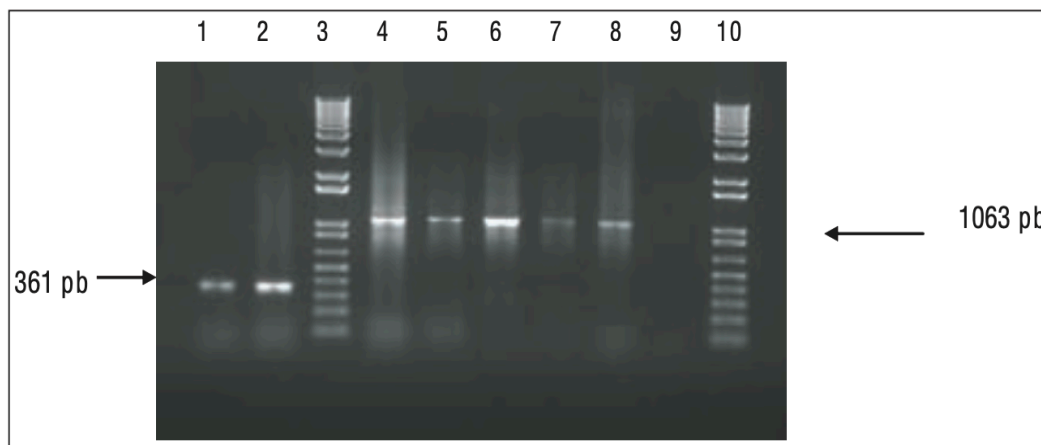


Figura 4. Productos de PCR visualizados en gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Carril (1): *B. abortus* S19 (Brovel) , Carril (2): *B. abortus* S19 (Pronabive), Carril (3): marcador de peso molecular 1 kb, Carril (4): *B. abortus* 2308, Carril (5): *B. abortus* 544, Carril (6): *B. abortus* RB51 (EU) , Carril (7): *B. abortus* RB51 (Pronabive), Carril (8): *B. abortus* RB51 (Schering Plough), Carril (9): control negativo, Carril (10): marcador de peso molecular 1 kb. Las flechas señalan el producto característico de 361 pb. característico de la cepa S19 *B. abortus* y el producto de 1063 pb. amplificado a partir de cepas diferentes a ésta.

Cepa vacunal de *B. abortus* RB51.

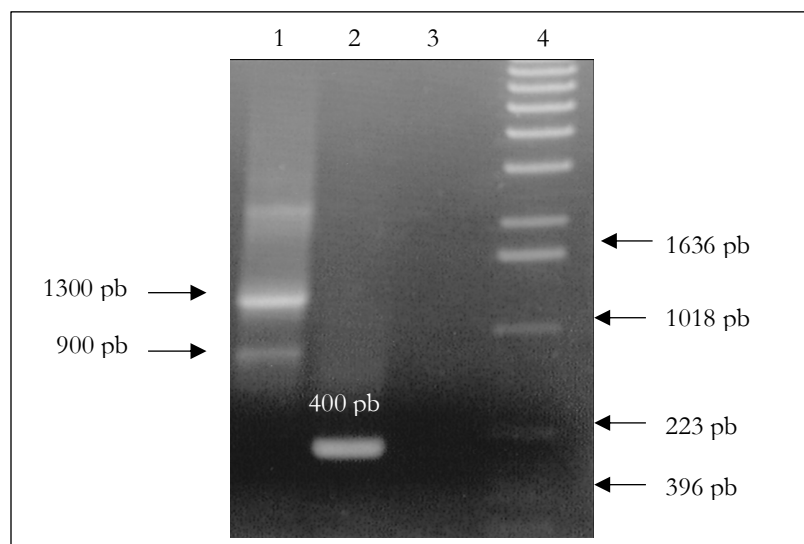


Figura 5. Productos de PCR visualizados en gel de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio. Carril (1): *B. abortus* RB51 (vacunal), Carril (2): *B. abortus* cepa 2308, Carril (3): control negativo, Carril (4): marcador de peso molecular de 1kb. Las flechas de la izquierda señalan el producto característico de 900 pb y 1300 pb característico de la *B. abortus* RB51 y el producto de 400 pb. amplificado a partir de cepa 2308. Es posible la diferenciación de la cepa RB51 de su parental la cepa 2308.

Brucella melitensis.

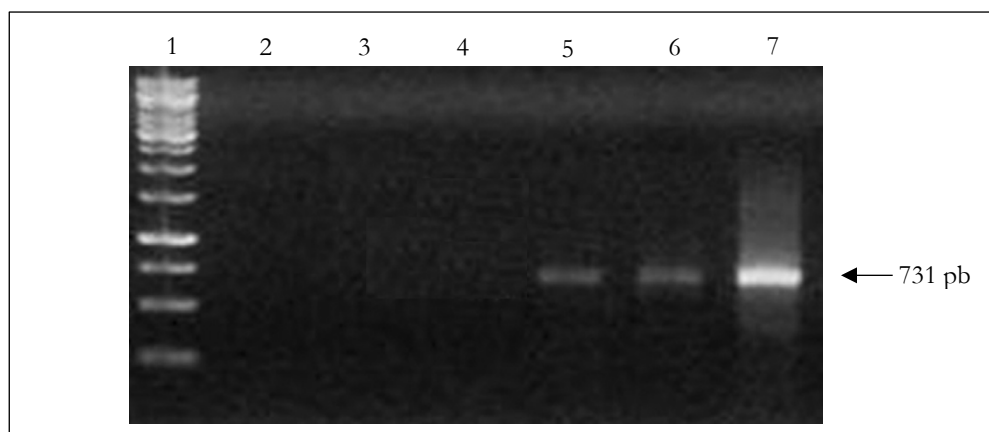


Figura 6. Productos de PCR visualizados en gel de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio. Carril (1): marcador de peso molecular de 1kb, Carril (2): control negativo, Carril (3): ADN de *E. coli*, Carril (4): *B. abortus*, Carril (5): muestras de ADN positivas a *B. melitensis* Carril (6): Carril (7): control positivo de cepa de *B. melitensis* 16 M. La flecha de la derecha señala el producto de 731 pb característico de la *B. melitensis* 16 M.

Cepa vacunal de *B. melitensis* Rev.1.

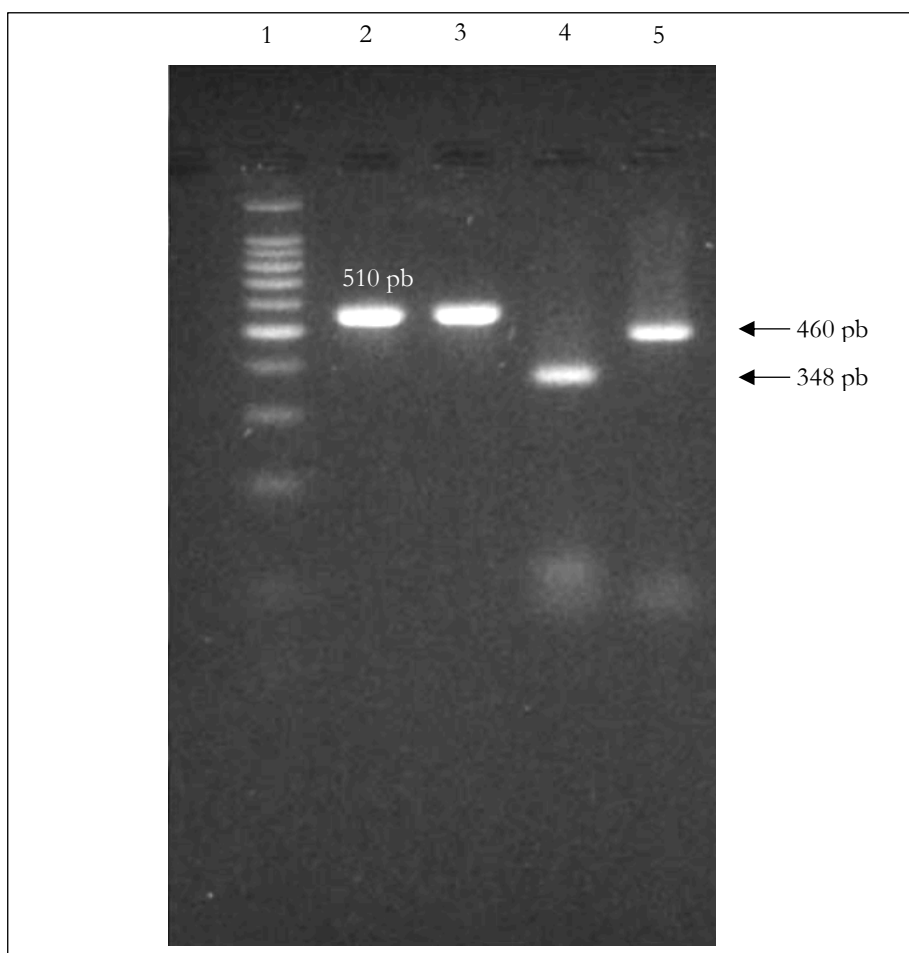


Figura 7. Productos de PCR-RFLP del gen *rpsL* digeridos con enzimas de restricción *NciI* visualizados en gel de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio. Carril (1): marcador de peso molecular de 1kb, Carriles (2) y (3): productos de PCR no digeridos, Carril (4): *B. melitensis*, Carril (5): cepa vacunal Rev.1. Las flechas de la derecha señala el producto de 460 pb de la cepa vacuna Rev.1 y 438 pb de *B. melitensis*.

Brucella ovis.

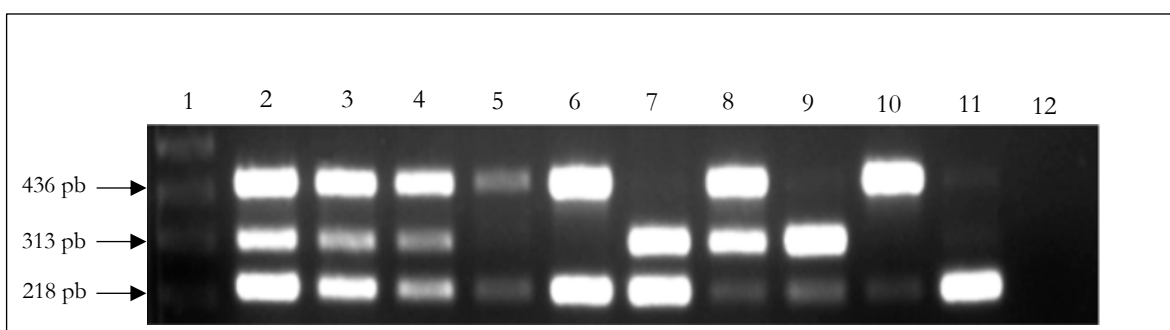


Figura 8. Productos de PCR multiplex visualizados en gel de agarosa al 1,8%. Carril (1): marcador de peso molecular de 1kb, Carril (2): concentración de ADN 200 ng , Carril (3): concentración de ADN 20 ng , Carril (4): concentración de ADN 2 ng, Carril (5): concentración de ADN 0,2 ng, Carril (6): concentración de ADN de arriba abajo (200, 2 y 200 ng), Carril (7): concentración de ADN de arriba abajo (2, 200 y 200 ng), Carril (8): concentración de ADN de arriba abajo (200, 200 y 20 ng), Carril (9): concentración de ADN de arriba abajo (2, 200 y 2 ng), Carril (10): concentración de ADN de arriba abajo (200, 2 y 2 ng), Carril (11): concentración de ADN de arriba abajo (2, 2 y 200 ng), Carril (12): control negativo. Las flechas de la derecha señala el producto de 218 pb de *B. ovis*, 313 pb de *Actinobacillus seminis* y 436 pb *Histophilus somni*.

3. CONCLUSIONES

En este material se resume la aplicación de la PCR convencional como herramienta para el diagnóstico de las diferentes especies de *Brucella* en rumiantes. La utilización de métodos basados en PCR son de gran utilidad, pues permiten la diferenciación de cepas de campo de las vacunales S19, RB51 y Rev.1, lo cuál no es posible mediante técnicas serológicas.

Si bien, el cultivo microbiológico es el “gold” estándar para el diagnóstico de Brucelosis, la PCR permite la identificación en menos tiempo y son más prácticos que los métodos tradicionales. Sin embargo, un punto de gran importancia es la calidad y pureza del ADN, teniendo en cuenta que cualquier inhibidor presente en las muestras alterarían los resultados dando reacciones falsas negativas. Las reacciones falsas positivas resultantes de la contaminación de la muestra o el arrastre de amplicones también requieren atención. Existe una gran cantidad de trabajo necesario para la verificación, validación, establecimiento de controles estándar positivo y negativo, control interno y de inhibición, reactivos, garantía de calidad y contaminación, antes de que cualquiera de los métodos basados en PCR pueda emplearse como prueba laboratorial de rutina para el diagnóstico de Brucelosis¹⁷.

Referencias.

1. Martínez-Chavarría L, Verdugo-Rodríguez A, Hernández Castro R. Identificación de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19 en muestras de leche de vaca. Vet. Méx. [Internet]. 2006 may 23; 37 (4): 479-486. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2006/vm064g.pdf>
2. Ocampo-Sosa A, Agüero-Balbín J, García-Lobo J. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. Vet. Micr. [Internet]. 2005 jun 9; 110: 41-51. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16029934/>
3. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). Brucellosis: *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*. Infección por *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*). En: Manual Terrestre de la OIE. Cap.3.1.4. OIE: Madrid; 2018.
4. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). *Brucella ovis*. En: Manual Terrestre de la OIE. Cap. 3.7.7. OIE: Madrid, 2018.
5. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). Brucellosis bovina. En: Manual Terrestre de la OIE. Cap. 2.3.4. OIE: Madrid; 2008.
6. Vemulapalli R, Mcquiston J, Schurig G, Sriranganathan N, Halling S, Boyle S. 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. Immunol. [Internet]. 1999 jun 22; 6 (5): 760-764. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC95769/>
7. Cloeckaert A, Grayon M, Grépinet O. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. Vaccine [Internet]. 2002 feb 21; 20: 2546-2550. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12057611/>
8. Pierce B. Fundamentos de genética: conceptos y relaciones. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2011. 536 p.
9. Klug W, Cummings M, Spencer C, Palladino M. Conceptos de genética. 10ª. Madrid: Pearson Educación; 2013. 992 p.
10. Luque J, Herráez A. Biología molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la Salud. Madrid: Elsevier; 2006. 469 p.
11. Serrato-Díaz A, Florez-Rentería Ll, Aportela-Cortez J, Sierra-Palacios E. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. En: Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales: México; 2014. p. 53-73.
12. De Dios T, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Medigraphic. [Internet]. 2008 ag. sf. ; 2: 70-78. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>

13. Fierro F. Electroforesis de ADN. En: Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales: México; 2014. p. 27-51.
14. Baily G, Krahn J, Drasar B, Stoker N. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg. [Internet]. 1992 sf.; 95: 271-275. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1495123/>
15. Garshasbi M, Sorouri R, Javani S, Moradi S. Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Irán. Braz. J. Microb. [Internet]. 2014 set 09; 45 (2): 533-538. Disponible en: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822014005000048&script=sci_arttext
16. Moustacas V, Silva T, Costa L, Xavier M, Carvalho C, Costa E, Paixão T, Santos R. Species-specific multiplex for the of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus sonmi* infection in rams. BMC. Vet. Res. [Internet]. 2013 sf.; 9 (51): 8. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/51>
17. Wei-Ling K. Review of detection of *Brucella spp.* By Polymerasa Chain Reaction. Croat. Med. J. [Internet]. 2010 ag 9; 51 (4): 306-313. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20718083/>

Fuente de Figuras

Figura 1. Modificado de Serrato-Díaz A, Florez-Rentería Ll, Aportela-Cortez J, Sierra-Palacios E. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. En: Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales: México; 2014. p. 53-73.

Figura 2. De Dios T, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Medigraphic. [Internet]. 2008 ag. sf.; 2: 70-78. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

Figura 3. Modificado a partir de gel de agarosa obtenido en el “Curso teórico-práctico sobre técnicas moleculares (PCR) para diagnóstico y tipificación de *Brucella*”. Organizado en el marco del Proyecto PINV 15-377, financiado con por el CONACYT.

Figura 4. Martínez-Chavarría L, Verdugo-Rodríguez A, Hernández Castro R. Identificación de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19 en muestras de leche de vaca. Vet. Méx. [Internet]. 2006 may 23; 37 (4): 479-486. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2006/vm064g.pdf>

Figura 5. Modificado de Vemulapalli R, Mcquiston J, Schurig G, Sriranganathan N, Halling S, Boyle S. 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. Immunol. [Internet]. 1999 jun 22; 6 (5): 760-764. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC95769/>

Figura 6. Modificado de Garshasbi M, Sorouri R, Javani S, Moradi S. Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Irán. Braz. J. Microb. [Internet]. 2014 set 09; 45 (2): 533-538. Disponible en: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822014005000048&script=sci_arttext

Figura 7. Modificado de Cloeckert A, Grayon M, Grépinet O. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. Vaccine [Internet]. 2002 feb 21; 20: 2546-2550. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12057611/>

Figura 8. Modificado de Moustacas V, Silva T, Costa L, Xavier M, Carvalho C, Costa E, Paixão T, Santos R. Species-specific multiplex for the of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus sonmi* infection in rams. BMC. Vet. Res. [Internet]. 2013 sf.; 9 (51): 8. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/51>