



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TITULO:** Aplicación de un ensayo de PCR convencional múltiple para la detección y diferenciación de cepas de campo y cepas vacunales S19 y RB51 de *Brucella abortus* en muestras biológicas de bovinos.

Tesis previa a la obtención del título de  
Médico Veterinario Zootecnista.

**AUTORA:** María Elena Aucancela Yunganula **C.I.** 0302622402

**DIRECTOR:** Mvz. Antonio Javier Vallecillo Maza, PhD **C.I.** 0151059417

**CUENCA, ECUADOR**

**(2017)**



## RESUMEN

La brucelosis bovina es una enfermedad infecto-transmisible de distribución mundial, causada por una bacteria del género *Brucella*. Esta enfermedad se caracteriza por abortos en el último tercio de la gestación y reducción de la fertilidad, constituyéndose un serio problema a nivel económico y sanitario. El objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación de un ensayo de PCR múltiple para el diagnóstico de la infección de *Brucella abortus* en dos muestras biológicas de bovinos seropositivos y seronegativos, que permita diferenciar las cepas de campo de las vacunales S19 y RB51. Para serología (Rosa de bengala) se colectaron muestras de sangre de 200 animales, de los cuales 82 vacas estaban en producción láctea, de las que se tomaron sendas muestras de leche para PCR más 69 muestras de tejido de nódulos linfáticos (preescapular derecho y/o izquierdo y supramamario). Se obtuvo una frecuencia de seropositivos del 8 % con rosa de bengala, y con PCR una frecuencia de casos positivos del 1.2%, que correspondía a una muestra de leche que presentó una banda de amplificación de 456 bp, que pertenece al amplicón esperado de la cepa vacunal S19, en las muestras de leche restantes y en las muestras de tejido se observaron varias bandas tenues de diferente tamaño, siendo amplificaciones inespecíficas, por lo que se concluye que la PCR múltiple evaluada en este estudio, no fue aplicable con los indicadores empleados.

**Palabras clave:** Brucelosis bovina, *Brucella abortus*, PCR múltiple.



## ABSTRACT

Bovine Brucellosis is an infectious-transmissible disease of global distribution, caused by a bacterium of the genus *Brucella*. This disease is characterized by abortions in the last third of gestation and reduced fertility, representing a serious economic and sanitary problem. The objective of this work was to evaluate a multiplex PCR assay for the diagnosis of *Brucella abortus* infection in milk and lymph node samples from seropositive and seronegative bovines distinguishing field strains from vaccine strains S19 and RB51. For serology (Rose Bengal) blood samples were collected from 200 animals, of which 82 cows were in milk production from which milk samples for PCR were taken, plus 69 samples of lymph node tissue (right and / or left prescapular and supramammary). Eight percent of the samples were found to be seropositive by rose bengal test, whereas only 1.2% of the samples resulted positive using the multiplex PCR, corresponding to a milk sample that presented a 456 bp amplification band, coincident with the expected amplicon length of the S19 vaccine strain. The remaining milk samples and in the tissue samples produced several thin bands of different sizes, being nonspecific amplifications, so it is concluded that the multiplex PCR evaluated in this study was not applicable for diagnosis with the primers used.

**Keywords:** Bovine Brucellosis, *Brucella abortus*, Multiplex PCR.



## INDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INDICE DE CONTENIDOS</b> .....	3
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	5
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	6
<b>INDICE DE ANEXOS</b> .....	7
<b>ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA</b> .....	8
<b>DEDICATORIA</b> .....	11
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	12
<b>CAPITULO I: INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>1.1 Objetivo general:</b> .....	14
<b>1.2 Objetivos específicos:</b> .....	14
<b>1.3 Pregunta de investigación</b> .....	15
<b>CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>2.1 BRUCELOSIS</b> .....	16
<b>2.2 SINONIMIA</b> .....	17
<b>2.3 SIGNOS</b> .....	17
<b>2.4 AGENTE CAUSAL</b> .....	17
2.4.1 Características del agente causal .....	18
<b>2.5 FUENTE DE INFECCIÓN</b> .....	19
<b>2.6 IMPORTANCIA ZONÓTICA</b> .....	20
2.6.1 Vías de transmisión en el humano .....	20
2.6.2 Signos y síntomas en el humano .....	20
2.6.3 Tratamiento de la brucelosis en humanos.....	21
<b>2.7 CONTROL Y ERRADICACION DE LA BRUCELOSIS BOVINA</b> .....	21
2.7.1 Vacuna con la cepa S19 de <i>B. abortus</i> .....	21
2.7.2 Vacuna con la cepa RB51 de <i>B. abortus</i> .....	23
<b>2.8 DIAGNÓSTICO</b> .....	24
2.8.1 Prueba de aglutinación con antígeno teñido con Rosa de Bengala (RBT, de sus siglas en Inglés) .....	25



2.8.2 Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en Inglés).....	26
<b>2.9 TRATAMIENTO .....</b>	<b>27</b>
<b>CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Área de estudio y unidad de análisis.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Prueba de aglutinación con antígeno teñido con Rosa de Bengala (RBT) .....</b>	<b>28</b>
3.2.1 Materiales: .....	28
3.2.2 Métodos:.....	29
<b>3.3 Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....</b>	<b>30</b>
3.3.1 Colecta, conservación, transporte y almacenado de las muestras de tejidos (Nódulos linfáticos pre-escapular derecho y/o izquierdo y supra-mamario) y leche de bovinos:.....	30
3.3.2 Procesamiento de las muestras biológicas colectadas: extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) total:.....	31
3.3.3 Generación de los productos de PCR específicos del control de proceso:.....	35
3.3.4 Generación de los productos de PCR específicos de <i>B. abortus</i> .....	37
3.3.5 Detección de los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio .....	40
<b>3.4 Análisis estadístico.....</b>	<b>42</b>
<b>CAPITULO IV: RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Identificación de animales seropositivos a <i>B. abortus</i>. .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Resultados del control de proceso.....</b>	<b>43</b>
<b>4.3 Detección de <i>B. abortus</i> en muestras de leche mediante PCR. ....</b>	<b>44</b>
<b>4.4 Detección de <i>B. abortus</i> en muestras de tejido mediante PCR .....</b>	<b>45</b>
<b>4.5 Sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo PCR. ....</b>	<b>46</b>
<b>CAPITULO V: DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>CAPITULO VI: CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>CAPITULO VII: RECOMENDACIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>CAPITULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>53</b>
<b>CAPITULO IX. ANEXOS .....</b>	<b>59</b>



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Reactores positivos (%) a diversas pruebas serológicas de vacas revacunadas con cepa S19 de <i>B. abortus</i> .....	22
<b>Tabla 2:</b> Mezcla de la reacción de PCR para amplificar ADN bovino .....	36
<b>Tabla 3:</b> Perfil de temperatura para generar los amplicones o productos del material genético del control de proceso (ADN bovino) .....	37
<b>Tabla 4:</b> Tamaño de los productos de PCR de acuerdo a la cepa de <i>B. abortus</i> .....	38
<b>Tabla 5:</b> Mezcla de la reacción de PCR para amplificar ADN ya sea de la cepa de campo o de las cepas vacunales S19 y RB51 de <i>B. abortus</i> .....	39
<b>Tabla 6:</b> Perfil de temperatura para generar los amplicones o productos del material genético de <i>B. abortus</i> (cepa de campo y cepas vacunales S19 y RB51) .....	39
<b>Tabla 7:</b> Resultados de RB (muestras de sangre) y PCR (muestras de leche) de 82 bovinos en periodo de lactancia .....	45



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fórmulas para determinar sensibilidad y especificidad diagnóstica de una prueba.....	42
<b>Figura 2.</b> Resultados de la prueba rosa de bengala.....	43
<b>Figura 3.</b> Productos de amplificación del PCR control de proceso: muestras de leche. ....	44
<b>Figura 4.</b> Productos de amplificación del PCR control de proceso: muestras de tejido (nódulos linfáticos). ....	44
<b>Figura 5.</b> Productos de amplificación de PCR para la detección de <i>B. abortus</i> en muestras de leche.....	45
<b>Figura 6.</b> Productos de amplificación de PCR para detección de <i>B. abortus</i> en muestras de tejido.....	46



## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Hoja de datos: Resultados de la prueba RB y PCR en muestras de leche .....	59
<b>Anexo 2.</b> Registro de los resultados de PCR de las muestras de nódulos linfáticos	62
<b>Anexo 3.</b> Colecta de muestras de sangre, leche y tejidos .....	64
<b>Anexo 4.</b> Formato de ensayo de PCR para la amplificación del control de proceso	65
<b>Anexo 5.</b> Formato de ensayo de PCR para la amplificación de material genético de las cepas de <i>Brucella abortus</i> .....	66



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**LAMP:** Prueba de amplificación isotérmica mediada por lazo.

**Ig:** Inmunoglobulina

**CTAB:** Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

**EDTA:** Acido etilendiaminotetraacético

**FW:** Forward (hacia adelante)

**REV:** Reverse (hacia atrás)

**kDa:** kilo Dalton

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio

**MgSO<sub>4</sub>:** Sulfato de magnesio

**UV:** ultravioleta

**g:** gravedades

**®:** Marca registrada

**∞:** infinito

**F.CC.AA:** Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Yo, María Elena Aucancela Yunganula, autora del trabajo de titulación “Aplicación de un ensayo de PCR convencional múltiple para la detección y diferenciación de cepas de campo y cepas vacunales S19 y RB51 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.

---

María Elena Aucancela Yunganula

CI: 0302622402



## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Yo, María Elena Aucancela Yunganula, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Aplicación de un ensayo de PCR convencional múltiple para la detección y diferenciación de cepas de campo y cepas vacunales S19 y RB51 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.

María Elena Aucancela Yunganula

CI: 0302622402



## DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mis padres Carmen Yunganaula y Jaime Aucancela, gracias por su paciencia, por su apoyo en todo momento y por haberme impulsado a superarme. Sin ustedes no habría podido conseguirlo.

Gracias.

**María Elena Aucancela Yunganaula**



## AGRADECIMIENTOS

Principalmente al Dr. Antonio Vallecillo Maza, director de este proyecto de investigación, gracias por su ayuda, por los consejos y el conocimiento impartido.

Al Dr. Eduardo Chica y al Laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA de la Universidad de Cuenca.

A mis amig@s y compañer@s del laboratorio: Doris Chuva, Carina Villegas y Rolando Wampash.

Al Dr. Omar Andrade

Al Dr. Jhonny Narváez

Al Dr. Guido Calle

Al Dr. Romeo Sánchez

**María Elena Aucancela Yunganaula**



## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

Un sin número de enfermedades afectan a los bovinos ocasionando grandes pérdidas, sobre todo derivadas de problemas reproductivos. Una de estas enfermedades es la brucelosis que también afecta a muchas otras especies animales. La brucelosis es una enfermedad infecto-transmisible de distribución mundial, el agente causal es una bacteria Gram (-) del género *Brucella*, el cual está integrado por varias especies y sus distintos biotipos o biovares, las cuales son consideradas potencialmente patógenas para los humanos con excepción de *Brucella neotomae* (*B. neotomae*), *B. microti* y *B. ovis* **(1)**.

Generalmente la brucelosis bovina es causada por *B. abortus*, pero ocasionalmente también se pueden infectar con otras especies de *Brucella*. La principal característica de esta enfermedad es que afecta al tracto reproductor tanto de machos como hembras adultas, ocasionando abortos, reducción de la fertilidad, metritis, entre otras patologías **(2)**. Esta enfermedad es de gran importancia económica y sanitaria. En un estudio realizado en Ecuador se estimó una pérdida anual de aproximadamente 5.5 millones de dólares a causa de la brucelosis bovina, por reducción en la producción de leche, abortos y mortalidad a diferentes edades **(3)**, además de representar un gran riesgo para la salud humana al ser una enfermedad zoonótica. Una de las herramientas aplicadas para el control y la prevención de brucelosis bovina, es la vacunación, para lo cual se utiliza a nivel internacional las cepas RB51 y S19 de *B. abortus*. Sin embargo cabe mencionar que la cepa vacunal S19 tiene una desventaja, ya que al realizar pruebas serológicas de tamizado no es posible diferenciar entre animales naturalmente infectados de los recién vacunados **(3)**. Es por ello que se desarrolló la cepa vacunal RB51, que no contiene la cadena O del lipopolisacárido y por lo tanto no induce interferencia en las pruebas serológicas de tamizado; y se ha demostrado que es igual de efectiva que la cepa S19 para la prevención de esta enfermedad **(4)**. Adicional a la vacunación para el control de la brucelosis bovina se requiere el uso de pruebas diagnósticas. Al momento existen métodos indirectos como: pruebas serológicas (Rosa de Bengala, Test de fijación del Complemento, ELISA indirecto, pruebas de Ring-Test en leche) **(3, 4)**, pero estas pruebas en muchos casos no permiten diferenciar la respuesta inmune inducida por las cepas vacunales o por las cepas de campo de *B. abortus*.



Además, algunas de estas pruebas serológicas pueden dar resultados falsos positivos dado que existen bacterias que dan reacción cruzada como por ejemplo: *Yersinia enterocolitica* O: 9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella landau*, *Escherichia coli* O: 157 (5). De ahí que se deben utilizar métodos directos, entre los que se cuentan: Cultivo e identificación bacteriana y técnicas de biología molecular como PCR (Reacción en cadena de la polimerasa, del Inglés Polymerase Chain Reaction) (6). Las técnicas de biología molecular son conocidas y aplicadas a nivel mundial, pero no se han implementado ampliamente en nuestro medio. El ensayo de PCR es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Kary Mullis; con la cual se puede amplificar un fragmento de ADN (Ácido desoxirribonucleico) de interés, permitiendo de esta forma determinar la presencia específica de microorganismos de acuerdo a su ADN (7). PCR es una prueba altamente específica y sensible para el diagnóstico de *B. abortus*, en una investigación realizada por Gall *et al.* (5), se demostró que PCR tiene en promedio una especificidad de 98.6% y una sensibilidad de 82%. Por lo anterior, en este trabajo se empleó un ensayo de PCR múltiple para evaluar su posible aplicación en la identificación de la presencia de ADN de *B. abortus* en dos tipos de muestras biológicas de bovinos, en este ensayo se ha descrito que permite diferenciar cepas de campo de las cepas vacunales S19 y RB51, otra de las ventajas de utilizar esta técnica es el tiempo que nos lleva realizarla, ya que los resultados se pueden emitir luego de 18-24 horas de haber receptado las muestras ya sea de leche o tejidos. Además se reduce el riesgo de contagio dentro del laboratorio, gracias a las condiciones de trabajo y el tipo de material que se manipula.

Los objetivos a alcanzar y el cuestionamiento a contestar son los siguientes:

### 1.1 Objetivo general:

Evaluar la aplicación de un ensayo de PCR convencional múltiple para el diagnóstico de la infección de *B. abortus* en dos tipos de muestras biológicas de bovinos seropositivos y seronegativos, que permita diferenciar las cepas de campo de las cepas vacunales S19 y RB51.

### 1.2 Objetivos específicos:

Identificar animales previos al sacrificio o en etapa de producción láctea seropositivos a *B. abortus* mediante la prueba de Rosa de Bengala.



Evaluar el ensayo de PCR para la detección e identificación de las cepas de campo y las vacunales S19 y RB51 en muestras de leche de animales seropositivos y seronegativos previamente identificados con la prueba Rosa de Bengala.

Evaluar el ensayo de PCR para la detección e identificación de las cepas de campo y cepas vacunales S19 y RB51 en nódulos linfáticos (preescapular derecho y/o izquierdo y supramamario) de animales sacrificados en el camal de la Ciudad de Cuenca “EMURPLAG”.

Estimar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo de PCR empleando como referente la prueba Rosa de Bengala.

### **1.3 Pregunta de investigación**

¿PCR tiene una sensibilidad y especificidad diagnóstica mayor a la prueba Rosa de Bengala, bajo las condiciones de trabajo con las que se cuenta en el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca?



## CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BRUCELOSIS

La brucelosis fue descrita por primera vez en el año de 1886 por David Bruce en la isla de Malta, luego de que unos soldados enfermaran y cuyo síntoma principal era una fiebre misteriosa (llegaba a los 41°C en la noche y en el día la temperatura se normalizaba), que conllevó a la muerte de muchos de ellos; luego de la autopsia se tomaron muestras de hígado y bazo, de los cuales aisló un microorganismo al que se le denominó *Micrococcus melitensis*. La enfermedad inicialmente se conocía como fiebre de Malta, por el lugar en donde se descubrió, sin embargo años después, en la década de 1920 se renombró al género bacteriano como *Brucella* en honor a David Bruce, y de ahí se conoce a la enfermedad como brucelosis **(8)**.

Themistokles Zammit un científico miembro de la comisión de la fiebre del Mediterráneo que estaba dirigida por Bruce demostró que el reservorio del patógeno aislado (conocido en la actualidad como *Brucella melitensis-B. melitensis*), era la leche de cabra, sin embargo hasta la actualidad se han aislado otras especies del género *Brucella*, de otro tipo de muestras tanto del hombre como de otras especies animales (bovinos, caninos, ovinos, porcinos, equinos, roedores, etc.). Luego de más de un siglo de investigaciones, *Brucella spp.*, son consideradas patógenos de alto riesgo, causantes de la brucelosis **(9)**.

La brucelosis bovina es una enfermedad infecto-transmisible de distribución mundial, que afecta seriamente al desarrollo de la industria ganadera, tiene un impacto negativo en el aspecto socioeconómico en países del Mediterráneo, Asia Central, América Central, América del Sur y África, especialmente en áreas rurales, en donde las familias se dedican a la ganadería, principalmente a la producción de leche y sus derivados **(10)**. Por lo cual está incluida en la lista B de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) en la que se citan las enfermedades transmisibles de importancia sanitaria y socioeconómica tanto a nivel nacional como internacional **(11)**, y su agente etiológico está clasificado en el grupo de riesgo nivel 3 **(1)**.



## 2.2 SINONIMIA

La brucelosis bovina se conoce con varias denominaciones como: Enfermedad de Bang, Aborto contagioso, Aborto infeccioso, Aborto epizoótico; en el hombre se conoce como: Fiebre ondulante, Fiebre de Malta o Fiebre recurrente **(12)**.

## 2.3 SIGNOS

No existen signos patognomónicos de la brucelosis bovina, sin embargo existe una serie de signos que se presentan en los animales infectados. *B. abortus* en las hembras bovinas está asociado a problemas reproductivos, como abortos generalmente en el último tercio de la gestación, nacimiento de terneros débiles, retención placentaria, mastitis, metritis, y reducción en la producción de leche; en toros se puede presentar orquitis, epididimitis, disminución de la libido, inflamación de las vesículas seminales; y en ambos sexos puede generar artritis e infertilidad **(10, 13)**. En algunos países tropicales un signo común de brucelosis son los higromas, en las articulaciones de las extremidades posteriores, estando con frecuencia el líquido del higroma infectado con la bacteria **(4)**. Los animales adultos o terneros débiles infectados pueden sobrevivir como portadores y nunca llegar a producir una respuesta inmune contra la infección (reacción serológica) o en ciertos casos ser portadores latentes hasta la primera preñez y luego del parto mostrar una respuesta serológica positiva **(14)**.

## 2.4 AGENTE CAUSAL

Esta enfermedad es causada por un cocobacilo Gram (-). Doce especies de *Brucella* se han reportado hasta el momento: *B. abortus* (ganado), *B. canis* (perros), *B. melitensis* (cabras y ovejas), *B. suis* (porcinos), *B. ovis* (ovejas), *B. neotomae* (roedores), *B. microti* (roedores), *B. pinnipedialis* (pinípedos), *B. ceti* (cetáceos), *B. papionis* (babuinos), *B. vulpis* (zorros) y *B. inopinata* (humanos) **(15)**. Las seis últimas han sido descritas en la década actual, luego de un largo periodo de estabilidad de la taxonomía del género *Brucella*, porque se sugería que el género debía ser mono-específico debido a la alta relación del ADN entre las seis especies inicialmente descritas, por lo que se consideraba a *B. melitensis* como una especie y esta tenía biovars como: Melitensis, Abortus, Suis, Ovis, Neotomae y Canis **(16)**.



Sin embargo en el 2003 el Subcomité en la taxonomía de *Brucella* del Comité Internacional de Sistemática de Procariontes (ICSP) decidió en un acuerdo unánime el retorno de la taxonomía descrita previo a 1986, la que consistía en seis especies, y con el reconocimiento de las biovarios o biotipos de tres especies de *Brucella*: *B. abortus* 8 biovarios (1-7,9), *B. melitensis* 3 biovarios (1-3) y *B. suis* 5 biovarios (1-5) **(1)**. Posterior a ello se han aislado nuevas especies de este género bacteriano **(17)**.

El agente causal más común de la brucelosis bovina es *B. abortus*, sin embargo también puede ser causada aunque con menor frecuencia por *B. melitensis* y *B. suis*. De todas las especies descritas hasta el momento 4 de ellas son consideradas zoonóticas, así tenemos: *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis* y *B. suis* **(4, 15)**. Por lo cual la brucelosis bovina es considerada una enfermedad zoonótica.

#### 2.4.1 Características del agente causal

*B. abortus* tiene afinidad por el tracto reproductor, es un microorganismo intracelular facultativo, inmóvil, aerobio, no forma esporas, posee membrana externa e interna que encierra un espacio periplásmico con péptidoglicano y otras proteínas, su membrana externa es hidrofóbica y resistente a los detergentes, posee un lipopolisacárido (LPS) en su envoltura, y se observa al microscopio como cocobacilos de 0.5-0.7  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de largo **(18)**.

*B. abortus* tiene la capacidad de evadir el sistema inmune innato el cual puede detectar pequeñas cantidades de componentes que llevan los denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), sin embargo *B. abortus* posee un lipopolisacárido con PAMPs alterados, lo cual facilita su invasión, además utiliza una gran variedad de factores de virulencia como adhesinas, enzimas, toxinas que actúan sobre células y tejidos del huésped y rompen las barreras de defensa del mismo **(19)**.

*B. abortus* presenta un fuerte tropismo tisular, generalmente se replica dentro de macrófagos, células dendríticas y trofoblastos placentarios, también puede replicarse en una gran variedad de células en mamíferos incluyendo fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales **(20)**. Debido al estilo de vida intracelular de *B. abortus*, se limita la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedero y a su vez se encuentra aislada de la acción de algunos antibióticos. En una infección por



*Brucella spp.*, la fase de incubación varía entre 14 y 180 días, el cual va a depender de la virulencia de la bacteria, dosis de la misma, la vía de infección y la susceptibilidad del animal **(21)**.

*B. abortus* puede aislarse de diferentes muestras biológicas como: membranas fetales, órganos fetales (pulmones, nódulo linfático bronquial, bazo, hígado y contenido gástrico), leche, secreciones vaginales, sangre, semen, órganos reproductores y nódulos linfáticos (preescapulares, mamarios, iliacos, faríngeos, parotídeos y cervicales) tanto de machos como de hembras **(1, 4)**.

## 2.5 FUENTE DE INFECCIÓN

La principal fuente de infección dentro de un hato bovino son las hembras grávidas o periparturientas, porque *B. abortus* tiene tropismo hacia órganos reproductores, es así que cuando el animal aborta o llega a parir se eliminan grandes cantidades de este patógeno presente en las membranas fetales, en el propio feto, fluido amniótico y descargas uterinas. En áreas en las cuales no se cuenta con un buen manejo sanitario, se puede llegar a contaminar el pasto, el agua, los establos, salas de ordeño, etc. Los animales susceptibles adquieren la infección al ingerir agua o alimentos contaminados, e incluso al ponerse en contacto con material contaminado **(22)**. La enfermedad puede diseminarse en todo el hato, cuando se tiene animales en producción que estén infectados con el patógeno, ya que este puede eliminarse por la leche durante semanas, meses e incluso años, lo mismo que puede ocurrir cuando los animales han sido vacunados (sea con cepa vacunal S19 o RB51 de *B. abortus*) **(4)**. Lo cual fue demostrado por Corner *et al.* **(23)** quienes realizaron un estudio, inoculando bovinos con la cepa vacunal S19, aislando la misma en muestras de leche, calostro, ubre y nódulos linfáticos supramamaros, de animales que fueron sacrificados a las 16, 20 y 22 semanas luego de la inoculación.

En base a las fuentes de infección se puede definir las formas de transmisión, siendo en el ganado bovino por vía vertical, cuando pasa de la madre al hijo, u horizontal cuando el patógeno pasa de un animal a otro. Las vías por las que puede ingresar *B. abortus* durante la infección pueden ser las superficies mucosas del tracto gastrointestinal, vaginal, respiratoria o a través de la piel. Constituyendo factores de riesgo: el transporte y la incorporación de bovinos sin control veterinario



en hatos en los cuales se desconoce la situación sanitaria, malas prácticas de higiene y, la presencia de roedores y perros que ingieren la placenta o los fetos abortados (11).

## 2.6 IMPORTANCIA ZONÓTICA

La brucelosis bovina es una enfermedad de gran importancia zoonótica, por lo cual es considerada como un grave problema de salud pública, sobre todo en aquellos países considerados en vías de desarrollo (24).

Cuando *B. abortus* está presente en un hato pueden encontrarse con facilidad en secreciones vaginales, fetos abortados, restos placentarios, leche, semen, ubre, nódulos linfáticos entre otros, lo cual tiene gran repercusión en la salud pública, ya que el personal que trabaja en los laboratorios, mataderos o en el campo directamente con los animales, pueden contraer la enfermedad al manipular el material contaminado (25).

### 2.6.1 Vías de transmisión en el humano

Los humanos pueden adquirir la infección por vía conjuntival, cutánea o a través de membranas mucosas, los trabajadores de mataderos, carniceros y veterinarios pueden contagiarse al inhalar aerosoles contaminados, al manipular fetos abortados, terneros nacidos vivos de madres infectadas, durante exámenes ginecológicos o en viajes a lugares donde la infección es endémica; también están expuestos los trabajadores de frigoríficos y aquellos que consuman leche cruda o sus derivados contaminados (18). En países en los cuales existe gran prevalencia de brucelosis bovina, también se han presentado más casos de brucelosis en humanos, por lo que la transmisión se da la mayoría de las veces por exposición en lugares endémicos, y por contacto con animales infectados; siendo prácticamente nula la transmisión de una persona a otra (26).

### 2.6.2 Signos y síntomas en el humano

La brucelosis en humanos afecta el sistema musculo-esquelético, sistema nervioso y cardiaco, pudiendo presentarse síntomas y signos, tales como: fiebre ondulante, sudoración, fatiga, anorexia, escalofríos, cefalea, pérdida de peso, náusea, vómito, dolores musculares y articulares, depresión, irritabilidad, dolor de pecho, dolor de espalda, artralgia, artritis, mialgia, espondilitis, sacroilitis, epididimitis, orquitis,



aborto, endocarditis, signos respiratorios, neurológicos y cambios en la piel desde un rash eritematopapular hasta lesiones purpúricas; en algunos casos puede terminar con la muerte o volverse crónica **(27-29)**.

### **2.6.3 Tratamiento de la brucelosis en humanos**

Para establecer un tratamiento lo primero que se debe hacer es un correcto diagnóstico para ello existen métodos directos, como es el aislamiento y cultivo del agente causal; o métodos indirectos (serológicos) para la detección de antígeno o anticuerpo **(27)**. Luego de que se confirme la enfermedad se puede instaurar un tratamiento antibacteriano, para lo cual en general se recomienda una combinación de Rifampicina, Estreptomicina y Doxiciclina durante seis semanas como mínimo, ya que en estos casos se requiere de agentes antimicrobianos que penetren al espacio intracelular **(30)**.

## **2.7 CONTROL Y ERRADICACION DE LA BRUCELOSIS BOVINA**

Para poder controlar esta enfermedad, es necesario tener un adecuado manejo del ganado; teniendo en cuenta una adecuada nutrición e higiene, sobre todo cuando se tiene un sistema de cría estabulado. Básicamente para lograr un correcto control y se busca la erradicación de la enfermedad, es importante la vacunación, sin embargo no es suficiente, ya que es necesario tomar medidas y estrategias sanitarias como: un correcto diagnóstico, eliminación de reactores o animales infectados, mediante sacrificio, control de movilización del ganado, tener criterios acordes a la prevalencia de la enfermedad en la toma de decisiones para iniciar la aplicación de calendarios de vacunación, tipo de vacuna y seguimiento del programa **(3)**.

Para la prevención de la brucelosis bovina generalmente se utilizan dos tipos de vacunas: cepa S19 y cepa RB51.

### **2.7.1 Vacuna con la cepa S19 de *B. abortus***

Esta vacuna es la más ampliamente utilizada en el ganado vacuno. Por lo general se suministra a terneros de entre 3-6 meses de edad como dosis única subcutánea de 5–8 X 10<sup>10</sup> microorganismos viables. Se puede también administrar a los adultos en dosis reducida (3 X 10<sup>8</sup> a 3 X 10<sup>9</sup> microorganismos) porque *Brucella spp.*, tiene tropismo por órganos reproductores, pero algunos suelen desarrollar títulos



duraderos de anticuerpos, y pueden abortar, o excretar la cepa vacunal por la leche **(31)**. La cepa S19 fue aislada como cepa virulenta por el Dr. John M. Buck en 1930, a partir de leche de vaca, la bacteria es incapaz de crecer en presencia de Eritritol, porque ha perdido entre sus loci el gen *eri*, que codifica para la enzima necesaria para su utilización. La vacuna tiene baja patogenicidad, alta inmunogenicidad y buena antigenicidad **(32)**. Una de las desventajas de utilizar esta vacuna es que induce la generación de anticuerpos que pueden interferir en el diagnóstico cuando se realizan pruebas serológicas de tamizado en las que se utilizan antígenos con lipopolisacáridos (LPS) lisos. Este LPS está presente tanto en las cepas de campo como en la cepa vacunal S19, por lo tanto son similares antigénicamente. Cuando se realiza una prueba serológica la respuesta inmune es similar y no se puede diferenciar si el animal está vacunado con ésta cepa o infectado con alguna cepa de campo **(32)**.

Martínez *et al.* **(32)** recomiendan realizar pruebas serológicas en animales vacunados con esta cepa a los 22 meses de edad. Sin embargo en un estudio realizado por Bustamante *et al.* **(33)**, reportan que animales revacunados presentan reacción a las pruebas serológicas posterior a los 32 meses post-revacunación como se muestra en la Tabla 1, sin obtener ningún aislamiento de la bacteria, por ello para tener un diagnóstico confiable es necesario emplear pruebas diagnósticas de mayor especificidad.

**Tabla 1:** Reactores positivos (%) a diversas pruebas serológicas de vacas revacunadas con cepa S19 de *B. abortus*

Número de animales	Rangos de meses post-revacunación	Pruebas serológicas		
		Tarjeta (antígeno de <i>B. abortus</i> cepa 1119-3)	Fijación del complemento	Rivanol
10	1-10	100.0	20.0	50.0
8	11-20	100.0	25.0	75.0
7	21-32	100.0	28.5	71.4
1	33-90	100.0	100.0	100.0

En base a lo publicado por Bustamante *et al.* **(33)**



### 2.7.2 Vacuna con la cepa RB51 de *B. abortus*

La cepa RB51 es una mutante de *B. abortus* cepa 2308 que carece de la cadena “O” de lipopolisacáridos, de la membrana celular, por ello no induce reacción cruzada cuando se realizan pruebas serológicas, y no interfiere en el diagnóstico. Esta cepa vacunal se obtuvo mediante pases seriados en medios con Rifampicina y mediante la selección de colonias con morfología rugosa denominadas RB, las cuales se pasaron a varias concentraciones de rifampicina y penicilina, resultando en un clon, denominado RB19, este clon se pasó varias veces en placas que contenían caldo de soya tripticasa dando como resultado la cepa RB51 **(34)**. Su aplicación es segura, y se administra a terneros entre los 4 y 12 meses de edad con dosis de  $1-3,4 \times 10^{10}$  microorganismos viables, la vacunación del ganado de mayor edad solo se hace bajo autorización de organizaciones oficiales de Sanidad animal y la dosis recomendada es de  $1-3 \times 10^9$  microorganismos viables **(35)**. Se ha comprobado su eficacia en hembras gestantes, sin producir abortos; y luego de un experimento no se ha aislado de exudados vaginales, tejidos fetales o membranas placentarias **(36)**. Sin embargo se ha reportado que cuando se administran dosis altas vía intravenosa induce una placentitis e incluso puede ser excretada en la leche, debido a esto cuando se vacunan animales susceptibles se debería utilizar dosis bajas **(4)**.

Características de la vacuna RB51:

- No induce respuesta serológica que llegue a interferir con el diagnóstico.
- Más atenuada que la cepa S19.
- Más segura para el vacunador.
- Admite la revacunación de animales adultos entre 12 a 16 meses con una dosis de  $1-3 \times 10^9$  UFC.
- Al aplicarla una vez induce niveles de protección análogos a la cepa S19.
- Realizar una revacunación incrementa la inmunidad individual y del hato en general **(37)**.



## 2.8 DIAGNÓSTICO

En los hatos bovinos es necesario llevar un buen programa de control de las enfermedades reproductivas, más aun cuando se presentan abortos en el último tercio de la gestación, tomando en cuenta que este no es un signo patognomónico de la brucelosis bovina, sin embargo la historia clínica de los animales puede ayudar en el diagnóstico. Para una correcta identificación del patógeno se puede realizar aislamiento o cultivo, pero por el tiempo que conlleva realizar este proceso ya que *Brucella spp.*, tiene un crecimiento lento, y por las condiciones estrictamente necesarias de bioseguridad, la mayor parte de las veces no es posible realizar pruebas directas, en consecuencia los métodos serológicos juegan un papel importante en la evaluación de la respuesta de anticuerpos como parte del diagnóstico **(4, 38)**.

Existen otras enfermedades que producen abortos y otros signos similares a los que induce la brucelosis, por ello se deben realizar pruebas diagnósticas que permitan identificar al agente causal. En el ganado bovino el diagnóstico diferencial incluye: Leptospirosis, Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), Tricomoniasis, Campilobacteriosis, Listeriosis, Aborto epizoótico (espiroquetosis), Neosporosis, Diarrea viral bovina (DVB), Vibriosis y varias micosis **(39)**. Los test serológicos, dan resultados seronegativos y seropositivos, en el caso de obtener resultados seropositivos se debe tener en cuenta que existen ciertos microorganismos que son similares antigénicamente a *B. abortus* como: *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio Cholerae* O:1, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella landau*, *Escherichia coli* O: 116 y O:157, entre otras, que pueden inducir la aparición de falsos positivos **(5)**.

Para el diagnóstico de la brucelosis bovina se cuenta con una serie de pruebas diagnósticas clasificadas como directas (detectan al agente causal) e indirectas (detectan antígeno o anticuerpo). Entre los métodos indirectos reportados tenemos: Prueba de aglutinación con antígeno teñido con Rosa de Bengala, Prueba de fijación de complemento, ELISA indirecto, Prueba del anillo en leche **(4)**, Test de Rivanol, Test de hemolisis indirecta, Prueba cutánea alérgica, Prueba de hemolisis en gel, Prueba 2-mercaptoethanol, Inmunodifusión radial, Prueba de inmunodifusión en gel de agar, Ensayo de polarización de fluorescencia en tanque de leche a granel **(5)**; mientras que entre métodos directos, están los cultivos bacterianos; identificación y



tipificación, y varias técnicas de biología molecular como: PCR, Southernblot, LAMP, entre otras **(4)**.

### **2.8.1 Prueba de aglutinación con antígeno teñido con Rosa de Bengala (RBT, de sus siglas en Inglés)**

La también llamada prueba de Rosa de Bengala, conocida también como prueba de tarjeta, es una prueba simple que utiliza un antígeno teñido con el colorante Rosa de Bengala y tamponado a un pH de  $3,65 \pm 0,05$ . El antígeno está preparado con células muertas de *B. abortus* S99 O S1119-3 resuspendidas en una solución salina fenicada estéril (0,5%), a razón de 1 g por cada 22,5 ml **(4)**. La RBT es ampliamente utilizada como prueba tamiz en Medicina Veterinaria y en el rápido diagnóstico de brucelosis humana, tiene en promedio una sensibilidad del 81,2% y una especificidad del 86,3% **(5)**, es fácil de realizar, no se requiere de equipos sofisticados, los resultados se emiten en corto tiempo y a un mínimo costo. Sin embargo, los resultados que se obtienen son seropositivos o seronegativos, pudiendo encontrar deficiencias en el diagnóstico **(40)**.

La sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba Rosa de Bengala depende de varios factores, los mismos que pueden influir en la presentación de resultados falsos positivos y falsos negativos, entre estos factores tenemos: a) pH del antígeno: antígeno con un pH neutro puede identificar la presencia de IgM, IgG1 e IgG2, por el contrario con un pH de 3,65 el RBT previene la aglutinación por la presencia de IgM, o puede ser que en ciertos casos se dé una reacción de aglutinación con IgM en animales previamente vacunados con la cepa S19, siendo importante tener en cuenta que luego de una infección por *B. abortus* se da una rápida producción de IgM 2-3 semanas post-infección y desaparece pocos meses después, en contraste con la producción de IgG 3-4 semanas post-infección, la misma que permanece detectable por un largo periodo de tiempo, hasta por años **(41)**; b) temperatura del antígeno y c) temperatura ambiente al momento de llevar a cabo la reacción **(42)**. Por lo cual los animales considerados como reactores (seropositivos) deben confirmarse con pruebas más específicas que determinen si se trata de una infección por cepa de campo o cepa vacunal de *B. abortus*, o por algún otro tipo de bacteria.



### 2.8.2 Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en Inglés)

Las técnicas moleculares son una herramienta importante para el diagnóstico y estudio epidemiológico porque proporcionan información relevante para la identificación de especies y biovars del género *Brucella*. Estas técnicas han revolucionado nuevos aspectos de la investigación como el diagnóstico de defectos genéticos, detección de patógenos y el estudio evolutivo de las especies. Kary Mullis en 1985 describió la técnica de PCR, que es relativamente sencilla y produce un gran número de copias de ADN a partir de una muestra por muy pequeña que ésta sea. Hasta el momento existen algunos ensayos de PCR empleados en el diagnóstico de la brucelosis bovina, algunos de estos son específicos para el género *Brucella* pero no para las especies, por otro lado existe otro que permite identificar y diferenciar especies de *Brucella* y sus biovars (AMOS-PCR). Y también existe un ensayo de PCR múltiple que permite distinguir las cepas vacunales S19 y RB51 de las cepas de campo de *B. abortus* (43).

La PCR imita la replicación que tiene el ADN en forma natural dentro de una célula. El ensayo básicamente consiste en colocar en un tubo una pequeña cantidad de ADN que contiene la secuencia de interés, nucleótidos sueltos, primers u oligonucleótidos y la enzima *Taq* polimerasa (Proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que habita ambientes con temperaturas entre 50°C a 80°C (44)). El tubo con la reacción se somete a calentamiento para una desnaturalización inicial, que permite separar las dos cadenas de ADN, luego baja la temperatura para que los primers se unan a la secuencia de interés, mientras tanto la enzima enlaza a los nucleótidos sueltos permitiendo que se formen las copias. Este proceso de desnaturalización, hibridación y extensión se repite en varios ciclos, para finalmente obtener un gran número de copias del ADN (7,45), las bandas de amplificación se observan mediante electroforesis en gel de agarosa (38). Entre las regiones del genoma de *Brucella spp* que se han identificado y que se usan en ensayos de PCR tenemos: el elemento genético IS711, 16S rRNA, gen *omp2*, BCSP-31 y secuencia codificante de la proteína de membrana externa de 43 kDa (6).

Las pruebas de PCR tienen en promedio una sensibilidad de 82,0% y una especificidad de 98,6%, ambas diagnósticas, sin embargo la sensibilidad del ensayo



podría verse afectado por el proceso de extracción del ADN **(5)**, ya que existen ciertos factores que inhiben la amplificación entre los cuales tenemos: residuos de células somáticas, polisacáridos, proteínas de suero y otros componentes de los tejidos, siendo esto una de las principales causas de que se puedan encontrar falsos negativos. La solución a este problema será la utilización de protocolos de extracción eficientes y con el cual se pueda obtener ADN libre de inhibidores **(46)**.

## **2.9 TRATAMIENTO**

Hasta el momento no se aplica un tratamiento para curar la brucelosis bovina. Lo cual puede deberse a la forma de vida del patógeno, que se replica en el interior de las células de defensa (leucocitos, macrófagos, etc.) **(20,39)**. Por lo que sería necesaria la instauración de un tratamiento antibacteriano riguroso por un periodo de tiempo considerable, lo cual no resultaría económicamente viable en una explotación ganadera, uno porque no podrían comercializar productos como carne, leche y sus derivados, pero principalmente por el costo del tratamiento individual.



## CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Área de estudio y unidad de análisis

El proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA de la Universidad de Cuenca. Se colectaron muestras de sangre de un total de 200 animales en dos granjas del Cantón Cuenca, de los cuales 82 vacas estaban en producción láctea, de las que se tomaron sendas muestras de leche; y 69 muestras de tejido de nódulos linfáticos (55 preescapulares derecho y/o izquierdo y 14 supramamarios), de animales sacrificados en el camal del Cantón Cuenca.

Para contrastar los resultados de las pruebas rosa de bengala y PCR, se tomaron en cuenta únicamente las muestras analizadas de las 82 vacas en producción.

A continuación se describen los materiales y los métodos empleados en este estudio.

### 3.2 Prueba de aglutinación con antígeno teñido con Rosa de Bengala (RBT)

#### 3.2.1 Materiales:

##### A. Biológicos

- 200 muestras de sangre (suero sanguíneo) de bovinos criollos y de raza Holstein, colectadas en dos granjas del Cantón Cuenca.

##### B. Reactivos y soluciones:

- Etanol 70%
- Brucella Rose Bengal Antigen (INV-EC) (Código: RSA-RB) (Nº de lote: 013)

##### C. Equipos y otros materiales:

- Guantes de látex
- Papel absorbente
- Tubos vacutainer tapa roja
- Agujas vacutainer
- Adaptador de agujas
- Marcador permanente
- Termo-cooler
- Set de micropipetas (1 ml y 50 µl) con puntas estériles.
- Tubos eppendorf (0.5 ml)
- Placa de vidrio



### 3.2.2 Métodos:

#### 1.- Colecta, conservación, transporte y almacenamiento de las muestras (Un total de 200 muestras):

- Los animales seleccionados para el estudio fueron llevados a una manga, y se procedió a tomar la muestra de sangre (vena yugular o coccígea), los tubos estaban previamente identificados.
- Los tubos con las muestras se colocaron en una gradilla y se las conservó en el cooler hasta llevarlas al laboratorio.
- Las muestras se conservaron en el laboratorio a temperaturas de refrigeración para su posterior procesamiento.

#### 2.- Extracción del suero sanguíneo de las muestras colectadas:

- Una vez que la sangre estaba coagulada se procedió a extraer el suero.
- Con una micropipeta primero se extrajo 0.5 ml de suero y se lo transfirió a un tubo Eppendorf, los cuales estaban identificados previamente.
- El suero se conservó a temperaturas de refrigeración.

#### 3.- El ensayo RB se realizó en base a lo descrito en el artículo de la OIE capítulo 2.4.3 sobre brucelosis bovina (4):

- Primero se procedió a desinfectar el material necesario (placa de vidrio) sobre el cual se realizó las reacciones.
- Se colocó una gota (25  $\mu$ l) de cada muestra de suero en la placa de vidrio.
- Luego se colocó el mismo volumen (25  $\mu$ l) de antígeno RB próximo a la gota de suero (2-3 mm).
- Inmediatamente después de añadir la última gota de antígeno en la placa, se mezcló cuidadosamente el suero y el antígeno (utilizando un palillo) hasta producir una zona circular u oval de aproximadamente 2 cm de diámetro.
- La mezcla se agitó suavemente durante 4 minutos a temperatura ambiente (22-25°C).
- Se observó si hubo aglutinación a los 4 minutos. Cualquier reacción visible se consideró positiva, y negativa cuando no se observó aglutinación.



### **3.3 Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

#### **3.3.1 Colecta, conservación, transporte y almacenado de las muestras de tejidos (Nódulos linfáticos pre-escapular derecho y/o izquierdo y supra-mamario) y leche de bovinos:**

##### **Materiales:**

##### **A. Biológicos**

- Se colectaron un total de 69 muestras de nódulos linfáticos (55 preescapulares y 14 supramamarios) de animales sacrificados en el camal del Cantón Cuenca “EMURPLAG”.
- Se colectaron 82 muestras de leche en 2 predios del Cantón Cuenca.

##### **B. Reactivos y soluciones:**

- Etanol 70%
- Solución de conservación para muestras de tejidos: (80% de Etanol, Concentración 1X de TE 10:1 y 2.5% de Glicerol (Sigma, Cat. No.: G5516)).

##### **C. Equipos y otros materiales:**

- Envases de plástico estériles
- Guantes y solución desinfectante
- Termo para conservar las muestras
- Cubre boca
- Kit de disección

##### **Métodos:**

##### **3.3.1.1 Muestras de tejido**

##### **Paso No:**

- 1.- Luego de sacrificados los animales, se procedió a tomar las muestras, nódulos linfáticos preescapular derecho y/o izquierdo y supramamario.
- 2.- Con la ayuda de un bisturí se tomó una porción (Aproximadamente de 1 g) de cada nódulo linfático y se los colocó en envases estériles previamente identificados que contenían 9 volúmenes de solución de conservación (9 mg/1g).
- 3.- Una vez que las muestras llegaron al laboratorio se conservaron a temperatura ambiente.



### 3.3.1.2 Muestras de leche

#### Paso No:

- 1.- Se identificaron a los animales que se iban a muestrear y se los llevó a la sala de ordeño.
- 2.- Previo a la toma de muestra se realizó una buena limpieza de la ubre.
- 3.- Se colectó en total 20 ml de los cuatro cuartos en un envase estéril y se mantuvieron en el cooler protegidas de la luz solar.
- 4.- Las muestras se llevaron inmediatamente al laboratorio y se las conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$

### 3.3.2 Procesamiento de las muestras biológicas colectadas: extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) total:

#### 3.3.2.1 Extracción del ADN de muestras de tejido (nódulos linfáticos)

##### Materiales:

##### A. Biológicos

- Tejidos: nódulos linfáticos preescapular derecho y/o izquierdo y supramamario.

##### B. Reactivos y soluciones:

- Kit comercial (PureLink® Genomic DNA Mini Kit) (Invitrogen).
- Etanol absoluto (Sigma, Cat. No: E7023).
- Etanol 70% (Solución al 70 % de Etanol en agua).

##### C. Equipos y otros materiales:

- Mango y hoja de bisturí
- Pinza estéril
- Caja petri estéril
- Tubos eppendorf de 1.5 ml y 2.0 ml.
- Centrifuga refrigerada (eppendorf)
- Micropipetas de diferentes volúmenes.
- Puntas para micropipetas.
- Baño María
- Vortex
- Guantes de látex
- Cubre boca

**Métodos:**

**La extracción y purificación del ADN total de muestras de nódulos linfáticos (preescapular derecho y/o izquierdo y supramamario), se realizó con la ayuda de un Kit comercial (PureLink® Genomic DNA Mini Kit). A continuación se describe cada paso:**

**Paso No:**

- 1.- Se puso el baño María a 55°C
- 2.- Se colocó aproximadamente 25 mg de tejido en un tubo eppendorf de 2.0 ml.
- 3.- Se agregó 180 µl del Buffer de digestión (PureLink® Genomic Digestion Buffer) y 20 µl de Proteinasa K en el tubo. Se aseguró de que el tejido quede sumergido completamente en la solución y se incubó a 55°C toda la noche en el baño María.
- 4.- Al día siguiente se centrifugó el lisado a 12,000 x g por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante (200 µl) a un nuevo tubo de 1.5 ml.
- 5.- Se añadió 20 µl de ARNasa A al lisado, se mezcló bien en el vortex, e incubó a temperatura ambiente (22-25°C) por 2 minutos.
- 6.- Se añadió 200 µl del Buffer de lisis (PureLink® Genomic Lysis / Binding Buffer) y se mezcló bien en el vortex.
- 7.- Se añadió 200 µl de Etanol (96-100%) al lisado y se mezcló en el vortex por 5 segundos.
- 8.- Se pasó el lisado (620 µl) preparado con el PureLink® Genomic Lysis / Binding Buffer y etanol a la columna (PureLink® Spin Column).
- 9.- Se centrifugó la columna a 12,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 10.- Se eliminó lo que se colectó en el tubo y se colocó la columna en un tubo limpio (PureLink® Collection Tube) que viene incluido en el kit.
- 11.- Se añadió a la columna 500 µl de la solución de lavado 1 (Wash Buffer 1) preparado con Etanol.
- 12.- Se centrifugó la columna a 12,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 13.- Se descartó lo que se colectó en el tubo y se colocó la columna en un tubo limpio (PureLink® Collection Tube) que viene incluido en el kit.
- 14.- Se añadió a la columna 500 µl de la solución de lavado 2 (Wash Buffer 2) preparado con Etanol, se centrifugó la columna a 12,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente y se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml.



15.- Se añadió 50 µl del Buffer de elución (PureLink® Genomic Elution Buffer) a la Columna. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Se centrifugó la columna a 12,000 x g por 1 min. El tubo eppendorf contenía el ADN total purificado. Para recuperar más ADN, se realizó una segunda elusión, usando el mismo volumen del Buffer de elución y se centrifugó la columna a 12,000 x g por 1 minuto.

16.- Finalmente se descartó la columna y se almacenó el ADN purificado a -20°C.

### 3.3.2.2 Extracción de ADN de muestras de leche

#### Materiales:

##### A. Biológicos

- 82 muestras de leche

##### B. Reactivos y soluciones:

- Buffer NET (50 mM de NaCl, 125 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS) y 50 mM de Tris-HCl (Sigma, Cat. No.: T4661) pH 7.6).
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) 24% (Sigma, Cat. No.: 71725)
- Proteinasa K (5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, Cat. No: P2308), 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA y 50 % de Glicerol pH 8.0)
- NaCl 5M
- CTAB/NaCl 10%/0.7M (10 de CTAB y 0.7M de NaCl)
- Fenol/Cloformo/A. Isoamílico 25/24/1 (Sigma, Cat. No: 77619).
- Etanol absoluto (Sigma, Cat. No: E7023).
- Etanol 70%.
- Buffer TE 10:1 1X (10 mM de Tris-HCl y 1 mM de EDTA pH 8.0)

##### C. Equipos y otros materiales:

- Tubos eppendorf de 1.5 ml y 2.0 ml.
- Centrifuga refrigerada (eppendorf)
- Micropipetas de diferentes volúmenes.
- Puntas para micropipetas.
- Baño María
- Vortex
- Guantes de látex
- Cubre boca

**Métodos:**

**La extracción y purificación del ADN total de muestras de leche, se realizó en base al protocolo publicado por Romero *et al.* (47) con algunas modificaciones como se describe a continuación.**

**Paso No:**

- 1.- Se procedió a descongelar las muestras de leche conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- 2.- Se tomó 2 ml de cada muestra y se colocó en tubos eppendorf de 2.0 ml, se centrifugó a  $6000 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 3.- Se colectó 500  $\mu\text{l}$  de la capa de grasa, en tubos eppendorf de 2.0 ml.
- 4.- Se adicionó a la muestra 100  $\mu\text{l}$  de la solución Buffer NET y 100  $\mu\text{l}$  de una Solución SDS al 24%. Se mezcló perfectamente en el vortex por 20-30 seg y se incubó por 10 min a  $80^{\circ}\text{C}$  en el baño María.
- 5.- Se adicionó 48.75  $\mu\text{l}$  de la Solución de Proteinasa K para tener una concentración final de 325  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , se mezcló perfectamente en vortex por 20-30 seg e incubó por 2 h a  $50^{\circ}\text{C}$  en el baño María.
- 6.- Para precipitar los detritus se adicionó 125  $\mu\text{l}$  de la Solución de NaCl 5 M y 100  $\mu\text{l}$  de la Solución de CTAB/NaCl 10%/0.7 M e incubó en el baño María por 10 min a  $65^{\circ}\text{C}$ . Y se centrifugó a  $12,000 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 7.- Se colectó el sobrenadante (500  $\mu\text{l}$ ) y colocó en un tubo nuevo, se adicionó un volumen igual de la Solución de Fenol/Cloformo/A. Isoamílico 25/24/1, y se mezcló en vortex por 30 seg, se centrifugó a  $12,000 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 8.- Se colectó el sobrenadante (400  $\mu\text{l}$ ) y colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml, se adicionó 2.5 volúmenes de Etanol absoluto frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ), se mezcló por inversión y centrifugó a  $12,000 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  para formar la pastilla de ADN total.
- 9.- Se eliminó el Etanol absoluto y adicionó 500  $\mu\text{l}$  de la Solución de Etanol al 70%, se lavó la pastilla invirtiendo el tubo varias veces y se centrifugó a  $12,000 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 10.- Finalmente se eliminó completamente la solución de Etanol al 70% y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente, protegida de la luz y el polvo. Se re-suspendió la pastilla de ADN en 50  $\mu\text{l}$  de solución Buffer TE 10:1 1X.



### 3.3.3 Generación de los productos de PCR específicos del control de proceso:

Luego de la extracción del ADN total tanto de las muestras de leche como de tejido fue necesario hacer un control de proceso, para verificar que el ADN obtenido era viable para ser amplificado.

#### **Materiales:**

##### **A. Biológicos**

- ADN total de las muestras de tejidos y leche obtenido por los procesos antes mencionados (**sección 3.3.2**).

##### **B. Reactivos y soluciones:**

- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502).
- Buffer 10 X
- Solución de dNTP's 10 mM de cada uno (Desoxinucleotidos Trifosfato) (dNTP's set, Thermoscientific, Cat. No.: R0182). Se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20 °C.
- MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- Solución de oligonucleótidos o primers a 100 μM (Invitrogen). Par de oligonucleótidos específicos (12SFW-Mod: 5'-TAA ATC TCG TGC CAG CCA y 12SREV-Mod: AGT ATG CTT ACC TTG TTA CGA C-3') para el género *Bos*, que hibridan en el gen de la subunidad 12S ribosomal del genoma mitocondrial y generan un producto de aproximadamente 720 bp (pares de bases, del inglés base pairs).
- Enzima *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Cat. No.: 10966-033).
- Control negativo (agua grado biología molecular)

##### **C. Equipos y otros materiales:**

- Micropipetas diferentes volúmenes
- Puntas para micropipetas
- Tubos para PCR de 0.2 ml.
- Cabina de PCR
- Centrífuga
- Termociclador (Eppendorf Modelo: Nexus GSX1).
- Vortex



### Métodos:

Las reacciones de PCR para realizar control de proceso, se realizó en base a lo descrito por López-Calleja *et al.* (48) con algunas modificaciones, para lo cual se utilizaron primers que permiten detectar la presencia de ADN bovino, ya que las muestras provenían de esta especie y era lo mínimo que se esperaba encontrar.

### Pasos No:

- 1.- Se descongelaron todos los reactivos necesarios para preparar las reacciones de PCR.
- 2.- Por cada muestra se preparó una reacción de 25  $\mu$ l:

**Tabla 2:** Mezcla de la reacción de PCR para amplificar ADN bovino (concentración y volumen de cada reactivo)

Reactivo:	Concentración		Volumen
	Inicial:	Final:	Por reacción:
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	18,65 $\mu$ l x n
Buffer 10 X	10X	1X	2,5 $\mu$ l x n
dNTP`s	10 mM	0,1 mM	0,25 $\mu$ l x n
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,0 mM	1 $\mu$ l x n
Oligonucleótido: 12SFW	100 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	0,2 $\mu$ l x n
Oligonucleótido: 12SREV	100 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	0,2 $\mu$ l x n
Enzima Taq ADN polimerasa	5 U/ $\mu$ l	0,04 U/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l x n
ADN total(sea de leche o tejido)	--- $\mu$ g/ $\mu$ l	--- $\mu$ g/ $\mu$ l	2 $\mu$ l x n
Volumen final			25 $\mu$ l x n

\* n = Número de muestras

3.- Los tubos con las reacciones de amplificación se colocaron en el termociclador y fueron sometidas al siguiente perfil de temperatura para generar los productos de PCR del control de proceso.



**Tabla 3:** Perfil de temperatura para generar los amplicones o productos del material genético del control de proceso (ADN bovino)

Paso:	Desnaturalización inicial:	35 ciclos			Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:		
Tiempo:	5 min	45 seg	30 seg	45 seg	5 min	∞
Temperatura (°C):	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C

\*min: minutos; seg: segundos

Fuente: Se realizó en base a lo descrito por López-Calleja *et al.* (48).

### 3.3.4 Generación de los productos de PCR específicos de *B. abortus*

#### Materiales:

##### A. Biológicos

- ADN total de las muestras de tejidos y leche obtenidos por los procesos antes mencionados (**sección 3.3.2**).

##### B. Reactivos y soluciones:

- Agua grado biología molecular.
- Buffer 10X
- Solución de dNTP's 10 mM de cada uno (Desoxinucleotidos Trifosfato) (dNTP's set, Thermoscientific, Cat. No.: R0182). Se prepararon alícuotas y se almacenaron -20 °C.
- Solución de oligonucleótidos o primers 100 µM (Invitrogen). Dos pares de oligonucleótidos específicos para *B. abortus*

FW: wbo1 5'-GCC AAC CAA CCC AAA TGC TCA CAA-3' y REV: wbo3 5'-TTA AGC GCT GAT GCC ATT TCC TTC AC-3' que hibridan en el gen wboA de *B. abortus* RB51, el cual es interrumpido por un elemento IS711J (49).

FW: Eri1 5'-GCG CCG CGA AGA ACT TAT CAA-3' y REV: eri2 5'-CGC CAT GTT AGC GGC GGT GA-3'). Estos primers detectan una deleción de 702 bp en el operón eri de *B. abortus* cepa S19 (50).

Los dos pares de primers descritos generan productos de diferente tamaño de acuerdo al tipo de cepa como se indica a continuación:

**Tabla 4:** Tamaño de los productos de PCR de acuerdo a la cepa de *B. abortus*

Tamaño producto PCR:	<i>B. abortus</i> cepa de campo	<i>B. abortus</i> cepa S19	<i>B. abortus</i> cepa RB51
± 1300 bp			XXXX
456 bp	XXXX	XXXX	
178 bp	XXXX		XXXX

- Enzima *Pfx* ADN polimerasa (Invitrogen, Cat. No.: 11708-039).
- Enhancer 10X
- MgSO<sub>4</sub> a 50mM
- Control positivo (ADN genómico de las cepas vacunales S19 y RB51)
- Control negativo (Agua grado biología molecular)

**C. Equipos y otros materiales:**

- Micropipetas diferentes volúmenes
- Puntas para micropipetas
- Tubos para PCR de 0.2 ml.
- Cabina de PCR
- Centrifuga
- Vortex
- Termociclador (Eppendorf Modelo: Nexus GSX1)
- Guantes de látex

**Métodos:**

Las reacciones de PCR para la amplificación de ADN de *B. abortus* se realizó en base a lo descrito por Sharifi-Yazdi *et al.* (2) con algunas modificaciones:

**Paso N°:**

- 1.- Se descongelaron todos los reactivos necesarios para preparar las reacciones de PCR.
- 2.- Por cada muestra se preparó una reacción de 25 µl:

**Tabla 5:** Mezcla de la reacción de PCR para amplificar ADN ya sea de la cepa de campo o de las cepas vacunales S19 y RB51 de *B. abortus*

Reactivo:	Concentración		Volumen
	Inicial:	Final:	Por reacción:
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	16,875 µl x n
Buffer 10X	10X	1X	2,5 µl x n
Solución 10X enhancer	10X	1X	1,875 µl x n
dNTP`s	10 mM	0,1 mM	0,25 µl x n
MgSO4	50 mM	2,0 mM	0,5 µl x n
Oligonucleótido: WBO1	100 µM	0,8 µM	0,2 µl x n
Oligonucleótido: WBO3	100 µM	0,8 µM	0,2 µl x n
Oligonucleótido: ERI 1	100 µM	0,8 µM	0,2 µl x n
Oligonucleótido: ERI 2	100 µM	0,8 µM	0,2 µl x n
Enzima Pfx ADN polimerasa	2,5 U/µl	0,02 U/µl	0,2 µl x n
ADN total(sea de leche o tejido)	--- µg/µl	--- µg/µl	2 µl x n
Volumen final			25 µl x n

\* n = Número de muestras

3.- Los tubos con las reacciones de amplificación se colocaron en el termociclador y fueron sometidas al siguiente perfil de temperatura para generar los productos de PCR del material genético de *B. abortus*.

**Tabla 6:** Perfil de temperatura para generar los amplicones o productos del material genético de *B. abortus* (cepa de campo y cepas vacunales S19 y RB51)

Paso:	Desnaturalización inicial:	40 ciclos			Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:		
Tiempo:	5 min	30 seg	25 seg	30 seg	5 min	∞
Temperatura (°C):	95°C	95°C	58°C	68°C	68°C	4°C

\*min: minutos; seg: segundos

Fuente: En base a lo publicado por Sharifi-Yazdi *et al.* (2).



### 3.3.5 Detección de los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio

#### 3.3.5.1 Materiales:

##### A. Biológicos

- Productos amplificados (tubos con las reacciones de PCR)

##### B. Reactivos y soluciones:

- Agarosa (Invitrogen, Cat. No. 16500-100)
- Buffer TAE 1X (Tris base, EDTA pH 8.0, ácido acético glacial y agua destilada.
- Bromuro de Etidio (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637)
- Buffer de carga 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 (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermoscientific Cat. No.: SM0321)

##### C. Equipos y otros materiales:

- Micropipetas diferentes volúmenes
- Puntas para micropipetas
- Balanza analítica
- Matraz Erlenmeyer
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis horizontal
- Horno de microondas.
- Guantes de látex
- Fotodocumentador UV-Impresora (BioRad Modelo: Gel Doc XR+).

#### 3.3.5.2 Métodos:

Se realizó electroforesis para detectar los productos de amplificación tanto del PCR de control de proceso como del PCR múltiple para detección de *B. abortus* en muestras de tejidos y leche.

**Paso No:**

- 1.- Luego de la amplificación se retiraron los tubos con la reacción de PCR del termociclador, y se colocó en cada uno de ellos 5  $\mu$ l de Buffer de carga 6X. Se mezclaron estas dos soluciones.
- 2.- La preparación del gel de agarosa fue a una concentración del 1.2%. El tamaño del gel dependió del número de muestras. Para homogenizar la mezcla se calentó en un microondas por 30 seg o más (hasta que se disuelva completamente la agarosa).
- 3.- Antes de que se gelifique, se adicionó 1  $\mu$ l de Bromuro de Etidio a 10 mg/ml por cada 30 ml de la mezcla (Buffer TAE 1X + Agarosa), luego se colocó en el molde con un peine (para formar los pocillos), se dejó solidificar aproximadamente por 10 minutos.
- 4.- Una vez que se solidificó el gel, se colocó el mismo en la cámara de electroforesis con el buffer de corrida y se cargaron los pocillos: 10  $\mu$ l de la mezcla (Reacción de PCR + Buffer de carga 6X).
- 5.- Adicional a las muestras se colocó un control positivo, negativo y 6  $\mu$ l de la solución de marcador de peso molecular.
- 6.- Los fragmentos se resolvieron en el gel de agarosa, sometiendo al mismo a 90 Voltios por un tiempo promedio de 45 min, de acuerdo a la longitud del gel (gel pequeño para 11 muestras: 30 min; gel grande para 15 muestras: 1 hora).
- 7.- Una vez resueltos los productos de PCR, se fotodocumentaron para su análisis.
- 8.- En el caso del control de proceso, se consideró válido cuando una muestra presentó una banda de amplificación de aproximadamente 720 bp. Para la detección de *B. abortus*, el control positivo al igual que la muestra positiva presentaron bandas de amplificación de diferente tamaño dependiendo del tipo de cepa, como se indica en la Tabla 4 (**sección 3.3.4**).

### 3.4 Análisis estadístico

Este es un estudio descriptivo, ya que básicamente el objetivo fue evaluar la aplicación de un ensayo de PCR múltiple para determinar la presencia de ADN de *B. abortus* en dos tipos de muestras (tejido y leche), en un determinado momento, es decir no hay manipulación de variables.

Al ser un estudio descriptivo, se determinaron las frecuencias absolutas y relativas correspondientes a: los resultados positivos y negativos encontrados para PCR en los 82 animales en producción de leche; y seropositivos y seronegativos para RBT en los 200 animales, muestreados de las granjas 1 y 2.

Para contrastar los resultados de PCR (leche) y Rosa de Bengala (suero sanguíneo), se planteó realizar un cuadro de contingencia de 2 X 2, y en base a ello determinar la especificidad y sensibilidad diagnóstica de PCR utilizando las siguientes formulas:

$$\text{Sensibilidad Dx} = \frac{VP}{VP+FN} \quad \text{Especificidad Dx} = \frac{VN}{VN+FP}$$

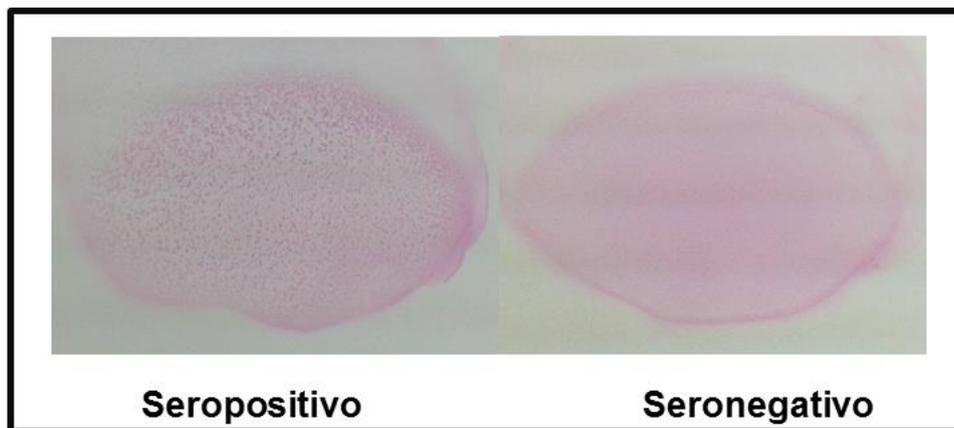
**Figura 1.** Fórmulas para determinar sensibilidad y especificidad diagnóstica de una prueba. \*VP: verdaderos positivos; FN: falsos negativos; FP: falsos positivos; VN: verdaderos negativos.

Esto no se realizó puesto que la frecuencia de PCR fue muy baja y esto impide efectuar y obtener resultados favorables.

## CAPITULO IV: RESULTADOS

### 4.1 Identificación de animales seropositivos a *B. abortus*.

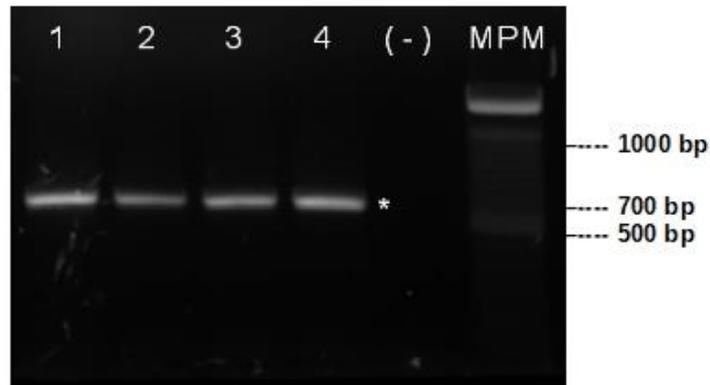
El número total de bovinos que se incluyó en esta parte del estudio fue de 200, de los cuales 82 vacas estaban en periodo de lactancia (**Anexo 1**). Del total de muestras analizadas se encontraron 16 seropositivas (8%) y 184 seronegativas (92%) (Fig.2).



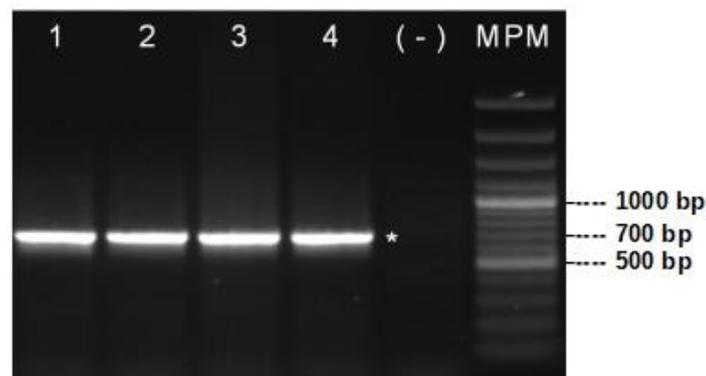
**Figura 2.** Resultados de la prueba rosa de bengala. Seropositivo: cualquier reacción visible de aglutinación; Seronegativo: no hay reacción de aglutinación.

### 4.2 Resultados del control de proceso

Luego de la extracción de ADN de un total de 82 muestras de leche y 69 muestras de nódulos linfáticos, se realizó un PCR simple (control de proceso) con el fin de observar si se obtuvo ADN viable de ser amplificado. Mediante electroforesis se observó un producto de aproximadamente 720 bp, que corresponde a la amplificación de una secuencia específica del género *Bos*.



**Figura 3.** Productos de amplificación del PCR control de proceso. **1-4:** muestras de leche que presentan un amplicon de aproximadamente **720 bp**; (-): control negativo; MPM: marcador de peso molecular (GeneRuler 100bp Plus DNA ladder).



**Figura 4.** Productos de amplificación del PCR control de proceso. **1-4:** muestras de tejido (nódulos linfáticos) que presentan un amplicon de aproximadamente **720 bp**; (-): control negativo; MPM: marcador de peso molecular (GeneRuler 100bp Plus DNA ladder).

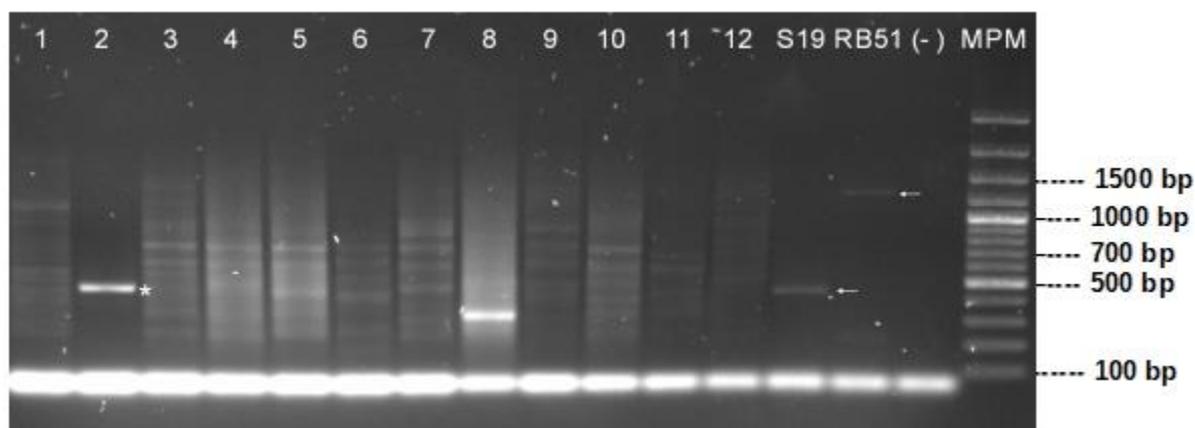
#### 4.3 Detección de *B. abortus* en muestras de leche mediante PCR.

Se realizó un PCR múltiple para la detección y diferenciación de las cepas de campo y cepas vacunales S19 y RB51 de *B. abortus* en 82 muestras de leche de vacas identificadas como seropositivas y seronegativas mediante la prueba RB, con la cual se obtuvo 5 seropositivas (6,1%) y 77 seronegativas (93,9%) (**Anexo 1**). Al analizar las muestras de leche de los mismos animales con la técnica de PCR los resultados

mostraron amplificaciones inespecíficas, con excepción de una muestra de una vaca seronegativa que dio un resultado positivo (1,2%) a *B. abortus* y que fue identificada como cepa S19 (Fig. 5).

**Tabla 7:** Resultados de RB (muestras de sangre) y PCR (muestras de leche) de 82 bovinos en periodo de lactancia

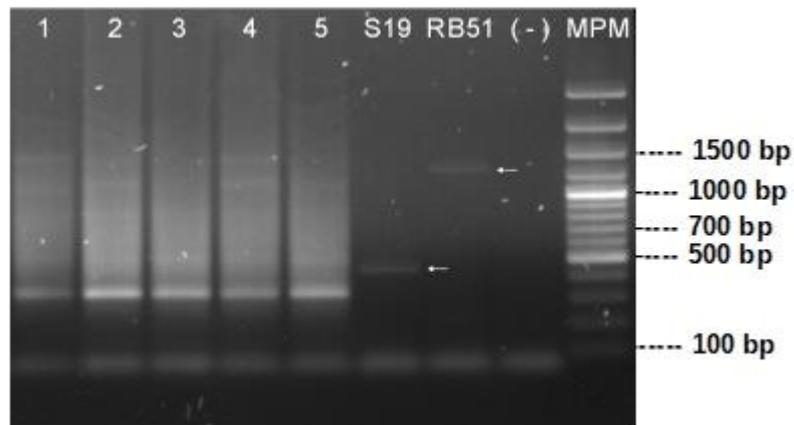
Pruebas	Positivos		Negativos	
	Nº	%	Nº	%
Rosa de Bengala (RB)	5	6.1	77	93.9
PCR	1	1.2	81	98.8



**Figura 5.** Productos de amplificación de PCR para la detección de *B. abortus* en muestras de leche. **1,3-12:** muestran amplificaciones inespecíficas; **2:** cepa S19 de *B. abortus* (**456 bp**); S19 (**456 bp**) y RB51 (**±178 bp y 1300 bp**): cepas vacunales utilizadas como controles positivos; (-): control negativo; MPM: marcador de peso molecular (GeneRuler 100bp Plus DNA ladder).

#### 4.4 Detección de *B. abortus* en muestras de tejido mediante PCR

Un total de 69 muestras de nódulos linfáticos fueron analizadas (55 preescapulares, 14 supramamarios) (**Anexo 2**). En todas las muestras se observaron amplificaciones inespecíficas, por lo que no fue posible determinar si eran negativas o positivas y por ende no se pudo identificar algún tipo de cepa (Fig. 6).



**Figura 6.** Productos de amplificación de PCR para detección de *B. abortus* en muestras de tejido. **1-5:** muestran amplificaciones inespecíficas; S19 (**456 bp**) y RB51 ( $\pm 178$  bp y **1300 bp**): cepas vacunales utilizadas como controles positivos; (-): control negativo; MPM: marcador de peso molecular (GeneRuler 100bp Plus DNA ladder).

#### 4.5 Sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo PCR.

No fue posible determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo PCR, porque el mismo no fue aplicable, únicamente se obtuvo una muestra positiva a PCR que provenía de una vaca seronegativa, por lo que no se pudo contrastar los resultados entre RBT y el ensayo de PCR.



## CAPITULO V: DISCUSIÓN

De un total de 200 muestras de suero sanguíneo, analizadas mediante la prueba RB, se obtuvieron 184 seronegativos (92%) y 16 seropositivos (8%), estos resultados coinciden con estudios en otros países. Por ejemplo, en un estudio en Egipto encontraron una frecuencia de 90,7% de seronegativos y 7,3% de seropositivos **(14)**; al igual que en un estudio en Pakistán con frecuencias del 93% y 7% respectivamente **(10)**. Sin embargo los resultados encontrados deben ser confirmados con otras pruebas inmunodiagnósticas como ELISA competitivo, ya que RBT tiene ciertas limitaciones, por lo que los resultados podrían ser falsos negativos o falsos positivos, en el primer caso podría deberse a: 1) los títulos de anticuerpos se encuentran reducidos a través del tiempo, sobre todo cuando la enfermedad ha entrado en la fase crónica, momento en el cual la bacteria se localiza intracelularmente a menudo en los nódulos supra-mamarios y la ubre **(51)**; 2) en la fase temprana de la infección (primeros 14 días), la respuesta inmune humoral no produce niveles detectables de anticuerpos; 3) animales que son infectados en el útero o luego del nacimiento se vuelven individuos latentemente infectados, en unos casos nunca llegan a producir una respuesta serológica positiva, en otros pueden portar el agente hasta el primer parto y luego seroconvertirse; y 4) Los animales podrían padecer otras enfermedades infecciosas, las cuales disminuyen la respuesta inmunológica por ejemplo: Leucemia-leucosis bovina **(14, 52, 53)**. En el caso de los seropositivos que podrían o no ser falsos positivos, cabe recalcar que de las 16 muestras, 9 fueron de animales de entre 6 y 14 meses de edad, por lo que posiblemente se deba a una interferencia con la cepa vacunal S19; en el caso de vacas adultas es posible que estén infectadas, que aun haya interferencia con la vacuna o que se haya dado una reacción cruzada con otras especies bacterianas, principalmente con *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio Cholerae* O:1, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli* O:116 y O:157 **(5)**. Por lo tanto es muy importante asociar las pruebas serológicas con métodos más específicos.

El ensayo de PCR evaluado en este estudio para la detección y diferenciación de cepas de campo y cepas vacunales de *B. abortus* en muestras de leche y nódulos linfáticos no funcionó. Los pares de primers utilizados en el ensayo dieron bandas de amplificación de diversos tamaños, sobre todo en muestras de tejido, por lo que no fue posible determinar si las muestras eran positivas y de ser así a que cepa



correspondían, esto no concuerda con un estudio realizado por Sharifi-Yazdi *et al.* **(2)**, en el cual se pudo observar bandas de amplificación que definían claramente el tipo de cepa encontrado en cada muestra, sin embargo, es probable que esto se deba, a que en ese estudio se utilizaron muestras de cultivos, lo cual coincide con lo publicado por Vemulapalli *et al.* **(49)** y Bricker *et al.* **(50)**; por el contrario en este estudio se utilizaron muestras obtenidas directamente de los animales, por lo mismo podrían encontrarse otros blancos, secuencias con capacidad de hibridar con los primers u oligonucleótidos usados, afectando la especificidad de la PCR múltiple, la cual depende de la temperatura en la fase de hibridación, así tenemos que a mayor temperatura más dificultada se ve la unión entre el primer y la cadena molde, por lo tanto en condiciones de temperatura de hibridación elevadas el primer solo se unirá a la cadena molde si son complementarios en todos sus nucleótidos, siendo importante mencionar que en este estudio se tuvo una temperatura de hibridación de 58°C, que podría haber permitido la unión de los primers a otros blancos **(54)**. Además en el desarrollo de la PCR se pueden generar artificios que explicarían la razón de porqué se observan bandas de amplificación inespecíficas, existen tres tipos de artificios: 1) Formación de quimeras, 2) Formación de moléculas heterodúplex y 3) Errores producidos por la enzima. Las quimeras son productos de PCR incompletos que pueden hibridar como oligonucleótidos en secuencias heterólogas. Las moléculas heterodúplex se forman cuando se produce una hibridación cruzada entre secuencias heterólogas, esto generalmente se da en los últimos ciclos de la PCR, cuando existe una limitación en la concentración de oligonucleótidos. Y errores por la enzima, cuando se da la introducción de una base errónea **(55)**. Como se mencionó anteriormente la presencia de bandas inespecíficas es más evidente en muestras de tejido de nódulos linfáticos, ya que en este tipo de muestra se encuentran células como los linfocitos B y T, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas, las que segregan a los anticuerpos, los mismos que a nivel de proteína muestran varios tipos de variabilidad, una es la diversidad de las regiones variables (V) tanto de las cadenas pesadas y ligeras, múltiples genes de estas regiones están codificadas en el genoma de forma que contienen tres tipos distintos de segmentos, por el mecanismo de recombinación de estos genes regionales es posible generar un gran repertorio de anticuerpos, razón



por la cual al momento de realizar la PCR, los primers podrían haber hibridado con secuencias que generaron artificios en el ensayo de PCR múltiple **(56, 57)**.

De un total de 82 muestras de leche analizadas con PCR, en una de ellas (muestra de una vaca seronegativa) se pudo observar una banda de amplificación de 456 bp que corresponde a la cepa vacunal S19 de *B. abortus*, que representa el 1,2 % de la frecuencia de casos positivos lo cual no concuerda con un estudio preliminar realizado por Rodríguez-Hidalgo *et al.* **(58)**, quienes encontraron una frecuencia de casos positivos del 44%, generalmente en el país se aplica esta vacuna una sola vez en terneros de entre 3-6 meses de edad **(3)**, sin embargo esta muestra se obtuvo de una vaca adulta que al parecer estaba eliminando la cepa vacunal a través de la leche. Hay estudios que han demostrado que la mencionada cepa puede excretarse por la leche de forma intermitente hasta los 9 años en vacas que han sido vacunadas entre 3-8 meses de edad **(59)**. Pacheco *et al.* **(59)** en su estudio indican que no hay relación con la edad del animal y las fases del ciclo reproductivo, no obstante la excreción de la cepa S19 disminuye entre los 150 días de preñez hasta antes del parto independientemente de la edad del animal, periodo en el cual hay una concentración máxima de Eritritol al cual es sensible la cepa S19, ello explica que esta cepa desaparezca de la circulación durante este periodo, claro está que en ciertos casos la misma tolera ciertas cantidades de Eritritol y podría ser esta una de las causas de infección persistente. Los niveles circulantes de *B. abortus* cepa S19, también van a determinar los resultados de las pruebas serológicas, así mientras haya un pequeño número de microorganismos, no se producirán niveles de anticuerpos detectables y las pruebas serológicas se mostrarán negativas, además esta vacuna presenta baja interferencia con las pruebas serológicas convencionales 18 meses post-vacunación **(59)**, lo que podría explicar el resultado seronegativo obtenido en el proyecto mediante la prueba Rosa de bengala al analizar la muestra de suero del mismo animal que estaba excretando la cepa S19 a través de la leche. En base a este resultado es importante considerar las implicaciones en la salud pública, ya que una de las vías de transmisión es el consumo de leche cruda y sus derivados. Este trabajo coincide con lo publicado por Corner *et al.* **(23)**, quienes encontraron la cepa S19 en leche y calostro, por ello es importante tener adecuadas medidas de higiene al momento de consumir estos productos, y sobre todo aplicar adecuados criterios de vacunación ya que cuando se vacuna con la cepa S19 no se



considera necesaria una revacunación **(4)**, sin embargo si en una determinada ganadería se considera aplicable la revacunación, lo recomendable es que sea entre los 3-4 meses antes de la pubertad, periodo que depende del peso y la edad de los animales, lo cual varía de una raza a otra.



## CAPITULO VI: CONCLUSIONES

De un total de 200 animales provenientes de dos predios del Cantón Cuenca, fueron colectadas muestras de sangre, las mismas que fueron analizadas mediante serología (RBT), obteniéndose 16 seropositivos (8%) y 184 seronegativos (92%). Del grupo de animales seleccionados 82 vacas estaban en producción láctea, de estas resultaron 5 seropositivas (6.1 %) y 77 seronegativas (93.9%).

Un total de 82 muestras de leche y 69 muestras de tejido de nódulos linfáticos (pre-escapulares y/o supra-mamarios), fueron analizados mediante PCR, para lo cual primero se realizó la extracción del ADN total de cada una de las muestras. Al realizar el control de proceso, se pudo determinar que los protocolos de extracción (**sección 3.3.2**) tanto de leche como tejidos, funcionaron correctamente, permitiendo obtener un ADN viable para ser amplificado.

Para la detección de *B. abortus* sea cepa de campo o cepa vacunal (S19 o RB51) en las 151 muestras de ADN tanto de leche como de tejidos (82 y 69 respectivamente), se realizó un PCR múltiple, el mismo que no produjo resultados concluyentes con valor diagnóstico. Los primers u oligonucleótidos utilizados en este ensayo no son útiles cuando se analiza ADN de muestras biológicas directas, ya que en estudios anteriores en los cuales se utilizaron estos primers, se reporta que trabajaron con muestras de cultivos. Sin embargo de las 82 muestras de leche, en una de ellas se logró detectar material genético de *B. abortus* cepa vacunal S19.

Debido a ciertas limitaciones, el ensayo de PCR múltiple evaluado en este estudio no es aplicable para el diagnóstico de la infección de *B. abortus* en muestras de leche y tejidos de nódulos linfáticos. Por lo mismo no fue posible determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo PCR con los primers aquí empleados.



## CAPITULO VII: RECOMENDACIONES

- Repetir el estudio y evaluar el ensayo con otro tipo de primers u oligonucleótidos que permitan obtener amplificaciones específicas.
- Comparar el ensayo de PCR con una prueba de mayor especificidad diagnóstica que la prueba RBT, como por ejemplo ELISA competitivo.
- Al realizar el ensayo de PCR, en una de las muestras se encontró material genético de *B. abortus* cepa S19, en base a este resultado se puede decir que es muy importante tener estrictas medidas de bioseguridad cuando se manejan animales vacunados, así también en el consumo de leche cruda y sus sub-productos que provengan de animales que hayan sido vacunados.
- Secuenciar las bandas inespecíficas para determinar su identidad.



## CAPITULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. da silva MJP, de Araújo FS, Paixão TA, Santos RL. Laboratorial diagnosis of animal brucellosis. R. Bras. Ci. Vet. 2012; 19(3): 117-26.
2. Sharifi-Yazdi H, Khazralinia P, Zahraei-Salehi T, Behroozikhah AM. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for differentiation of field strain isolates and vaccine strains S19 y RB51 of *Brucella* in Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University. 2008; 9(1): 19-24.
3. Agrocalidad. *Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina*. [Internet]. Ecuador. 2009. [Citado el 20 de enero de 2017]. Recuperado a partir de: [http://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad/images/pdfs/sanidadanimal/programa\\_nacional\\_brucelosis\\_bovina.pdf](http://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad/images/pdfs/sanidadanimal/programa_nacional_brucelosis_bovina.pdf)
4. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Brucelosis Bovina. En: Código sanitario para los animales terrestres. (18º ed). Capítulo 2.4.3. [Internet]. Paris-Francia. 2009. p. 1-35. Recuperado a partir de: [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.04.03.%20Brucelosis%20bovina.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.04.03.%20Brucelosis%20bovina.pdf)
5. Gall D, Nielsen K. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. Rev. Sci. Tech. 2004; 23 (3), 989-1002.
6. O'Leary S, Sheahan M, Torres S. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. Res Vet Sci. 2006; 81(2): 170-6.
7. Mullis Kary. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. 1990; 262(4): 56-61, 64-5.
8. Tan SY, Davis C. David Bruce (1855-1931): discoverer of brucellosis. Singapore Med J. 2011; 52(3): 138-9.
9. de Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rossetti CA, Adams LG. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions. Am J Pathol. 2015; 185(6):1505-17.
10. Ali S, Akhter S, Neubauer H, Melzer F, Khan I, Abatih EN, *et al*. Seroprevalence and risk factors associated with bovine brucellosis in the Potohar Plateau, Pakistan. BMC Res Notes. 2017; 10(1): 73.



11. Rodríguez VY, Ramírez SW, Antúnez SG, Pérez BF, Ramírez PY, Igarza PA. Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. REDVET. 2005; 6(9): 1-9.
12. Pool G, Rivera S, Torres T, Pérez M, García A, Castejón O, *et al.* Prevalencia de brucelosis bovina mediante ELISA competitivo en el Municipio la Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. REDVET. 2004; 14(2): 1-19
13. İça T, Aydın F, Gümüşsoy S, Perçin D, Sümerkan, AB, Ocak F. Conventional and molecular biotyping of *Brucella* strains isolated from cattle, sheep and human. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 2012; 59: 259-64.
14. Gwida M, El-Ashker M, Melzer F, El-Diasty M, El-Beskawy M, Neubauer H. Use of serology and real time PCR to control an outbreak of bovine brucellosis at a dairy cattle farm in the Nile Delta region, Egypt. Ir Vet J. 2016; 69:3: 1-7.
15. 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(5): 2090-8.
16. Verger JM, Grimont F, Grimont PA, Grayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. Int J Syst Bacteriol. 1985; 35: 292-5.
17. 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(12): 4120-8.
18. Rivers R, Andrews E, González SA, Donoso G, Oñate A. *Brucella abortus*: Inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. Arch. Med. Vet. 2006; 38(1): 7-18.
19. Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzmán-Verri C, Chacón-Díaz C, Rucavado A, *et al.* *Brucella abortus* uses a Stealthy Strategy to Avoid Activation of the Innate Immune System during the Onset of Infection, PLoS ONE. 2007; 2(7): e631.
20. Martirosyan A, Gorvel JP. *Brucella* evasion of adaptive immunity. Future Microbiol. 2013; 8: 147-54.
21. Querol SJ. Ganadería. Brucelosis bovina. Cuestiones clínicas, epidemiológicas y diagnósticas de la brucelosis bovina, ovina y caprina.



- [Internet]. España; 2011 [Citado 17 de junio de 2017]. Recuperado a partir de: <http://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/brucelosis-bovina-t29060.htm>
22. Terefe Y, Girma S, Mekonnen N, Asrade B. Brucellosis and associated risk factors in dairy cattle of eastern Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.* 2017; 49(3):599-606.
  23. Corner LA, Alton GG. Persistence of *Brucella abortus* strain S19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Res Vet Sci.* 1981; 31(3):342-4.
  24. Castro HA, González SR, Prat MI. Brucellosis: una revisión práctica. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 2005; 39(2):203-16.
  25. Tique V, González M, Mattar S. Seroprevalencia de *Brucella abortus* en bovinos del departamento de Córdoba. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 2009; 12(2): 51-9.
  26. Calle LJ. Control y erradicación de *Brucella abortus* en establos lecheros [tesis en Internet]. [Lima-Perú]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009 [Citado 26 de mayo de 2017]. Recuperado a partir de: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/747/Calle\\_lj.pdf?sequence=1](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/747/Calle_lj.pdf?sequence=1)
  27. Galińska E, Zagórski J. Brucellosis in humans – etiology, diagnostics, clinical forms. *Ann Agric Environ Med.* 2013; 20(2): 233-38.
  28. Dean AS, Crump L, Greter H, Hattendorf J, Schelling E, Zinsstag J. Clinical manifestations of human brucellosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(12): e1929.
  29. Moral M. Ministerio de Salud de la Nación. Dirección de Epidemiología. Guía para el Equipo de Salud Nro. 12. Enfermedades infecciosas. Brucellosis. [Internet]. Argentina; 2013. [Citado 13 de julio de 2017]. Recuperado a partir de: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000304cnt-guia-medica-brucelosis.pdf>
  30. MINSA. Ministerio de Salud. Norma técnica de diagnóstico y tratamiento de brucellosis humana. 1ra ed. [Internet]. Perú; 2005. [Citado 25 de marzo de 2017]. Recuperado a partir de: [www.minsa.gob.pe/portada/est\\_san/archivo/2011/NT\\_Brucelosis.pdf](http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/archivo/2011/NT_Brucelosis.pdf)



31. Stevens MG, Hennager SG, Olsen SC, Chevillie NF. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. J Clin Microbiol. 1994; 63: 264-70.
32. Martínez HD, Peniche CA, Hernández RS, Abeledo M, Barradas PF, Villanueva VM, *et al.* Evaluación de la cepa S19 *Brucella abortus* en el control de la brucelosis bovina en Actopan, Veracruz, México. Rev. Salud Anim. 2011; 33(1): 44-50.
33. Bustamante SJ, Salazar HF, Díaz AE, Manzano CC, Pérez GR, Hernández AL. Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*. Tec. Pecu MéX. 2000; 38(1): 35-42.
34. 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):171-88.
35. Olsen SC. Immune responses and efficacy after administration of commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. Vet. Ther. 2000; 1(3): 183-191.
36. Salazar J, Sánchez-Castilleja YM, Bojórquez JL, Díaz E. Estabilidad de la vacuna liofilizada contra *Brucella abortus* cepa RB51. Rev. Salud Anim. 2007; 29(2): 101-4.
37. Schurig G. Uso de la vacuna RB51 contra brucelosis. Taurus, Bs. As. 2001; 3(9): 31-36.
38. Amin MM, Ahmed SA, Zaki HM, Ismail RI. Serological and Molecular Studies on the Diagnosis of Bovine Brucellosis. Nat Sci. 2012; 10(11): 68-76.
39. Gasque GR. Enciclopedia Bovina. FMVZ. (1ª edición). UNAM. México DF. 2008. p.102-106 pp.
40. Cho D, Nam H, Kim J, Heo E, Cho Y, Hwang I, *et al.* Quantitative Rose Bengal Test for diagnosis of bovine brucellosis. J Immunoassay Immunochem. 2010; 31(2):120-30.
41. Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. Croat Med J. 2010; 51(4):296-305.
42. Kaltungo BY, Saidu SNA, Sackey AKB, Kazeem HM. A review on diagnostic techniques for brucellosis. Afr. J. Biotechnol. 2014; 13(1): 1-10.



43. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol. 1994; 32(11):2660-6.
44. Brock T, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a non-sporulating extreme thermophile. J Bacteriol. 1969; 98(1): 289-97.
45. Wang Y, Wang Z, Zhang Y, Bai L, Zhao Y, Liu C, et al. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of human brucellosis. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014; 13: 31.
46. Matrone M, Keid LB, Rocha VC, Vejarano MP, Ikuta CY, Rodriguez CA, 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(3): 480-9.
47. Romero C, Lopez-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): 3735-7.
48. López-Calleja I, González 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.
49. Vemulapalli R, McQuiston JR, Schurig GG, Sriranganathan N, Halling SM, Boyle SM. Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1999; 6(5): 760-4.
50. Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. J. Clin. Microbiol. 1995; 33(6): 1640-2.
51. Zowghi E, Ebadi A, Mohseni B. Isolation of *Brucella* organisms from the milk of seronegative cows. Rev Sci Tech. 1990; 9(4):1175-8.
52. Lindahl-Rajala E, Hoffman T, Fretin D, Godfroid J, Sattarov N, Boqvist S, et al. Detection and characterization of *Brucella spp.* in bovine milk in small-scale urban and peri-urban farming in Tajikistan. PLoS Negl Trop Dis. 2017; 11(3):e0005367.



53. Castelli M, Mangold A, Maciel M, Abdala A. Leucosis bovina. Diagnóstico, transmisión, control y prevención. Infortambo [Internet]. 1999 [citado 19 de julio de 2017]; 128: 68. Recuperado a partir de: <http://rafaela.inta.gov.ar/revistas/inf0999.htm>
54. Bolivar AM, Rojas A, Garcia-Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avan Biomed*. 2014; 3(1): 25-33.
55. Acinas SG, Sarma-Rupavtarm R, Klepac-Ceraj V, Polz MF. PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(12): 8966-9.
56. Taussig MJ. Molecular genetics of immunoglobulins. *Immunology*. 1988; 64(1): 7-16.
57. Mandal A. Antibody immunoglobulin diversity. [Internet]. 2012 [Citado 29 de septiembre de 2017]. Recuperado a partir de: <https://www.news-medical.net/health/Antibody-Immunoglobulin-Diversity.aspx>
58. Rodríguez HR, Contreras ZJ, Ortiz W, Guerrero VK, Salcan GH, Minda E, *et al*. Circulating strains of *Brucella abortus* in cattle in Santo Domingo de los Tsáchilas Province – Ecuador. *Front Public Health*. 2015; 3(45): 1-5.
59. Pacheco WA, Genovez ME, Pozzi CR, Silva LM, Azevedo SS, Did CC, *et al*. Excretion of *Brucella abortus* vaccine B19 strain during a reproductive cycle in dairy cows. *Braz J Microbiol*. 2012; 43(2):594-601.

## CAPITULO IX. ANEXOS

## Anexo 1. Hoja de datos: Resultados de la prueba RB y PCR en muestras de leche

Resultados serológicos (RB: suero sanguíneo) y moleculares (PCR: leche)							
Granja 1				Granja 2			
#muestra	RBT	CPro	PCR	#muestra	RBT	CPro	PCR
1	Sero (-)	X	---	1	Sero (-)	X	---
2	Sero (-)	X	---	2	Sero (-)	X	---
3	Sero (-)	X	---	3	Sero (-)	X	---
4	Sero (-)	X	---	4	Sero (-)	X	---
5	Sero (-)	X	---	5	Sero (-)	X	---
6	Sero (-)	X	---	6	Sero (+)	X	---
7	Sero (-)	X	---	7	Sero (-)	X	---
8	Sero (-)	X	---	8	Sero (-)	X	---
9	Sero (-)	X	---	9	Sero (+)	X	---
10	Sero (-)	X	---	10	Sero (-)	X	---
11	Sero (-)	X	---	11	Sero (-)	X	---
12	Sero (-)	X	---	12	Sero (-)	X	---
13	Sero (-)	X	---	13	Sero (-)	X	---
14	Sero (-)	X	---	14	Sero (-)	X	---
15	Sero (-)	X	---	15	Sero (-)	X	---
16	Sero (-)	X	---	16	Sero (-)	X	---
17	Sero (-)	X	---	17	Sero (-)	X	---
18	Sero (-)	X	---	18	Sero (-)	X	---
19	Sero (-)	X	---	19	Sero (-)	X	---
20	Sero (-)	X	---	20	Sero (-)	X	---
21	Sero (-)	X	(+):S19	21	Sero (-)	X	---
22	Sero (-)	X	---	22	Sero (-)	X	---
23	Sero (-)	X	---	23	Sero (-)	X	---
24	Sero (-)	X	---	2	Sero (-)	X	---
25	Sero (-)	X	---	25	Sero (-)	X	---
26	Sero (-)	X	---	26	Sero (-)	X	---
27	Sero (-)	X	---	27	Sero (-)	X	---
28	Sero (-)	X	---	28	Sero (-)	X	---
29	Sero (-)	X	---	29	Sero (-)	X	---
30	Sero (+)	X	---	30	Sero (-)	X	---
31	Sero (+)	X	---	31	Sero (-)	X	---
32	Sero (+)	X	---	32	Sero (-)	X	---
33	Sero (-)	X	---	33	Sero (-)	X	---
34	Sero (-)	X	---	34	Sero (-)	X	---
# Sero (+)	3			35	Sero (-)	X	---
# Sero (-)	31			36	Sero (-)	X	---
35	Sero (-)			37	Sero (-)	X	---
36	Sero (-)			38	Sero (-)	X	---
37	Sero (-)			39	Sero (-)	X	---
38	Sero (-)			40	Sero (-)	X	---
39	Sero (-)			41	Sero (-)	X	---
40	Sero (-)			42	Sero (-)	X	---



41	Sero (-)			43	Sero (-)	X	---
42	Sero (-)			44	Sero (-)	X	---
43	Sero (-)			45	Sero(-)	X	---
44	Sero (-)			46	Sero (-)	X	---
45	Sero (-)			47	Sero (-)	X	---
46	Sero (-)			48	Sero (-)	X	---
47	Sero (-)			# Sero(+)	2		
48	Sero (-)			# Sero (-)	46		
49	Sero (-)			49	Sero (-)		
50	Sero (-)			50	Sero (-)		
51	Sero (-)			51	Sero (-)		
52	Sero (-)			52	Sero (-)		
53	Sero (+)*			53	Sero (-)		
54	Sero (-)			54	Sero (-)		
55	Sero (-)			55	Sero (-)		
56	Sero (-)			56	Sero (-)		
57	Sero (-)			57	Sero (-)		
58	Sero (-)			58	Sero (-)		
59	Sero (-)			59	Sero (-)		
60	Sero (-)			60	Sero (-)		
61	Sero (-)			61	Sero (-)		
62	Sero (-)			62	Sero (-)		
63	Sero (-)			63	Sero (-)		
64	Sero (-)			64	Sero (-)		
65	Sero (-)			65	Sero (-)		
66	Sero (-)			66	Sero (-)		
67	Sero (-)			67	Sero (-)		
68	Sero (-)			68	Sero (-)		
69	Sero (-)			69	Sero(-)		
70	Sero (-)			70	Sero (-)		
71	Sero (-)			71	Sero (-)		
72	Sero (-)			72	Sero (-)		
73	Sero (-)			73	Sero (-)		
74	Sero (-)			74	Sero (-)		
75	Sero (-)			75	Sero (-)		
76	Sero (-)			76	Sero (-)		
77	Sero (+)			77	Sero (-)		
78	Sero (-)			78	Sero (-)		
79	Sero (-)			79	Sero (-)		
80	Sero (-)			80	Sero (-)		
81	Sero (-)			81	Sero (-)		
82	Sero (-)			82	Sero (-)		
83	Sero (-)			83	Sero (-)		
84	Sero (-)			84	Sero (-)		
85	Sero (-)			85	Sero (-)		
86	Sero (-)			86	Sero (+)		
87	Sero (-)			87	Sero (-)		
88	Sero (-)			88	Sero (+)*		



89	Sero (-)			89	Sero (+)*		
90	Sero (-)			90	Sero (+)*		
91	Sero (-)			91	Sero (-)		
92	Sero (-)			92	Sero (-)		
93	Sero (-)			93	Sero (-)		
94	Sero (-)			94	Sero (+)		
95	Sero (-)			95	Sero (-)		
96	Sero (-)			96	Sero (-)		
97	Sero (-)			97	Sero (+)		
98	Sero (-)			98	Sero (+)		
99	Sero (-)			99	Sero (+)		
100	Sero (-)			100	Sero (+)		
# Sero (+)	2			# Sero(+)	9		
# Sero (-)	64			# Sero (-)	43		
<b>Total Sero (+)</b>	5			<b>Total Sero (+)</b>	11		
<b>Total Sero (-)</b>	95			<b>Total Sero (-)</b>	89		

Sero (+): Seropositivo, reacción de aglutinación bien marcada; Sero (+)\*: Seropositivo, leve reacción de aglutinación; Sero (-): Seronegativo, no hay reacción de aglutinación; Celdas en gris: muestras de animales en producción láctea; X: Control de proceso válido; ---: amplificación inespecífica.


**Anexo 2. Registro de los resultados de PCR de las muestras de nódulos linfáticos**

<b>MUESTRAS DE TEJIDO-Camal "EMURPLAG"</b>			
<b># Muestra</b>	<b>Nódulo linfático</b>	<b>Control de Proceso</b>	<b>PCR</b>
1	Supramamario	X	---
2	Preescapular	X	---
3	Preescapular	X	---
4	Preescapular	X	---
5	Preescapular	X	---
6	Preescapular derecho	X	---
7	Preescapular derecho	X	---
8	Preescapular derecho	X	---
9	Preescapular	X	---
10	Preescapular	X	---
11	Preescapular	X	---
12	Preescapular	X	---
13	Preescapular derecho	X	---
14	Preescapular derecho	X	---
15	Preescapular izquierdo	X	---
16	Preescapular derecho	X	---
17	Supramamario	X	---
18	Preescapular derecho	X	---
19	Preescapular izquierdo	X	---
20	Preescapular izquierdo	X	---
21	Preescapular derecho	X	---
22	Preescapular izquierdo	X	---
23	Supramamario	X	---
24	Supramamario	X	---
25	Supramamario	X	---
26	Supramamario	X	---
27	Supramamario	X	---
28	Supramamario	X	---
29	Supramamario	X	---

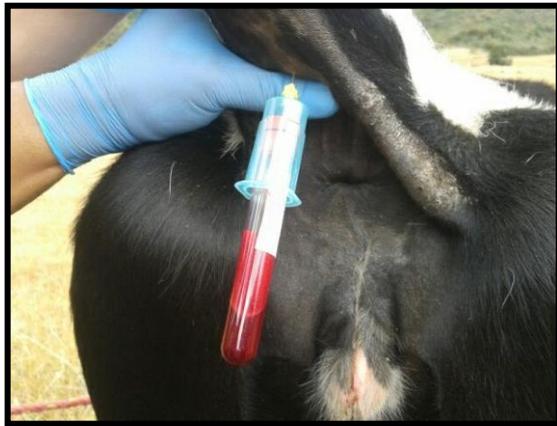


30	Preescapular	X	---
31	Preescapular	X	---
32	Preescapular derecho	X	---
33	Supramamario	X	---
34	Supramamario	X	---
35	Supramamario	X	---
36	Supramamario	X	---
37	Preescapular derecho	X	---
38	Preescapular derecho	X	---
39	Preescapular derecho	X	---
40	Preescapular izquierdo	X	---
41	Preescapular izquierdo	X	---
42	Preescapular derecho	X	---
43	Preescapular derecho	X	---
44	Preescapular derecho	X	---
45	Preescapular derecho	X	---
46	Preescapular izquierdo	X	---
47	Preescapular derecho	X	---
48	Preescapular derecho	X	---
49	Preescapular derecho	X	---
50	Preescapular derecho	X	---
51	Preescapular derecho	X	---
52	Preescapular	X	---
53	Preescapular derecho	X	---
54	Preescapular	X	---
55	Preescapular derecho	X	---
56	Preescapular	X	---
57	Preescapular izquierdo	X	---
58	Preescapular	X	---
59	Preescapular	X	---
60	Preescapular derecho	X	---
61	Supramamario	X	---

62	Preescapular	X	---
63	Preescapular	X	---
64	Preescapular	X	---
65	Preescapular	X	---
66	Preescapular	X	---
67	Preescapular	X	---
68	Preescapular	X	---
69	Preescapular derecho	X	---

X: Control de proceso válido; ---: amplificación inespecífica.

**Anexo 3. Colecta de muestras de sangre, leche y tejidos**





**Anexo 4. Formato de ensayo de PCR para la amplificación del control de proceso**

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

**A.- Información del ensayo:**

Usuario:	Antonio J. Vallejo		
Fecha:	Nombre del programa: CP10-2016		
No:	Nombre del producto de PCR:	Tamaño (bp):	Observaciones:
1			
2			
3			
4			
5			

**B.- Mezcla de reacción:**

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	de mezcla:	por reacción:
Agua grado Biología Molecular:	No aplica.	No aplica.	93,25 µl	18,65 µl
Tampon de amplificación 10X:	10X	1X	12,5 µl	2,5 µl
Solución de dNTP's:	10 mM	0,1 mM	4,25 µl	0,85 µl
Solución de MgCl <sub>2</sub> :	50 mM	2,0 mM	5 µl	1 µl
Oligonucleotido 12S FW -F:	100 µM	0,8 µM	1 µl	0,2 µl
Oligonucleotido 12S REV -R:	100 µM	0,8 µM	1 µl	0,2 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:	5 U/µl	0,04 U/µl	1 µl	0,2 µl
Muestra de ADN total:	_____ µg/µl	_____ µg/µl	10 µl	2 µl
Volumen final:			125 µl	25 µl

**C.- Perfil de temperaturas de amplificación:**

Paso:	Desnaturalización inicial:	Número de ciclos: _____			Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:		
Tiempo ( min , seg ):	2' - 00"	1' - 40"	1' - 30"	1' - 45"	5' - 00"	8
Temperatura (°C):	94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C
			_____ °C < _____ °C			

**D.- Curva de temperatura de alineamiento:**

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



**Anexo 5.** Formato de ensayo de PCR para la amplificación de material genético de las cepas de *Brucella abortus*

 UNIVERSIDAD DE CUENCA CENSA 1967	<b>Laboratorio de Biología Molecular</b>		01-FE-MBM-PfxPol	
			Versión:	I
	Formato de ensayo: Pfx ADN polimerasa		Fecha:	2017.02.02
			Página:	1 de 2

**A.- Información del ensayo:**

Usuario:	Antonio J. Vallejo		
Fecha:	2017.05.16	Nombre del programa:	Brv-PCR-multiplex
Nº:	Nombre del producto de PCR:	Tamaño (bp):	Observaciones:
1			
2			
3			
4			

**B.- Mezcla de reacción:**

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	de premezcla:	por reacción:
Agua grado Biología Molecular.	No aplica.	No aplica.	14.375 µl	16.375 µl
Buffer de amplificación 10X.	10X	1X	12.5 µl	2.5 µl
Solución enhancer 10X.	10X	X	4.375 µl	1.375 µl
Solución de dNTP's.	mM	mM	1.25 µl	0.25 µl
Solución de MgSO <sub>4</sub> .	50 mM	mM	2.5 µl	0.5 µl
Oligonucleótido _____-F.	µM	µM	1 µl	0.2 µl
Oligonucleótido _____-R.	µM	µM	1 µl	0.2 µl
Oligonucleótido _____-F.	µM	µM	1 µl	0.2 µl
Oligonucleótido _____-R.	µM	µM	1 µl	0.2 µl
Oligonucleótido _____-F.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleótido _____-R.	µM	µM	µl	µl
Enzima Pfx ADN polimerasa.	2.5 U/µl	U/µl	1 µl	0.2 µl
Muestra de ADN total.	µg/µl	µg/µl	10 µl	2 µl
<b>Volumen final:</b>			<b>125 µl</b>	<b>25 µl</b>

**C.- Perfil de temperaturas de amplificación:**

Paso:	Desnaturalización inicial:	Número de ciclos: 40				Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:	Extensión final:		
Tiempo (min., seg.):	5:--	= 30"	= 25"	= 20"	5:--	=	
Temperatura (°C):	95 °C	95 °C	56 °C	68 °C	66 °C	4 °C	
			°C < °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.:												