



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

TITULO:

Sensibilidad analítica de un ensayo de PCR múltiple para la identificación de cepas de campo o vacunales de *Brucella abortus* en leche y nódulos linfáticos de bovinos.

Tesis previa a la obtención del Título de
Médico Veterinario Zootecnista

AUTOR: Rolando Fabián Wampash Paati

C.I. 1400758189

DIRECTOR: Mvz. Antonio Javier Vallecillo Maza, PhD

C.I. 0151059417

CUENCA - ECUADOR

2017

RESUMEN

La brucelosis bovina es una enfermedad infecto-transmisible causada principalmente por *Brucella abortus*, tiene una distribución mundial y un efecto socioeconómico negativo debido a pérdidas ocasionadas por abortos, nacimiento de terneros débiles, reducción en la producción de leche e infertilidad en bovinos infectados, e impacto en salud pública por su carácter zoonótico. Para el diagnóstico existen diferentes métodos laboratoriales, los indirectos como la aglutinación con antígeno teñido con Rosa de Bengala, la prueba de anillo en leche, ELISAs, entre otros, y los directos como el aislamiento bacteriano, Inmunofluorescencia directa y PCR. En el proceso de implementación de un ensayo diagnóstico en un laboratorio es necesario evaluar y estimar su idoneidad para su utilización concreta. Se evalúan una serie de variables, entre ellas la cantidad mínima de análisis que se logra detectar por el ensayo, éste valor se conoce como sensibilidad analítica. El caso del PCR no es la excepción, por lo que el presente proyecto se planteó estimar la sensibilidad analítica del ensayo de PCR múltiple para su empleo en la identificación de cepas de campo de *Brucella abortus* y/o las cepas vacunales S19 y RB51 en muestras de leche y tejidos de nódulos linfáticos de bovinos. Como resultado se encontró que, en leche, la cepa S19 se amplificó un producto de 456 pb y cepa RB51 se amplificó un producto de 1290 pb y el límite de detección en las dos cepas fue de 1×10^4 UFC/ml. En el caso de los tejidos no se logró estimar la sensibilidad analítica, dado la incapacidad del método de extracción para obtener material genético de calidad para ser empleado en los ensayos de PCR y por otro lado, la inespecificidad mostrada por los primers empleados. Por lo que se deberá modificar el método de extracción de ADN total y usar otros primers o rediseñarlos.

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

ABSTRACT

Bovine brucellosis is an infectious-transmissible disease caused mainly by *Brucella abortus*, has a worldwide distribution and a negative socioeconomic effect due to losses caused by abortions, birth of weak calves, reduction in milk production and infertility in infected cattle, and impact in public health because of its zoonotic nature. For the diagnosis different laboratory methods exist, indirect ones such as agglutination with the antigen stained with Rose of Bengal, ring test in milk, ELISAs, among others, and the direct ones like bacterial isolation, direct immunofluorescence and PCR. In the process of implementing a diagnostic test in a laboratory it is necessary to evaluate and estimate its suitability for its concrete application. It evaluates a series of variables, including the minimum amount of analyte that is detected by the test, this value is known as analytical sensitivity. The case of PCR is not the exception, and the current project was intended to estimate the analytical sensitivity of the multiple PCR assay for use in the identification of *Brucella abortus* field strains and / or vaccine strains S19 and RB51 in the milk samples and bovine lymph node tissues. As a result it was found that, in milk, strain S19 was amplified the product of 456 bp and strain RB51 the product of 1290 bp was amplified and the limit of detection in the two strains was 1×10^4 CFU/ml. In the case of tissues, it has not been possible to estimate the analytical sensitivity, given the inability of the extraction method to obtain the quality genetic material to be used in the PCR assays and the other side, the non-specificity shown by the primers used. So you have to change the method of total DNA extraction and use other primers or redesign them.

Key words: Bovine brucellosis, *Brucella abortus*, Multiplex PCR, Validation, Analytical sensitivity.

INDICE DE CONTENIDOS:

Número:	Contenido:	Página:
	RESUMEN	2
	ABSTRACT	3
	ÍNDICE DE CONTENIDOS	4
	ÍNDICE DE TABLAS	6
	ÍNDICE DE FIGURAS	7
	ÍNDICE DE ANEXOS	7
	INDICE DE FOTOGRAFIAS	7
	ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	8
	CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	10
	CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	11
	DEDICATORIA	12
	AGRADECIMIENTOS	13
I.	INTRODUCCIÓN	14
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
2.1.	Brucelosis bovina	17
2.1.1.	Definición	17
2.1.2.	Agente causal	17
2.1.3.4	Características	17
2.1.4.	Biotipos	18
2.1.5.	Distribución geográfica	18
2.1.6.	Transmisión	18
2.1.7.	Signos clínicos	19
2.1.7.1.	Hembras	19
2.1.7.2.	Machos	19
2.1.8.	Importancia de la brucelosis bovina en salud pública	19
2.1.9.	Control y erradicación	20
2.1.9.1.	Vacuna S19	20
2.1.9.2.	Vacuna RB51	20
2.1.10.	Diagnóstico	21
2.1.10.1.	Métodos indirectos	21
2.1.10.2.	Métodos directos	22

2.1.10.3.	Pruebas moleculares en el diagnóstico de brucelosis	22
III.	HIPÓTESIS O PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1.	Colecta, conservación, transporte y almacenado de las muestras biológicas (leche/tejidos).	25
4.1.1.	Materiales:	25
4.1.1.1.	Biológicos	25
4.1.1.2.	Reactivos/soluciones	25
4.1.1.3.	Equipos y otros materiales	25
4.1.2.	Métodos.	25
4.2.	Dilución de las cepas vacunales de <i>B. abortus</i> S19 y RB51 e inoculación en las muestras biológicas (leche/tejidos).	26
4.2.1.	Materiales:	26
4.2.1.1.	Biológicos	26
4.2.1.2.	Reactivos/soluciones	27
4.2.1.3.	Equipos y otros materiales	27
4.2.2.	Métodos	27
4.3.	Procesamiento de las muestras biológicas inoculadas: extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) total de <i>B. abortus</i> .	29
4.3.1.	Materiales:	29
4.3.1.1.	Biológicos	29
4.3.1.2.	Reactivos/soluciones	29
4.3.1.3.	Equipos y otros materiales	30
4.3.2.	Métodos:	31
4.3.2.1.	Extracción del ADN Total de leche según Romero y López-Goñi, 1999, con algunas modificaciones.	31
4.3.2.2.	Extracción del ADN Total de tejidos protocolo Lisis con Proteinasa K (PK) y Fenol / Cloroformo según Matrone <i>et al.</i> , 2009, con algunas modificaciones.	31
4.4.	Amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) total de bovino de las muestras de leche y tejido mediante un ensayo PCR (Control de proceso) y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE	32
4.4.1.	Materiales:	32

4.4.1.1.	Biológicos	32
4.4.1.2.	Reactivos/soluciones	33
4.4.1.3.	Equipos y otros materiales	33
4.4.2.	Métodos	34
4.5.	Amplificación del ácidos desoxirribonucleico (ADN) de <i>B. abortus</i> mediante el ensayo PCR y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE.	36
4.5.1.	Materiales:	36
4.5.1.1.	Biológicos	36
4.5.1.2.	Reactivos/soluciones	36
4.5.1.3.	Equipos y otros materiales	37
4.5.2.	Métodos	37
V.	RESULTADOS	41
5.1.	Colecta de las muestras biológicas (leche/tejidos)	41
5.2.	Detección del material genético de las muestras de leche y tejido del bovino (control de proceso).	41
5.3.	Detección del fragmento del ADN de las cepas vacunales de <i>B. abortus</i> S19 y RB51 en las muestras de leche y tejido del bovino.	43
5.4.	Evaluación de las dos cepas vacunales de <i>B. abortus</i> en leche.	46
VI.	DISCUSIÓN	47
VII.	CONCLUSIONES	49
VIII.	RECOMENDACIONES	50
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
X.	ANEXOS	56

INDICE DE TABLAS:

Número:	Tabla:	Página:
Tabla 1.	Concentraciones de las cepas vacunales de <i>B. abortus</i> S19 y RB51 en leche y nódulos linfáticos.	29
Tabla 2	Mezcla de reacción en el control de proceso.	34
Tabla 3	Perfil de temperaturas de amplificación en el control de proceso.	35
Tabla 4	Mezcla de reacción en el PCR múltiple.	48
Tabla 5	Perfil de temperaturas de amplificación en el PCR múltiple.	39
Tabla 6	Detección del fragmento de ADN y el límite del ensayo PCR	45

múltiple de las dos cepas vacunales de *B. abortus* en muestras de leche bovina.

INDICE DE FIGURAS:

Número:	Figura:	Página:
Figura 1	Procedimiento de la dilución e inoculación de la cepas vacunales de <i>B. abortus</i> S19 y RB51 en leche.	30
Figura 2	Procedimiento de la dilución e inoculación de la cepas vacunales de <i>B. abortus</i> S19 y RB51 en nódulos linfáticos	30
Figura 3	Electroforesis (gel de agarosa al 1.2 %) de los productos de PCR correspondientes al control de proceso de las siete diluciones en leche.	44
Figura 4	Electroforesis (gel de agarosa al 1.2 %) de los productos de PCR correspondientes al control de proceso de las siete diluciones en nódulos linfáticos.	44
Figura 5	Electroforesis (gel de agarosa al 1.2 %) de los productos de PCR correspondientes a la detección del fragmento de ADN y el límite de detección de <i>B. abortus</i> cepa vacunal S19 de siete diluciones en leche.	45
Figura 6	Electroforesis (gel de agarosa al 1.2 %) de los productos de PCR correspondientes a la detección del fragmento de ADN y el límite de detección de <i>B. abortus</i> cepa vacunal RB51 de siete diluciones en leche.	46

INDICE DE ANEXOS:

Número:	Anexo:	Página:
Anexo 1	Formato del ensayo PCR para el control de proceso	56
Anexo 2	Formato del ensayo PCR para la amplificación del material genético de <i>B. abortus</i> .	57

INDICE DE FOTOGRAFÍAS:

Número:	Fotografía:	Página:
Foto 1	Colección de muestras de leche.	58
Foto 2	Dilución e inoculación de las cepas vacunales de <i>B. abortus</i> en muestras de leche.	58
Foto 3	Extracción del ADN en muestras de leche inoculadas con cepas vacunales.	58

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

Abreviatura:	Significado:
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGROCALIDAD	Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro
BPA	Aglutinación en placa con antígeno tamponado
Buffer NET	Solución de NaCl, EDTA y Tris-HCl
Buffer TAE	Solución de Tris-acetato y EDTA
Buffer TE	Solución de Tris-HCl y EDTA
c.b.p	Cantidad bastante para
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
eri1 y eri2	Oligonucleótidos o primers para detectar una delección en los dos genes del operon <i>ery</i> .
F.CC.AA.	Facultad de Ciencias Agropecuarias
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FC	Fijación del Complemento
LAMP	Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle
LPSO	Cadena O del lipopolisacarido
Mb	Megabase
MPM	Marcador de peso molecular
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR AMOS	Ensayo PCR para identificar <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. ovis</i> y <i>B. suis</i>
PNSA-MAG	Programa Nacional de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería
RB	Rosa Bengala
RFLP	Polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción
Riv	Prueba de Rivanol



RT	Prueba de anillo en leche (Ring test)
SAE	Seroaglutinación estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
wbo1 y wbo3	Oligonucleótidos o primers diseñados para detectar el elemento IS711 que interrumpe al gen <i>wboA</i> .

Símbolo:	Significado:
μm	Micra
∞	Infinito
Cm	Centímetro
C°	Grados centígrados
G	Gravedad
G	Gramos
H	Hora
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
M	Molar
Mg	Miligramo
MgCl	Cloruro de magnesio
Min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
Seg	Segundo
Ug	Microgramo
$\alpha 2$	Alfa 2
ml	Microlitro
μM	Micromolar

CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Rolando Fabián Wampash Paati, autor del trabajo de titulación “Sensibilidad analítica de un ensayo de PCR múltiple para la identificación de cepas de campo o vacunales de *Brucella abortus* en leche y nódulos linfáticos de bovinos”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, a 14 de noviembre de 2017.



Rolando Fabián Wampash Paati

CI: 1400758189

**CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL
REPOSITORIO INSTITUCIONAL**

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Yo, Rolando Fabián Wampash Paati, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Sensibilidad analítica de un ensayo de PCR múltiple para la identificación de cepas de campo o vacunales de *Brucella abortus* en leche y nódulos linfáticos 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.



Rolando Fabián Wampash Paati

CI: 1400758189

A mis padres Celestino y Luisa, que con esfuerzo y sacrificio me apoyaron incondicionalmente durante mi vida estudiantil y personal, por su amor infinito y que siempre confiaron en mí.

A mis hermanos y hermanas, quienes siempre estuvieron brindándome cariño y apoyándome en los momentos difíciles de mi vida.

Rolando.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias – Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, y a sus docentes, quienes gracias a ellos cultive conocimientos y valores humanos. Al Dr. Antonio J. Vallecillo, Director de tesis por brindarme sus conocimientos teóricos y prácticos en la ejecución del proyecto, y por demostrar paciencia, amabilidad, sencillez, y respeto hacia sus dirigidos. A mis amigos por permitirme tener la alegría de estar juntos y por su colaboración durante la formación profesional de cinco años transcurridos.

Muchas gracias a todos ustedes.

Rolando.

I. INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina es una enfermedad infecto-transmisible de origen bacteriano, también conocida como aborto infeccioso o enfermedad de Bang, afecta a bovinos de todas las edades, pero persiste con mayor frecuencia en animales sexualmente maduros; además, son susceptibles al agente causal otras especies como porcinos, ovinos, caprinos, equinos y búfalos; en ellas produce variados signos (1). La brucelosis bovina es una enfermedad zoonótica distribuida en todo el mundo que se puede adquirir mediante contacto directo o indirecto con animales infectados o sus productos y caracterizada como una enfermedad febril aguda que puede persistir y progresar a una enfermedad crónica con complicaciones graves (2).

En el ganado bovino la brucelosis es causada principalmente por biovariedades de *Brucella abortus*, con menor frecuencia por *B. melitensis*, y en raras ocasiones por *B. suis* (3). En los bovinos la brucelosis causa abortos, placentitis, orquitis, mastitis y muerte perinatal de terneros (4).

La brucella es capaz de vivir y multiplicarse dentro de las células de los tejidos del sistema retículo endotelial (5). Se trata de una enfermedad de curso crónico con graves repercusiones en la salud pública y animal, provoca grandes pérdidas económicas debido a que los animales infectados se descarta y no es factible su tratamiento, además que implica las restricciones tanto en animales infectados como a sus productos (6).

Actualmente para el diagnóstico de la brucelosis bovina existen diversos métodos de diagnóstico, que varían en su sensibilidad y especificidad diagnósticas. Las pruebas indirectas los más utilizados para la identificación de anticuerpos anti-brucella en el suero sanguíneo; las más comunes son la Seroaglutinación estándar (SAE), Fijación del Complemento (FC), Aglutinación en placa con antígeno teñido con Rosa Bengala (RB) y la Prueba de Rivanol (Riv). Para el caso de leche, el más utilizado es la Prueba de anillo en leche o Ring test (RT). Últimamente se han incorporado los métodos de inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA (Del Inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), tanto para evidenciar la presencia de anticuerpos en suero sanguíneo como en leche (7). Los métodos directos como aislamiento y cultivo bacteriano, la inmunohistoquímica, y técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Del Inglés Polymerase Chain Reaction) se emplean para identificar la infección; en el caso de la PCR se considera una herramienta diagnóstica muy práctica, por ser más segura y rápida que el aislamiento bacteriano, el cual implica mucho riesgo para quien lo ejecuta y también necesita mayor tiempo para la identificación de las bacterias (8).

Durante los últimos años la PCR toma un avance y desarrolla diferentes tipos como la
Rolando F. Wampash Paati

PCR múltiple convencional (Bruce-ladder), una ventaja importante es que se puede identificar y diferenciar de un solo paso todas las especies de *Brucella* y las cepas de vacunales en el mismo ensayo (9).

En la actualidad en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (F.CC.AA.) de la Universidad de Cuenca se está implementando un ensayo analítico para la detección de material genético de *B. abortus*, el cual permite diferenciar si este pertenece a una cepa de campo o de una de las cepas vacunales (S19 o RB51). El ensayo que se seleccionó para implementarse consiste en un PCR múltiple previamente descrito por Yazdi *et al.*, 2008 (10), el cual se aplicará a muestras de leche y tejidos de nódulos linfáticos de bovinos.

En el trabajo realizado por Yazdi *et al.*, 2008 (10) reportan la diferenciación entre *B. abortus* cepas vacunales (S19 y RB51) de las cepas de campo de *Brucella*, para lo cual utilizan dos pares de primers específicos de las cepas; para la detección de *B. abortus* RB51 fueron utilizado el primer par de primers diseñados por Vemulapalli *et al.*, 1999 (11): wbo1 5'- GCC AAC CAA CCC AAA TGC TCA CAA-3' y wbo3 5'-TTA AGC GCT GAT GCC ATT TCC TTC AC-3' , estos primers fueron diseñados para detectar el elemento IS711 que interrumpe al gen *wboA*, razón por la cual se amplificará un producto de 1290 pb (pares de bases, del Inglés, basepair), y 456 pb cuando se trata de cualquier otra cepa, ya sea de campo o la vacunal S19. Por otro lado, el segundo par de primers para la detección de *B. abortus* S19 fueron diseñados por Bricker y Halling, 1995 (12): eri1 5'- GCG CCG CGA AGA ACT TAT CAA- 3'and eri2 5'-CGC CAT GTT AGC GGC GGT GA- 3', este par de primers detecta una delección en los dos genes del operon *ery*, operon esencial para el catabolismo de eritritol (13), por lo tanto en el momento de la amplificación no se amplificara nada en el operon *ery* pero si se amplificara 456 pb, mientras que para las demás cepas se tendrá 178 pb aproximadamente ya que estas poseen completo el locus *ery*. Ciertas diferencias genéticas únicas que poseen las cepas RB51 y S19 hacen la PCR múltiple un método diagnóstico útil para identificar cepas de *B. abortus* vacunales y/o las de campo en muestras de bovinos.

Aunque en el estudio de Yazdi *et al.*, 2008 (10), se demuestra la especificidad analítica, es decir que es posible diferenciar las cepas vacunales de *B. abortus* de las cepas de campo mediante el ensayo de la PCR múltiple, sin embargo en éste no se realizó la estimación de la sensibilidad analítica, que nos diría el número menor de bacterias que se podrían detectar en muestras de tejido (UFC(Unidades Formadoras de Colonias)/g) y leche (UFC/ml). Por lo que se hace necesario estimar esta variable con los protocolos de extracción de ADN total que se emplearan para el caso de muestras de leche y para las



de tejido. Comentado lo anterior, en este proyecto se planteó implementar el ensayo de PCR múltiple de Yazdi *et al.*, 2008 (10) para estimar la sensibilidad analítica con muestras de leche y de tejidos de nódulos linfáticos de bovinos con el empleo de los protocolos de extracción de ADN total descritos por Romero y López-Goñi, 1999 (14) y Matrone *et al.*, 2009 (15), respectivamente.

La importancia de realizar este trabajo es para conocer la sensibilidad analítica del ensayo de PCR múltiple, radica en que conocer éste valor permite considerar la idoneidad del ensayo para su aplicación en el diagnóstico de la infección por *B. abortus*, empleando muestras de leche y tejidos de nódulos linfáticos de bovinos.

Adicionalmente, la implementación de éste ensayo de PCR múltiple como prueba diagnóstica que permite diferenciar cepas vacunales de las de campo, evitará que los falsos positivos que se identifican con algunas pruebas serológicas y que corresponden a animales vacunados con la cepa S19 sean eliminados de los hatos, sabiendo que tras la vacunación las dichas bacterias permanecen localizadas en los nódulos linfáticos por 10 a 12 semanas posteriores a su inoculación (16), y en la leche se pueden estar excretando hasta por 12 meses (17), esto último lo cual representa un riesgo para la salud humana al ser estas cepas vacunales patógenas para las personas.

El objetivo de este estudio fue estimar la sensibilidad analítica del ensayo de PCR múltiple previamente reportado por Yazdi *et al.*, 2008 (10) para su empleo en la identificación de cepas de campo de *Brucella abortus* y/o las cepas vacunales S19 y RB51 en muestras de leche y tejidos de nódulos linfáticos de bovinos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Brucelosis bovina

2.1.1. Definición

La brucelosis bovina es una enfermedad infecto-transmisible de origen bacteriano, también conocida como aborto infeccioso o enfermedad de Bang, afecta a bovinos de todas las edades, pero persiste con mayor frecuencia en animales sexualmente maduros; además, son susceptibles al agente causal otras especies como porcinos, ovinos, caprinos, equinos y búfalos; en ellas produce variados signos (1). La brucelosis es una enfermedad zoonótica distribuida en todo el mundo y caracterizada por abortos y reducción de fertilidad en vacas.

Es causada principalmente por biovariedades de *Brucella abortus*, con menor frecuencia por *B. melitensis*, y en raras ocasiones por *B. suis* (3). En el ganado bovino la brucelosis causa abortos, placentitis, orquitis, mastitis y muerte perinatal de terneros (4).

La brucella es capaz de vivir y multiplicarse dentro de las células de los tejidos del sistema retículo endotelial (5). Se trata de una enfermedad de curso crónico con graves repercusiones en la salud pública y animal, provoca grandes pérdidas económicas debido a que los animales infectados es recomendable el descarte y no es factible su tratamiento, además que implica las restricciones tanto en animales infectados como a sus productos (6).

2.1.2. Agente causal

En el ganado bovino, la brucelosis está causada principalmente por biovariedades de *B. abortus*, sin embargo en algunos países donde el ganado bovino se cría junto a ovejas o cabras, la infección también puede estar causada por *B. melitensis* (3), en ocasiones *B. suis* biovar 1 es causante de la brucelosis crónica en los bovinos (18).

2.1.3. Características

B. abortus, así como otros miembros del género *Brucella*, el cual pertenece a la subdivisión $\alpha 2$ de la clase Proteobacteria; es un patógeno intracelular facultativo que infecta a varios hospedadores mamíferos, principalmente a rumiantes. Las células bacterianas son pequeñas (0,4–3 μm), Gram-negativas, con una morfología cocobacilar y carentes de motilidad. *B. abortus* tiene 2 cromosomas circulares, que en conjunto suman un tamaño aproximado de 3.2 Mb (Megabase). De acuerdo a propiedades bioquímicas, fenotípicas y antigénicas que muestran las células bacterianas de *B. abortus*, se le ha dividido en 9 biovariedades o biotipos (19).

2.1.4. Biotipos

Se han reportado hasta ahora 9 biotipos para *B. abortus* (1-9), cinco biotipos (1-5) para *B. suis*, y 3 biotipos para *B. melitensis* (20).

2.1.5. Distribución geográfica

La brucelosis bovina está ampliamente distribuida en el mundo, pero la distribución de las diferentes especies y sus biotipos presenta variaciones geográficas. *B. abortus* es la más ampliamente difundida; *B. melitensis* y *B. suis* tienen una distribución irregular.

Cuadro 1. Distribución geográfica mundial de la brucelosis bovina.

Especie	Biotipo	País/Región endémico	País/Región libre
<i>B. abortus</i>	1-9	Todo el mundo. Principalmente en América central y del sur. África Asia Países de Medio oriente	Japón, Canadá, Norte y centro de Europa, Australia, Nueva Zelanda e Israel. En EE.UU. (excepto en fauna silvestre)
<i>B. melitensis</i>	1	América latina, Países de	No hay reportes
	2	Medio oriente, Mediterráneo	
	3	y Asia central	
<i>B. suis</i>	1-5	América Asia China y Europa	No hay reportes

Fuente: (21,22)

Las zonas de mayor prevalencia de la brucelosis bovina corresponden a la región del Mediterráneo, Asia occidental, algunas partes de África y América (Estados Unidos en fauna silvestre, México, Brasil, Perú, Colombia y Argentina). En el Ecuador en 1979, el Programa Nacional de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería (PNSA-MAG) realizó una encuesta serológica en la población bovina en todo el país, de las cuales las provincias de la Sierra y Costa se encontraron niveles de seroprevalencia que oscilan en un intervalo comprendido entre 1.3 y 10.6 % (23).

2.1.6. Transmisión

La transmisión se realiza principalmente a través de contacto directo entre animales y siendo las principales fuentes: la mucosa vaginal, aerosol con fluidos, tejidos asociados



con el nacimiento o aborto de fetos infectados con brucellas (19). La transmisión lateral sucede de aquellos animales que tienen contacto directo con materiales de abortos o tejidos de partos. Mientras que la transmisión vertical puede ocurrir cuando el ternero ingiere leche contaminada con brucellas (24).

2.1.7. Signos clínicos

2.1.7.1. Hembras

La enfermedad afecta los órganos reproductores y provoca abortos en el último tercio de la gestación, disminución de la producción láctea, alargamiento del periodo interparto e infertilidad permanente (5).

También se pueden observar por nacimientos de terneros débiles, mortinatos, se caracteriza principalmente por inducir problemas de placentitis, con la excreción de los microorganismos en las secreciones uterinas y la leche (25). Las vacas afectadas no gestantes pueden continuar su vida reproductiva normal, convirtiéndose en diseminadoras silenciosas de la enfermedad (1).

2.1.7.2. Machos

Cuando los machos son enteros y se infectan, la enfermedad se manifiesta con pérdida de la fertilidad debido a orquitis y epididimitis (26).

En ambos sexos en países tropicales, un signo común es la presencia de higromas, particularmente en las articulaciones de las patas y artritis después de infecciones prolongadas (27).

2.1.8. Importancia de la brucelosis bovina en salud pública

La brucelosis es considerada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como una de la zoonosis más común en el mundo (28).

En humanos, la brucelosis puede ser causada principalmente por *B. abortus*, seguida de *B. melitensis*, *B. suis* biotipos 1 al 4 y raramente por *B. canis*. Desde el punto de vista de la salud pública, la brucelosis es considerada como una enfermedad ocupacional que afecta principalmente a trabajadores agrícolas, trabajadores de los mataderos o camales, carniceros y veterinarios (29).

La infección en humanos y su prevalencia en una región dependen de varios factores, como los hábitos alimenticios, los métodos de procesamiento de la leche y los productos lácteos, las costumbres sociales, las prácticas ganaderas, las condiciones climáticas, el estatus socioeconómico y la higiene ambiental (30).

La transmisión normalmente se produce a través del contacto con animales infectados, por medio de materiales contaminados que contactan con la piel lacerada o con abrasiones, también por la inhalación de aerosoles o la ingestión de productos lácteos y alimenticios contaminados o no pasteurizados (31).

2.1.9. Control y erradicación

En forma general los programas de control y erradicación de la brucelosis bovina están basados en la vacunación de hembras pre-púberes, aplicación de pruebas serológica para el rastreo de animales seropositivos o reactivos, cuarentena de hatos infectados, y la eliminación de animales seropositivos/infectados. La vacunación del ganado es la herramienta fundamental para controlar o erradicar la brucelosis, previene la presentación de los signos clínicos de la enfermedad que favorecen la transmisión. Los programas de erradicación más eficaces combinan la aplicación de vacunación y pruebas serológicas (19). Para profilaxis que se aplica en las hembras de reemplazo, se puede emplear una de las dos cepas vacunales de *B. abortus*, la cepa S19 y la RB51.

2.1.9.1. Vacuna S19

La cepa vacunal *B. abortus* S19 fue la principal vacuna utilizada para vacunación a bovinos en Estados Unidos hasta 1996. Derivado de un aislamiento virulento de *B. abortus*, S19 es una cepa lisa que expresa la cadena lateral O en su lipopolisacárido. La cadena lateral O de *B. abortus* S19 induce respuestas serológicas que interfiere en algunas de las pruebas serológicas de tamizado y vigilancia seroepidemiológica de la brucelosis bovina, lo que impide que no se pueda diferenciar la respuestas de anticuerpos provocados por la infección con cepas de campo de *B. abortus* de la inducida por la vacunación (19).

2.1.9.2. Vacuna RB51

B. abortus RB51 es una cepa rugosa, resistente a Rifampicina, que ha sido derivado de la cepa virulenta *B. abortus* 2308 (32). Esta cepa es utilizada desde 1996 en la prevención de la brucelosis en Estados Unidos y en otros países, como Chile. Se le administra en dosis que van entre 1×10^{10} y 4×10^{10} Unidades formadoras de colonias (UFC) por ml (mililitro) en bovinos no menores a 4 meses de edad (26, 27).

La ventaja de esta vacuna permite diferenciar entre bovinos vacunados y aquellos infectados con cepas de campo o silvestres, debido a que no induce anticuerpos contra la cadena O del lipopolisacárido (35).

Sin embargo, se ha determinado que puede causar placentitis, endometritis e infección fetal en vaquillas adultas que han sido vacunadas durante la preñez (33).

2.1.10. Diagnóstico

El desarrollo de una prueba diagnóstica definitiva para la brucelosis bovina sigue siendo un objetivo difícil de alcanzar. Es así que el desarrollo de la primera prueba serología para la brucelosis se realizó hace más de un siglo, y desde entonces se ha perseguido tener una prueba diagnóstica con alta sensibilidad y especificidad para esta enfermedad. Las pruebas serológicas son relativamente fáciles de realizar y proporcionan una ventaja en la detección de la prevalencia de la infección por *Brucella spp* (31). Pero el diagnóstico inequívoco de una infección solo puede realizarse mediante el aislamiento y la identificación de brucelas en las muestras biológicas de los animales en estudio. Normalmente se necesita una combinación de métodos serológicos, bacteriológicos y/o moleculares para incrementar la certeza del diagnóstico (3).

2.1.10.1. Métodos indirectos

Actualmente están disponibles varios métodos serológicos para el diagnóstico de la brucelosis bovina, estas pruebas pueden ser clasificados como como pruebas o tests de tamizaje (ejemplo: Aglutinación en placa con antígeno tamponado o BPA), pruebas de vigilancia epidemiológica (Ejemplo; Prueba de anillo en leche) y como pruebas confirmatorias (2-mercaptoetanol, Fijación del Complemento, ELISAs, y Ensayo de polarización de la fluorescencia) (8).

De éstos, los más utilizados en suero sanguíneo son Seroaglutinación estándar, Fijación del Complemento, Aglutinación con antígeno teñido con Rosa de Bengala y la prueba de Rivanol. En leche, el más utilizado es la Prueba del anillo en leche (7). En Ecuador para el diagnóstico de brucelosis bovina el “Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina” plantea: a) Realizar pruebas de tamizaje; Prueba de anillo en leche y Rosa de bengala en suero sanguíneo, y como prueba confirmatoria el ELISA competitivo (ELISAc) y otras pruebas autorizadas por la OIE (23).

Tras la realización de Prueba de anillo en leche por su propiedad presenta resultados variables dependiendo del número de animales que aportan leche a la muestra, se basa en la aglutinación de anticuerpos secretados en la leche (8), es importante destacar que los resultados falsos positivos es proporcional al número de vacas y presencia de leche de vacas con mastitis o de calostro en la muestra, razón por la cual la OIE no recomienda su aplicación en predios pequeños o cuando la muestra provenga de más de 100 vacas (36). Por otro lado, la prueba de RB para la identificación de la presencia de anticuerpos anti-brucella suero sanguíneo tiene limitaciones debido a anticuerpos aglutinantes resultantes de la vacunación con la cepa S19 de *B. abortus* y algunos anticuerpos que producen reacciones cruzadas son detectados por esta prueba, generándose falsos

positivos, por lo que es necesario utilizar otras pruebas para confirmar o descartar a los animales reactivos o infectados (37).

El principal inconveniente de estos ensayos indirectos, es que no siempre son específicos, pueden presentar reacciones cruzadas con otras bacterias Gram-negativas como: *Escherichia coli*, *Pasteurella spp.*, *Haemophilus*, *Yersinia enterocolitica O:9*, *Francisella spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter*. Las reacciones cruzadas se deben a la similitud que existe entre LPSO de estas bacterias y el de *Brucella*, lo cual constituyen un importante objeto de estudio, particularmente por que provocan serias interferencias en el diagnóstico que favorecen el descarte de animales falsos positivos (38).

2.1.10.2. Métodos directos

Permiten la detección de las partículas de los agentes y/o sus componentes, como ácidos nucleicos, proteínas estructurales o no estructurales, enzimas, etc. (39). Se basan en evidenciar la presencia de la bacteria o de sus componentes en los tejidos de los animales.

Para el caso de la brucelosis bovina el diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de la bacteria causante, a partir de diversas muestras clínicas.

Otro de los métodos permiten identificar la presencia de componentes (antígenos/ácidos nucleicos) de las brucellas en distintos tejidos, como el ELISA, Inmunofluorescencia directa, Hemaglutinación reversa, la PCR y LAMP (40).

2.1.10.3. Pruebas moleculares en el diagnóstico de brucelosis

Los métodos basados en ensayos de PCR son más rápidos y más sensibles que los métodos tradicionales utilizados en el diagnóstico de brucelosis bovina. Estos ensayos identifican fragmentos de ácidos nucleicos de las bacterias, resultando así más útil y práctico. Tan pronto como 10 días después de la inoculación, el ensayo PCR puede detectar brucella y por lo tanto ayuda en el diagnóstico precoz y control de la brucelosis bovina (41).

El método de la PCR; la sensibilidad diagnóstica es muy alta, porque se producen varios millones de copias de la diana seleccionada. La especificidad de la reacción puede ser también muy alta, ya que está determinada por las secuencias específicas de nucleótidos de la diana seleccionada, así como por el diseño del cebador o primer. De acuerdo al tipo de PCR que se emplea; ejemplo la "PCR convencional", la sensibilidad analítica es relativamente alta, con un número mínimo de 100 a 1000 copias del genoma diana detectables y la especificidad analítica puede ser alta, dependiendo de la selección de la diana, del cebador designado, y de la optimización de la prueba. Pero dicha sensibilidad y



especificidad analíticas se pueden mejorar mediante la aplicación de la “PCR anidada” (42). Por lo que estas pruebas tienen una aplicación muy importante en la identificación de la infección por *B. abortus* en los bovinos.

Estas técnicas moleculares como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y del polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP) son necesarios para diferenciar especies y cepas dentro del género *Brucella* (43). El denominado PCR AMOS, es un ensayo PCR específica para diferenciar especies de *Brucella* esta prueba consta de cinco oligonucleotidos que identifican tres biovariedades (1,2 y 4) de *B. abortus*, todas las biovariedades de *B. melitensis* y *B. ovis* y un biovar de *B. suis* (12)

La PCR es una buena herramienta complementaria en una situación de brote, si se dispone de un ensayo que pueda diferenciar las cepas vacunales y de campo con una alta sensibilidad analítica (44). Además la PCR es una herramienta confiable para la detección de *Brucella* en varios matrices incluyendo cultivo puro (45), en sangre y leche de bovinos (46), en queso (47), órganos de bovinos naturalmente infectados (48) y varios otros materiales clínicos.

Otra de las técnicas moleculares es la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP) que se caracteriza por su simplicidad porque todo el proceso de amplificación y detección se realiza en una única etapa en la que los componentes de reacción se someten a condiciones isotérmicas (49) esta técnica requiere equipos menos sofisticados en comparación con la PCR por lo tanto LAMP es accesible en países en desarrollo (50).

III. HIPÓTESIS O PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la cantidad mínima de células de *Brucella abortus* que pueden ser detectadas en un ensayo de PCR múltiple, previamente reportado por Yazdi *et al.*, 2008 (10), el cual permite diferenciar las cepas de campo de las cepas vacunales S19 y RB51?

Para el desarrollo de la esta pregunta de investigación se planteó los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Estimar la sensibilidad analítica del ensayo de PCR múltiple previamente reportado por Yazdi *et al.*, 2008 (10) para su empleo en la identificación de cepas de campo de *Brucella abortus* y/o las cepas vacunales S19 y RB51 en muestras de leche y tejidos de nódulos linfáticos de bovinos.

Objetivos específicos:

Implementar el ensayo de PCR múltiple previamente usado por Yazdi *et al* 2008 (10) en la identificación de cepas de campo de *Brucella abortus* y/o las cepas vacunales S19 y RB51, para su aplicación en muestras de leche y tejidos de nódulos linfáticos de bovinos.

Estimar la sensibilidad analítica del ensayo de PCR múltiple en muestras bovinas de leche y tejidos de nódulos linfáticos inoculados *in vitro* con las cepas vacunales S19 y RB51.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Se describen los materiales y métodos empleados para el cumplimiento del proyecto planteado.

4.1. Colecta, conservación, transporte y almacenado de las muestras biológicas (leche/tejidos). (Actividad experimental 1).

4.1.1. Materiales:

A. Biológicos:

Se colectaron aproximadamente 10 ml de leche de cada cuarto, se obtuvieron de tres vacas que estaban en producción siendo en total 120 ml de leche, de la granja Irquis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

Se colectaron dos nódulos linfáticos (pre-escapular y supramamario) por cada animal faenado, en total de dos animales faenados entre hembra y macho, del camal municipal de Cuenca.

B. Reactivos/soluciones

Solución de conservación (Solución Etanol al 80 %, Buffer TE 10:1 100X, Glicerol 2.5 % (Sigma, Cat. No.: G5516).

Buffer TE 10:1 100X (Solución de 10 mM de Tris-HCl (Sigma, Cat. No.: T4661), pH 8.0 y 100 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS).

C. Equipos y otros materiales:

Guantes de nitrilo

Frascos estériles de 100 ml

Tobos Falcón de 15 ml

Fundas plásticas estériles

Bolsas de basura

Cooler o termo congelador

Marcador resistente al agua y alcohol

Equipo de disección

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

Congelador – 80 °C

4.1.2. Métodos:

La obtención de muestra de leche se realizó en la granja Irquis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca; mientras que la obtención de tejido se realizó en el camal municipal de Cuenca.

Paso 1. Para las muestras de leche se preparó todo el material necesario y para el caso de las muestras de tejido se preparó la solución de conservación en tubos Falcón.

Paso 2. Colección de las muestras de leche: antes de la colecta se procedió a la asepsia de la glándula mamaria, limpiando la ubre de la vaca con agua; se utilizó guantes y se colectó aproximadamente 10 ml de cada cuarto en un frasco estéril y se rotuló el mismo.

Colección de las muestras de tejidos: se tomaron muestras *post-mortem* de bovinos faenados en el camal municipal de Cuenca, se procedió a la asepsia, utilizando guantes, lavando con agua el área donde se encuentran los nódulos linfáticos. Se tomó 1 nódulo linfático pre-escapular, que se encuentra en el borde anterior del supraespinoso aproximadamente 10 cm delante de la articulación del hombro y también se tomó 1 nódulo linfático supramamario, que se encuentra en la parte superoposterior de la glándula mamaria, luego se diseccionó aproximadamente un cuarto de cada nódulo linfático y se colocó en los tubos Falcón previa rotulación.

Paso 3. Transporte de las muestras: luego de la colección de muestras, tanto para las muestras de leche como las de tejidos, se transportó en un termo.

Paso 4. Una vez en el laboratorio, las muestras de leche se hicieron alícuotas de 2 ml. Y para las muestras de tejido, se tomó aproximadamente de 1 g. de cada uno de los nódulos linfáticos (pre-escapular y supramamario) y se colocó en tubos Falcón que estaban con la solución de conservación.

Paso 5. Las muestras de leche fueron conservadas bajo congelación a - 80 °C y las de tejido se conservaron a temperatura ambiente, en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de CC.AA. de la Universidad de Cuenca hasta su análisis.

4.2. Dilución de las cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51 e inoculación en las muestras biológicas (leche/tejidos). (Actividad experimental 2).

4.2.1. Materiales:

A. Biológicos:

Alícuotas de 2 ml de leche

Alícuotas de 1 g. de tejidos de nódulos linfáticos

Cepas vacunales; S19 de la marca antibang CEPA S19 y RB51 de la marca *BRUCELLA ABORTUS* RB-51[®], con registro 4A-5295-AGROCALIDAD, cada una en frasco de 5 dosis.

B. Reactivos/soluciones:

Buffer TE 10:1, 1X (Solución de 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM de EDTA). La solución se almacena en frasco de vidrio con tapa rosca a temperatura ambiente y protegida de la luz.

C. Equipos y otros materiales:

Guantes de nitrilo

Tubos Falcón de 15 ml

Tubos Eppendorf de 2 ml y 1.5 ml

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

Agitador (Vortex)

Cabina de bioseguridad

Bolsas de basura

Congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.2.2. Métodos:

Paso 1. Primero, se realizó la resuspensión de las cepas vacunales S19 y RB51 de *B. abortus*:

De acuerdo a lo indicado en el empaque, el contenido de la cepa S19 fue de $15\text{-}30 \times 10^9$ UFC/2 ml (dosis), es decir $7.5\text{-}15 \times 10^9$ UFC/ml y en promedio 11.25×10^9 UFC/ml.

Se tomó 1 ml de la cepa vacunal S19 (11.25×10^9 UFC/ml) y se inoculó en 10.25 ml buffer TE 10:1, 1X, para tener una concentración final de 1×10^9 UFC/ml.

De esta solución se tomó 0.1 ml (1×10^9 UFC) y se inoculó en 9.99 ml de buffer TE 10:1, 1X, para tener una concentración final de 1×10^7 UFC/ml (solución stock).

El contenido indicado en el empaque de la cepa vacunal RB51 fue $10\text{-}34 \times 10^9$ UFC/2 ml (dosis), es decir $5\text{-}17 \times 10^9$ UFC/ml y en promedio 11×10^9 UFC/ml.

Se tomó 1 ml de la cepa vacunal RB51 (11×10^9 UFC/ml) y se inoculó en 10 ml de buffer TE 10:1, 1X, para tener una concentración final de 1×10^9 UFC/ml.

De esta solución se tomó 0.1 ml (1×10^9 UFC/ml) y se inoculó en 9.99 ml de buffer TE 10:1, 1X, para tener una concentración final de 1×10^7 UFC/ml (solución stock).

Paso 2. Preparación de leche antes de la inoculación; se descongeló las alícuotas de 2 ml de leche y se centrifugó, luego se colectó 450 μ l de leche junto a la capa grasa para su posterior inoculación. Se tomó 50 μ l de solución stock (1×10^7 UFC) y se inoculó en 450 μ l de buffer TE 10:1, 1X y a partir de esta se hicieron 5 diluciones seriadas en base diez. Para la dilución más concentrada (1×10^6 UFC/ml) se tomó 50 μ l de solución stock (1×10^7 UFC) y se inoculó en 450 μ l de leche junto a la capa grasa y para las 6 diluciones restantes, de cada una de las diluciones de buffer TE 10:1, 1X se tomó 50 μ l y se inoculó en 450 μ l de leche junto a la capa grasa correspondiente a cada número del tubo.

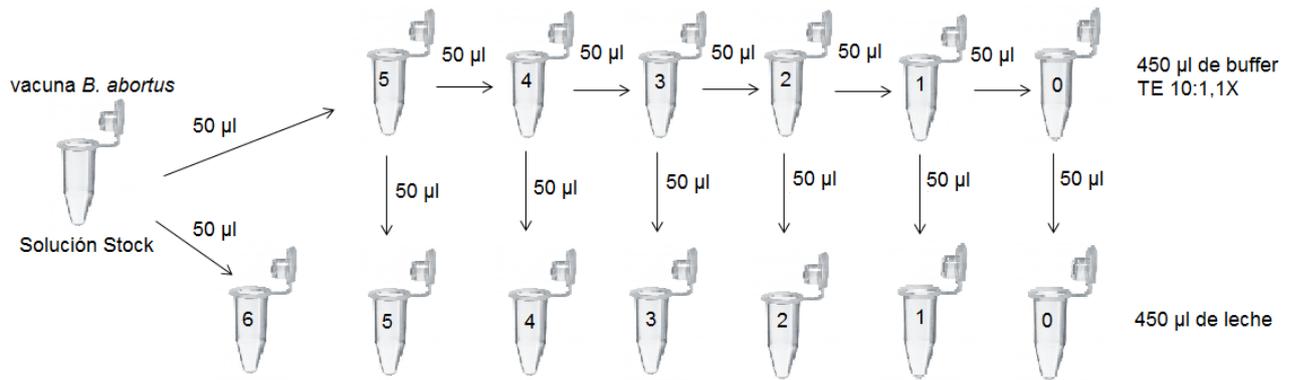


Figura 01. Procedimiento de la dilución e inoculación de la cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51 en leche.

Paso 3. Preparación de muestras de nódulos linfáticos; se tomaron porciones de aproximadamente 1 g. que estaban en solución de conservación, de esta se hicieron fracciones ± de 25 mg para su posterior inoculación. Se tomó 25 µl de solución stock (1×10^7 UFC/ml) y se inoculo en 450 µl de buffer TE 10:1,1X y a partir de esta se hicieron 5 diluciones seriadas en base diez en 450 µl de buffer TE 10:1,1X, finalmente para la dilución más concentrada (1×10^7 UFC/ml) se tomó 25 µl solución stock (1×10^7 UFC) y se inoculo en 25 mg de tejido y para las 6 diluciones restantes, de cada una de las diluciones de buffer TE 10:1,1X se tomó 25 µl y se inoculo en 25 mg de tejido aproximadamente correspondiente a cada número del tubo.

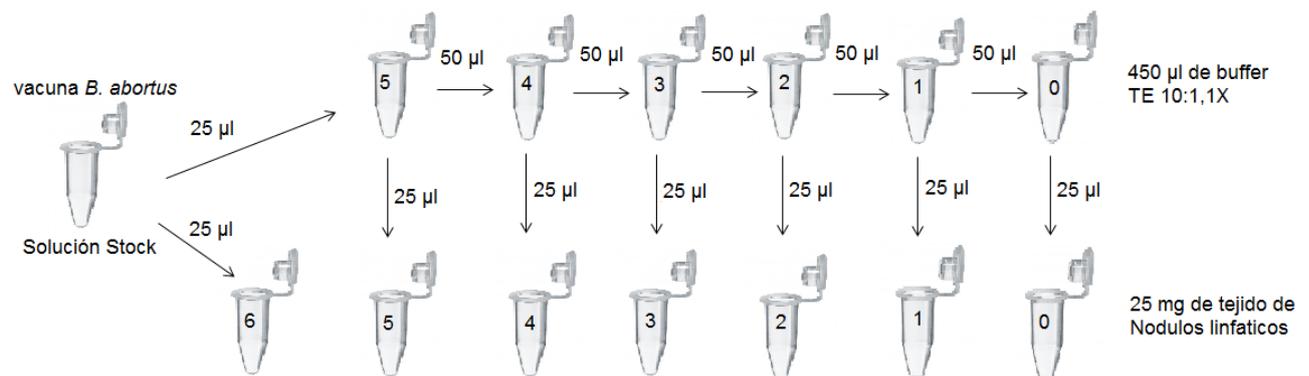


Figura 02. Procedimiento de la dilución e inoculación de la cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51 en nódulos linfáticos.

Todas las muestras anterior a inocular tanto de leche como de tejido fueron realizadas un PCR para conocer que estaban libres de *B. abortus*.

Las diluciones correspondientes fueron:

Tabla 01. Concentraciones de las cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51 en leche y nódulos linfáticos.

Nº tubo	Dilución en muestras de leche	Dilución en muestras de tejido
6	1 x 10 ⁶ UFC/ml de leche	1 x 10 ⁷ UFC/g de tejido
5	1 x 10 ⁵ UFC/ml de leche	1 x 10 ⁶ UFC/g de tejido
4	1 x 10 ⁴ UFC/ml de leche	1 x 10 ⁵ UFC/g de tejido
3	1 x 10 ³ UFC/ml de leche	1 x 10 ⁴ UFC/g de tejido
2	1 x 10 ² UFC/ml de leche	1 x 10 ³ UFC/g de tejido
1	1 x 10 ¹ UFC/ml de leche	1 x 10 ² UFC/g de tejido
0	1 x 10 ⁰ UFC/ml de leche	1 x 10 ¹ UFC/g de tejido

Paso 4. Se repitieron dos veces el paso 2 y 3, es decir se realizó tres repeticiones para cada una de las cepas tanto en muestras de leche como en tejidos. Por lo tanto se hicieron 42 alícuotas de las muestras de leche de 0.450 ml a las que se inocularon las cepas vacunales por separado, y 42 muestras de tejidos de nódulos linfáticos aprox. de 25 mg y se inocularon las dos cepas vacunales por separado.

Las tres repeticiones de inoculación realizadas en las muestras biológicas (leche y tejido) fueron con el objetivo de que sean muestras independientes para su respectivo análisis.

4.3. Procesamiento de las muestras biológicas inoculadas: extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) total de *B. abortus*. (Actividad experimental 3).

4.3.1. Materiales:

A. Biológicos:

Alícuotas de leche inoculada con las diluciones de las cepas vacunales de *B. abortus* RB51 y S19.

Alícuotas de tejidos de nódulos linfáticos inoculada con cepas vacunales de *B. abortus* RB51 y S19.

B. Reactivos/soluciones:

Extracción de ADN Total (leche)

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

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

Proteinasa K (Solución con 5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, Cat. No: P2308) en 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM de EDTA y 50 % de Glicerol). La solución ya preparada se hizo alícuotas de 50 µl y se almacenaron a – 20 °C, protegidas de la luz.

Solución 5 M de NaCl (Solución con 292.2 g. de NaCl (Sigma, Cat. No: S3014) y c.b.p. 1 litro de agua destilada).

Solución CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma, Cat. No: 52365)).

Fenol/Cloformo/A. Isoamílico 25/24/1 (Sigma, Cat. No: 77619). La solución se almacenó en refrigeración y protegido de la luz.

Etanol al 100 % (absoluto) (Sigma, Cat. No: E7023). Almacenada en refrigeración y protegido de la luz.

Etanol al 70 %. (Solución al 70 % de Etanol en agua grado biología molecular). Almacenada en refrigeración y protegido de la luz.

Buffer TE 10:1. 1x. (Solución de 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM de EDTA).

Extracción de ADN Total (tejidos).

Solución de conservación (Solución de Etanol al 80 %, Buffer TE 10:1 100X y Glicerol 2.5 %). Conservada a temperatura ambiente.

Solución H₂O destilada Conservada a temperatura ambiente.

Buffer de lisis 2X (Solución con 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM de EDTA pH 8.0, 100 mM de NaCl y 2 % de SDS. La solución ya preparada se almacenó a temperatura ambiente protegida de la luz solar directa.

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

ARNasa (Solución 20 ug/ul de ARNasa).

Fenol/Cloformo/A. Isoamílico 25/24/1

Etanol al 85 % (absoluto). Conservada en refrigeración.

Etanol al 70 % (Solución al 70 % de Etanol en agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502). Conservada en refrigeración.

Buffer TE 10:1. 1x. (Solución de 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM de EDTA). Conservada a temperatura ambiente.

C. Equipos y otros materiales:

Guantes de nitrilo

Tubos Eppendorf de 2 y 1.5 ml.

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

Baño María

Vortex

Centrifuga

Cabina de seguridad biológica.

4.3.2. Métodos:

Extracción del ADN Total de leche según Romero y López-Goñi, 1999 (14), con algunas modificaciones.

Paso 1. Se descongelo las muestras de leche anteriormente almacenadas (alícuotas de 2 ml). Y centrifugar a 12000 x *g* por 10 min.

Paso 2. Se tomó 450 μ l del sobrenadante incluido la fase grasa de las muestras de leche y se colocó en un tubo nuevo Eppendorf de 2 ml. Aquí en este paso se realizó la inoculación de las diluciones correspondientes.

Paso 3. Se adiciono 100 μ l del Buffer NET (50 mM de NaCl, 125 de EDTA, 50 mM de Tris-HCl, pH 7.6) y más 100 μ l de una solución de SDS al 24 % y se incubo a 80 °C por 10 min.

Paso 4. Posteriormente se adiciono 48.75 μ l de Proteinasa K hasta tener una concentración final de 325 μ g/ml, se mezcló en vortex y se incubo por 2 h a 50 °C.

Paso 5. Precipitar los detritus, se adiciono 125 μ l de una solución 5 M de NaCl y 100 μ l de una solución de CTAB/NaCl 10 % 0.7 M, se mezcló en vortex y se incubo por 10 min a 65° C, y se centrifugo a 12000 x *g* por 10 min a 4 °C.

Paso 6. Luego se colecto 500 μ l del sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo Eppendorf de 2 ml, y se adiciono un volumen igual de Fenol/Cloformo/A. Isoamílico 25/24/1, se mezcló en vortex, y se centrifugo a 12000 x *g* por 10 min a 4 °C.

Paso 7. Se colecto 400 μ l del sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo Eppendorf de 1.5 ml, y se adiciono 2.5 volúmenes de Etanol absoluto, se mezcló por inversión y se centrifugo a 12000 x *g* por 10 min a 4 °C para formar la pastilla de ADN total.

Paso 8. Se eliminó el Etanol absoluto y se adiciono 500 μ l de Etanol al 70 %, se lavó la pastilla de ADN invirtiendo el tubo varias veces y se centrifugo a 12000 x *g* por 10 min a 4 °C.

Paso 9. Se eliminó completamente la solución Etanol al 70 % y se secó la pastilla a temperatura ambiente protegida de la luz y el polvo.

Paso 10. Finalmente se resuspendio la pastilla de ADN en 50 μ l buffer TE 10:1. 1 X.

Extracción del ADN Total de tejidos, protocolo Lisis con Proteinasa K (PK) y Fenol / Cloroformo según Matrone *et al.*, 2009 (15), con algunas modificaciones.

Paso 1. Se descongelo las muestras de tejido de nódulos linfáticos anteriormente almacenadas.

Paso 2. Se cortó 1 g. de tejido y se colocó en un tubo Falcón de 10 ml.

Paso 3. Al tubo se añadió solución de conservación hasta los 9 ml y se dejó reposar a temperatura ambiente toda la noche.



Paso 4. Se desechó el alcohol del tubo Falcón y se dividió en 5 porciones iguales (25 mg), de estas solo una porción se colocó en un tubo Eppendorf de 2 ml.

Paso 5. Se dejó evaporar el alcohol a temperatura ambiente por 2 horas. Aquí en este paso se realizó la inoculación de las diluciones correspondientes.

Paso 6. Se añadió al tubo Eppendorf: 200 µl de H₂O destilada, 200 µl de buffer de lisis 2X, 50 µl de Proteinasa K y 2.5 µl de ARNasa.

Paso 7. Se mezcló en vortex y se incubo a baño maria a 56 °C durante toda la noche.

Paso 8. Se retiró del baño maria y se mezclo en vortex de 20 a 30 segundos.

Paso 9. Se añadió 500 µl de solución Fenol/Cloroformo/A. Isoamilico 25:24:1, se agito en vortex de 20 a 30 segundos y se centrifugo a 12000 x g por 10 minutos.

Paso 10. Se colecto 400 µl del sobrenadante y se colocó en un tubo Eppendor nuevo de 2 ml.

Paso 11. Se adiciono al sobrenadante colectado 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se homogenizo por inversión, luego se centrifugo a 12000 x g por 10 minutos para formar la pastilla de ADN.

Paso 12. Se eliminó el etanol absoluto y se añadió 500 µl de solución etano al 70 %.

Paso 13. Se lavó la pastilla invirtiendo el tubo varias veces y se centrifugo a 12000 x g por 10 minutos.

Paso 14. Se eliminó completamente la solución etanol al 70 %.

Paso 15. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente protegida de la luz y el polvo.

Paso 16. Finalmente se resuspendio la pastilla de ADN en 50 µl buffer TE 10:1. 1 X.

Paso 17. Se mantuvo las muestras de ADN tanto de leche como de tejido a - 80 °C para luego emplear 2 µl de cada una de las muestras de ADN total en los ensayos de amplificación y detección del material genético de *B. abortus*.

4.4. Amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) total de bovino de las muestras de leche y tejido mediante un ensayo PCR (Control de proceso) y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental 4).

4.4.1. Materiales:

A. Biológicos

Muestras de ácido desoxirribonucleico (ADN) total, extraído de las muestras de leche y de tejido de nódulos linfáticos de bovinos inoculados con cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51.

B. Reactivos y soluciones:

Agua grado biología molecular. Se prepararon alícuotas de 1 ml y se almacenaron a temperatura ambiente protegidas de la luz y el polvo.

Buffer de amplificación 10X. Se prepararon alícuotas 0.5 ml y se almacenaron a - 20 °C.

Solución de dNTP's 10 mM. (dNTP's set, Thermo- scientific, Cat. No.: R0182). Se prepararon alícuotas y se almacenaron a - 20 °C.

Solución a 50 mM de MgCl₂. Se prepararon alícuotas 0.5 ml y se almacenaron a - 20 °C.

Solución de oligonucleótidos o primers 100 μM. (Invitrogen, Cat. No.: 10336022). Par de oligonucleótidos específicos para el control de proceso (12SFV-Mod: TAA ATC TCG TGC CAG CCA, 12SREV-Mod: AGT ATG CTT ACC TTG TTA CGA C) (51). Se resuspendieron en agua grado biología molecular para tener una concentración final de 100 μM y se prepararon alícuotas que se almacenaron a - 20 °C.

Enzima Taq ADN polimerasa. (Invitrogen, Cat. No.: 10966-033).

Solución muestras de ADN total: Muestras de ADN total resuspendida en 50 μl de buffer TE 10:1. 1 X, obtenido de las muestras de leche y tejido de nódulos linfáticos inoculados con cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51. Las alícuotas se mantuvieron almacenadas a - 20 °C.

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

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

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

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

Marcador de peso molecular para ADN (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

C. Equipos y otros materiales:

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

Agitador (Vortex).

Centrifuga.

Cabina de PCR.

Termociclador (Eppendorf Modelo: Nexus GSX1).

Congelador a - 20 °C.

Fuente de poder.

Cámara de electroforesis.

Balanza analítica (Calibrada).

Horno de microondas.

Transluminador UV.

Fotodocumentador UV (BioRad Modelo: Gel Doc XR+).

Probeta de 100 ml.

4.4.2. Métodos:

Paso 1. Se descongelaron los reactivos: Agua grado biología molecular, Buffer de amplificación 10X, Solución de dNTPs 10 mM, Solución de MgCl₂, Solución de oligonucleótidos y las Soluciones de las muestras de ADN total, pero a excepción de la enzima *Taq* ADN polimerasa.

Paso 2. Se preparó una premezcla con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (sabiendo que por reacción 25 µl volumen final). Los cálculos fueron los siguientes:

Tabla 02. Mezcla de reacción en el control de proceso.

Reactivo	Concentración		Volumen	
	Inicial	Final	Por reacción	Premezcla *
H₂O biología molecular	No aplica	No aplica	18.65 µl	18.65 µl x n
Solución buffer de amplificación 10X	10X	1X	2.5 µl	2.5 µl x n
Solución de dNTPs 10mM	10 mM	0.1 mM	0.25 µl	0.25 µl x n
Solución de MgCl₂	50 mM	2.0 mM	1.0 µl	1.0 µl x n
Oligonucleótido 12SFW	100 µM	0.8 µM	0.2 µl	0.2 µl x n
Oligonucleótido 12SREV	100 µM	0.8 µM	0.2 µl	0.2 µl x n
Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa	5 U/µl	0.04 U/µl	0.2 µl	0.2 µl x n
Muestra de ADN total	-----µg/µl	-----µg/µl	2.0 µl	2.0 µl x n
Volumen final	-----	-----	25 µl	25 µl x n

* n= número de muestras

Paso 3. La premezcla ya preparada se mezcló en vortex durante 5 a 10 segundos.

Paso 4. Se identificó los tubos PCR (200 µl) y a cada tubo se agregó 23 µl de la premezcla. Luego en el mismo orden a cada tubo se añadió 2 µl de la muestra de ADN total correspondiente.

Paso 5. Los tubos PCR se colocaron al termociclador y fueron sometidas con el siguiente perfil de temperatura de amplificación para generar productos de PCR del control de proceso.

Tabla 03. Perfil de temperaturas de amplificación en el control de proceso.



Paso:	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Extensión final	Almacenamiento
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
Temperatura (°C):	94	94	60	72	72	4
Tiempo (min:seg):	05:00	00:45	00:30	00:45	05:00	8

Paso 6. Terminada el proceso de amplificación, se almaceno en el mismo termociclador en refrigeración hasta la preparación del gel de agarosa.

Paso 7. Para la preparación del gel de agarosa al 1.2 %, se adiciono 0.36 g. de agarosa por cada 30 ml de buffer TAE 1X en un vaso de precipitación. Se agito la mezcla con movimientos continuos de rotación hasta la ebullición de la mezcla por 5 minutos o más y conseguir una correcta homogenización. Se dejó enfriar la solución de agarosa.

Paso 8. Antes de que se gelifique se adiciono 1.0 µl de bromuro de etidio por cada 30 ml de la solución, se mezcló y se dispersó la solución agarosa en la bandeja o molde para gel. Luego se colocó el respectivo peine y se dejó gelificar aproximadamente por 20 min.

Paso 9. Se introdujo la bandeja de gel con la agarosa ya gelificada en el equipo de electroforesis. Se cubrió el gel con buffer TAE 1X y se retiró el peine, formado ya los pocillos en el gel.

Paso 10. Antes de cargar los pocillos del gel, previo de retirar las muestras del termociclador, a cada tubo PCR se le adiciono 5 µl de la solución buffer de carga para ADN 6X y se mezclaron con la micropipeta.

De cada una de estas reacciones, se tomó 10 µl y fueron cargados en los respectivos pocillos del gel de agarosa. Luego al final de la hilera en uno de los pocillos se cargó 6 µl del marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

Paso 11. Luego la cámara de electroforesis fue conectada a la fuente de poder a 90 Voltios por 30 min aproximadamente.

Paso 12. Para visualizar los productos de los PCR, el gel fue llevado al fotodocumentador, se tomó y se guardó la foto para su análisis.

Paso 13. Se consideró muestra válida aquella en la que se logró amplificar el fragmento del control de proceso. En este caso mostró un producto de PCR de un tamaño de 600 bp.

4.5. Amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) de *B. abortus* mediante el ensayo PCR y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental 5).

4.5.1. Materiales:

A. Biológicos

Muestras de ácido desoxirribonucleico (ADN) total, extraído de las muestras de leche y de tejido de nódulos linfáticos de bovinos inoculados con cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51.

B. Reactivos y/o soluciones:

Agua grado biología molecular. Se prepararon alícuotas de 1 ml y se almacenaron a temperatura ambiente protegidas de la luz y el polvo.

Buffer Pfx de amplificación 10X. (Invitrogen, Cat. No.: 11708-039).

Solución Enhancer 10X. (Invitrogen, Cat. No.: 11708-039).

Solución a 50 mM de MgSO₄. (Invitrogen, Cat. No.: 11708-039).

Solución de dNTP's 10 mM. (dNTP's set, Thermo scientific, Cat. No.: R0182). Se prepararon alícuotas de 50 µl y se almacenaron a -20 °C.

Solución de oligonucleótidos o primers 100 µM. (Invitrogen, Cat. No.: 10336022). El primer par de oligonucleótidos específicos para la detección de *B. abortus* S19 (ERI1: 5'-GCG CCG CGA AGA ACT TAT CAA- 3' y ERI2: 5'-CGC CAT GTT AGC GGC GGT GA-3'). El segundo par de oligonucleótidos específicos para la detección de *B. abortus* RB51 (WBO1: 5'-GCC AAC CAA CCC AAA TGC TCA CAA-3' y WBO3: 5'-TTA AGC GCT GAT GCC ATT TCC TTC AC-3'). Se resuspendieron con agua grado biología molecular para tener una concentración final de 100 µM. Se hicieron alícuotas de 50 µl y se almacenaron a -20 °C.

Enzima Pfx ADN polimerasa. (Invitrogen, Cat. No.: 11708-039).

Solución muestras de ADN total: Muestras de ADN total resuspendida en 50 µl buffer TE 10:1. 1 X, obtenido de las muestras de leche y tejido de nódulos linfáticos inoculados cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51. Las alícuotas se mantuvieron almacenadas a -20 °C.

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

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

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

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

Marcador de peso molecular para ADN (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

C. Equipos y otros materiales:

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

Tubos de PCR

Guantes de nitrilo

Cabina de PCR

Vortex

Balanza analítica (Calibrada).

Termociclador (Eppendorf Modelo: Nexus GSX1)

Congelador a -20°C (para mantener las enzimas y otros reactivos).

Vaso de precipitación

Horno microondas

Cámara de electroforesis

Fuente de poder

Transiluminador UV

Fotodocumentador (BioRad Modelo: Gel Doc XR+).

4.5.2. Métodos:

Amplificación del producto de ADN de *Brucella abortus*, según Yazdi *et al.*, 2008 (10).

Paso 1. Se descongelaron los reactivos: Agua grado biología molecular, Buffer de amplificación 10X, Solución de dNTPs 10 mM, Solución de MgCl_2 , Solución de oligonucleótidos y las Soluciones de las muestras de ADN total, pero a excepción de la enzima *Pfx* ADN polimerasa.

Paso 2. Se preparó una premezcla con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (sabiendo que por reacción 25 μ l volumen final). Los cálculos fueron los siguientes:

Tabla 04. Mezcla de reacción en el PCR múltiple.

Reactivo	Concentración	Volumen
----------	---------------	---------

	Inicial	Final	Por reacción	Premezcla *
H ₂ O biología molecular	No aplica	No aplica	18.65 µl	18.65 µl x n
Solución Buffer Pfx de amplificación 10X	10X	1X	2.5 µl	2.5 µl x n
Solución Enhancer 10X	10X	1X	1.875 µl	1.875 µl X n
Solución de dNTP's 10mM	10 mM	0.1 mM	0.25 µl	0.25 µl x n
Solución de MgSO ₄	50 mM	2.0 mM	0.5 µl	0.5 µl x n
Oligonucleótido ERI1	100 µM	0.8 µM	0.2 µl	0.2 µl x n
Oligonucleótido ERI2	100 µM	0.8 µM	0.2 µl	0.2 µl x n
Oligonucleótido WBO1	100 µM	0.8 µM	0.2 µl	0.2 µl x n
Oligonucleótido WBO3	100 µM	0.8 µM	0.2 µl	0.2 µl x n
Enzima Pfx ADN polimerasa	2.5 U/µl	0.04 U/µl	0.2 µl	0.2 µl x n
Muestra de ADN total	-----µg/µl	-----µg/µl	2.0 µl	2.0 µl x n
Volumen final	-----	-----	25 µl	25 µl x n

* n= número de muestras

Paso 3. La premezcla ya preparada se mezcló en vortex durante 5 a 10 segundos.

Paso4. Se identificaron los tubos PCR (200 µl) y a cada tubo se agregó 23 µl de la premezcla. Luego en el mismo orden a cada tubo se añadió 2 µl de la muestra de ADN total correspondiente.

Paso 5. Las reacciones así preparadas en tubos PCR se colocaron al termociclador y fueron sometidas con el siguiente perfil de temperatura de amplificación para generar productos de PCR específicos de cepas vacunales *B. abortus*.

Tabla 05. Perfil de temperaturas de amplificación en el PCR múltiple.



Paso:	Desnaturalización inicial	40 ciclos			Extensión final	Almacenamiento
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
Temperatura (°C):	95	95	58	68	68	4
Tiempo (min:seg):	05:00	00:30	00:25	00:30	05:00	8

Paso 6. Terminada el proceso de amplificación, se almaceno en el mismo termociclador en refrigeración hasta la preparación del gel de agarosa.

Paso 7. Para la preparación del gel de agarosa al 1.2 %, se adiciono 1.08 g. de agarosa en 90 ml de buffer TAE 1X buffer en un vaso de precipitación. Se agito la mezcla con movimientos continuos de rotación hasta la ebullición de la mezcla por 5 minutos o más y conseguir una correcta homogenización. Se dejó enfriar la solución de agarosa.

Paso 8. Antes de que se gelifique se adiciono 3.0 µl de bromuro de etidio y se dispersó la solución agarosa en la bandeja o molde para gel. Luego se colocó el respectivo peine y se dejó gelificar aproximadamente por 20 min.

Paso 9. Se introdujo la bandeja de gel con la agarosa ya gelificada en el equipo de electroforesis. Se cubrió el gel con buffer TAE 1X y se retiró el peine, formado ya los pocillos en el gel.

Paso 10. Antes de cargar los pocillos del gel, previo de retirar las muestras del termociclador, a cada tubo PCR se le adiciono 5 µl de la solución buffer de carga para ADN 6X y se mezclaron con la micropipeta.

De cada una de estas reacciones, se tomó 10 µl y fueron cargados en los respectivos pocillos del gel de agarosa. Luego al final de la hilera en uno de los pocillos se cargó 6 µl del marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

Paso 11. La cámara de electroforesis fue conectada a la fuente de poder a 90 Voltios por 45 min aproximadamente.



Paso 12. Para visualizar los productos de los PCR, el gel fue llevado al fotodocumentador, se tomó y se guardó la foto para su análisis.

Paso 13. Se consideró muestra válida para el caso de la cepa vacunal S19 cuando se amplificó un producto de 456 bp, y para el caso de cepa vacunal RB51 cuando se amplificó un producto de 1290 bp.

V. RESULTADOS

Se describen los resultados obtenidos en las diferentes actividades experimentales realizadas.

5.1. Colecta de las muestras biológicas (leche/tejidos)

En el presente trabajo para conocer la sensibilidad analítica de un ensayo de PCR múltiple en la identificación de cepas vacunales de *B. abortus* en leche y nódulos linfáticos de bovinos, las muestras de leche se colecto de tres vacas en producción de la granja de Iruquis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca; mientras que la obtención de tejido se colecto de dos animales *post-mortem* faenados del camal municipal de Cuenca.

Las muestras colectadas se trasportaron en un termo congelador y fueron almacenadas en congelación a - 80 °C en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de CCAA de la Universidad de Cuenca hasta su procesamiento.

5.2. Detección del material genético de las muestras de leche y tejido del bovino (control de proceso).

Luego de aplicar el protocolo de extracción del ADN total en leche según Romero y López-Goñi, 1999 (14), con algunas modificaciones cuya muestras fueron inoculadas con las dos cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51 en siete diluciones y con tres repeticiones cada uno respectivamente, es decir se obtuvieron en total 42 muestras, se logró realizar el control de proceso correctamente como se describen en la **Tabla 06**, por lo que se las consideró muestras idóneos para la realización del siguiente PCR específicamente en la detección de las diluciones en diferentes concentraciones de cepas vacunales de *B. abortus* (**Figura 03**).

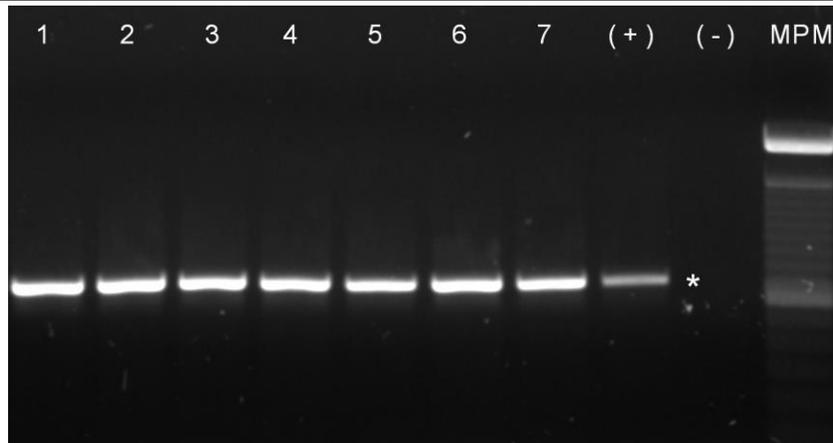


Figura 03. Electroforesis (gel de agarosa al 1.2 %) de los productos de PCR correspondientes al control de proceso de las siete diluciones en leche. Carriles 1-7: Productos de PCR; Carril 8: Control positivo; Carril 9: Control negativo y Carril 10: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder). * 720 pares de bases.

Sin embargo en tejido de nódulos linfáticos, luego de aplicar el protocolo de extracción de ADN total en tejido (según Matrone *et al.*, 2009 (15) con algunas modificaciones) inoculada con las dos cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51 en siete diluciones con diferentes concentraciones y con tres repeticiones cada uno respectivamente. No se logró detectar la amplificación de los productos de PCR en el control de proceso en todas las muestras de tejido (**Figura 04**), este resultado no satisfactorio y no confiable, se consideró muestras no aptas para la siguiente actividad experimental.

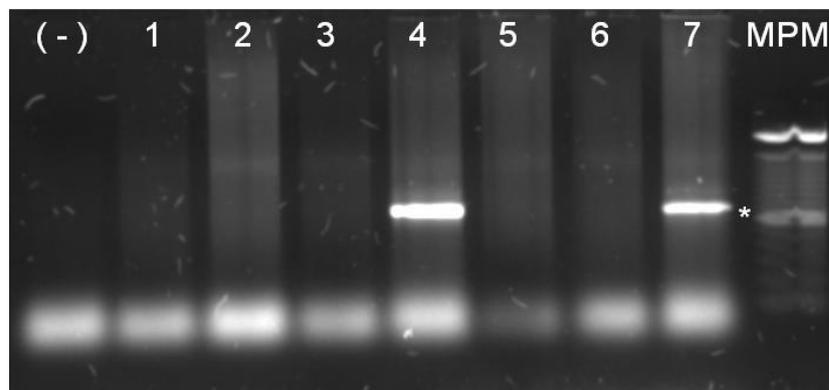


Figura 04. Electroforesis (gel de agarosa al 1.2 %) de los productos de PCR correspondientes al control de proceso de las siete diluciones en nódulos linfáticos. Carriles 1: Control negativo; Carriles: 2,3,4,6 y 7: no se amplificó ningún producto de PCR; Carriles 5 y 8: Productos de PCR y Carril 9: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder). * 720 pares de bases.

5.3. Detección del fragmento del ADN de las cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51 en las muestras de leche y tejido del bovino.

Luego de las diluciones e inoculación en leche de las cepas vacunales de *B. abortus* y aplicado el protocolo de extracción del ADN total planteado, se logró detectar el fragmento del ADN de las dos cepas vacunales y conocer el límite de detección del ensayo PCR múltiple. En la cepa vacunal S19 se amplificó un producto de 456 bp y sobre el límite de detección del ensayo PCR múltiple, se encontró que los PCRs eran positivos hasta el carril 3, que corresponde a la dilución 1×10^4 UFC/ml de leche (10 mil bacterias/ml de leche) (**Figura 05**) (**Tabla 06**).

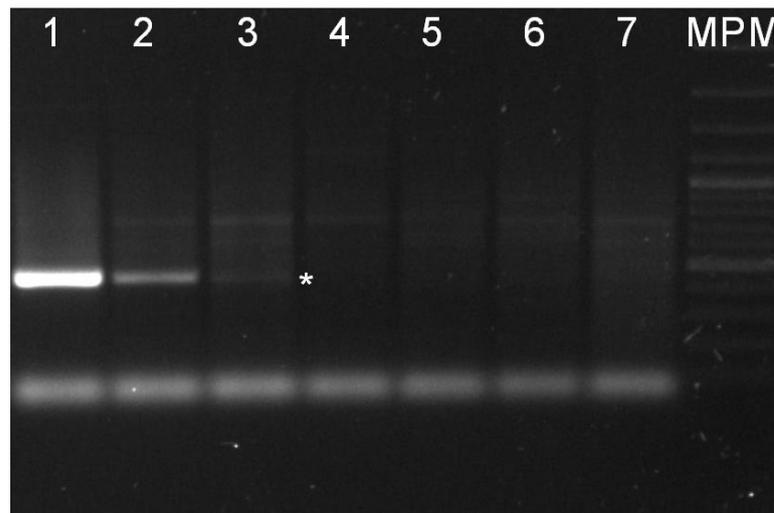


Figura 05. Electroforesis (gel de agarosa al 1.2 %) de los productos de PCR correspondientes a la detección del fragmento de ADN y el límite de detección de *B. abortus* cepa vacunal S19 de siete diluciones en leche. Carril 1: 1×10^6 UFC/ml de leche; Carril 2: 1×10^5 UFC/ml de leche; Carril 3: 1×10^4 UFC/ml de leche; Carril 4: 1×10^3 UFC/ml de leche; Carril 5: 1×10^2 UFC/ml de leche; Carril 6: 1×10^1 UFC/ml; Carril 7: 1×10^0 UFC/ml de leche y Carril 8: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder). * 456 pares de bases.

Por otro lado, en la cepa vacunal RB51 se amplificó un producto de 1290 bp y el límite de detección del ensayo PCR múltiple en dos de las tres repeticiones se identificó hasta el carril 3 al igual que la cepa anterior, que corresponde a la dilución 1×10^4 UFC/ml de leche (10 mil bacterias/ml de leche) (**Figura 06**) (**Tabla 06**)

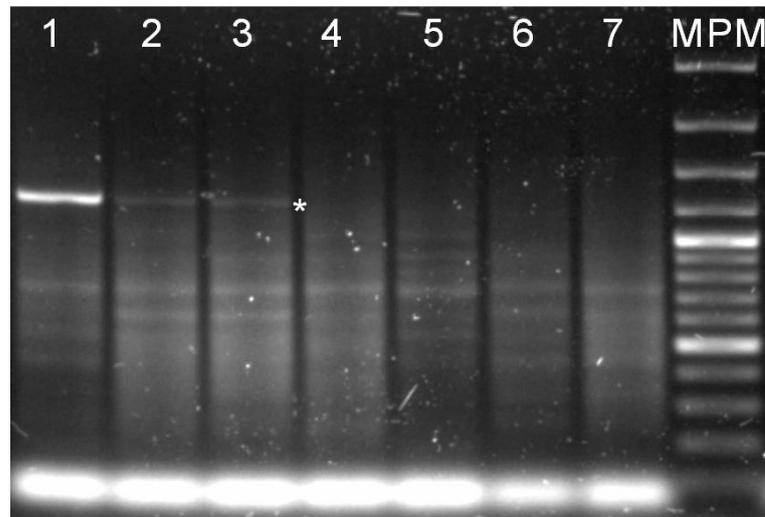


Figura 06. Electroforesis (gel de agarosa al 1.2 %) de los productos de PCR correspondientes a la detección del fragmento de ADN y el límite de detección de *B. abortus* cepa vacunal RB51 de siete diluciones en leche. Carril 1: 1×10^6 UFC/ml de leche; Carril 2: 1×10^5 UFC/ml de leche; Carril 3: 1×10^4 UFC/ml de leche; Carril 4: 1×10^3 UFC/ml de leche; Carril 5: 1×10^2 UFC/ml de leche; Carril 6: 1×10^1 UFC/ml; Carril 7: 1×10^0 UFC/ml de leche y Carril 8: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder). * 1290 pares de bases.



Tabla 06: Detección del fragmento de ADN y el límite del ensayo PCR múltiple de las dos cepas vacunales de *B. abortus* en muestras de leche bovina.

Matriz	Repetición	Cepa vacunal de <i>B. abortus</i>	Fragmento de amplificación (pb)	Diluciones (UFC/ml de leche)	Control de proceso	Límite de detección del ensayo PCR.
Leche	1	S19	456	1 X 10 ⁶	Valida	Detectable
				1 X 10 ⁵	Valida	Detectable
				1 X 10 ⁴	Valida	Detectable
				1 X 10 ³	Valida	No detectable
				1 X 10 ²	Valida	No detectable
				1 X 10 ¹	Valida	No detectable
				1 X 10 ⁰	Valida	No detectable
Leche	2	S19	456	1 X 10 ⁶	Valida	Detectable
				1 X 10 ⁵	Valida	Detectable
				1 X 10 ⁴	Valida	Detectable
				1 X 10 ³	Valida	No detectable
				1 X 10 ²	Valida	No detectable
				1 X 10 ¹	Valida	No detectable
				1 X 10 ⁰	Valida	No detectable
Leche	3	S19	456	1 X 10 ⁶	Valida	Detectable
				1 X 10 ⁵	Valida	Detectable
				1 X 10 ⁴	Valida	No detectable
				1 X 10 ³	Valida	No detectable
				1 X 10 ²	Valida	No detectable
				1 X 10 ¹	Valida	No detectable
				1 X 10 ⁰	Valida	No detectable
Leche	1	RB51	1290	1 X 10 ⁶	Valida	Detectable
				1 X 10 ⁵	Valida	Detectable
				1 X 10 ⁴	Valida	Detectable
				1 X 10 ³	Valida	No detectable
				1 X 10 ²	Valida	No detectable
				1 X 10 ¹	Valida	No detectable
				1 X 10 ⁰	Valida	No detectable
Leche	2	RB51	1290	1 X 10 ⁶	Valida	Detectable
				1 X 10 ⁵	Valida	Detectable
				1 X 10 ⁴	Valida	Detectable
				1 X 10 ³	Valida	No detectable
				1 X 10 ²	Valida	No detectable
				1 X 10 ¹	Valida	No detectable
				1 X 10 ⁰	Valida	No detectable
Leche	3	RB51	1290	1 X 10 ⁶	Valida	Detectable
				1 X 10 ⁵	Valida	Detectable
				1 X 10 ⁴	Valida	No detectable
				1 X 10 ³	Valida	No detectable
				1 X 10 ²	Valida	No detectable
				1 X 10 ¹	Valida	No detectable
				1 X 10 ⁰	Valida	No detectable



5.4. Evaluación de las dos cepas vacunales de *B. abortus* en leche.

Para evaluar los resultados obtenidos sobre el nivel de detección del ensayo PCR múltiple se realizó una estadística descriptiva. Los datos de la variable límite de detección no tuvieron una distribución normal, por lo que para realizar este análisis se efectuó con la prueba no paramétrica equivalente a una prueba T de Student, llamada prueba de U Mann-Whitney para comparar la sensibilidad analítica del ensayo entre las dos cepas vacunales, la S19 y la RB51.

Luego del estadístico de contraste se obtuvo: el valor $P = 1$, lo que explica que no hay diferencia significativa (estadística) para la variable límite de detección entre las dos cepas vacunales haciendo el PCR múltiple; la media o el promedio fue de 40000; la moda 10000 y el error típico 30000 UFC/ml de leche, son iguales.

VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo el objetivo principal fue medir la sensibilidad analítica de un ensayo de PCR múltiple para la identificación de cepas de campo de *B. abortus* y/o las cepas vacunales S19 y RB51 en muestras de leche y tejidos de nódulos linfáticos de bovinos, con el uso de los oligonucleótidos o primers descrito por Yazdi *et al.*, 2008 (10). Para lo anterior se tomaron muestras de leche y tejido de nódulos linfáticos las cuales fueron inoculadas con diferentes concentraciones de las cepas vacunales S19 y RB51. Las muestras con concentraciones conocidas de brucelas fueron empleadas para extraer el ADN total con los métodos descritos por Romero y López-Goñi en 1999 (14), para el caso de leche y por Matrone *et al.*, 2009, para el caso de tejidos. Para evaluar la calidad del material genético extraído se realizó un ensayo de PCR que identifica la presencia de ADN bovino, este control de proceso nos permite evaluar la capacidad de los protocolos de colecta, conservación y extracción del material genético de la muestra íntegra y de calidad para ser amplificado. En este caso se logró identificar el amplicon o producto de PCR en todas las muestras de leche, sin embargo en muestras de tejido no se logró detectar en todas las muestras y tener resultados confiables, se sabe que este último resultado primeramente explica a que los primers utilizados en este estudio no fueron evaluados en ningún estudio anterior con los protocolos de extracción del ADN en tejido y leche, puesto que en el estudio descrito por Yazdi *et al.*, 2008 (10), fueron realizados con cultivos puros de *B. abortus*, esto supone de los factores inhibidores que pueden estar presentes en muestras de tejido y que pueden estar inhibiendo en la amplificación del ADN, tales como proteínas séricas, restos de células somáticas, polisacáridos y otros componentes de los fluidos corporales o una extremada concentración de ADN de la muestra (52,53), estos inhibidores pueden estar originalmente en la muestra matriz, introducirse en el procesamiento de las muestras, o en la extracción del ADN (54) esto permite sugerir realizar o añadir otros pasos en la extracción del ADN bovino para eliminar ciertos inhibidores que pueden interferir en estos experimentos. En conclusión en leche la amplificación del ADN bovino en el PCR del control de proceso nos garantiza que las muestras son idóneas para la amplificación y detección del ADN de brucelas, sin embargo en tejido al no ser así consideramos muestras de ADN no funcionales para la siguiente actividad experimental.

En la detección del ADN de *B. abortus*, a partir del ADN obtenido de la leche inoculada experimentalmente con dos cepas vacunales en siete diluciones (1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 y 1×10^0 UFC/ml de leche) y con tres repeticiones por cada dilución, es decir obteniendo 21 muestras de leche inoculadas con S19 y 21 con RB51, y

realizando el ensayo PCR múltiple se logró identificar el fragmento del ADN como era de esperar de la cepa vacunal S19 no se amplificó el operón *ery* pero si se tuvo un producto de amplificación de 456 pb este resultado coincide con Bricker y Halling (12) y de RB51 se logró detectar el elemento IS711 y el producto de amplificación fue de 1290 pb que concuerdan con los resultados obtenidos por Vemulapalli *et al.*, (11). Por otro lado, el límite de detección del ensayo PCR múltiple, para las cepas S19 y RB51 fue correspondiente a la dilución 1×10^4 (10000 UFC/ml de leche). Estos resultados referentes al nivel de detección no coinciden con el reportado por otros investigadores como Mosquera *et al.* (55) quienes reportaron un nivel de 1×10^1 (10 UFC/ml de leche), Romero y Lopez-Goñi reportaron un nivel de entre 5 – 50 UFC/ml de leche y Hamdy y Amin (56) reportaron un nivel de 1×10^3 (1000 UFC/ml en leche). En este estudio a pesar de detectar el fragmento de ADN de las dos cepas de *B. abortus* S19 y RB51 en muestras de leche, no se consideró lo suficientemente bueno para el límite de detección, se sabe que los resultados adquiridos de los anteriores investigadores son en base a kits comerciales y otros protocolos para extracción de ADN y para la amplificación del ADN bacteriano con oligonucleótidos diferentes a los utilizados en este estudio, lo que sugiere evaluar o optimizar el método de extracción del ADN con el fin de mejorar el nivel de detección o evaluar otros oligonucleótidos en diferentes condiciones de PCR.

En contraste en las muestras de tejido aunque no se logró detectar la amplificación en el PCR del control de proceso este sí afectó en la amplificación del ADN de brucelas y no se pudo detectar las amplificaciones en ninguna de las muestras. Se asume que los inhibidores antes mencionados podrían tener efecto negativo sobre la eficiencia de la PCR y en la detección de ADN bacteriano.



VII. CONCLUSIONES

En esta investigación el protocolo de extracción del ADN en leche planteado en el laboratorio de Biología molecular de la Universidad de Cuenca, tiene una funcionalidad muy buena en siete diluciones de diferentes concentraciones.

Los ensayos de PCRs para la detección y amplificación del ADN de *B. abortus* son admisibles.

El protocolo de extracción de ADN en tejido de nódulos linfáticos no es funcional y no es válida para los ensayos PCRs.

En leche, la especificidad analítica del ensayo PCR múltiple es acertado y concuerda con los descritos por Bricker y Halling (12), Vemulapalli *et al.*, (11) y Yazdi *et al.*, (10).

En leche, la cantidad mínima de células de *B. abortus* que se detecta mediante el ensayo PCR múltiple corresponde a la dilución 1×10^4 UFC/ml.

La variable límite de detección en el ensayo PCR múltiple no hay diferencia significativa en las dos cepas vacunales evaluadas.



VIII. RECOMENDACIONES

Evaluar y optimizar otros protocolos de extracción de ADN tanto en leche para mejorar el nivel de detección y en tejido para eliminar los supuestos inhibidores que estarían interfiriendo en la amplificación y detección del ADN.

Los pares de oligonucleótidos o primers utilizados en muestras de tejido de nódulos linfáticos al no ser funcionales, se recomienda utilizar otros primers para este tipo de muestras.

En otro caso, se recomienda rediseñar los primers utilizados en este estudio para que sean funcionales en muestras de tejido de bovinos o evaluarlos en diferentes condiciones de PCR.

Para mejorar el promedio del nivel de detección, es necesario aumentar el número de repeticiones para cada dilución correspondiente.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Osorio Martínez FJ. Brucelosis bovina: Prevención, diagnóstico y control. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 2010; (4):1-12.
2. Corbel MJ. Brucellosis in humans and animals. First. SS Elberg and O Cosivi, editor. Hertfordshire; 2006. 102 p.
3. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Código sanitario para los animales terrestres. Brucelosis bovina. OIE. 2009;1-39.
4. McDermott JJ, Arimi SM. Brucellosis in sub-Saharan Africa: Epidemiology, control and impact. *Vet Microbiol.* 2002;90(1-4):111-34.
5. Samartino LE, Enright FM. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immun Microbiol Infect.* 1993;16(2):95-101.
6. Luna-Martínez JE, Mejía-Terán C. Brucellosis in Mexico: Current status and trends. *Vet Microbiol.* 2002;90(1-4):19-30.
7. Lopez J, Best A, Morales C. Diagnóstico de brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la provincia de Ñuble (VIII Región). *Arch Med Vet.* 1998;30(1):133-8.
8. Pinto da Silva Mol J, de Araújo França S, Alves da Paixão T, de Lima Santos R. Laboratorial diagnosis of animal brucellosis / Diagnóstico laboratorial da brucelose. *Rev Bras Ciênc Vet.* 2012;19(3):117-26.
9. López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, De Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol.* 2008;46(10):3484-7.
10. Sharifi Yazdi H, Khazrainia P, Zahraei Salehi T, Behroozikhah AM. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for differentiation of field strain isolates and vaccine strains S19 and RB51 of *Brucella* in Iran. *Iran J Vet Res.* 2008;9(1):19-24.
11. 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.
12. 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.
13. Sangari FJ, Agüero J. Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the Rolando F. Wampash Paati

- detection of DNA polymorphism at the ery locus. *Vaccine*. 1994;12(5):435–8.
14. Romero C, López-Goñi I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(8):3735–7.
 15. Matrone, M.; Keid, L.B.; Rocha, V.C.M.; Vejarano, M.P.; Ikuta, C.Y.; Rodriguez, C.A.R.; Ferreira, F.; Dias, R.A.; Ferreira Neto JS. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* pcr detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. *Brazilian J Microbiol*. 2009;40(3):480–9.
 16. Casas Olascoaga R. Informe sobre vacunas y vacunacion contra Brucelosis bovina. *Vet*. 2003;38(152–153):31–41.
 17. Alton GG, Corner LA, Plackett P. Vaccination of pregnant cows with low doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *Aust Vet J*. 1980;56(8):369–72.
 18. Ewalt DR, Payeur JB, Rhyan JC, Geer PL. *Brucella Suis Biovar 1* in Naturally Infected Cattle: A Bacteriological, Serological, and Histological Study. *J Vet Diagnostic Investig*. 1997;9(4):417–20.
 19. Olsen S, Tatum F. Bovine Brucellosis. *Vet Clin North Am - Food Anim*. 2010;26(1):15–27.
 20. Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect Genet Evol*. 2009;9(6):1168–84.
 21. Díaz Aparicio E. Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Rev sci tech Off int Epiz*. 2013;32(1):43–51.
 22. Center for Food Security & Public Health - Institute for International Cooperation in Animal Biologics. Brucellosis. 2009;1–15.
 23. Agrocalidad. Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina. Dirección de Sanidad Animal Programas Específicos. 2009. (1):1-75.
 24. O'Brien MP, Beja-Pereira A, Anderson N, Ceballos RM, Edwards WH, Harris B, et al. Brucellosis Transmission between Wildlife and Livestock in the Greater Yellowstone Ecosystem: Inferences from DNA Genotyping. *J Wildl Dis*. 2017;53(2):339–43.
 25. England T, Kelly L, Jones RD, MacMillan A, Wooldridge M. A simulation model of brucellosis spread in British cattle under several testing regimes. *Prev Vet Med*. 2004;63(1–2):63–73.
 26. Lopetegui P. Avances de la Erradicación de Brucelosis Bovina en Chile. *Boletín Rolando F. Wampash Paati*



- Veterinario Oficial (BVO). 2005;3.
27. Rovid Spickler A, Roth JA, Galyon J. Enfermedades emergentes y exóticas de los animales. The Center for Food Security & Public Health; 2010.
 28. Schelling E, Diguimbaye C, Daoud S, Nicolet J, Boerlin P, Tanner M, et al. Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. *Prev Vet Med.* 2003;61(4):279–93.
 29. Yagupsky P, Baron EJ. Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(8):1180–5.
 30. Mantur BG, Amarnath SK. Brucellosis in India - a review. *J Biosci.* 2008;33(4):539–47.
 31. Abubakar M, Mansoor M, Arshed MJ. Bovine Brucellosis: Old and New Concepts with Pakistan Perspective. *Pak Vet J.* 2012;32(2):147–55.
 32. 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.
 33. Olsen SC. Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51. *Res Vet Sci.* 2000;69(2):135–40.
 34. Vemulapalli R, He Y, Buccolo LS, Boyle SM, Sriranganathan N, Schurig GG. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. *Infect Immun.* 2000;68(7):3927–32.
 35. Pasquali P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C, Ciuchini F. Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. *Infect Immun.* 2001;69(10):6541–4.
 36. Maldonado J, Kowalski A, Milla M, Rodríguez M, Villasmil C. Implementación de la prueba del anillo en leche y elisa indirecto para el diagnóstico de brucelosis en rebaños doble propósito del estado Lara, Venezuela. *Rev Científica.* 2010;20(3):240–4.
 37. Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol.* 2002;90(1–4):447–59.
 38. Díaz AG, Soto ;, Estein SM. Estudio de la interferencia serológica en el diagnóstico de la brucelosis bovina en el modelo murino. *In Vet.* 2012;14(1).
 39. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Código sanitario para los animales terrestres. Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. OIE. 2013;1–18.
 40. Castro HA, González SR, Prat MI. Brucellosis: una revisión práctica. *Acta bioquím*

- clín latinoam. 2005;39(2):203–16.
41. Shenoy B, Jaiswal A, Vinod A. Lab diagnosis of brucellosis. *Pediatr Infect Dis.* 2016;8(1):40–4.
 42. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Código sanitario para los animales terrestres. Validación y control de calidad de los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. OIE. 2008;1–11.
 43. Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin Lab.* 2003;49(9–10):487–505.
 44. 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.* 2015;69(1):3.
 45. Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58(6):2099–101.
 46. Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-Merino A, Martínez-Soriano JP. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol.* 1995;33(12):3087–90.
 47. Miyashiro S, Scarcelli E, Piatti RM, Campos FR, Vialta A, Keid LB, et al. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). *Brazilian J Microbiol.* 2007;38(1):17–22.
 48. Gallien P, Dorn C, Alban G, Staak C, Protz D. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet Rec.* 1998;142(19):512–4.
 49. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63.
 50. Trangoni MD, Gioffré AK, Cerón Cucchi ME, Caimi KC, Ruybal P, Zumárraga MJ, et al. LAMP technology: Rapid identification of *Brucella* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Braz J Microbiol.* 2015;46(2):619–26.
 51. 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.
 52. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ*



-
- Microbiol. 1997;63(10):3741–51.
53. Vejarano MP, Matrone M, Keid LB, Rocha VCM, Ikuta CY, Rodriguez CAR, et al. Evaluation of four DNA extraction protocols for *Brucella abortus* detection by PCR in tissues from experimentally infected cows with the 2308 strain. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2013;13(4):237–42.
 54. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012;113(5):1014–26.
 55. C. XM, V. CB, L. CM, G. JB. Detección de *Brucella abortus* por PCR en sangre y leche de vacunos. *Rev MVZ Córdoba.* 2008;13(3).
 56. Hamdy MER, Amin AS. Detection of *Brucella* Species in the Milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. *Vet J.* 2002;163(3):299–305.



X. ANEXOS

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

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

A.- Información del ensayo:

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

B.- Mezcla de reacción:

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

C.- Perfil de temperaturas de amplificación:

Paso:	Desnaturalización inicial:	Número de ciclos:			Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:		
Tiempo (min , sec):	<u>5</u> "	<u>1</u> "	<u>30</u> "	<u>45</u> "	<u>5</u> "	es
Temperatura (°C):	<u>94</u> °C	<u>94</u> °C	<u>60</u> °C	<u>72</u> °C	<u>72</u> °C	<u>4</u> °C
			— °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.:												

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

 UNIVERSIDAD DE CUENCA Cuenca 1967	Laboratorio de Biología Molecular	01-FE-MBM-PfXPol	
	Formato de ensayo: Pfx ADN polimerasa	Versión:	1
		Fecha:	2017.02.02
		Página:	1 de 2

A.- Información del ensayo:

Usuario:	Antonio J. Vallejo		
Fecha:	2017.05.16	Nombre del programa:	Bru-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.	64.75 µl	16.875 µl
Buffer de amplificación 10X:	10X	1X	12.5 µl	2.5 µl
Solución enhancer 10X:	10X	___ X	9.275 µl	1.875 µl
Solución de dNTP's:	___ mM	___ mM	1.25 µl	0.25 µl
Solución de MgSO ₄ :	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
Mostra 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: 40			Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alimentación:	Extensión:		
Tiempo (min, seg):	5:--	30"	25"	30"	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.:												

Fotografías:



Foto N° 01: Colección de muestras de leche.



Foto N° 02: Dilución e inoculación de las cepas vacunales de *B. abortus* en muestras de leche.



Foto N° 03: Extracción del ADN en muestras de leche inoculadas con cepas vacunales.