



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TITULO:

“IMPLEMENTACIÓN Y EVALUACIÓN DEL ENSAYO AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR UN LAZO (LAMP) PARA DETECCIÓN DE *BRUCELLA ABORTUS* EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE BOVINOS.”

TESIS DE GRADO, PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL
TITULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

AUTORA: Doris Alexandra Chuva Coyago

CI: 0106477235

DIRECTOR: Mvz. Antonio Javier Vallecillo Maza, PhD

CI: 0151059417

CUENCA, ECUADOR

2017

I. RESUMEN

Brucelosis bovina es una enfermedad infecto-transmisible provocada por *Brucella abortus* que se caracteriza por afectar principalmente al tracto reproductivo de hembras adultas. Esta enfermedad causa grandes impactos en el sector económico y representa una gran problemática en la salud pública. En el presente trabajo se planteó implementar un ensayo LAMP empleando material genético de las cepas vacunales de *B. abortus* RB51 y S19 inoculado y extraído de muestras de leche ($1 \times 10^6 - 1 \times 10^0$ UFC/ml leche) y tejidos de nódulos linfáticos ($10 \times 10^6 - 10 \times 10^0$ UFC/g tejido) de bovinos, posteriormente evaluar la sensibilidad analítica recurriendo a diferentes métodos de detección. Lográndose obtener ADN de *B. abortus* susceptible de ser amplificado en las muestras de leche, estableciendo un nivel de sensibilidad analítica mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio de 10 UFC/ml de leche, y la misma sensibilidad mediante el uso de SYBR green para la detección de fluorescencia, con éste colorante bajo luz natural se observó un cambio de color del naranja al verde así como un aumento de fluorescencia en las muestras positivas. En lo que respecta a tejidos inoculados con las cepas vacunales se observó gran variabilidad en la amplificación del ADN total por lo que no se obtuvo un ensayo confiable al aplicar el método LAMP para la detección de *B. abortus* presumiéndose la presencia de inhibidores de origen endógeno en los tejidos de nódulos linfáticos.

Palabras clave: Brucelosis bovina, Diagnóstico, LAMP, Sensibilidad analítica, Leche.

II. ABSTRACT

Bovine brucellosis is an infectious-transmissible disease caused by *Brucella abortus*, which is characterized by mainly affecting the reproductive tract of adult females. This disease causes great impacts in the economic sector and represents a great problem in public Health. In the present work we proposed to implement a LAMP assay using genetic material from the *B. abortus* RB51 and S19 vaccine strains inoculated and extracted from bovine milk (1×10^6 - 1×10^0 CFU/ml milk) and lymph node (10×10^6 - 10×10^0 UFC/g tissue) samples, and then evaluate the analytical sensitivity using different detection methods. Obtaining DNA from *B. abortus* susceptible to being amplified in the milk samples, establishing a level of analytical sensitivity by agarose-TAE gel electrophoresis stained with Ethidium bromide of 10 CFU/ml milk, and the same sensitivity by use SYBR green for fluorescence detection, with this dye under natural light was observed a change of color from orange to green as well as an increase of fluorescence in the positive samples. As regards tissues inoculated with the vaccine strains, great variability was observed in the amplification of the total DNA. Therefore, it did not obtain a reliable assay when applying the LAMP method for the detection of *B. abortus* presuming the presence of inhibitors of endogenous origin in the tissues of lymph nodes.

Key words: Bovine brucellosis, Diagnosis, LAMP, Analytical sensitivity, Milk.

III. INDICE

Número:	Contenido:	Página:
I	RESUMEN	1
II	ABSTRACT	2
III	INDICE	3
IV	INDICE DE FIGURAS	6
V	INDICE DE TABLAS	7
VI	INDICE DE ANEXOS	7
VII	ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA	8
1	INTRODUCCIÓN	13
1.1	Objetivos general	14
1.2	Objetivos específicos	14
1.3	Pregunta de investigación	15
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	16
2.1	Brucelosis	16
2.1.1	Antecedentes	17
2.2	Brucelosis bovina	17
2.2.1	Etiología	18
2.2.2	Sinonimia	19
2.2.3	Transmisión	19
2.2.4	Patogenia	20
2.2.5	Signos clínicos	21
2.2.5.1	Salud pública	21
2.2.6	Diagnóstico de la Brucelosis bovina	23
2.2.6.1	LAMP	24
2.2.7	Prevención y control	26
2.2.7.1	Vacuna cepa S19 de <i>B. abortus</i> .	26
2.2.7.2	Vacuna cepa RB51 de <i>B. abortus</i> .	27
3	MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1	Colecta, conservación, transporte y almacenado de las muestras biológicas (leche/tejidos).	28
3.1.1	Materiales	28
3.1.2	Métodos	29

3.2	Dilución de las cepas vacunales de <i>B. abortus</i> (S19, RB51) e inoculación en las muestras biológicas (leche/tejidos)	29
3.2.1	Materiales	29
3.2.2	Métodos	30
3.3	Procesamiento de las muestras biológicas inoculadas: extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) total de <i>B. abortus</i> .	32
3.3.1	Materiales	32
3.3.2	Métodos	33
3.4	Amplificación del ADN de <i>B. abortus</i> mediante el ensayo LAMP	35
3.4.1	Materiales	35
3.4.2	Métodos	37
3.5	Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio, la detección de fluorescencia con SYBR green y Calceína y cambio de color mediante el uso de Azul de hidroxinaftol	39
3.5.1	Electroforesis en gel agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio	39
3.5.1.1	Materiales	39
3.5.1.2	Métodos	40
3.5.2	Detección de la fluorescencia con SYBR green	40
3.5.2.1	Materiales	40
3.5.2.2	Métodos	41
3.5.3	Detección de fluorescencia con Calceína	41
3.5.3.1	Materiales	41
3.5.3.2	Métodos	41
3.5.4	Cambio de color mediante el uso de Azul de hidroxinaftol	42
3.5.4.1	Materiales	42
3.5.4.2	Métodos	42
3.6	Análisis y fotodocumentación de los resultados	43



	generados por el ensayo LAMP.	
3.6.1	Materiales	43
3.6.2	Métodos	43
3.7	Análisis estadístico	44
4	RESULTADOS	45
4.1	Preparación de las muestra	45
4.2	Extracción de ADN total	45
4.3	Verificación de ausencia de ADN de <i>B. abortus</i> .	47
4.4	Evaluación de la sensibilidad analítica del ensayo LAMP en las curvas realizadas tanto de leche como de tejidos mediante electroforesis en gel agarosa TAE teñido con Bromuro de Etidio, la detección de fluorescencia con SYBR green y Calceína y cambio de color mediante el uso de Azul de hidroxinaftol.	47
4.4.1	Verificación de la amplificación de ADN de <i>B. abortus</i> mediante el ensayo LAMP	47
4.4.2	Electroforesis en gel agarosa TAE teñido con Bromuro de Etidio	48
4.4.3	Detección de fluorescencia con SYBR green	49
4.4.4	Detección de fluorescencia con Calceína	50
4.4.5	Detección por cambio de color con Azul de Hidroxinaftol	50
4.5	Análisis estadístico	51
5	DISCUSIÓN	52
6	CONCLUSIONES	55
7	RECOMENDACIONES	56
8	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	57
9	ANEXOS	62

IV. INDICE DE FIGURAS:

Número:	Gráfico o Figura:	Página:
Figura 1	Oligonucleótidos de LAMP. Primers internos (FIP, BIP), primers externos (F3, B3), primers bucle o lazo (LF, LB).	12
Figura 2	Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de los productos de PCR correspondientes al control de proceso en leche.	34
Figura 3	Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de los productos de PCR correspondientes al control de proceso en tejidos.	34
Figura 4	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de LAMP correspondientes a las cepas vacunales.	35
Figura 5	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de LAMP correspondiente a las cepas vacunales de <i>B. abortus</i> en leche.	36
Figura 6	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de LAMP correspondiente a las cepas vacunales de <i>B. abortus</i> en tejidos.	37
Figura 7	Productos de LAMP con SYBR green correspondiente a las cepas vacunales de <i>B. abortus</i> en leche.	37
Figura 8	Productos de LAMP con Azul de Hidroxinaftol correspondiente a las cepas vacunales de <i>B. abortus</i> en leche	38
Figura 9	Productos de LAMP con Azul de hidroxinaftol + MgSO ₄ correspondiente a las cepas vacunales de <i>B. abortus</i> en leche	39

V. INDICE DE TABLAS:

Número:	Tabla:	Página:
Tabla 1	Especies de Brucella que están integradas por biotipos.	4
Tabla 2	Resultados de las inoculaciones y diluciones de las cepas vacunales de S19 y RB51 en leche.	36

VI. INDICE DE ANEXOS

Número:	Anexos:	Página:
Anexo 1	Formato de ensayo de PCR para la amplificación del control de proceso.	49
Anexo 2	Formato del ensayo LAMP para la amplificación de material genético de <i>B. abortus</i> .	50

VII. ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

bp:	pares de bases del inglés base pairs.
Cat.:	catálogo.
g:	gramo.
g:	gravedad.
HCl:	Ácido clorhídrico.
h:	horas.
Kbp:	kilobase.
M:	molar.
ml:	mililitros.
mg:	miligramos.
min:	minutos.
mM:	milimolar.
NaCl:	Cloruro de Sodio.
ng:	nano gramos.
No:	número.
pH:	potencial de hidrogeno.
rpm:	revoluciones por minuto.
s:	segundos.
µg:	microgramos.
µM:	micromolar.
U:	unidades.
µl.:	Microlitros
v/v:	volumen/volumen.

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Doris Alexandra Chuva Coyago, autora del trabajo de titulación "Implementación y evaluación del ensayo amplificación isotérmica mediada por un lazo (LAMP) para detección de *Brucella abortus* en muestras biológicas de bovinos", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, a 14 de noviembre de 2017.



Doris Alexandra Chuva Coyago

CI: 0106477235

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Doris Alexandra Chuva Coyago, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Implementación y evaluación del ensayo amplificación isotérmica mediada por un lazo (LAMP) para detección de *Brucella abortus* en muestras biológicas de bovinos”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, a 14 de noviembre de 2017.



Doris Alexandra Chuva Coyago

CI: 0106477235



DEDICATORIA

A Dios por su infinito amor, bondad, y misericordia, me permitió culminar una etapa más en mi vida.

De igual manera, con mucho amor orgullo, y agradecimiento dedico esta tesis a mis padres Miguel y Narcisa, quienes supieron brindarme constantemente su apoyo y amor incondicional durante toda mi carrera profesional y por sus grandes consejos que me permiten llegar hasta este punto de mi vida y ser una persona de bien.

A mi esposo Olger por la paciencia y el amor que me brindo para poder realizar una meta más en mi vida.

A mis hermanos Cecilia y Franklin quienes me han impulsado a seguir adelante cada día.

DORIS ALEXANDRA CHUVA COYAGO



AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy exclusiva al Dr. Antonio J. Vallecillo, Director del presente trabajo de investigación por su ayuda ilimitada y por su tiempo invertido para que este trabajo culminara. A la Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias – Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al laboratorio de Biología Molecular de ya mencionada institución. A mis compañeras/os de laboratorio, gracias por los momentos que compartimos día a día y por la ayuda brindada.

DORIS ALEXANDRA CHUVA COYAGO



1. INTRODUCCIÓN

Brucelosis bovina está provocado por *B. abortus*, es una enfermedad infecto-transmisible de distribución mundial. Se caracteriza por afectar al tracto reproductivo de hembras adultas ocasionando abortos en el último tercio de la gestación, reducción en la producción láctea, metritis, mastitis, y en los machos produce orquitis y artritis, en ambos sexos provoca una disminución de la fertilidad.

Los impactos primordiales de esta enfermedad, es el económico y la zoonosis que representa una gran problemática en la salud pública, corriendo peligro granjeros, veterinarios, personal de camales, laboratoristas que pueden contraer la infección al manipular fetos abortados, secreciones uterinas, etc., y el público en general quienes pueden contraer la infección al consumir leche y queso no procesado correctamente por medios como la pasteurización o ebullición. En el Ecuador, las pérdidas se estiman en aproximadamente 5.5 millones de dólares por año a causa de la reducción en la producción de leche, muertes fetales y del neonato y por el costo de reemplazo de los animales infectados.

La vacunación es uno de los medios para prevenir los problemas que implica la presencia de esta enfermedad en un hato; en nuestro país Ecuador existen dos cepas vacunales S19 y RB51. La cepa vacunal S19 induce la formación de anticuerpos contra el LPS “O” bacteriano por lo que su uso presenta dificultades de carácter diagnóstico debido a que las pruebas serológicas de rutina no logran distinguir animales vacunados de infectados, mientras que la cepa vacunal RB51 carece de la cadena “O” de polisacárido por lo tanto descarta la presencia de los anticuerpos detectables tanto en sangre como en leche. Sin embargo, se ha determinado que puede causar placentitis, endometritis e infección fetal, en vaquillas adultas que han sido vacunadas durante la preñez.

Para proceder a un control y una posible erradicación de esta enfermedad en la población bovina es necesario aplicar técnicas diagnósticas. Existen pruebas indirectas como las pruebas serológicas (Rosa de Bengala, Test de fijación de Complemento, ELISA y Prueba de seroaglutinación lenta en tubo) y pruebas de Ring-Test en leche. Están también los métodos directos como cultivo e

identificación que significa gran riesgo para el personal ya que implica trabajar con microorganismos viables en grandes cantidades y están las técnicas de biología molecular como PCR (prueba de reacción en cadena de la polimerasa) y LAMP (método de amplificación isotérmica mediado por Lazo).

En la actualidad en el Ecuador no se cuenta con técnicas diagnósticas sensibles, específicas y sobre todo seguras para el personal, es por ello que se intenta implementar una técnica de biología molecular como lo es LAMP que amplifica el ADN diana presente en las muestras ya sea de leche o tejidos en condiciones isotérmicas (60-65°C) y no requiere el uso de un termociclador, además se puede leer los resultados a simple vista por la turbidez o por cambio de color asociado a reactivos propios de la reacción; resultando una técnica segura, poco costosa y de fácil aplicación provocando que LAMP pueda llegar a regiones donde es de difícil acceso por su facilidad de traslado y en donde los recursos económicos son bajos, al mismo tiempo se evitaría resultados falsos positivos con lo que se ayudaría a detectar el estado de salud de la población animal bovina; evitando perder animales y la producción no se verá afectada por esta enfermedad elevando tanto el nivel productivo como reproductivo del área ganadera. Mencionado todos estos antecedentes se planteó los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo general

Implementar un ensayo de amplificación isotérmica mediada por un lazo (LAMP) y evaluar su sensibilidad analítica en la detección de material genético específico de *Brucella abortus* en muestras de leche o tejidos de nódulos linfáticos de bovinos.

1.2. Objetivos específicos

Implementar el ensayo de LAMP reportado por Kang y colaboradores (Kang, *et. al.*, 2015), empleando material genético de las cepas vacunales de *Brucella abortus* RB51 y S19.

Evaluar la sensibilidad analítica de LAMP empleando diluciones de material genético de las cepas vacunales de *Brucella abortus* RB51 o S19 mediante el uso de electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio, la



detección de fluorescencia con SYBR green y Calceína y cambio de color mediante el uso de Azul de Hidroxinaftol.

Evaluar la sensibilidad analítica de LAMP y el efecto de matriz empleando muestras de tejidos de nódulos linfáticos de bovinos y leche inoculados con diluciones de las cepas vacunales de *Brucella abortus* RB51 o S19 y los dos métodos con mayor sensibilidad en la detección de las amplificaciones.

1.3. Pregunta de investigación.

¿Cuál es la sensibilidad analítica del ensayo LAMP, comprendida esta como la cantidad mínima de unidades formadoras de colonias que pueden ser detectados de manera consistente por mililitro de leche o gramo de tejido?

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Brucelosis

La Brucelosis es considerada según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como una de las zoonosis más extendidas a nivel mundial (1). La OIE ha catalogado a esta enfermedad como la segunda más importante en el mundo después de la Rabia (2). Es una enfermedad causada por bacterias Gram negativas del género *Brucella*, en el que se incluyen doce especies, se distinguen por su especificidad de hospedero y su antigenicidad, las Brucelas son: *Brucella abortus* (*B. abortus*) (bovinos), *B. melitensis* (caprinos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (caninos), *B. suis* (porcinos), *B. neotomae* (roedores), *B. microti* (roedores), *B. pinnipedialis* (pinnípedos), *B. ceti* (cetáceos) y *B. inopinata* (aislados de los humanos) (3), *B. vulpis* aislado de los zorros rojos (específicamente de nódulos linfático mandibulares) en Austria (4) y *B. papionis* aislado de babuinos (de la muerte fetal de un primate) en Texas-EE.UU (5). Algunas especies de *brucella* están subdivididas en biotipos o biovares las cuales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Especies de *brucella* que están integradas por biotipos.

	<i>Biotipos</i>	<i>Referencia</i>
<i>B. melitensis</i>	1	(3,6,7)
	2	
	3	
<i>B. abortus</i>	1	(3,6,7)
	2	
	3	
	4	
	5	
	6	
	7	
	9	
<i>B. suis</i>	1	(3,6,7).
	2	
	3	
	4	
	5	

Las especies de *brucella* que son altamente patogénicas para humanos son: *B. abortus*, *suis*, *melitensis*, *canis* (7,8), por lo que todos los tejidos y materiales

potencialmente infectados deben ser manipulados en condiciones de máxima seguridad biológica para evitar entrar en contacto con ellas y contraer la infección (8).

En el manual de bioseguridad para los laboratorios elaborado por la OMS clasifica al género *Brucella* en el Grupo de Riesgo III, refiriendo a que son agentes que pueden ocasionar una enfermedad grave en el hombre con riesgo de que se propague a la colectividad animal (8).

2.1.1. Antecedentes

La Brucelosis fue una enfermedad que afectó a soldados que participaron en la guerra de Crimea y a marinos a bordo de las naves causándoles reumatismo, por lo que varios fueron derrogados. El capitán David Bruce en 1884 llegó a Malta y en 1887 aisló a un agente llamado *Micrococcus melitensis* (*B. melitensis*) del bazo de un soldado británico quien murió con una enfermedad febril (fiebre de Malta) provocada por el consumo de leche cruda de cabra, siendo Bruce quien identificó por primera vez *Brucella* nominándose así debido a su nombre (9). En los siguientes 20 años después del descubrimiento de *B. melitensis* aún no se conoció exactamente la fuente de transmisión o infección, Bruce mencionó que era la leche cruda de cabras la causante de esta enfermedad, pero había otras teorías, incluso se pensó que se podía transmitir por vectores; pero fue un médico maltés Dr. Themistocles Zammit quien demostró la verdadera fuente de infección de la enfermedad en 1905 al aislar *B. melitensis* de leche de cabra (10). En una primera instancia se creía que las cabras no eran la fuente de infección ya que estas no se enfermaron al inocularlas con brucellas. Pero el descubrimiento de que las cabras sanas pueden ser también portadoras de esta enfermedad fue un importante avance hecho en el estudio de la epidemiología de ésta enfermedad (10,11).

El veterinario danés L. F. Benhard Bang en 1897, descubrió el agente causal del aborto bovino lo que llamó *Brucella abortus*, conociéndose desde este tiempo como enfermedad de Bang o brucelosis (11,12).

2.2. Brucelosis bovina

La brucelosis bovina es una enfermedad infecto-transmisible de origen bacteriano se considera como una de las enfermedades más importantes a



nivel mundial, afecta principalmente a animales sexualmente maduros (13). La brucelosis bovina genera un impacto en la salud pública, animales domésticos y fauna silvestre. Las pérdidas económicas debido a la brucelosis en el ganado bovino son grandes, no sólo en términos de producción animal, sino también en términos de la salud humana. Estas pérdidas económicas son generadas principalmente por los abortos, reducción de la producción de leche y descartes (14). En el Ecuador se estima que las pérdidas están por encima de los 5.5 millones de dólares por año (15). En los humanos esta zoonosis conduce principalmente a las pérdidas en el tiempo de trabajo y los costos relacionados con el diagnóstico y tratamiento (16). La distribución de esta enfermedad es importante en el Mediterráneo, oeste de Asia, zonas de África y Latinoamérica, cabe mencionar que está erradicada en el centro y norte de Europa. *B. abortus* está presente en todos los países de América central, en Sudamérica en varios países la enfermedad es endémica y un problema sanitario (17).

2.2.1. Etiología

B. abortus es la causante de la brucelosis bovina, representada por ocho biovars o biotipos de los cuales en América latina se ha identificado la existencia de los biotipos o biovars 1, 2, 3, 4 y 6; el biovar 1 es el predominante en el mundo siendo el responsable de más del 80% de casos de brucelosis bovina (7). *B. abortus* es un coccobacilo Gram-negativo, no encapsulado, intracelular facultativo, inmóvil, de crecimiento lento, no formador de esporas y aerobios estrictos (4). Su longitud varía de aproximadamente 0.5-0.7 μm y en anchura desde 0.5-1.5 μm ; aparecen individualmente, en pares o cadenas cortas. Es catalasa y oxidasa positivo y no fermentan los azúcares (6). En cuanto a la conformación estructural de esta bacteria, en su membrana externa es rica en fosfatidilcolina y lipopolisacárido (LPS), éste último es el componente más abundante (14), el cual está compuesto por un oligosacárido unido a un lípido A y a una proteína (antígeno M); el oligosacárido tiene dos regiones diferentes, un centro de polisacáridos y un polisacárido de antígeno "O" y la producción de anticuerpos está dirigida contra este antígeno, cabe recalcar que este antígeno es capaz de producir reacción cruzada con anticuerpos contra el polisacárido de *Yersinia enterocolitica* O:9, *Pseudomonas maltophilia* S555, *Vibrio cholera* O1, *Escherichia coli* O157:H7, *Xanthomonas*



maltophilia, *Salmonella landau* y *Francisella tularensis* (18). El LPS es fuertemente inmunodominante, el que junto con la capacidad de sobrevivir en el interior de células fagocíticas constituyen sus principales factores de virulencia (19), ya que esta bacteria carece de factores de virulencia clásicos como exotoxinas y sistemas de secreción, el LPS activa la respuesta inmune humoral la responsable de proveer protección en contra de la infección por esta bacteria produciendo en primer lugar anticuerpos IgM y posteriormente anticuerpos IgG o IgA (6).

El genoma de *B. abortus* contiene un 58-59% de G + C (guanina y citosina) y el tamaño total del genoma se ha estimado en aproximadamente $2,5 \times 10^6$ bp (pares de bases) (20). Dos características genéticas de *Brucella* llaman la atención; la existencia de dos cromosomas circulares en la mayoría de las especies y biotipos, y la ausencia de plásmidos. Esta última característica refleja probablemente la adaptación a un nicho ecológico estable (el ambiente intracelular) y sin competencia bacteriana (20).

Brucella puede sobrevivir por períodos largos en condiciones de alta humedad, bajas temperaturas, sin luz solar y en el suelo; puede permanecer viable durante varios meses en agua, fetos abortados y estiércol en condiciones apropiadas (6). Son negativas a pruebas del rojo de metilo y Vogues-Proskaur, sensible al calor ($>60^{\circ}\text{C}$ por 30 min), a la radiación ionizante, luz ultravioleta (5 min), a la mayoría de desinfectantes de uso común excepto las sales cuaternaria de amonio y susceptible a la mayoría de antibióticos (7).

2.2.2. Sinonimia

La enfermedad en el ganado bovino es también conocida como: Enfermedad de Bang, Aborto contagioso, Aborto infeccioso y Aborto epizoótico. Mientras que en el hombre tiene sinónimos tales como: fiebre ondulante, fiebre de Malta, fiebre recurrente (7).

2.2.3. Transmisión

La mayoría de los animales adultos se infectan de manera horizontal a través de la mucosa oral ya que las vacas tienden a lamer a los fetos o terneros recién paridos, envolturas fetales y las descargas vaginales que contienen gran

número de brucelas, al alimentarse con leche de vacas infectadas, por la ingesta de pastos, alimento y agua contaminados con *B. abortus* provenientes de tejidos de fetos abortados, membranas fetales, fluidos uterinos, secreciones vaginales y materias fecales de terneros que se alimentaron con leche contaminada (19,21). En ambientes cerrados es posible que la infección se transmita mediante aerosoles y fómites (7). *B. abortus* también se puede transmitir de manera vertical donde el feto se infecta en el útero o al momento del nacimiento (19).

Se ha mencionado reservorios de infección en una amplia gama de animales domésticos, entre ellos están las aves y carnívoros (perros). La transmisión de la brucelosis por pulgas, garrapatas o mosquitos de un rebaño infectado a un rebaño no infectado no se ha reportado (8).

2.2.4. Patogenia

Después de la penetración e independientemente de la vía de entrada, las bacterias pueden ser fagocitadas por los polimorfonucleares (PMN) y macrófagos como parte de la inmunidad innata, si no son eliminadas llegan por vía linfática a los nódulos linfáticos regionales (19). Invaden el sistema reticuloendotelial estableciéndose en el retículo endoplásmico de las células donde permanece y se multiplican; mediante vía hematógica se disemina a otros órganos, siendo la principal afinidad de estas bacterias el endometrio grávido y la placenta fetal de bovinos lo que se atribuye a la presencia del eritritol que es fuente de energía necesario para el crecimiento de las brucelas (17), haciendo que proliferen extensamente en trofoblastos de la placenta donde alcanza concentraciones muy altas de bacterias (18,22), provocando que una de las manifestaciones clínicas de la infección sea el aborto durante el último tercio de la gestación o el nacimiento de terneros débiles poco viables (22), las bacterias llegan también a la glándula mamaria y aparecen los microorganismos en la leche (23). En el macho las bacterias invaden los testículos por lo que pueden ser excretados en el semen, contaminando a una vaca adulta cuando ésta sea inseminada (24). Lo que determina que este microorganismo lo podamos aislar de muestras como: membranas fetales, contenido gástrico fetal, leche, secreciones vaginales, semen y nódulos

linfáticos (preescapulares, mamarios, ilíacos, faríngeos, parotídeos y cervicales) (3).

2.2.5. Signos clínicos

Los signos clínicos de la brucelosis bovina no son patognomónicos, ya que muchos de los signos de la brucelosis bovina se pueden observar en otras enfermedades, de ahí su importancia de hacer un diagnóstico diferencial con Tricomoniasis, Vibriosis, Leptospirosis, Listeriosis, Rinotraqueitis infecciosa bovina, entre muchas otras patologías responsables de problemas de aborto e infertilidad en el hato (24).

B. abortus se caracteriza por inducir abortos y mortinatos, los abortos se produce entre el quinto y noveno mes de gestación, los terneros que pueden llegar a nacer están débiles y pueden morir al poco tiempo; pero si sobreviven se convierten en animales que permanecen infectados en forma latente, es decir permanecen infectados durante toda su vida; en las vacas se produce retención de placenta, metritis secundaria que puede ser causa de infertilidad permanente (8); se calcula que la infección origina una pérdida de 20 a 25% en la producción de leche debido a la interrupción del periodo de lactancia por el aborto, la mastitis y la concepción demorada (7). Cuando una vaca infectada aborta, las preñeces posteriores llegan a su término y las bacterias no permanecen mucho tiempo en el útero (25). La infección se vuelve crónica y las brucelas se acantonan en los nódulos linfáticos y glándula mamaria de la vaca. Las brucelas pueden permanecer en la ubre durante años (22).

En bovinos machos provoca alteraciones en testículos y glándulas genitales anexas; cuando la enfermedad se manifiesta clínicamente hay orquitis uni o bilateral y una disminución del libido e infertilidad, acompañadas algunas veces por abscesos en testículos y epidídimo; en lugares tropicales se observa animales con higromas y artritis en las infecciones prolongadas (25). Normalmente la enfermedad se mantiene sin signología clínica en hembras no gestantes (22).

2.2.5.1. Salud pública

La brucelosis bovina es una enfermedad de gran importancia por tratarse de una antropozoonosis. A pesar de que fue descubierta hace más de cien años

continúa incurriendo a un problema de tipo sanitario y económico. En los humanos la infección ocurre por el consumo de leche, queso u otros derivados lácteos contaminados que no fueron sometidos a ningún proceso de conservación como la pasteurización o ebullición, siendo también de tipo ocupacional para trabajadores de mataderos o camales, veterinarios, ganaderos y trabajadores de laboratorios quienes tienen un alto riesgo de adquirir la infección debido a que manipulan animales infectados, muestras biológicas y/o sus desechos (18). El periodo de incubación es usualmente de una a tres semanas pero puede prolongarse a varios meses, tiene un curso agudo o crónico, caracterizada por presentar fiebre intermitente variando en la duración, escalofríos, sudor nocturno caracterizado por un olor particular, fatiga, anorexia, pérdida de peso, cefalea (18), impotencia sexual, constipación, algunos pacientes presentan nódulos linfáticos periféricos aumentados de tamaño; la enfermedad produce un gran impacto en el sistema nervioso que provoca irritación, nerviosismo, y depresión (7). Algunos se recuperan espontáneamente y otros pueden presentar complicaciones como artritis, fatiga crónica, epidídimo-orquitis, meningitis entre otras. El tratamiento se fundamenta en el uso de antibióticos como Rifampicina y Estreptomicina por seis semanas como mínimo, pero se puede observar recaídas. Las muertes suelen darse por complicaciones en las que se desarrolla problemas endocarditis o meningitis (19).

De acuerdo con el INEC (Instituto nacional de estadística y censos) en el Ecuador se registraron 152 personas hospitalizadas por brucelosis entre los años 1995 - 2007, indistintamente de donde se contaminaron y adquirieron la infección ya sea en el campo o el laboratorio (16). La medida considerada eficaz para la prevención de la infección en humanos se centra en el control y la erradicación de la enfermedad en los animales susceptibles ya que mientras existan reservorios de microorganismos la enfermedad continuará dándose en las personas (18). Cabe recalcar que el uso de guantes, respiradores y batas-mandiles en los laboratorios constituyen medidas importantes de prevención de la brucelosis, finalmente la pasteurización de la leche y productos lácteos es de vital importancia en lugares donde la enfermedad es endémica (26).

2.2.6. Diagnóstico de la Brucelosis bovina

Dado que los signos clínicos de esta enfermedad son inespecíficos, el cultivo y la serología son importantes herramientas para un diagnóstico certero. Las pruebas serológicas son de fácil realización mientras que para el diagnóstico directo es necesario el cultivo con muestras biológicas como leche, hisopados vaginales, secreciones de ubres no lactantes, fetos abortados (contenido estomacal, bazo y pulmón), placenta, nódulos linfáticos mamarios, semen, testículos, epidídimo y fluidos de higroma; en medios artificiales con la posterior identificación de los aislamientos por la morfología y características de crecimiento de las colonias (8). Para un correcto aislamiento de la bacteria es necesario tener en cuenta factores como la frescura de la muestra, el método de transporte, la asepsia, la temperatura a la que se envió y el manejo de la misma en el laboratorio pero hay que recalcar las desventajas como los altos costos, el tiempo necesario para el crecimiento e identificación además del alto riesgo biológico que implica para el personal ya que se trabaja con organismos vivos en grandes cantidades (27).

Las pruebas serológicas son inespecíficas debido a reacciones cruzadas o son poco sensibles (24). Estas pruebas buscan la presencia de anticuerpos anti-brucelas en el suero del animal; están las pruebas de aglutinación tales como Rosa de Bengala, Seroaglutinación en tubo o placa con pocillos (SAT), Enzimoinmunoanálisis ELISA, Prueba del anillo en leche, Test de Rivanol, Inmunofluorescencia indirecta, Fijación del complemento, Prueba de aglutinación con 2-mercaptoetanol y, entre otras (8,21).

En la actualidad se cuenta con técnicas moleculares que permiten la identificación de elementos genéticos de la bacteria como lo es PCR y LAMP. Kary Mullis en 1985 invento la técnica de PCR (Reacción en la Cadena de la Polimerasa), que es relativamente sencilla y produce un gran número de copias de ADN a partir de una muestra por muy pequeña que sea (28). El PCR es un método rápido, sensible y específico para la detección de brucelas, en donde una molécula de ADN se amplifica y se identifica de una mezcla compleja de secuencias genómicas y se observa como una banda distinta en el gel de agarosa (29). Hasta el momento existen algunos ensayos de PCR empleados

en el diagnóstico de la brucelosis bovina, algunos son específicos para el género *Brucella*, mientras que otros ensayos permite la diferenciación e identificación de ciertas especies de *Brucella* y sus biotipos o biovars (AMOS-PCR) (21). También se ha desarrollado un ensayo de PCR convencional múltiple permite diferenciar cepas vacunales S19 y RB51 de las cepas de campo de *B. abortus* (30).

2.2.6.1. LAMP.

El ensayo LAMP (amplificación isotérmica mediada por un lazo) del inglés Loop mediated isothermal amplification, fue reportado por primera vez en el año 2000 por Notomi et al; este ensayo amplifica ADN con alta sensibilidad y especificidad bajo condiciones isotérmicas (60 – 65°C) en un tiempo relativamente corto (30 min a 1h) (31). LAMP muestra menos sensibilidad a sustancias inhibitoras presentes en muestras biológicas. Esta técnica se basa en el uso del *Bst* ADN polimerasa de *Geobacillus stearothermophilus* y de otras especies de *Geobacillus*, que tienen actividad de desplazamiento de la cadena junto con seis oligonucleótidos para la amplificación, que hibridan en ocho sitios del ADN diana (32). Los oligonucleótidos son: 2 externos (F3, B3); dos internos (FIP, (F1c-F2c), BIP (B1c-B2)) que tienen secuencias tanto de sentido y antisentido; y dos oligonucleótidos lazo (LF, LB) (33). Como se muestra en la Figura 1.

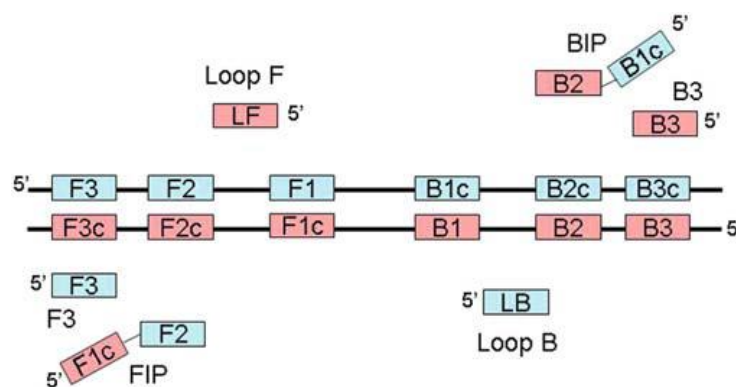


Figura 1: Oligonucleótidos de LAMP. Primers internos (FIP, BIP), primers externos (F3, B3), primers bucle (LF, LB) (32).

La reacción genera en corto tiempo una cantidad extraordinaria del producto de amplificación el cual está representado por una estructura de múltiples lazos con tallos sobre el ADN blanco, dando un aspecto parecido a las flores de un

coliflor (31). La amplificación se realiza en baño María o en bloques de calentamiento, tiene la gran ventaja de que se puede observar el material generado de amplificación a simple vista por aumento de la turbidez ya que la reacción genera pirofosfato o por la adición de reactivos colorimétricos a la reacción (33). Otros métodos de detección de los amplificados generados en la reacción de LAMP son:

Electroforesis: Se utiliza geles de agarosa teñidos con Bromuro de Etidio que se intercala en la molécula de ADN y es iluminado con lámpara de luz ultravioleta (UV), la cual se verá en un aumento de la fluorescencia. En consecuencia, la presencia de fluorescencia puede indicar la presencia del material genético diana (33).

Calceína: Durante la amplificación de ADN en el ensayo LAMP se produce una gran cantidad de Pirofosfato de Magnesio que es resultado de la combinación del ión Pirofosfato liberado del sustrato (dNTP`s) más el ión magnesio presente en la solución de amplificación (solución Buffer de amplificación), este ión pirofosfato puede unirse fuertemente a iones metálicos y formar sales insolubles (34). La Calceína es un indicador de metales que produce una fuerte fluorescencia con iones metálicos divalentes como el Calcio y el Magnesio y se utiliza para diversos análisis (35).

SYBRGreen: Se agrega un colorante intercalador al ADN a la solución después de que la reacción de amplificación es completada, si es positivo el resultado se observará un cambio de color del naranja a verde que se puede juzgar bajo luz natural o una lámpara UV (36). Sin embargo se asocia con un alto riesgo de contaminación de otras soluciones de reacción de LAMP porque en este ensayo se requiere abrir los tubos que contiene el ADN diana amplificado (34).

Azul Hidroxinaftol (HNB): Es un nuevo colorante metalocrómico para titulación de iones de Calcio a pH 13.0 e iones de Magnesio a pH 10.0. Es un nuevo indicador de la reacción de LAMP por el seguimiento de la variación de la concentración de iones de Magnesio, ya que el fragmento *Bst* DNA polimerasa sintetiza DNA en condiciones alcalinas (pH 8.8 a 25°C). Se añade

120 μ M de HNB a la mezcla de reacción de LAMP. El color de HNB cambia dependiendo del pH de la solución, de la concentración y quelación de iones de Magnesio. Una reacción positiva se indica mediante un cambio de color del violeta al azul cielo (34).

2.2.7. Prevención y control

La prevención de la brucelosis bovina incluye estrategia de vacunación y/o prueba-sacrificio de animales reactivos lo que ha dado éxito en el control de la enfermedad en muchos países (37). Los esfuerzos se dirigen hacia la detección y prevención de esta enfermedad ya que no hay un tratamiento práctico disponible, siendo la vacunación el pilar fundamental para prevenir la brucelosis animal. Mukhtar & Kokab (38), sugirieron pautas que se deben considerar para un correcto control de brucelosis bovina, tales como una buena limpieza de corrales y un apropiado programa de vacunación para los animales jóvenes, la detección de rebaños reactivos y la eliminación posterior de enfermos y por último concienciar a los ganaderos, autoridades y personas en general sobre el riesgo que implica la propagación de la enfermedad (8).

2.2.7.1. Vacuna cepa S19 de *B. abortus*.

La cepa más conocida y utilizada en la prevención de la brucelosis bovina es la cepa S19, aislada en 1930 por el Dr. John M. Buck, que correspondía al lote 19 de una serie de cultivos obtenidos a partir de leche de una vaca Jersey como una cepa virulenta pero después de permanecer en el laboratorio a temperatura ambiente durante más de un año se atenuó (39). La cepa S19 es un organismo atenuado de morfología lisa, no crece en presencia del eritritol debido a que ha perdido el gen *eri* que codifica la enzima necesaria para la utilización de este carbohidrato (40). Posee esta vacuna una baja patogenicidad en el ganado bovino, buena antigenicidad y alta inmunogenicidad, lo que se demuestra si se considera que es capaz de conferirle a la vaca inmunidad contra la enfermedad hasta por 8 partos (41). Cabe recalcar que aunque es de baja virulencia, la vacunación en vacas preñadas puede inducir abortos (42), sin embargo, se le considera patógena para la especie humana (18,43). La principal desventaja de esta cepa vacunal radica en la inducción de anticuerpos en las hembras vacunadas que interfieren en las pruebas diagnósticas de tamizajes que usan antígenos con LPS lisos



porque estos están presentes tanto en la vacuna como en las cepas de campo (44). Se recomienda no vacunar a los machos, hembras de más de seis meses de edad (post-púberes), tampoco se recomienda la revacunación. Se sugiere aplicarla a los 3-6 meses de edad a dosis única por vía subcutánea en la tabla del cuello, en una cantidad de $5-8 \times 10^{10}$ de microorganismos viables (7).

2.2.7.2. Vacuna cepa RB51 de *B. abortus*.

Desarrollada en 1984 por el Dr. Gerhardt Schurig; la cepa vacunal RB51 es una mutante estable atenuada derivada de la cepa virulenta y lisa 2308 de *B. abortus*, lo cual dio como resultado una cepa igualmente inmunogénica, pero menos virulenta que la vacuna cepa S19. Es resistente a la Rifampicina y contiene el gen *eri* funcional lo que permite realizar el metabolismo del eritritol (42,45). La cepa vacunal RB51 es rugosa ya que carece de la cadena "O" de polisacárido gracias a la interrupción del gen *wboA* que en *B. abortus* RB51 es interrumpido por un elemento de tipo IS711 (46); por lo tanto no induce la generación de anticuerpos aglutinantes detectables por pruebas de laboratorio para el tamizaje, logrando diferenciar los animales infectados con cepas de campo de los vacunados (43, 47). Los problemas asociados al uso de esta vacuna son placentitis, endometritis y en vaquillas vacunadas durante la gestación se produce una infección fetal. Se administra en dosis que varían entre $1-4 \times 10^{10}$ de microorganismos viables en bovinos de 4-10 meses de edad (43).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se indican los materiales y los métodos que se usaron y aplicaron en cada una de las actividades planificadas para el cumplimiento de los objetivos planteados.

3.1. Colecta, conservación, transporte y almacenado de las muestras biológicas (leche/tejidos).

3.1.1 Materiales

Biológicos:

Se recolectó cerca de 40 ml de leche de los cuatro cuartos de tres vacas (120 ml aproximadamente) en producción de la granja de Irquis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca y 2 nódulos linfáticos (Supraescapular y supramamario) de bovinos sacrificados en el Camal Municipal de Azogues provincia del Cañar.

Reactivos y soluciones

Solución conservación (Solución al 80% de Etanol (Sigma, Cat. No.: E7023), con 10 mM de Tris-HCl (Sigma, Cat. No.: T4661), pH 8.0; 1 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS) y 2.5 % de Glicerol (Sigma, Cat. No.: G5516)).

Solución a 1 M de Tris-HCl, pH 8.0.

Solución a 500 mM de EDTA, pH 8.0.

Equipos y otros materiales

Platina de calentamiento con agitación magnética.

Potenciómetro (pHmetro)

Set de micropipetas (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles)

Autoclave.

Equipo de filtración (\varnothing 0.22 µm).

Probetas y recipientes para soluciones

Bisturí, tijeras

Recipientes para las muestras (Tubos Falcón de 10 ml y envases estériles)

Solución desinfectante (Etanol al 70%).

Guantes de látex

Marcador resistente al agua

Cooler para el transporte de muestras

3.1.2. Métodos.

Leche.

Paso 1: En los envases estériles se colectó 10 ml de leche de cada cuarto de la ubre (40 ml) de tres vacas (120 ml aproximadamente), lo más aséptico posible para eso se lavó la ubre y posteriormente se secó con papel.

Paso 2: Se identificaron los frascos de leche.

Paso 3: Para el transporte de las muestras biológicas se procedió a colocar los recipientes en una caja térmica u cooler teniendo cuidado que no se derramen.

Paso 4: En el laboratorio de biología molecular se realizó alícuotas de 2 ml de leche en tubos Eppendorf y se almacenó bajo congelación a -80 °C en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de CCAA de la Universidad de Cuenca hasta su análisis.

Tejidos

Paso 5: Se recolectó los 2 nódulos linfáticos (preescapular, supramamario) y se transportó las muestras biológicas en una caja térmica u cooler.

Paso 6: En el laboratorio de biología molecular se preparó la solución de conservación necesaria para los tejidos.

Paso 7: Se colocó en tubos Falcón 8 ml de la solución de conservación.

Paso 8: Posteriormente se tomó aproximadamente 1 gramo de tejido de nódulo linfático y se adicionó en los tubos con la solución de conservación.

Paso 9: Se identificó los frascos con las muestras de tejido.

Paso 10: Se conservaron las muestras a temperatura ambiente en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de CCAA de la Universidad de Cuenca hasta su análisis.

3.2. Dilución de las cepas vacunales de *B. abortus* (S19, RB51) e inoculación en las muestras biológicas (leche/tejidos).

3.2.1. Materiales.

Biológicos

Muestras de leche

Muestras de tejido de nódulos linfáticos (preescapular, supramamario)

Cepas vacunales S19 (Life Quito-Ecuador 922924) y RB51 (Intervet-Ecuador S.A. Reg. San. 4A-5295 AGROCALIDAD).

Reactivos y soluciones

Solución Buffer TE 10:1 1X (10 mM Tris base (Sigma, Cat. No.: T4661) HCl (Sigma, Cat. No.: 320331), 1 mM EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS) pH 8.0).

Solución desinfectante (Etanol al 70%)

Equipos y otros materiales:

Jeringas de 10 ml

Tubos Eppendorf 2ml

Set de micropipetas (1 ml, 200 μ l, 50 μ l y 20 μ l con puntas estériles)

Vortex

Respiradores

Guantes de látex

Cabina de bioseguridad clase II

3.2.2. Métodos.

Paso 1: Se resuspendió las vacunas S19 de 5 dosis en 10 ml de Solución Buffer TE 10:1 1X.

Paso 2: La cepa vacunal S19 (5 dosis), está constituida por $10\text{--}34 \times 10^9$ Unidad Formadora de Colonias (UFC)/dosis, con un promedio de $11,25 \times 10^9$ UFC/ml. En tubos Falcón de 50 ml se colocó 10,25 ml de Solución Buffer TE 10:1 1X, se adicionó 1ml de la vacuna S19 quedando a una concentración de 1×10^9 UFC/ml; y se añadió 100 μ l de esta dilución realizada en un nuevo tubo Falcón que contenía 9,900 μ l de buffer TE 10:1 1X, resultando a una concentración de 1×10^7 UFC/ml, (Solución stock).

Paso 3: La cepa vacunal RB51 (5 dosis), está constituida por $15\text{--}30 \times 10^9$ UFC/dosis, con un promedio 11×10^9 UFC/ml. En tubos Falcón de 50 ml colocar 10 ml de Buffer TE 10:1 1X, se adicionó 1ml de la vacuna RB51 teniendo una concentración de 1×10^9 UFC/ml; y se adicionó 100 μ l de esta dilución realizada en un nuevo tubo Falcón que contenía 9.900 μ l de Solución buffer TE 10:1 1X, quedando a una concentración de 1×10^7 UFC/ml, (Solución stock).

Paso 4: Se tomó 7 alícuotas de leche (2 ml) realizadas en los tubos Eppendorf, se centrifugó a $6000 \times g$ por 10 min a 4°C y se tomó 450 μ l de leche en donde se incluyó la parte de grasa de la misma y se colocó en nuevos tubos

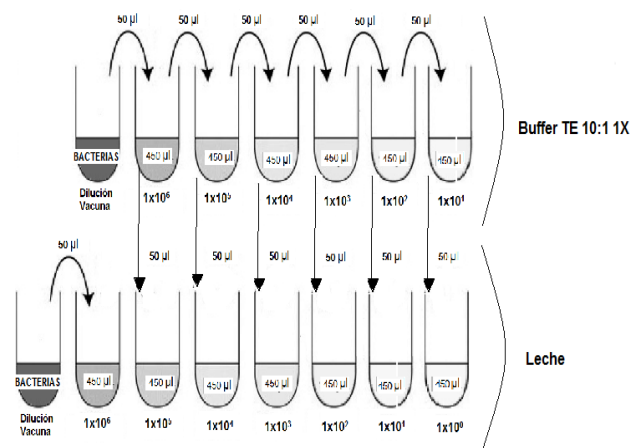
Eppendorf de 2ml (Siete tubos por cada una de las curvas, tres replicas para cada cepa vacunal), se reservaron hasta su utilización.

Paso 5: Para la realización de las diluciones de las cepas vacunales se efectuó en primer lugar en Solución Buffer TE 10:1 1X colocando 450 μ l del mismo en tubos Eppendorf (seis tubos).

Paso 6: Se tomó 50 μ l de la solución stock de las vacunas, se agregó a uno de los tubos con la Solución Buffer TE 10:1 1X y desde este al próximo y así sucesivamente, resultando las diluciones desde una concentración de 1×10^6 UFC/ml hasta 1×10^1 UFC/ml.

Paso 7: Para las inoculaciones en la leche reservada anteriormente, se tomó un tubo Eppendorf con los 450 μ l de leche a las que se adicionó 50 μ l de la solución stock de las vacunas directamente a esta muestra.

Paso 8: En las siguientes muestras de leche se tomó 50 μ l de las diluciones ya realizadas en la Solución Buffer TE 10:1 1X y se inoculó en la leche, quedando las inoculaciones desde una concentración de 1×10^6 UFC/ml hasta 1×10^0 UFC/ml.



Paso 9: Para las inoculaciones en tejido (1 gramo) mantenidos en el método de conservación, se tomó aproximadamente 25 mg de tejido y se colocó en tubos Eppendorf (Siete tubos por cada una de las curvas, tres replicas para cada cepa vacunal). Se dejó reposar por algunos minutos para que evapore el alcohol, y se reservó hasta su utilización.

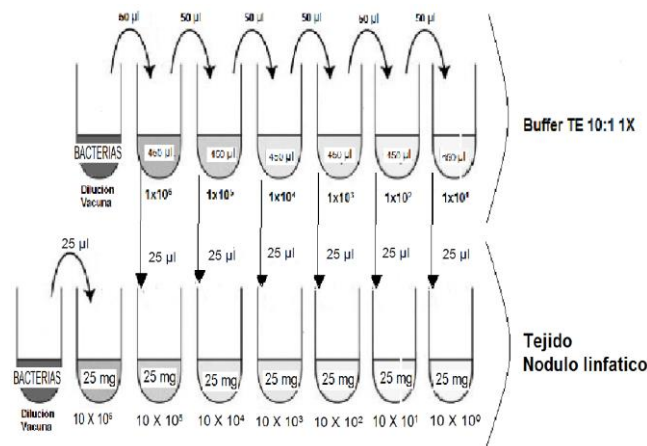
Paso 10: Para las diluciones se realizó primero en Buffer TE 10:1 1X colocando 450 μ l del mismo en tubos Eppendorf (seis tubos).

Paso 11: Se tomó 50 μ l de la solución stock de las vacunas, se agregó a uno de los tubos y desde este al próximo y así sucesivamente, iniciando las

diluciones desde una concentración de 1×10^6 UFC/ml hasta 1×10^1 UFC/ml en la Solución buffer TE 10:1 1X.

Paso 12: Para la inoculación en los tejidos ya preservados se colocó 25 μ l de la solución stock de las vacunas directamente a una de las muestra de tejido.

Paso 13: En las siguientes muestras de tejido se tomó 25 μ l de las diluciones realizadas en Solución Buffer TE 10:1 1X inoculando en los tejidos, quedando las inoculaciones desde una concentración de 10×10^6 UFC/g hasta 10×10^0 UFC/g. Las muestras así preparadas se almacenaron en congelación (-80°C) hasta su uso.



3.3. Procesamiento de las muestras biológicas inoculadas: extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) total.

3.3.1. Materiales.

Biológicos

Muestras de leche inoculada con las cepas vacunales RB51 y S19.

Tejidos de nódulos linfáticos inoculados con las cepas vacunales RB51 y S19.

Suspensiones bacterianas de la cepas vacunales S19 y RB51

Reactivos y soluciones

Buffer NET (50 mM de NaCl (Sigma, Cat. No.: S3014), 125 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS), 50 mM de Tris-HCl, pH 7.6)

Dosedil sulfato de sodio (SDS) (Sigma, Cat. No.: 71725) al 24%

Proteinasa K (Solución con 5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, Cat. No: P2308), 10mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM de EDTA y 50% de Glicerol).

NaCl 5 M (Sigma, Cat. No.: S3014)



CTAB/NaCl 10%/0.7M (Hexadecyl trimethylammonium bromide al 10%. (Sigma, Cat. No.: 52365) y 0.7M NaCl (Sigma, Cat. No.: S3014)).

Fenol/Cloformo/A. Isoamílico (Sigma, Cat. No.: 77619) Almacenada en refrigeración y protegido de la luz.

Solución Etanol absoluto (Sigma, Cat. No.: E7023) Almacenada en refrigeración y protegido de la luz.

Solución Etanol al 70% en agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502). Almacenada en refrigeración y protegido de la luz.

Solución Buffer TE 10:1 1X (10 mM Tris HCl, 1mM EDTA pH≈8.0)

Buffer de lisis (Proteinasa K 20 unidades/mg, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %, Tris-HCL 1M, EDTA 0.5 M, NaCl 5M y Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502)).

Equipos y otros materiales

Tubos de microcentrífuga o viales de 2 ml

Set de micropipetas (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles)

Baño María/Termociclador

Centrífuga

Vortex

Cabina de seguridad biológica

3.3.2. Métodos

Extracción del ADN Total (leche) se usa el protocolo reportado por Romero & López-Goñi (48), con algunas modificaciones.

Para la extracción de ADN de las suspensiones bacterianas de las cepas vacunales (S19 y RB51) se realizó de una alícuota (500 µl) de la solución stock preparado de las vacunas con el mismo protocolo de extracción para leche aquí descrito.

Paso 1: Preparadas todas las soluciones a utilizar se procedió a la extracción del ADN Total.

Paso 2: Se descongeló las curvas de inoculaciones de leche (500 µl).

Paso 3: A estos tubos se adicionó 100 µl del Buffer NET; 100 µl de la solución de SDS al 24% y se mezcló en vortex por 15 s; se incubó a 80 °C por 10 min en baño María.

Paso 4: Terminado este proceso se adicionó 48.75 µl Proteinasa K hasta tener una concentración final de 325 µg/ml, se mezcló en vortex por 15 s y se incubó por 2 h a 50 °C en baño María.

Paso 5: Precipitar los detritus con la adición de 125 µl de una solución 5 M de NaCl y 100 µl de una solución de CTAB, se mezcló en vortex por 15 s, y se incubó por 10 min a 65 °C en baño María y se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4°C.

Paso 6: Se colectó el sobrenadante (aproximadamente 500 µl) y se adicionó un volumen igual de Fenol/Cloformo/A. isoamílico 25/24/1, se mezcló en vortex por 15 s, y se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4 °C.

Paso 7: Completado este proceso, se colectó el sobrenadante (aproximadamente 400 µl) y se precipitó con la adición de 2.5 volúmenes de Etanol absoluto, se procedió a mezclar por inversión y se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4 °C para formar la pastilla de ADN total.

Paso 8: Una vez concluida la centrifugación se eliminó el Etanol absoluto y se colocó 500 µl Etanol al 70% para lavar la pastilla de ADN total, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4 °C; se eliminó el etanol al 70%.

Paso 9: La pastilla obtenida se secó a temperatura ambiente, protegida de la luz y el polvo. Y posteriormente fue resuspendida en 50 µl de Solución Buffer Te 10:1 1X, pH 8.0.

Extracción del ADN total (tejidos) protocolo de lisis con proteinasa K (PK) y extracción con Fenol/Cloroformo/A. Isoamílico, según Matrone et al. (29).

Paso 10: Se descongeló la muestra de tejido (25mg) inoculada con las cepas vacunales, se colocó en una funda plástica estéril, se selló la misma, y se procedió a macerar el tejido hasta obtener todo el líquido ahí contenido.

Paso 11: Se tomó aproximadamente 400 µl de la muestra, se colocó en un tubo Eppendorf a la cual se agregó 1000 µl de Solución TE 10:1 1X, se mezcló en vortex por 10 s, y se procedió a centrifugar a 13000 x g por 5 min y se removió el sobrenadante.

Paso 12: Se resuspendió el sedimento en 300 µl de Buffer de lisis y se incubó en baño María a 37 °C durante la noche a 600 rpm.

Paso 13: A esta mezcla se añadió 500 µl de Fenol/Cloformo/A. isoamílico 25/24/1, se mezcló en vortex por 20 s y se procedió a centrifugar a 13000 x g por 3 min.

Paso 14: Terminado esta incubación se transfirió 200 µl de la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf cuidadosamente evitando pipetear la interfase orgánica.

Paso 15: A este tubo se añadió 300 µl de Fenol/Cloroformo/A. isoamílico, 25/24/1, se mezcló por inversión unos 10 s y se centrifugó a 13000 x g por 5 min. Posteriormente se transfirió 200 µl de la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf cuidadosamente evitando pipetear la interface orgánica.

Paso 16: A estos tubos se le añadió 120 µl de Fenol/Cloroformo/A. isoamílico 25/24/1 y se mezcló por inversión. Se mantuvo a -20 °C por 4 h, y se centrifugó a 13000 x g por 30 min.

Paso 17: Terminado este proceso se removió el sobrenadante y se añadió 500 µl de Etanol al 70 % y se centrifugó a 13000 x g por 10 min para formar la pastilla de ADN. Posteriormente se eliminó el Etanol al 70 %.

Paso 18: La pastilla obtenida se secó a temperatura ambiente, protegida de la luz y el polvo. Y a continuación fue resuspendida en 50 µl de la Solución buffer TE 10:1 1X, pH 8.0.

Paso 19: Se mantuvo las muestras de ADN total tanto de leche como de tejidos a -80°C y se empleó 2 µl de cada una de las muestras de ADN total en el control de procesos y en los ensayos de amplificación y detección del material genético de *B. abortus*.

3.4. Amplificación del ADN de *B. abortus* mediante el ensayo LAMP.

3.4.1. Materiales.

Biológicos

ADN total extraído de las muestras de leche y tejidos inoculados, sin inocular y de las cepas vacunales puras.

Reactivos y/o soluciones

Control de proceso mediante PCR.

Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502)

Solución de dNTP's 10mM de cada uno (Desoxinucleótidos trifosfatos) (Thermoscientific, Cat. No.: R0182), almacenar -20 °C.



Solución de Oligonucleótidos o primers 100 mM (Invitrogen) para el control de proceso (amplifica ADN de bovino)

12SFWMoD: TAA ATC TCG TGC CAG CCA,

12SREVMoD: AGT ATG CTT ACC TTG TTA CGA C

Enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Cat. No.: 10966-033) con la **Solución buffer de amplificación 10 X** (20mM Tris-HCl +10mM (NH₄)₂SO₄ +10mM KCl+2mM MgSO₄+0.1%Triton X-100 pH 8.8 @ 25°C) y la **Solución MgCl₂ a 50mM**.

Control positivo: ADN Total obtenido de leche y tejidos.

Control negativo: Agua grado biología molecular.

Amplificación de ADN de *B. abortus* mediante el ensayo LAMP

Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502)

Solución de oligonucleótidos o primers de *B. abortus* (Invitrogen Custom Primers Cat. No.: 10336022)

F3 GGGCTTACGCTTGGATCG

B3 CGTAGCTGGGGCTATTCGT

FIP (F1C-F2)

AGTGGCGCCAGTAGTATTGACGTTTTGAGCGTGGACAAGGTGT

BIP (B1C-B2)

CGCAGGGCGATGGTCTGTTGCTTTTCAGTTGAAGTTGCCCGTAG

LF TCGTTGACCTGCTGGTTGAT

LB GGCAATGGCACCTGGACA

Solución de dNTP's a 2.8mM de cada uno (Desoxinucleótidos trifosfatos) (dNTP's set, Thermoscientific, Cat. No.: R0182).

Bsm ADN polimerasa (Thermo Scientific # EP069_TS_QR_7) con la **Solución Buffer de amplificación 10 X** (200mM Tris-HCl (pH 8.8 a 25 °C) + 100mM KCl + 100 mM (NH₄)₂SO₄ + 10mM + 20mM MgSO₄ + 1% (v/v) Tween 20)

Betaina 1.6 M (Sigma Aldrich Cas.: 107-43-7)

Control positivo (ADN Total de la cepa vacunal S19 y RB51 y ADN obtenido de las inoculaciones en leche y tejidos)

Control negativo (Agua grado biología molecular)

Equipos y otros materiales

Baño María/Termociclador

Tubos de PCR o viales de 0.2ml

Set de micropipetas (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles)

3.4.2. Métodos.

Control de Proceso.

Amplificación del producto de ADN de Bovinos con el ensayo PCR.

Paso 1: Previo a realizar el ensayo de amplificación LAMP se procedió a realizar un control de proceso en base a los descrito por López-Calleja et al (49) utilizando el ensayo PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para detectar ADN bovino ya que las muestras biológica procedían de esta especie para lo cual se utilizó oligonucleótidos que permiten detectar la presencia de ADN bovino y otros reactivos antes descritos (**Sección 6.4**).

Paso 2: Se descongelaron los reactivos necesarios para la amplificación y el ADN total correspondiente a las muestras a analizar (25 µl de volumen final por reacción), colocando en el siguiente orden los reactivos exceptuando las muestras de ADN total:

Reactivo:	Concentración		Volumen
	inicial:	final:	por reacción*:
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	18.65µl x n
Solución Buffer de amplificación 10 X	10X	1X	2.5 µl x n
Solución dNTP's	10 mM	0.1 mM	0.5 µl x n
Solución MgCl ₂	50 mM	20mM	1 µl x n
Oligonucleótido 12SREVMod o FAP59For	100 µM	0.8 µM	0.2µl x n
Oligonucleótido 12SREVMod o FAP64Rev	100 µM	0.8 µM	0.2 µl x n
Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa	5 U/µl	0.04 U/µl	0.2 µl x n
Muestra de ADN total	--- µg/µl	--- µg/µl	2 µl x n
Volumen final	-----	-----	25 µl x n

*n=número de muestras.

Paso 3: La premezcla preparada se mezcló en el vortex por 4 a 6 s, y fue colectada por centrifugación a máxima velocidad durante 15 a 20 s.

Paso 4: Se marcaron los tubos de PCR (200 µl), y les fue colocado 23 µl de la premezcla y se adicionó 2 µl de ADN de la muestra correspondiente.

Paso 5: Los tubos con las reacciones de amplificación (25 µl) se colocaron en el termociclador y fueron sometidos al siguiente perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR del control de proceso en primer lugar.

	Desnaturalización inicial	35 ciclos			
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final:
Tiempo (min', s''):	5'	45''	30''	45''	5'
Temperatura (°C):	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C

Paso 6: Posteriormente se realizó una premezcla para el ensayo de amplificación LAMP para detección de ADN de *B. abortus* con todos los reactivos antes descritos (**Sección 6.4**) con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (25 µl de volumen final por reacción) colocando en el siguiente orden los reactivos exceptuando las muestras de ADN total:

Reactivo:	Concentración		Volumen
	Inicial:	Final:	Por reacción*:
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	16.7 µl x n
Buffer de amplificación 10 x	10X	1X	2.5 µl x n
dNTP's	10 mM	0.28 mM	0.7 µl x n
Oligonucleótido FIP	100 µM	1.6 µM	0.4 µl x n
Oligonucleótido BIP	100 µM	1.6 µM	0.4 µl x n
Oligonucleótido F3	25 µM	0.2 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido B3	25 µM	0.2 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido LF	100 µM	0.8 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido LB	100 µM	0.8 µM	0.2 µl x n
Betaina	120 µM	2.5 µM	0.5 µl x n
Muestra de ADN total	--- µg/µl	--- µg/µl	2 µl x n
Volumen final	-----	-----	24 µl x n

*n=número de muestras.

Paso 7: La premezcla preparada se llevó al vortex por 4 a 6 s, y fue colectada por centrifugación a máxima velocidad durante 15 a 20 s.

Paso 8: Se marcaron los tubos de PCR (200 µl) y les fue colocado 22 µl de la premezcla y se les adicionó 2 µl de la muestra de ADN total correspondiente.

Paso 9: Los tubos con las reacciones de amplificación (24 µl) se colocaron en el baño María/termociclador para la incubación de esta premezcla con el fin de que suceda la desnaturalización y el alineamiento:

Paso:	Desnaturalización	Alineamiento
Tiempo (min', s''):	5'	5'
Temperatura (°C):	94 °C	4°C

Paso 10: Culminado este tiempo, se sacó los tubos de PCR (200 µl) del baño María/termociclador y se añadió la enzima para que suceda la extensión y la inactivación:



Reactivo:	Concentración		Volumen
	Inicial	Final	por reacción
Enzima <i>Bsm</i> ADN polimerasa	8 U/ μ l	0.32 U/ μ l	1 μ l
Volumen final:	----	---	25 μ l

Paso 11: Posteriormente se sometió esta mezcla al proceso de extensión e inactivación en el baño María/termociclador.

Paso:	Extensión	Inactivación
Tiempo (min`, s``):	60´	10`
Temperatura (°C):	60 °C	80°C

3.5. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio, la detección de fluorescencia con SYBR green y Calceína y cambio de color mediante el uso de Azul de hidroxinaftol.

3.5.1. Electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio.

Este método de detección se usó tanto para Control de proceso con PCR y para el ensayo LAMP.

3.5.1.1. Materiales

Biológicos:

Productos amplificados mediante PCR.

Productos amplificados en el ensayo LAMP.

Reactivos y/o soluciones

Agarosa (Invitrogen, Cat. No.: 16500-100).

Buffer TAE 1X (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH \approx 8.0 y 1 mM EDTA).

Bromuro de Etidio (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637)).

Buffer de carga para ADN 6X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA, 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol.

Marcador de peso molecular 100 bp o 1 Kbp (GeneRuler 100 bp o 1KbpPlus DNA ladder, Thermo Scientific Cat. No.: SM0321).

Equipos y otros materiales:

Set de micropipetas (1 ml, 200 μ l, 50 μ l y 20 μ l con puntas estériles).



Probeta de 100 ml.

Matraz de Erlenmeyer.

Balanza analítica (Mantener calibrada).

Horno de microondas.

Bandeja para gel de electroforesis.

Peinillas para formar pocillos.

Cámara de electroforesis horizontal.

Fuente de poder.

3.5.1.2. Métodos

Paso 1: Se preparó la solución de buffer TAE 10:1 1X.

Paso 2: Se realizó el gel agarosa al 0.8% en solución buffer TAE 1X. Antes de que se gelifique se adicionó 3 µl de Bromuro de Etidio y vertiendo la agarosa en la bandeja para gel. Se dejó gelificar aproximadamente por 15 min.

Paso 3: Las reacciones tanto del control de proceso con PCR como del ensayo LAMP sometidas al proceso de amplificación se les adicionó 5 µl de la Solución buffer de carga para ADN 6X. Se mezcló ambas soluciones.

Paso 4: De la mezcla de cada una de las reacciones de PCR y del ensayo LAMP con la Solución buffer de carga para ADN 6X se tomó 10 µl. En uno de los pozos se colocó 450 ng del marcador de peso molecular.

Paso 5: Los fragmentos se resolvieron en el gel de agarosa, sometiendo al mismo a 100 Voltios por el tiempo necesario de acuerdo a la longitud del gel.

Paso 6: Una vez resueltos los productos de los PCR y del ensayo LAMP, se fotodocumentaron para su análisis.

Paso 7: Se consideró como muestra válida toda aquella en la que se logró amplificar el fragmento correspondiente al control de proceso. Y como muestra positiva, toda aquella que mostró un producto de PCR de un tamaño entre 720 bp. En el caso del ensayo LAMP se consideró una curva positiva aquella en la que se observó el ADN de *B. abortus* amplificada.

3.5.2. Detección de fluorescencia con SYBR green.

3.5.2.1. Materiales

Biológicos:

Productos amplificados en el ensayo LAMP.

**Reactivos y/o soluciones**

SYBRGreen 10,000 X (Invitrogen, Cat. No: S7567).

Solución Buffer TE 10:1 1X

Equipos y otros materiales:

Set de micropipetas (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles).

Transiluminador UV

Cámara fotográfica.

3.5.2.2. Métodos

Paso 1: Se disolvió 1 µl de SYBR green en 999 µl de Solución Buffer TE 10:1 1X. Reservar en refrigeración hasta su utilización protegida de la luz directa.

Paso 2: Al finalizar el proceso de amplificación del ensayo LAMP, se aplicó a cada tubo de reacción 2.8 µl de SYBR green y se dejó reposar por 10 min.

Paso 3: Transcurrido los minutos se observó bajo luz natural, analizando el color de la reacción y posteriormente se examinó bajo luz UV para apreciar la fluorescencia.

3.5.3. Detección de fluorescencia con Calceína.**3.5.3.1. Materiales.****Biológicos:**

ADN total.

Reactivos y/o soluciones

Calceína (Sigma, Cat. No.: C0875).

Dimetil sulfóxido (Sigma, Cat. No.: D8418).

Equipos y otros materiales:

Set de micropipetas (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles).

Balanza analítica (Mantener calibrada).

Transiluminador UV

Cámara fotográfica.

3.5.3.2. Métodos.

Paso 1: Para usar el método de detección con el aumento de la fluorescencia con Calceína, se disolvió la Calceína en Dimetil sulfóxido a 5mM y se preparó

una solución stock que consistió de 0.5 mM de Calceína y agua grado Biología molecular. Se almacenó protegido de la luz hasta su utilización.

Paso 2: Se añadió 1 µl de la solución de stock de Calceína a la premezcla de reacción antes de la amplificación del ensayo LAMP.

Reactivo:	Concentración		Volumen
	Inicial:	Final:	Por reacción*:
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	15.7 µl x n
Buffer de amplificación 10 x	10X	1X	2.5 µl x n
dNTP's	10 Mm	0.28 mM	0.7 µl x n
Oligonucleótido FIP	100 µM	1.6 µM	0.4 µl x n
Oligonucleótido BIP	100 µM	1.6 µM	0.4 µl x n
Oligonucleótido F3	25 µM	0.2 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido B3	25 µM	0.2 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido LF	100 µM	0.8 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido LB	100 µM	0.8 µM	0.2 µl x n
Betaína	120 µM	2.5 µM	0.5 µl x n
Calceína	0.5 mM	20 µM	1 µL
Muestra de ADN total	--- µg/µl	--- µg/µl	2 µl x n
Volumen final	-----	-----	24 µl x n

*n=número de muestras.

Paso 3: Los próximos pasos son los ya descritos (**Sección 6.4.2, Pasos 7-11**).

Paso 4: Completado el procesos de amplificación del ensayo se analizó los tubos con los productos observando el color de la reacción.

3.5.4. Cambio de color mediante el uso de Azul de hidroxinaftol.

3.5.4.1. Materiales

Biológicos:

ADN total.

Reactivos y/o soluciones

Agua grado Biología molecular.

Azul de hidroxinaftol (Sigma Aldrich Cas.: 165660-27-5)

Equipos y otros materiales:

Set de micropipetas (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles).

Cámara fotográfica.

3.5.4.2. Métodos

Paso 1: Se disolvió el Azul de hidroxinaftol en agua grado biología molecular a 20 mM para preparar una solución stock.

Paso 2: Posteriormente se realizó una premezcla para el ensayo de amplificación LAMP para detección de ADN de *B. abortus* con todos los reactivos antes descritos (**Sección 6.4**) con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (25 µl de volumen final por reacción) colocando en el siguiente orden los reactivos exceptuando las muestras de ADN total:

Reactivo:	Concentración		Volumen
	Inicial:	Final:	Por reacción*:
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	16.45µl x n
Buffer de amplificación 10 x	10X	1X	2.5 µl x n
dNTP's	10 mM	0.28 mM	0.7 µl x n
Oligonucleótido FIP	100 µM	1.6 µM	0.4 µl x n
Oligonucleótido BIP	100 µM	1.6 µM	0.4 µl x n
Oligonucleótido F3	25 µM	0.2 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido B3	25 µM	0.2 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido LF	100 µM	0.8 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido LB	100 µM	0.8 µM	0.2 µl x n
Betaína	120 µM	2.5 µM	0.5 µl x n
Azul de hidroxinaftol	12 mM	480µM	0.25 µl x n
Muestra de ADN total	--- µg/µl	--- µg/µl	2 µl x n
Volumen final	-----	-----	24 µl x n

*n=número de muestras.

Paso 3: Los próximos pasos son los ya descritos (**Sección 6.4.2, Pasos 7-11**).

Paso 4: Terminado el proceso de amplificación del ensayo LAMP se procedió a observar bajo luz natural distinguiendo si hay cambio de color en las diferentes reacciones.

3.6. Análisis y fotodocumentación de los resultados generados por el ensayo LAMP.

3.6.1. Materiales

Reactivos y soluciones

Gel de agarosa con las muestras

Tubos de PCR o viales de 200 µl con los productos amplificados

Equipos y otros materiales

Fotodocumentador UV-Impresora.

Transiluminador UV.

Cámara fotográfica.

3.6.2. Métodos



Paso 1: El gel agarosa TAE con las muestras se llevó al fotodocumentador y se guardaron las imágenes observando la amplificación de ADN de *B. abortus* en las muestras positivas.

Paso 2: Los viales de PCR (200 µl) con los productos de amplificación con SYBR green se analizaron bajo luz natural, los cuales se mostraron de color verde en el caso de ser positiva una muestra, mientras que de color naranja aquellas muestras negativas; bajo luz UV se observó un aumento de la fluorescencia en una muestra positiva. Se contrastó los resultados con la realización de electroforesis en gel agarosa sin Bromuro de etidio.

Paso 3: Los viales de PCR (200 µl) con los productos de amplificación en los que se incluyó el Azul de hidroxinaftol se analizaron bajo luz natural, se consideraron las muestras positivas cuando el color cambió del violeta al azul cielo.

Paso 4: Los viales de 200 µl con los productos de amplificación en los que se incluyó el fluorescente Calceína se analizaron bajo luz natural, observándose que el color posiblemente cambió de amarillo a naranja en una muestra positiva.

3.7. Análisis estadístico

Para evaluar los resultados obtenidos en la implementación del ensayo LAMP se realizó una estadística descriptiva, mientras que para contrastar los diferentes métodos de detección colorimétricos utilizados en el ensayo LAMP se procedió a efectuar una prueba no paramétrica U de Mann Whitney.

4. RESULTADOS

A continuación se detallan los resultados alcanzados en las diferentes actividades realizadas:

4.1. Preparación de las muestra.

En este trabajo para la implementación y evaluación del ensayo LAMP para la detección de *B. abortus* en muestras biológicas de bovino. Se tomaron aproximadamente 120 ml de leche de tres vacas en producción de la granja de Iruquis de la F.CC.AA de la Universidad de Cuenca y 2 nódulos linfáticos procedente de animales sacrificados en el Camal Municipal de Azogues.

En las muestras de leche se realizó alícuotas de 2 ml en tubos Eppendorf, se procedió a centrifugar y se tomó 450 μ l de la misma en la que se incluía la parte de grasa, a cada tubo se inoculó 50 μ l de las diluciones realizadas de cada una de las cepas vacunales iniciando la concentración desde 1,000.000 de bacterias por ml, se inoculó siete tubos que representan una curva; realizándose por triplicado las curvas para cada una de las cepas vacunales teniendo las diluciones desde 1×10^6 UFC/ml hasta 1×10^0 UFC/ml en leche, también se realizó una muestra de leche sin la inoculación de bacterias.

El tejido almacenado en la solución de conservación (1 gramo) se descongeló y se realizó fraccionamiento para obtener porciones de aproximadamente 25 mg a los cuales se inoculó 25 μ l de cada una de las cepas vacunales, teniendo una concentración de 10,000,000 de bacterias por ml, se inoculó siete tubos que representan una curva; realizándose por triplicado las curvas para cada una de las cepas vacunales teniendo las diluciones desde 10×10^6 UFC/g hasta 10×10^0 UFC/g, también se realizó una muestra de tejido sin la inoculación de bacterias.

4.2. Extracción de ADN total.

Para la extracción de ADN en las curvas de leche se utilizó el protocolo reportado por Romero & Lopez-Goñi (48) con algunas modificaciones, mientras que para la extracción de ADN en tejidos se utilizó el protocolo reportado por Matrone et al. (29), descritos anteriormente (**Sección 6.3.2**).

Obtenida la pastilla de ADN total se resuspendió en 50 μ l de Solución Buffer TE 10:1 1X. Se almacenó a -20 °C hasta su utilización. Previo a la realización del ensayo LAMP y con el fin de evaluar y validar el protocolo de extracción y

purificación de ADN total se realizó un control de proceso (Detección de ADN genómico de bovino) en el que se pudo verificar que se logró obtener ADN de las tres réplicas de cada una de las cepas vacunales realizadas en leche (**Figura 2**), mientras que en el ADN total de tejidos se observó variabilidad en cada una de las cepas vacunales; se sospecha la presencia de inhibidores endógenos presentes en los mismos lo que impidió la amplificación de ADN en control de proceso PCR (**Figura 3**). Se consideró como muestra válida toda aquella en la que se logró amplificar el fragmento correspondiente al control de proceso. Y como muestra positiva, toda aquella que mostró un producto de PCR de un tamaño entre 720 bp, que corresponde a la amplificación de una secuencia específica del género *Bos*.

Detección de material genético de *B. abortus*. Control de proceso.

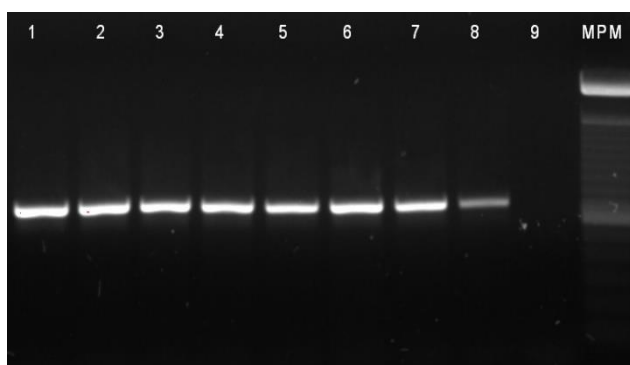


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de los productos de PCR correspondientes al control de proceso en leche. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: Productos de PCR; carril 9: Control negativo, Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder).

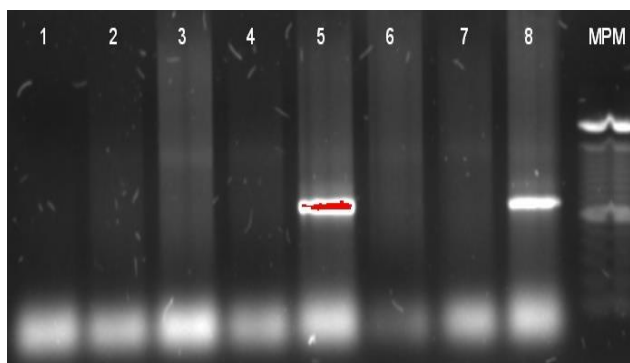


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de los productos de PCR correspondientes al control de proceso en tejidos. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, Productos de PCR; carril 8: Control negativo de tejido sin inoculación de las cepas vacunales y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder).

4.3. Verificación de ausencia de ADN de *B. abortus*.

Antes de realizar el ensayo LAMP de las inoculaciones en leche y en tejidos; se procedió a realizar un ensayo LAMP para la detección de ADN de *B. abortus*, para eso se tomó una alícuota de leche (500 µl) y una porción de tejido de nódulo linfático (25 mg) sin inoculación de bacterias y se realizó la extracción de ADN total con los respectivos protocolos. Conseguida la pastilla de ADN total se resuspendió en 50 µl de Solución Buffer TE 10:1 1X. Posteriormente se realizó el ensayo LAMP con todos los reactivos antes mencionados (**Sección 6.4**) en el que se observó un resultado negativo en la amplificación con lo que se asumió la ausencia de ADN de *B. abortus* en las muestras de leche y tejidos.

4.4. Evaluación de la sensibilidad analítica del ensayo LAMP en las curvas realizadas tanto de leche como de tejidos mediante electroforesis en gel agarosa TAE teñido con Bromuro de Etidio, la detección de fluorescencia con SYBR green y Calceína y cambio de color mediante el uso de Azul de hidroxinaftol.

4.4.1. Verificación de la amplificación de ADN de *B. abortus* mediante el ensayo LAMP.

Tal como se mencionó anteriormente (**Sección.6.3.2**) se extrajo el ADN de las cepas vacunales S19 y RB51; se procedió a realizar el ensayo LAMP y mediante electroforesis en gel agarosa TAE teñido con Bromuro de Etidio se pudo observar ADN de *B. abortus* amplificado. (**Figura 4**).

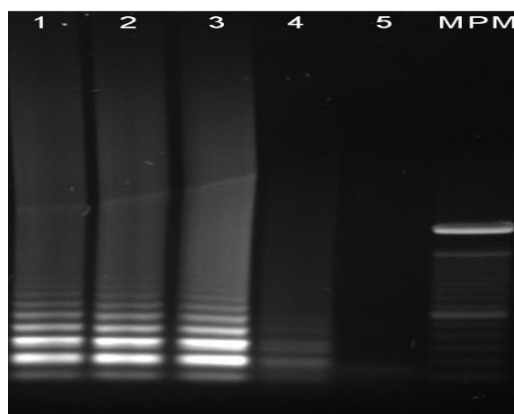


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de LAMP correspondientes a las cepas vacunales. Carriles 1, 2 (Cepa vacunal *B. abortus* S19), 3, 4 (Cepa vacunal *B. abortus* RB51), carril 5: Control negativo y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder).

4.4.2. Electroforesis en gel agarosa TAE teñido con Bromuro de Etidio.

Realizados todos los ensayos LAMP en las tres réplicas de cada una de las cepas vacunales S19 y RB51 en leche y aplicando el método de detección en electroforesis en gel de agarosa TAE teñido con Bromuro de Etidio se observó ADN de *B. abortus* susceptible a ser amplificado por lo que se consideró como una réplica positiva, observándose que el nivel promedio de detección en leche fue de 10 UFC/ml (**Tabla 2 y Figura 5**).

Tabla 2: Resultados de las inoculaciones y diluciones de las cepas vacunales de S19 y RB51 en leche.

Numero de <i>B. abortus</i> /ml:	ENSAYO LAMP EN LECHE					
	S19			RB51		
	Replicas			Replicas		
	1ra	2da	3ra	1ra	2da	3ra
1×10^6	+	+	+	+	+	+
1×10^5	+	+	+	+	+	+
1×10^4	-	+	+	+	+	+
1×10^3	-	+	+	+	+	-
1×10^2	-	-	+	+	+	+
1×10^1	-	-	+	+	+	+
1×10^0	-	-	-	-	-	-

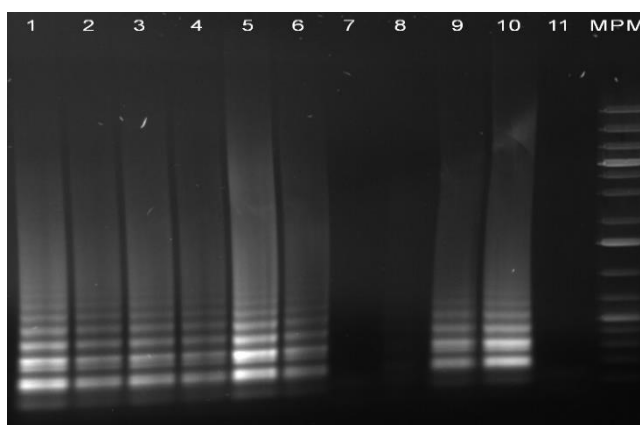


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de LAMP correspondiente a las cepas vacunales de *B. abortus* en leche. Carriles 1, 10^6 ; 2, 10^5 ; 3, 10^4 ; 4, 10^3 ; 5, 10^2 ; 6 10^1 ; 7, 10^0 : (dilución cepas vacunales de *B. abortus*) carril 8: Control Proceso (ADN Total de leche libre de *B. abortus*), carril 9 (S19), 10 (RB51): Controles positivos, carril 11: Control negativo y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kbp Plus DNA ladder).

En tejidos ya realizados los ensayos LAMP en las tres réplicas de cada una de las cepas vacunales y aplicando el método de detección en electroforesis en gel de agarosa TAE teñido con Bromuro de Etidio se logró observar ADN de *B. abortus* susceptible a ser amplificado pero que no puede calificarse como un ensayo viable debido a que en el control de proceso no se verificó la correcta extracción de ADN en todas las replicas realizadas en tejidos (**Figura 6**), por lo tanto no se pudo determinar el promedio de detección de UFC/g en tejidos.

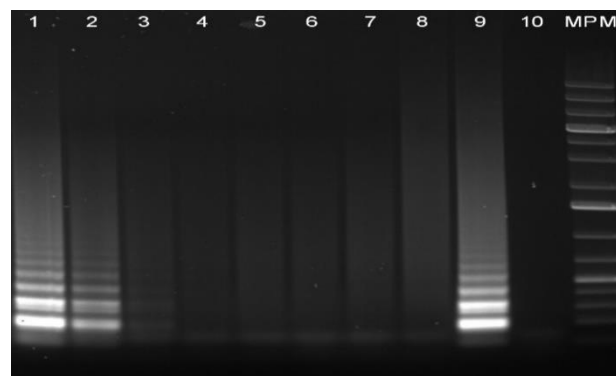


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de LAMP correspondiente a las cepas vacunales de *B. abortus* en tejidos. Carriles 1, 10^6 ; 2, 10^5 ; 3, 10^4 ; 4, 10^3 ; 5, 10^2 ; 6 10^1 ; 7, 10^0 : (dilución cepas vacunales de *B. abortus*) carril 8: Control Proceso (ADN Total de tejido libre de *B. abortus*), carril 9 (S19): Controles positivos, carril 10: Control negativo y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kbp Plus DNA ladder).

4.4.3. Detección de fluorescencia con SYBR green.

Posterior a la aplicación del fluorocromo SYBR green se observó cambio de coloración bajo luz natural del naranja al verde en muestra positiva y aumento de la fluorescencia bajo UV.

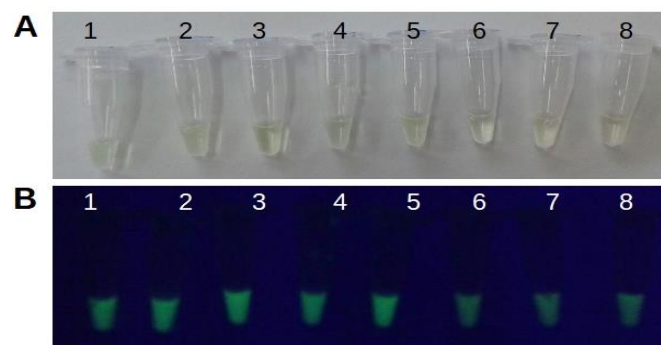


Figura 7: Productos de LAMP con SYBR green correspondiente a las cepas vacunales de *B. abortus* en leche: A) Luz natural, B) Luz Ultravioleta, Tubos: 1, 10^6 ; 2, 10^5 ; 3, 10^4 ; 4 10^3 ; 5, 10^2 ; 6 10^1 ; 7, 10^0 : (dilución cepas vacunales de *B. abortus*) tubo: 8: Control negativo.

4.4.4. Detección de fluorescencia con Calceína.

Durante la preparación de la premezcla del ensayo LAMP se añadió la Calceína antes de la amplificación. Terminado este proceso de amplificación del ensayo no se observó ningún cambio en la coloración del producto. Se llegó a la conclusión de que la amplificación del ensayo se inhibió por las bajas concentraciones de iones de Pirofosfato de Magnesio y como consecuencia no mostró un cambio en la coloración bajo luz natural ni un aumento de la fluorescencia bajo luz UV.

4.4.5. Detección por cambio de color con Azul de Hidroxinaftol.

Se aplicó el colorimétrico Azul de hidroxinaftol a cada tubo junto con la premezcla del ensayo LAMP, conociendo que la concentración de $MgSO_4$ fue de 2 mM que está incluida en el Buffer de amplificación 10 X. que acompaña a la enzima *Bsm* DNA polimerasa. Terminado el proceso de amplificación del ensayo LAMP no se observó un cambio de color apreciable en los tubos de reacción (**Figura 8**); pero al realizar electroforesis en gel agarosa TAE se pudo ver la presencia de ADN de *B. abortus* amplificado.

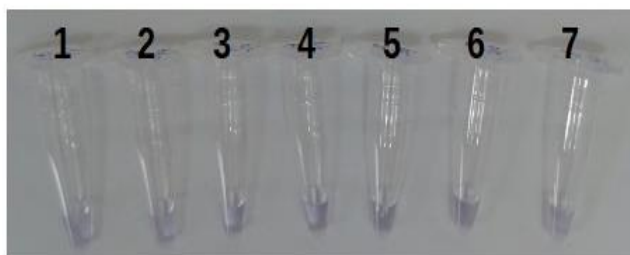


Figura 8: Productos de LAMP con Azul de Hidroxinaftol correspondiente a las cepas vacunales de *B. abortus* en leche. Luz natural: Tubos: 1, 10^6 ; 2, 10^5 ; 3, 10^4 ; 4, 10^3 ; 5, 10^2 ; 6 10^1 ; 7, 10^0 : (dilución cepas vacunales de *B. abortus*).

Se debe indicar que la cantidad requerida de $MgSO_4$ para lograr una amplificación acorde a lo esperado es de 6 mM por lo que se optó por adicionar ésta cantidad a la premezcla de reacción del ensayo LAMP. Terminada los procesos de amplificación del ensayo LAMP se pudo apreciar que la amplificación del ADN se inhibió debido a la concentración en exceso de $MgSO_4$.

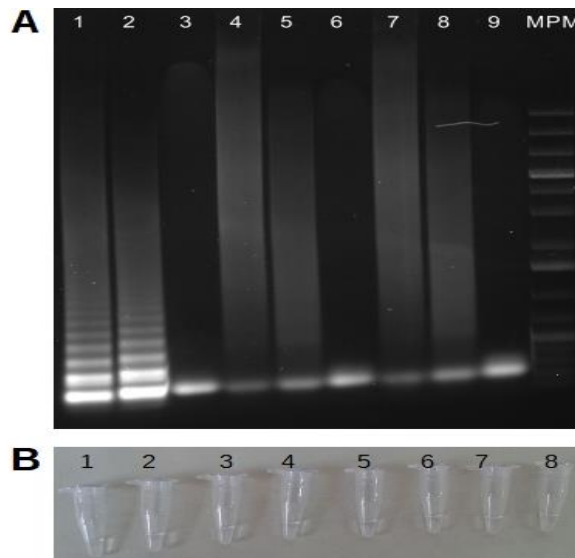


Figura 9: Productos de LAMP con Azul de hidroxinaftol + MgSO_4 correspondiente a las cepas vacunales de *B. abortus* en leche: A) Gel electroforesis al 0.8%: carriles 1, 10^6 ; 2, 10^6 (inoculación *B. abortus* S19 y RB51) con **Betaina** 120 μM , carril 3 control negativo; carril 4, 10^6 ; 5, 10^6 (inoculación *B. abortus* S19 y RB51) con **MgSO_4** 6 mM, carril 6 control negativo; carril 7, 10^6 ; 8, 10^6 (inoculación *B. abortus* S19 y RB51) con **Bet+ MgSO_4** , carril 9 control negativo y carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kbp Plus DNA ladder). B) Luz natural (tubos Eppendorf misma descripción).

4.5. Análisis estadístico.

Al usar una estadística descriptiva se clasificó como muestra positiva aquella que presentó amplificación de ADN de *B. abortus* con electroforesis en gel agarosa TAE teñido con Bromuro de Etidio y con SYBR green bajo luz natural un cambio del color naranja al verde así mismo un aumento de la fluorescencia bajo luz UV.

Al contrastar los dos métodos de detección trabajados en el ensayo LAMP: electroforesis en gel agarosa teñido con Bromuro de Etidio y la detección de fluorescencia con SYBR green, no se encontró diferencias significativas $P > 0,05$ con la prueba no paramétrica U de Mann Whitney ya que los datos obtenidos no mostraban una homología, para llevar a cabo este análisis se creó un archivo en SPSS versión 19 (50).

5. DISCUSIÓN

En ésta investigación se tuvo como objetivo principal la implementación del ensayo LAMP y evaluar la sensibilidad analítica en la detección de material genético de las cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51 en muestras de leche y tejidos de nódulos linfáticos de bovinos mediante el uso de electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio, la detección de fluorescencia con SYBR green y Calceína y cambio de color mediante el uso de Azul de hidroxinaftol.

Al aplicar el protocolo para la extracción de ADN total (48) en leche inoculado con cada una de las cepas vacunales se logró obtener ADN total que mediante el control de proceso con PCR se pudo verificar su presencia siendo los resultados reproducibles coincidiendo con la experiencia reportada por Romero & Lopez-Goñi (48).

En lo que respecta a la aplicación del protocolo para la de extracción de ADN total en tejidos (29), no se consiguió los resultados esperados, esto fue demostrado por el control de proceso, que muestra gran variabilidad en la amplificación de ADN total mediante PCR, lo que causa que no tengamos un ensayo confiable al aplicar el método LAMP para la detección de *B. abortus*, se presume que la presencia de inhibidores de origen endógeno presente en los tejidos de nódulos linfáticos como el colágeno, sangre, mioglobina entre otros, insuficientemente purificados interfiere con la amplificación de la enzima *Taq* ADN polimerasa coincidiendo con las investigaciones realizadas por Rådström P, et al. (51), Singh KK, et al. (52), Hughes MS, et al. (53), además el tejido se sometió a un medio de conservación que contenía alcohol, el cual ha demostrado que puede degradar el ADN a fragmentos cortos alrededor de 200 bp, que provoca que al aplicar el ensayo PCR para amplificar ADN de mayor tamaño, como en nuestro caso, no haya amplificación concordando con la investigación reportada por Schrader C, et al. (54).

La detección del ADN de *B. abortus* mediante la aplicación del ensayo LAMP y con el uso de electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio y la detección de fluorescencia con SYBR green, se pudo establecer el nivel de detección del ensayo LAMP siendo de 10 UFC/ml de leche, al aplicar una prueba no paramétrica como la prueba de U de Mann Whitney para contrastar los dos métodos de detección no se encontraron diferencias

significativas con un $P > 0,05$, siendo factible aplicar cualquiera de estos métodos de detección. En el trabajo realizado por Wanget al. (55) encontraron que el nivel de sensibilidad del ensayo RT-LAMP es 10 copias del ácido nucleico necesarias para la amplificación. Nijiru et al. (56) obtiene datos similares, determinando que LAMP puede detectar *T. b. rhodiense* (*Trypanosoma brucei rhodesiense*), 10 parásitos/ml de sangre, manifestando coincidencias al contrastar con éste trabajo. Notomi et al. (31) reportó que LAMP detecta hasta seis copias de ácido nucleico, no mostrando un nivel significativo de diferencia con nuestro estudio.

Adicionalmente, en éste estudio se aplicó la detección de fluorescencia con SYBR green, los resultados fueron notables a simple vista, cambiando del color naranja al verde en una muestra positiva con un aumento de la fluorescencia bajo luz UV. Parida et al. (36) en su investigación utilizó SYBR green en sus productos del ensayo concluyendo que una muestra positiva cambia del color naranja al verde a simple vista y bajo luz UV presenta aumento de fluorescencia. En una investigación realizada por Karthik et al. (57), donde analiza el ensayo LAMP para la detección de *B. abortus* en bovinos, obtuvo resultados similares con SYBR green siendo estos resultados acorde a los expuestos en este trabajo.

Por otro lado, se aplicó Calceína a la reacción del ensayo LAMP; notándose que no se obtuvo los resultados esperados. Tomita et al.(35) en su trabajo usó Calceína en una solución de reacción LAMP y llegó a la conclusión que la reducción del ión Magnesio no fue lo necesario y no cambió el color a un nivel detectable por observación visual, estos resultados coinciden con los obtenidos en este estudio. Tomita et al. (35) dedujo que al aplicar Calceína junto con ión Manganoso, este ión se verá privado de la Calceína por el ión pirofosfato generado, lo que da como resultado emisión de fluorescencia, la Calceína libre se une al ión Magnesio en la mezcla de la reacción de tal manera que aumenta la fluorescencia.

Al aplicar el método de detección mediante el cambio de color con el uso de Azul de hidroxinaftol no se obtuvo resultados satisfactorios, no observándose cambio de color del violeta al azul cielo en una muestra positiva. Para lograr este cambio de color es necesario una concentración de 6 mM de $MgSO_4$, en este estudio se utilizó la enzima *Bsm* ADN polimerasa que en la solución de



amplificación solo posee 2 mM, que al llevar a la concentración requerida el proceso de amplificación de ADN de *B. abortus* mediante el ensayo LAMP se vio inhibida por el exceso de MgSO_4 .

6. CONCLUSIONES

En esta investigación llevada a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca se procesó tres réplicas de cada una de las cepas vacunales con leche y tejidos de nódulos linfáticos, de las que solo se obtuvo ADN total susceptible de ser amplificado por el ensayo LAMP de las tres réplicas de cada una de las cepas vacunales realizadas en leche.

La implementación del ensayo LAMP reportado por Kang et al. (33) para la detección de ADN de *B. abortus* en leche fue factible se pudo verificar su presencia siendo los resultados reproducibles.

Se logró determinar la sensibilidad analítica del ensayo LAMP en las muestras de leche inoculadas con cada una de las cepas vacunales estableciendo que el nivel de detección fue de 10 UFC/ml de leche.

En tejidos no fue posible estimar la sensibilidad analítica, debido a la presencia de posibles inhibidores endógenos que impidieron la amplificación del ADN en el control de proceso mediante PCR, lo que provocó que al realizar el ensayo LAMP si éste mostraba amplificación de ADN de *B. abortus* no sea totalmente confiable.

Con respecto al método de detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio se pudo establecer la sensibilidad analítica del ensayo LAMP, y la detección por aumento de la fluorescencia con SYBR green se observó que es factible la aplicación de este reactivo a los productos de la amplificación del ensayo LAMP, con la subsiguiente visualización de los resultados a simple vista.

7. RECOMENDACIONES

Instaurar un protocolo de extracción de ADN en tejidos en el que sea posible la eliminación de inhibidores endógenos y así se obtenga el ADN más puro con la subsiguiente visualización y amplificación del ADN diana.

Con la implementación del ensayo LAMP para la detección de ADN de *B. abortus* en leche ya establecida en el laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA de la Universidad de Cuenca se propone continuar con la colecta de muestras de animales para la aplicación del ensayo a nivel del campo estableciendo así un diagnóstico preliminar del estadio de salud de la población animal bovina.

Contando con la información de la aplicación del ensayo LAMP en campo se fundamentara el desarrollo de herramientas profilácticas y de control específicas, para en lo posible llegar a la erradicación de la brucelosis bovina en el Ecuador.



8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Schelling E, Diguimbaye C, Daoud S, Nicolet J, Boerlin P, Tanner M, et al. Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. *Prev Vet Med.* 2003; 61: 279 – 293.
2. Wadood F, Ahmad M, Khan A, Gul ST, Rehman N. Seroprevalence of brucellosis in horses in and around Faisalabad. *Pak Vet J.* 2009; 29:196-198.
3. da Silva JP, Araújo-Franca S, Paixão TA, Lima-Santos R. Laboratorial diagnosis of animal brucellosis. *R Bras Ci Vet* 2012; 19(3):117-126.
4. Scholz HC, Revilla-Fernández S, Al Dahouk S, Hammerl JA, Zygmunt MS, Cloeckaert A, et al. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016; 66:2090-2098.
5. Whatmore AM, Davison N, Cloeckaert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014; 64:4120-4128.
6. Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian J Med Microbiol.* 2007; 25(3):188-202.
7. Acha P, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª ed. Washington, EEUU: OPS. 2001; 28-56.
8. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Código sanitario para los animales terrestres. Brucelosis Bovina. (18º Ed). Capítulo 2.4.3. Paris-Francia. 2009; 1-35.
9. Bruce D. Recent researches into the epidemiology of Malta fever. *J R Army Med Corps.* 1907; 8:225-235.
10. Wyatt H.V. How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. *J R Soc Med.* 2005; 98:451-454.
11. Seleem MN, Jain N, Pothayee N, Ranjan A, Riffle JS, Sriranganathan N. Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 294:24-31.
12. Reyes J, Sánchez M, Lotero M, Restrepo M, Palacio L. Seroprevalencia e incidencia de *Brucella sp* en vacunadores del Programa para el Control de Brucelosis Bovina, en el Departamento de Antioquia-Colombia. *Rev*



- Colomb Cienc Pecu. 2010; 23:35-46.
13. İça, T, Aydin F, Gümüşsoy S, Perçin D, Sümerkan AB, Ocak F, et al. Conventional and molecular biotyping of *Brucella* strains isolated from cattle, sheep and human. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2012; 59:259-264.
 14. Rodríguez M, Solera J, Sánchez L, Álvarez M. Brucelosis. Aspectos patogénicos. Clínica, diagnóstico y tratamiento. Formas específicas de la enfermedad. Medicine. 1998; 7(79):3651-3658.
 15. Agrocalidad. Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina. Dirección de Sanidad Animal Programas Específicos. 2009; 1-75. Disponible en: www.agrocalidad.gov.ec
 16. Ron-Román J, Ron-Garrido L, Abatih E, Celi-Erazo M, Vizcaíno-Ordoñez L, Calva-Pacheco J, et al. Human brucellosis in Northwest Ecuador: Typifying *Brucella* spp., seroprevalence, and associated risk factors. Vector Borne Zoonotic Dis. 2014; 14(2):1-10.
 17. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis. 1997; 3(2):213-221.
 18. Sbriglio JL, Sbriglio H, Sainz S. Brucelosis. Rev Bioanálisis. 2007; 19-22.
 19. Rivers R, Andrews E, González-Smith A, Donoso G, Oñate A. *Brucella abortus*: immunity, vaccines and prevention strategies based on nucleic acids. Arch Med Vet. 2006; 38(1):7-18
 20. Allardet-Servent A, Bourg G, Ramuz M, Pages M, Bellis M, Roizes G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. J Bacteriol. 1988; 170(10):4603-4607.
 21. Kaltungo BY, Saidu SNA, Sackey AKB, Kazeem HM. A review on diagnostic techniques for brucellosis. Afr J Biotechnol. 2014; 13(1):1-10.
 22. Ficht T. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. Vet Microbiol. 2003; 92:213-223.
 23. Meza A, Morales S, Ara M, Manchego A, Calle S, Angulo C. Seroprevalencia de brucelosis bovina en el distrito de Puerto Inca, Huánuco. Rev Investig Vet Perú. 2010; 21(2):223-226.
 24. Godfroid J, Saegerman C, Wellemans V, Walravens K, Letesson J, Tibor A, et al. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. Vet Microbiol. 2002; 90:461–477.
 25. Hausler W, Koontz F. Manual of Clinical Microbiology. 2nd ed. E. Lennette,



- E. Spaulding, J. Truant (eds.). ASM. Washington, D. C. 1974; 295-301.
26. Rabinowitz PM, Gordon Z, Odofin L. Pet-related infections. Am Fam Physician. 2007; 76(9):1314-1322.
 27. Fekete A, Bantle JA, Halling SM. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. J Vet Diagn Invest. 1992; 4(1):79–83.
 28. Asif M, Awan AR, Babar ME, Ali A, Firyal S, Khan QM. Development of genetic marker for molecular detection of *Brucella abortus*. Pak J Zool Suppl Ser. 2009; 9:267-271.
 29. Matrone M, Keid LB, Rocha VCM, Vejarano MP, Ikuta CY, Rodriguez CAR, et al. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. Braz J Microbiol. 2009; 40:480-489.
 30. Ewalt D, Bricker B. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strains isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. J Clin Microbiol. 2000; 38(8):3085-3086.
 31. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000; 28(12):1-7.
 32. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. J Infect Chemother. 2009; 15:62-69.
 33. Kang S-II, Moon Her, Ji-Yeon Kim, Jin Ju Lee, Kichan Lee, So-Ra Sung, et al. Rapid and specific identification of *Brucella abortus* using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2015; 1-6.
 34. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A. Short technical reports. Colorimetric detection of loop mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. BioTechniques. 2009; 46(3):167-172.
 35. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc. 2008; 3(5):877-882.
 36. Parida M, Horioka K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, et al. Rapid


- detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription loop mediated isothermal amplification assay. J Clin Microbiol. 2005; 43(6):2895-2903.
37. Abubakar M, Mansoor M, Arshed MJ. Bovine brucellosis: old and new concepts with Pakistan perspective. Pak Vet J. 2012; 32(2): 147-155.
 38. Mukhtar F, Kokab F. Brucella serology in abattoir workers. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2008; 20(3):57-61.
 39. Buck JM. Studies of vaccination during calfhood to prevent bovine infectious abortion. J Agric Res. 1930; 41(9):667-689.
 40. Jones LM, Montgomery V, Wilson JB. Characteristics of carbon dioxide independent cultures of *Brucella abortus* isolated from cattle vaccinated with strain 19. J Infect Dis. 1965; 115(3):312-320.
 41. Aréstegui MB, Gualtieri C, Domínguez J, Scharovsky G. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. Vet Méx. 2001; 32(2):131-139.
 42. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. Vet Microbiol. 2002; 90:479-496.
 43. Olsen SC. Immune responses and efficacy after administration of commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. Vet Ther. 2000; 1(3):183-191.
 44. Moriyon I, Grillo MJ, Monrea ID, Gonzalez D, Marin C, Lopez GI, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. Vet Res. 2004; 35 (1):1-38.
 45. Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. Vet Microbiol. 1991; 28(2):171-188.
 47. Pasquali P, Adone R, Gasbarre L, Pistoia C, Ciuchini F. Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. Infect Immun. 2001; 69(10):6541-6544.
 48. Romero C, López- Goñi I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65(8):3735-3737.
 49. López-Calleja I, Gonzales I, Fajardo V, Rodríguez MA, Hernández PE, García T, et al. Rapid detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk by



- a species-specific polymerase chain reaction technique. J. Dairy Sci. 2004; 87(9): 2839-45.
50. IBM SPSS Statistics Versión 19.0. Licensed Materials-Property of SPSS, Inc., and IBM Company © Copyright. NY; 1989-2010.
51. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. Mol Biotechnol. 2004; 26:133–146.
52. Singh KK, Muralidhar M, Kumar A, Chattopadhyaya TK, Kapila K, Singh MK, et al. Comparison of in house polymerase chain reaction with conventional techniques for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in granulomatous lymphadenopathy. J Clin Pathol. 2000; 53:355–361.
53. Hughes MS, Beck LA, Skuce RA. Identification and elimination of DNA sequences in *Taq* DNA polymerase. J Clin Microbiol. 1994; 32:2007-2008.
54. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol. 2012; 1014-1026.
55. Wang X, Zhang Q, Zhang F, Ma F, Zheng W, Zhao Z, et al. Visual detection of the human metapneumovirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. Virol J. 2012; 9:1-6.
56. Njiru ZK, Mikosza AS, Armstrong T, Enyaru JC, Ndung'u JM, Thompson AR. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. PLoS Negl Trop Dis. 2008; 2(2):1-8.
57. Karthik K, Rathore R, Thomas P, Arun TR, Viswas KN, Agarwal RK, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test for specific and rapid detection of *Brucella abortus* in cattle. Vet Q. 2014; 34(4):174-179. DOI: 10.1080/01652176.2014.966172.

9. ANEXOS

Anexo 1: Formato de ensayo de PCR para la amplificación del control de proceso.

 UNIVERSIDAD DE CUENCA desde 1867	Laboratorio de Biología Molecular		01-FE-MBM-TaqPol	
			Versión:	1
	Formato de ensayo: Taq ADN polimerasa		Fecha:	2016.08.23
			Página:	1 de 2

A.- Información del ensayo:

Usuario: <u>Antonio V.</u>			
Fecha: <u>2016.09.07</u>	Nombre del programa: <u>...</u>		
No:	Nombre del producto de PCR:	Tamaño (bp):	Observaciones:
1	<u>125 Rb Hit</u>	<u>±707-708</u>	<u>Control de proceso, según 12.5 de gen ribosomal del genoma mitocondrial. Bos spp.</u>
2			
3			
4			
5			

B.- Mezcla de reacción:

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	de premezcla:	por reacción:
Agua grado Biología Molecular.	No aplica.	No aplica.	<u>373</u> µl	<u>18.65</u> µl
Tampon de amplificación 10X.	10X	1X	<u>50</u> µl	<u>2.5</u> µl
Solución de dNTP's.	<u>10</u> mM	<u>0.1</u> mM	<u>5</u> µl	<u>0.5</u> µl
Solución de MgCl ₂ .	<u>50</u> mM	<u>2.0</u> mM	<u>20</u> µl	<u>1.0</u> µl
Oligonucleotido <u>125PW-HitF</u>	<u>100</u> µM	<u>0.8</u> µM	<u>4</u> µl	<u>0.2</u> µl
Oligonucleotido <u>125PW-HitR</u>	<u>100</u> µM	<u>0.8</u> µM	<u>4</u> µl	<u>0.2</u> µl
Oligonucleotido _____-F.	_____ µM	_____ µM	_____ µl	_____ µl
Oligonucleotido _____-R.	_____ µM	_____ µM	_____ µl	_____ µl
Oligonucleotido _____-F.	_____ µM	_____ µM	_____ µl	_____ µl
Oligonucleotido _____-R.	_____ µM	_____ µM	_____ µl	_____ µl
Enzima Taq ADN polimerasa.	<u>5</u> U/µl	<u>0.04</u> U/µl	<u>4</u> µl	<u>0.2</u> µl
Muestra de ADN total.	_____ µg/µl	_____ µg/µl	<u>40</u> µl	<u>2.0</u> µl
Volumen final:	_____	_____	_____ µl	<u>25</u> µl


C.- Perfil de temperaturas de amplificación:

Paso:	Desnaturalización inicial:	Número de ciclos: <u>35</u>			Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:		
Tiempo (min, seg):	<u>5' = "</u>	<u>45"</u>	<u>30"</u>	<u>45"</u>	<u>5' = "</u>	8
Temperatura (°C):	<u>94</u> °C	<u>94</u> °C	<u>60</u> °C	<u>72</u> °C	<u>72</u> °C	<u>4</u> °C

D.- Curva de temperatura de alineamiento:

No:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TM (°C):												
Tubo No.:												
Tubo No.:												
Tubo No.:												

Anexo 2: Formato del ensayo LAMP para la amplificación de material genético de *B. abortus*.

 UNIVERSIDAD DE CUENCA desde 1867	Laboratorio de Biología Molecular		02-FE-MBM-BsmPol	
	Formato de ensayo: <i>Bsm</i> ADN polimerasa		Versión:	1.1
			Fecha:	2016.12.21
			Página:	1 de 2

A.- Información del ensayo:

Usuario:	Antonio J. Vallejo
Fecha:	2016.12.22
Detección de:	<i>B. abortus</i>
Nombre del programa:	LAMP- Bsm
Observaciones	

B.- Premezcla de reacción (Desnaturalización / alineamiento):

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	de premezcla:	por reacción:
Agua grado Biología Molecular.	No aplica.	No aplica.	86 µl	17.2 µl 17.
Buffer de amplificación 10X.	10X	1X	12.5 µl	2.5 µl
Solución de dNTP's.	10 mM	0.28 mM	3.5 µl	0.7 µl
Oligonucleotido <i>Bsm</i> . FIP.	100 µM	1.6 µM	2.0 µl	0.4 µl
Oligonucleotido <i>-BIP</i> .	100 µM	1.6 µM	2.0 µl	0.4 µl
Oligonucleotido <i>-F3</i> .	25 µM	0.2 µM	1.0 µl	0.2 µl
Oligonucleotido <i>-B3</i> .	25 µM	0.2 µM	1.0 µl	0.2 µl
Oligonucleotido <i>-LF</i> .	100 µM	0.8 µM	1.0 µl	0.2 µl
Oligonucleotido <i>-LB</i> .	100 µM	0.8 µM	1.0 µl	0.2 µl
Muestra de ADN total.	µg/µl	µg/µl	10.0 µl	2.0 µl
Volumen final:			120 µl	24 µl 10 µl

C.- Desnaturalización / alineamiento:

Paso:	Desnaturalización:	Alineamiento:
Tiempo (min ' , seg ' '):	5 "	5 "
Temperatura (°C):	94 °C	4 °C

D.- Mezcla de reacción (Extensión / inactivación):

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	de premezcla:	por reacción:
Enzima <i>Bsm</i> DNA polimerasa.	8 U/µl	6.32 U/µl	5 µl	1 µl
Volumen final:			125 µl	25 µl

E.- Extensión / inactivación:

Paso:	Extensión:	Inactivación:
Tiempo (min ' , seg ' '):	60 "	10 "
Temperatura (°C):	60 °C	80 °C