

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
(UNAN-LEÓN)**

ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS Y MEDICINA VETERINARIAS



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

Tema:

Diagnóstico molecular de brucelosis bovina mediante las técnicas de PCR y qPCR

Autores:

Br. Rodney Francisco Castro Balmaceda

Br. Tess Carolina Leonyork Guardado

Tutores:

PhD. Byron Flores Somarriba

PhD. Jessica Sheleby Elías

León - Nicaragua 2017

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”



DEDICATORIA

Rodney Castro Balmaceda

Dedico mi proyecto de investigación primeramente a Dios por brindarme la paciencia, inteligencia y sabiduría, a mis padres y hermanas ya que sin su ayuda incondicional no hubieran podido culminar mis estudios y a cada una de las personas que de una u otra manera me apoyaron en el transcurso de mis estudios.

Tess Carolina Leonyork Guardado

Este estudio se lo dedico a Dios primeramente por permitirme cumplir esta etapa de mi vida. A mis padres que sin su apoyo incondicional no hubiera sido posible culminar este proyecto, y a mi hijo que me da fortaleza y motivación para seguir adelante siempre.



AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darnos la vida, fuerza y sabiduría para culminar esta etapa de nuestra vida.

A nuestros **padres** ya que sin su apoyo incondicional no habría sido posible nuestros estudios.

A nuestros tutores **PhD Byron José Flores Somarriba** y **PhD Jessica Sheleby Elías**, por dedicarnos tiempo, guiarnos, apoyarnos, motivarnos y por transmitir sus conocimientos durante la elaboración de nuestro proyecto de tesis.

Al **PhD. William Jirón Toruño** por ayudarnos en la recolección de muestras necesarias para nuestra investigación.

Al **PhD. Héctor Fuertes Negro** por su asesoramiento en la aplicación de los PCR.

Al laboratorio **Alquizvetek S.L., Zaragoza, España** por la donación de algunos reactivos para la aplicación del PCR.



RESUMEN

La brucelosis es una zoonosis con importancia para la salud pública y la economía agropecuaria en la mayoría de los países en desarrollo. El objetivo de este trabajo fue estandarizar técnicas moleculares para el diagnóstico de *Brucella* spp, en bovinos de Nicaragua. Se realizó un ensayo de laboratorio para una PCR multiplex, un PCR convencional y un PCR en tiempo real (SYBR Green), analizando 45 muestras procedentes de bovinos reactivos a rosa de bengala y rivanol de los cuales se tomaron muestras de linfonodos, leche, sangre entera, útero, glándula mamaria, placenta y fetos no abortados. El ADN fue extraído mediante el kit comercial (QIAamp ADN mini kit, Qiagen) y por calentamiento; mostrando que en el PRC multiplex se obtuvo el 55% de positividad (11/20), mientras que para el PCR convencional se obtuvo el 40% de positividad (18/45) y en el PCR en tiempo real se obtuvo una positividad del 40% (18/45); concluyendo que la técnica PCR resulta ser una técnica sensible y específica para el diagnóstico de la brucelosis bovina en dependencia del cebador utilizado.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
4. OBJETIVOS	5
4.1. Objetivo general	5
4.2. Objetivos específicos	5
5. MARCO TEÓRICO	6
5.1 Sinonimia de la brucelosis	6
5.2 Etiología	6
5.3 Epidemiología	7
5.3.1 Distribución geográfica	7
5.3.2 Trasmisión	7
5.4 Periodo de incubación	8
5.5 Patogenia	8
5.6 Signos clínicos	9
5.7 Diagnóstico	10
5.7.1 Diferencial	10
5.7.2 Clínico	10
5.7.3 Examen microscópico	11
5.7.4 Cultivo	11
5.7.5 Serología	12
5.7.5.1 Rivanol	12
5.7.5.2 La prueba de aglutinación en tubo	12
5.7.5.3 Prueba de Coombs	12
5.7.5.4 Fijación de complemento	13
5.7.5.5 Ensayo inmunológico ligado a enzima (ELISA)	13
5.7.6 Diagnóstico molecular	14
5.7.6.1 PCR	14
5.7.6.2 La técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (Loop LAMP)	15
5.8 Tratamiento	15
5.9 Control y Profilaxis	15



6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 Tipo de estudio	17
6.2 Tipo de diagnóstico	17
6.3 Muestras	17
6.4 Extracción de ADN	17
6.5 Cebadores utilizados	18
6.6 Ensayos para PCR Multiplex	18
6.7 Ensayo para PCR con cebador cromosoma II	19
6.8 Determinación de la sensibilidad analítica (límite de detección)	19
6.9 Determinación de sensibilidad diagnóstica	20
6.10 Especificidad diagnóstica	20
6.11 Análisis estadístico	20
7. RESULTADOS	22
8. DISCUSIÓN	24
9. CONCLUSIONES	26
10. RECOMENDACIONES	27
11. BIBLIOGRAFÍA	28
12. ANEXOS	32



1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una zoonosis con importancia para la salud pública y la economía agropecuaria en la mayoría de los países en desarrollo. La permanencia de esta enfermedad limita las posibilidades del sector pecuario y la comercialización internacional, influyendo negativamente en la rentabilidad de las explotaciones, en la calidad de los productos, en el consumo y en la salud pública (1).

Esta enfermedad es causada por bacterias del género *Brucella*, las cuales tienden a infectar varias especies, entre ellas a bovinos, búfalos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, camélidos y perros (2); se ha observado una asociación de la especie de *Brucella* con la especie animal, de tal forma que *Brucella abortus* infecta a bovinos, *Brucella melitensis* a ovinos y caprinos, *Brucella suis* a porcinos, *Brucella canis* a caninos y *Brucella ovis* a ovinos. La especificidad de las especies no es absoluta ya que pueden infectar otras especies cuando se crían juntas (3).

El estudio epidemiológico, auspiciado por el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), 2010 – 2013, para determinar prevalencia de brucelosis en Nicaragua arrojó resultados que indican baja prevalencia de la enfermedad. Las cifras fueron de 2.2% en hato y de 0.18% como prevalencia por animal. Las condiciones actuales de la enfermedad ante la poca acción de control oficial, reflejan la necesidad de realizar actividades de vigilancia de manera más intensiva sobre todo en el ganado lechero (4).

Los procedimientos serológicos usados rutinariamente en el diagnóstico de brucelosis (rosa de bengala y rivanol), tanto para humanos como para animales muestran reactividad cruzada con ciertos enteropatógenos y otras bacterias como: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* y *E. coli*. La causa de esta reactividad cruzada es la gran similitud del lipopolisacáridos (LPS) presente en la superficie de estas bacterias (5).

Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proveen de un método rápido, sensible y específico para el diagnóstico de la brucelosis bovina (6). Según diversos autores, la eficiencia diagnóstica de la PCR para la brucelosis



es \geq al 95%. En la última década son numerosos los antecedentes sobre el empleo de la PCR para la detección genómica en el diagnóstico de *Brucella* spp (7).

Siendo el motivo de este estudio estandarizar técnicas PCR para el diagnóstico de brucelosis bovina en muestras de sangre, linfonodos, materia fetal y leche de bovinos positivos a las pruebas serológicas rosa de bengala y rivanol.



2. ANTECEDENTES

En Argentina, Lavaroni *et al* (7) en el 2004 evaluaron la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la brucelosis en un rebaño lechero infectado con *Brucella* spp, donde la PCR ensayada obtuvo una sensibilidad del 100%.

En México, Rentería *et al* (8) en el 2005 evaluaron la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina, utilizando 51 muestras de sangre y leche, obteniendo amplificación en el 100 % y una sensibilidad y especificidad del 100%.

En México, Aguirre *et al* (6) en 2008 realizaron un estudio para el diagnóstico rápido y efectivo de brucelosis bovina en sangre, mediante una reacción en cadena de la polimerasa doble, obteniendo una sensibilidad analítica para la PCR doble de 1×10^{-6} ng/ μ l de ADN y una la sensibilidad y la especificidad diagnóstica de 96.3 % y 100 % respectivamente.

En Colombia, Mosquera *et al* (9) realizaron un estudio para detectar *Brucella abortus* por PCR convencional en muestras de sangre y leche de vacunos, resultando positivos el 94.1% (16/17) para muestras de sangre y el 30.3% (10/33) para muestras de leche.

En Colombia, Sánchez *et al* (10) en 2013 realizaron un ensayo de diseño y evaluación de una prueba de PCR para detección de *Brucella* spp y *Brucella abortus* empleando 30 muestras de sangre entera bovina, obteniendo una sensibilidad y especificidad del 100%.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la validez de las técnicas de PCR y qPCR para el diagnóstico de *Brucella* spp en bovinos?



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estandarizar técnicas moleculares PCR - qPCR para el diagnóstico de *Brucella* spp en ganado bovino.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de los cebadores utilizados.
2. Comparar dos métodos de extracción de ADN para el diagnóstico de *Brucella* spp.



5. MARCO TEÓRICO

5.1 Sinonimia de la brucelosis

- Fiebre ondulante
- Fiebre melitensis
- Fiebre del Río Grande
- Fiebre de Malta
- Fiebre de Chipre
- Fiebre de Gibraltar
- Fiebre de Mediterráneo
- Fiebre recurrente
- Fiebre Melitocócica
- Fiebre de Traum
- Fiebre Caprina
- Enfermedad de Bang

5.2 Etiología

Las bacterias pertenecientes al género *Brucella* son pequeños bacilos o coco bacilos (0.5-0.7 x 0.6-1.5µm) inmóviles y aerobios estrictos, de crecimiento lento que no poseen cápsulas ni forman esporas. Tienen un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa y oxidasa positivas (11). A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos (12). Es considerado un microorganismo patógeno intracelular facultativo (13).

El género *Brucella* ha sido clasificado en base a la patogenicidad y al hospedero:

Tabla 1. Clasificación del género *Brucella*

Especie	Hospedadores conocidos	Biovares
<i>B. melitensis</i>	Caprino, bovinos, ovinos, canidos, hombre	1 – 3
<i>B. abortus</i>	Bovinos, canidos, hombre	1 – 9
<i>B. suis</i>	Porcino, canidos, hombres	1 – 5
<i>B. canis</i>	Canidos, hombre	
<i>B. ovis</i>	Ovinos	
<i>B. neotomae</i>	Roedores	
<i>B. ceti</i>	Delfines, marsopas, ballenas	
<i>B. pinnipedialis</i>	Focas	
<i>B. microti</i>	Zorros rojos, roedores de campo	
<i>B. inopinata</i>	desconocido	

Fuente (14)

De estas especies sólo las primeras cuatro son capaces de infectar al hombre, así mismo, ciertos autores se han planteado que el género *Brucella* posee una sola especie y que el resto de las ya mencionadas son biovares (15).

En base al aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella* se clasifican habitualmente como lisas (S) o rugosas (R).



Dentro de las primeras se encuentran *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* y dentro de las segundas *B. ovis* y *B. canis*. El aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión de LPS en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas, aunque durante su crecimiento en los medios de cultivo pueden experimentar mutaciones que afectan la expresión del LPS (16).

5.3 Epidemiología

5.3.1 Distribución geográfica

La brucelosis tiene una distribución geográfica limitada, siendo un problema importante en el Mediterráneo, el oeste de Asia, algunas zonas de África y Latinoamérica, especialmente en países con bajos recursos económicos. En el Centro y Norte de Europa y en Australia la infección por *B. abortus* ha sido prácticamente erradicada. En Norteamérica, la brucelosis es especialmente prevalente en las zonas agrícolas del Norte y Centro de México, mientras que en Canadá y Estados Unidos ha disminuido considerablemente en los últimos años. En Sudamérica se encuentra en varios países, donde en muchos casos es endémica y un problema sanitario importante. En Chile, la Décima Región de los Lagos es la que comprende la mayor área productora de leche y, además, tiene la mayor concentración de ganado infectado (17). *B. abortus* está presente en todos los países de América Central, siendo la prevalencia de un 4 a un 8% (18).

5.3.2 Trasmisión

En los animales, *B. abortus* se suele transmitir por contacto con la placenta, el feto, los líquidos fetales y las descargas vaginales de los animales infectados. También se puede encontrar *B. abortus* en la leche, la orina, el semen, las heces y el líquido de los higromas. La liberación del organismo en la leche puede ser intermitente, prolongada o permanente. Muchas vacas infectadas se convierten en portadoras crónicas, la infección por *B. abortus* generalmente se produce por ingestión o a través de las membranas mucosas, pero también se puede transmitir a través de heridas en la piel (13).



Los humanos pueden infectarse, por lo general, por la ingestión o por la contaminación de las membranas mucosas y la piel lastimada. En el laboratorio y en los mataderos, la *Brucella* puede transmitirse en aerosoles. Las fuentes comunes de infección en las personas incluyen el contacto con productos de abortos de animales, ingestión de productos lácteos no pasteurizados de vacas y pequeños rumiantes, ingestión de carne cruda o con poca cocción; contacto con cultivos de laboratorio, muestras de tejidos y la inyección accidental de vacunas atenuadas de la brucelosis (19).

5.4 Periodo de incubación

El periodo de incubación varía con las especies y el estadio de gestación, en el momento de la infección. En los bovinos, las pérdidas reproductivas ocurren durante la segunda mitad de la preñez; por consiguiente, el periodo de incubación es más prolongado cuando los animales se infectan en etapas tempranas de gestación. En otras especies, los abortos y los mortinatos ocurren entre 2 semanas a 5 meses después de la infección (19). El período de “incubación serológica” (desde la infección hasta la aparición de anticuerpos) dura de varias semanas a varios meses. Factores tales como la virulencia y la dosis de la bacteria, la vía de infección y la susceptibilidad del animal hacen variar el período de incubación (20).

5.5 Patogenia

Las brucelas son bacterias que tienen una localización principalmente intracelular, ingresan al organismo por contacto directo a través de las membranas mucosas o heridas. Una vez dentro, pueden ser fagocitadas por células polimorfonucleares (PMN) y macrófagos como parte de la inmunidad innata (21). La *Brucella* es capaz de activar solamente el sistema humoral, mediante el LPS, produciendo de manera inicial anticuerpos IgM y posteriormente anticuerpos IgG ó IgA (22). Si no son eliminadas, llegan por vía linfática a los linfonodos regionales correspondientes pudiendo desde allí invadir el torrente sanguíneo (14), para luego localizarse principalmente en órganos y tejidos ricos en células reticuloendoteliales como el hígado, el bazo, la propia linfa, la médula ósea y los



riñones (23), donde pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de las vacuolas de los fagocitos circulantes y tisulares, formando nódulos granulomatosos que pueden desarrollarse en abscesos en tales lesiones (14).

Se cree que la supervivencia de la *Brucella* dentro de los fagocitos tisulares va a ser mediada por sustancias antioxidantes y por la producción de AMP y GMP cíclicos, los cuales van a inhibir la fusión de los fagosomas con los lisosomas, la activación del factor de necrosis tumoral alfa, la degranulación y la activación del sistema mieloperoxidasa (22). Todos estos factores de virulencia producidos por el microorganismo van a permitir la supervivencia a nivel intracelular de al menos 15 a 30% de las brucelas ingeridas y la posterior replicación de las mismas (15).

Las placentas y las membranas fetales de ganado vacuno, cerdos, ovejas y cabras contienen eritritol, un factor de crecimiento para las brucelas. La proliferación de microorganismos en animales preñados desencadena placentitis y aborto en estas especies. No hay eritritol en la placenta humana ni en placenta equina y el aborto no es parte de la infección por *Brucella* spp (24).

Después de que una vaca infectada aborta o pare normalmente, el agente patógeno no permanece mucho tiempo en el útero. La infección se vuelve crónica y las brucelas se acantonan en los ganglios y glándulas mamarias de la vaca, incluso se ha observado que las bacterias pueden permanecer en ubre durante años (20). Después del primer aborto, las preñeces subsiguientes son generalmente normales; sin embargo, las vacas pueden eliminar el organismo en la leche y en las descargas uterinas (19).

5.6 Signos clínicos

El inicio es insidioso y se caracteriza por ataque al estado general, fiebre, debilidad, mialgias generalizadas y diaforesis (24). En el ganado bovino, *B abortus* causa abortos y mortinatos; los abortos se suelen producir durante la segunda mitad de la gestación. Algunos terneros nacen débiles y pueden morir poco tiempo después de nacer. Se puede producir retención de placenta y metritis secundaria, también se observan epididimitis, vesiculitis seminal, orquitis o abscesos



testiculares en los toros. La infertilidad ocurre en ambos sexos debido a la metritis o a la orquitis/epididimitis (13).

Se estima que la infección ocasiona una pérdida de 20 a 25% en la producción de leche, por la interrupción del período de lactancia debido al aborto y a la concepción demorada. En la vaca inseminada artificialmente con semen infectado, los celos pueden volver repetidas veces (20).

En ocasiones las hembras no preñadas no muestran síntomas clínicos y cuando se infectan con anterioridad al servicio, muchas veces no abortan. En los toros las brucelas pueden localizarse en los testículos y las glándulas genitales anexas; cuando la enfermedad se manifiesta clínicamente, uno o ambos testículos pueden aumentar de volumen, con disminución de la libido e infertilidad. A veces puede haber atrofia del testículo debido a adherencias y fibrosis. Son frecuentes la vesiculitis seminal y la ampulitis. Ocasionalmente, en los bovinos se pueden observar higromas y artritis.

Los linfonodos aumentan de tamaño y el bazo se vuelve palpable, la hepatitis puede acompañarse de ictericia, también se presenta con dolor intenso y las alteraciones del movimiento, sobre todo en los cuerpos vertebrales que indican osteomielitis (24).

5.7 Diagnóstico

5.7.1 Diferencial

Se deben tomar en cuenta otras enfermedades que causan abortos o epididimitis y orquitis. En el ganado bovino, el diagnóstico diferencial incluye tricomoniasis, vibriosis, leptospirosis, listeriosis, rinotraqueitis infecciosa bovina y varias micosis.

5.7.2 Clínico

Se deben considerar las infecciones por brucelosis en todos los casos de aborto, especialmente cuando ocurren abortos múltiples en un rodeo en la última fase de la gestación (13).



5.7.3 Examen microscópico

Se puede utilizar el examen microscópico de frotis, con la modificación de stamp de método Ziahl-Neelsen para un diagnóstico presuntivo. Las brucelas se pueden encontrar en los productos de un aborto, descargas vaginales, leche, semen o en diversos tejidos. Las especies del género *Brucella* no son verdaderamente ácido-resistentes, aunque son resistentes a la decoloración por ácidos débiles y se tiñen de rojo sobre fondo azul. Las brucelas son cocobacilos o bacilos, que generalmente se ordenan individualmente, aunque a veces lo hacen en pares o pequeños grupos, sin embargo, es necesario mencionar que las tinciones no son pruebas definitivas. Otros organismos como *Chlamydophila abortus* y *Coxiella burnetii* pueden ser parecidos a *Brucella* además es posible que el examen directo no detecte las pequeñas cantidades de bacterias presentes en la leche y los productos lácteos (19).

5.7.4 Cultivo

El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de las brucelas, frecuentemente a partir de hemocultivos, el cual consiste en la inoculación de sangre en frascos herméticamente cerrados que contienen, simultáneamente, un medio líquido (caldo triptosa) y un medio sólido (agar triptosa). Los cultivos deben mantenerse en incubación un tiempo no menor a 30 días debido a que las bacterias del género *Brucella* son de crecimiento lento. En los últimos años se han desarrollado sistemas de hemocultivo automáticos o semiautomáticos entre los que se destaca el Bactec, que permite detectar más del 95% de los cultivos positivos antes del séptimo día de incubación. A medida que progresa la enfermedad disminuye la probabilidad de positividad de los hemocultivos, por lo que se hace necesario el aislamiento a partir de ganglios linfáticos, hígado o bazo (14).

Después de algunos días de incubación en medios de agar, las brucelas forman colonias en la estría primaria que tiene un diámetro <1 mm. No son hemolíticas. La observación de pequeñísimos cocobacilos gramnegativos que son catalasa y oxidasa positivos indica la presencia de bacterias del género *Brucella* (24).



5.7.5 Serología

La aglutinación con rosa de bengala y la aglutinación en tubo son las pruebas serológicas más frecuentemente utilizadas por su rapidez y sencillez, la aglutinación con rosa de bengala es una prueba muy económica y con una sensibilidad muy alta del 99%, pero tiene el inconveniente de una especificidad del 40% (22).

5.7.5.1 Rivanol

La prueba de rivanol se realiza a los sueros de animales reactivos a la prueba de tarjeta, con la finalidad de diferenciar una respuesta postvacunal de una respuesta de tipo infeccioso. El rivanol es un colorante de acridina que tiene la capacidad de sedimentar las proteínas del suero, entre ellas los anticuerpos de tipo IgM que predominan en el caso de una vacunación o infección primaria, quedando los tipos IgG, que se encuentran en mayor cantidad sólo en estimulaciones inmunogénicas posteriores (25). La prueba de rivanol tiene una especificidad relativa alta (100%), pero una sensibilidad relativa de 86% (26).

5.7.5.2 La prueba de aglutinación en tubo

La prueba de aglutinación en tubo (SAT) detecta anticuerpos contra las brucelas tanto de tipo IgM como de IgG. Un título $> 1:160$ se considera positivo; sin embargo, en áreas endémicas, se recomiendan títulos $> 1:320$ y la prueba puede permanecer positiva por tiempo prolongado. En infección aguda aparecen rápidamente anticuerpos IgM que son seguidos por anticuerpos IgG e IgA, estos anticuerpos se pueden detectar por aglutinación en tubo, en placa o por microaglutinación (22).

5.7.5.3 Prueba de Coombs

Es una prueba de aglutinación en tubo que permite detectar tanto anticuerpos completos como incompletos. Se realizan diluciones seriadas del suero a investigar, que se incuban con una suspensión antigénica de *B. abortus* para que se produzca la aglutinación mediada por los anticuerpos completos.



Las suspensiones correspondientes a las diluciones mayores se lavan adecuadamente y se agrega suero antiespeciés (Coombs) para detectar de esta forma la aglutinación mediada por los anticuerpos incompletos, los elementos de la prueba son:

Antígeno: suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5%

Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes de la clase IgG

Título significativo: el título obtenido es, como mínimo el de la aglutinación de la primera etapa y frecuentemente mucho más elevado. Este incremento es tanto mayor cuanto mayor es la concentración de anticuerpos no aglutinantes o incompletos (14).

5.7.5.4 Fijación de complemento

Es una técnica menos utilizada debido a su complejidad técnica. No obstante, es una prueba muy específica. Se basa en dos etapas: en la primera etapa de la reacción se incuban diluciones del suero inactivado con el antígeno y el complemento. En la segunda etapa se agrega el sistema hemolítico y se compara la hemólisis con los estándares correspondientes a 0, 25, 50, 75 y 100% de lisis. La capacidad de fijación del complemento se detecta más tardíamente que la aglutinante, pero persiste durante largo tiempo (12-13 meses). En la brucelosis aguda los títulos obtenidos por fijación de complemento son similares o ligeramente inferiores a los de seroaglutinación. En los casos de evolución crónica los resultados son semejantes a los obtenidos con la prueba de Coombs, esta prueba no añade información adicional útil a las anteriormente comentadas (27).

5.7.5.5 Ensayo inmunológico ligado a enzima (ELISA)

Es una técnica altamente sensible, específica y versátil, emplea muy pequeña cantidad de suero y proporciona buenos resultados aun en presencia de hemólisis. En el ELISA indirecto (ELISA-I), el antígeno se fija a placas de poliestireno, luego se incuba con el suero a investigar, posteriormente con una anti-especie conjugado con una enzima, se agrega el sustrato correspondiente y se mide el color desarrollado a la longitud de onda determinada. Pueden usarse conjugados



que reconozcan las distintas clases de inmunoglobulinas. Mientras que en el ELISA competitivo (ELISA-C), se emplea un anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo o del LPS-S, que compite con los anticuerpos del suero por la unión al antígeno fijado en la placa. El revelado se efectúa con un anticuerpo anti-ratón conjugado con una enzima. Se consideran positivos aquellos sueros con un porcentaje de inhibición mayor del 28% (14).

5.7.6 Diagnóstico molecular

5.7.6.1 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

La sensibilidad de la técnica de PCR convencional es muy alta, pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación, por lo que siempre es necesario correr al mismo tiempo que las muestras, los controles positivos y negativos.

Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Por otra parte, para solventar el problema de la cuantificación se han generado unas



variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (28).

5.7.6.2 La técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (Loop LAMP)

La técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés) se caracteriza por su simplicidad porque todo el proceso de amplificación y detección se realiza en un solo paso en el que los componentes de la reacción se someten a condiciones isotérmicas, que requiere un equipamiento menos especializado que las tecnologías convencionales de PCR. Por lo tanto, LAMP es accesible para laboratorios en países en desarrollo.

El método LAMP se basa en la actividad isotérmica de desplazamiento de cadena de la *Bst* ADN polimerasa derivada de *Bacillus subtilis*. Esta enzima, cuando se combina con cuatro cebadores específicos, produce la amplificación a temperatura (60°C) única de un fragmento altamente específico de una plantilla de ADN en cantidades mayores que las de una PCR equivalente. Además, esta mayor eficiencia de amplificación permite una detección visual directa mediante métodos colorimétricos (29).

5.8 Tratamiento

En el caso de Nicaragua, el acuerdo ministerial No. 008-2009 establece en el Artículo 22 y 23 que todo bovino positivo (reactor) será marcado y sacrificados en un rastro municipal o matadero bajo inspección veterinaria oficial, en un periodo no mayor a 8 días naturales posterior a la prueba diagnóstica (30).

5.9 Control y Profilaxis

Debido al impacto de la brucelosis para la salud pública y el daño que causa a la industria ganadera, mucho esfuerzo se ha utilizado para controlar y erradicar la enfermedad en el ganado. El desarrollo de una vacuna eficaz para el control/erradicación de la brucelosis ha sido un desafío para los científicos por muchos años. A pesar de los enormes avances y el desarrollo de vacunas *B abortus* S19 y RB51, la búsqueda de vacunas mejoradas nunca tiene fin. A



pesar de que las vacunas disponibles son efectivas para controlar brucelosis, estas tienen numerosos inconvenientes, como la interferencia con pruebas de diagnóstico, patogenicidad para humanos, potencial para causar aborto en animales gestantes, entre otros (31).

Una vacuna ideal contra la brucelosis debería poseer las siguientes características: a)- estar en vivo y poder proporcionar una respuesta inmune tipo Th1, b)- que no induzca anticuerpos que interfieren con las pruebas serológicas empleadas en el diagnóstico de ganado infectado, independientemente de ruta, dosis de administración, edad o sexo del animales, c)- estar atenuado y no causar enfermedad o infección persistente en animales inmunizados ni ser patógeno para los humanos, d)- ser capaz de inducir una protección fuerte y de larga duración contra la infección sistémica y uterina, además de prevenir el aborto, e)- que no conduzcan a seroconversión en la revacunación, f)- ser estable y que no se revierta la virulencia in vivo o in vitro, g)- ser de bajo costo, fácil de producir y administrar (32).

Considerando que la vacunación sola no es suficiente para controlar y erradicar la enfermedad, se debe asociar con la eliminación continua de animales infectados, ya que son la fuente de nuevas infecciones. Por lo tanto, además de la vacunación, la mayoría de los programas de erradicación de brucelosis bovina también incluyen políticas de pruebas y sacrificios, vigilancia y medidas higiénicas (33).



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio

Ensayo de laboratorio

6.2 Tipo de diagnóstico

Reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo Real (qPCR) y multiplex PCR.

6.3 Muestras

Se procesaron un total de 45 muestras provenientes de 31 bovinos reproductores a las pruebas serológicas rosa de bengala y rivanol cabe mencionar que de 2 vacas se tomaron muestras de leche, sangre, linfonodos, glándula mamaria y de una de estas se tomó muestra de órgano reproductor y feto (ver tabla 2)

Tabla 2. Tipos de muestra

Tipo de muestra	Cantidad de muestra	Extracción por kit Qiagen	Extracción por calentamiento
Sangre	6	6	-
Leche	2	2	-
Linfonodos mamarios	27	5	22
Glándula mamaria	2	-	2
Útero	1	-	1
Cotiledones	1	-	1
Sangre de feto no abortado	1	1	-
Pulmón de feto	1	-	1
Hígado de feto	1	-	1
Bazo de feto	1	-	1
Rosa de bengala	2	2	-
Total	45	16	29

6.4 Extracción de ADN

En las muestras de sangre, leche, rosa de bengala y 5 muestras de linfonodos, se realizó extracción de ADN empleando el kit de extracción QIAamp ADN mini kit (Qiagen) siguiendo el procedimiento recomendado por los fabricantes (Tabla 5).

En las muestras de tejido (linfonodos, glándula mamaria, cotiledones, útero, pulmones, bazo e hígado de feto) se ensayaron extracciones de ADN por



calentamiento; para esto, se maceraron 0.1g de tejido que fue suspendida en 200 µl de agua libre de nucleasas, fueron centrifugadas por 10 minutos a 14 000 rpm, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 200 µl de agua libre de nucleasas, se incubaron entre 95°C a 100°C por 10 minutos y luego almacenados a -20 °C hasta su uso.

6.5 Cebadores utilizados

Se utilizó un par de cebador cromosoma II (forward – reverse), diseñado para ser utilizado en termociclador convencional y de tiempo real, este cebador amplifica un producto final de *Brucella* spp de 150 pb. También se utilizaron cebadores de *B. Abortus spec* (forward – reverse) *B. Su1 spec* (forward) *B. mel spec* (forward) *B. ov spec* (forward) para ensayar un múltiplex PCR; estas fueron dirigidas a la amplificación de los fragmentos de 498 pb para los cebadores de *B. abortus*, 731 pb para el cebador de *B. mellitensis*, 976 pb para el cebador *B. ovis*, 285 pb para cebador de *B. suis* (ver tabla 3).

Tabla 3. Cebadores

CEBADORES	SECUENCIA	PCR	AMPLICON	REFERENCIA
<i>Cromosoma II</i>	F: 5'-GCGGCTTTTCTATCACGGTATTC-3' R: 5'-CATGCGCTATGATCTGGTTACG-3'	CON/RT	135-150 pb	Probert et al 2004 (34)
<i>B. abortus spec</i>	F: 5'-GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC-3' R: 5'-TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3'	CON/M	498 pb	Bricker et al 1994 (35)
<i>B. su1 spec</i>	F: 5'-GCGCGGTTTTCTGAAGGTTTCAGG-3'	CON/M	285 pb	
<i>B. mel spec</i>	F: 5'-AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA-3'	CON/M	731 pb	
<i>B. ov spec</i>	F: 5'-CGGGTTCTGGCACCATCGTCG-3'	CON/M	976 pb	

6.6 Ensayos para PCR Multiplex

Estos ensayos consistieron en la aplicación de los cebadores *B. abortus spec F*, *B. abortus spec R*, *B. su1 spec*, *B. mel spec* y *B. ovi spec*.

Para la mezcla se usó 12.5 µl de Master Mix 2x (Promega), 8 µl de agua libre de nucleasa, 2 µl de cebador F ab, 0.5 µl de cebador R ab, 0.5 µl de cebador R ov,



0.5 µl de cebador R mel, 0.5 µl de cebador R suis y .5 µl de muestra de ADN. Para un total de 25 µl de reacción. El protocolo de amplificación consistió en: una temperatura 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos (95°C durante 1.15 minutos, 55,5°C durante 2 minutos, 72°C durante 2 minutos). Después se realizó una amplificación final de 72°C durante 7 minutos, se enfrió a 4°C - ∞, (figura 1)

6.7 Ensayo para PCR con cebador cromosoma II

Estos ensayos consistieron en la aplicación con los cebadores, cromosoma II (forward – reverse), utilizando 12.5 µl de SYBR® Green Master Mix SYBR Green.GoTaq qPCR® 2X, 3.5 µl de agua libre de nucleasa, 2 µl del cebador forward, 2 µl del cebador reverse y 5µl de muestra de ADN, para una reacción de 25µl. Esta misma mezcla fue empleada en el PCR convencional, con la diferencia que se utilizó master mix 2X de Promega.

En el PCR convencional se aplicó el siguiente protocolo de amplificación: temperatura de 94°C durante 5 minutos, seguidos de 44 ciclos (94°C por 10 segundos, 56°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos), seguido de 72°C por 7 minutos y finalmente se dejó en reposo a 4°C (figura 2). La amplificación se realizó en el equipo Applied Biosystems 2720 thermal cycler (figura 3).

En el PCR en tiempo real se aplicó el siguiente protocolo de amplificación: una temperatura de 95°C durante 5 minutos, seguido de 44 ciclos (20 segundos a 56°C, 20 segundos a 72°C, 5 segundos a 79°C y 10 segundos a 94°C) y para la curva de melting, 10 segundos a 94°C, 5 segundos a 65°C seguido de un incremento de 0,5°C hasta 95°C y finalmente se dejó en reposo a 4°C. La amplificación se realizó en el equipo Applied Biosystems 7500 real time PCR system (figura 4).

6.8 Determinación de la sensibilidad analítica (límite de detección)

Para determinar la sensibilidad analítica del ensayo se realizó una extracción de ADN a partir de rosa de bengala (*Brucella abortus*, cepa 1119-3), empleando el kit de extracción QIAamp ADN mini kit (Qiagen) siguiendo el procedimiento recomendado por los fabricantes, la concentración y pureza del ADN fue medidas



en el equipo Thermo Scientific Nanodrop lite (figura 5), la pureza obtenida fue de 1.73 y una concentración de 63 ng/μl. Tomando en consideración que el equivalente genómico de *Brucella abortus* es de $2,5 \times 10^6$ pb (36), se determinó que 63 ng es el peso correspondiente a 2.33×10^7 bacterias en 1 μl (37). A partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas de base 10 en agua libre de nucleasas, repetida hasta ocho veces por duplicado ($10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8$). Con la medida de la Cts (del inglés cycle threshold) en cada dilución, se realizó una curva de regresión para determinar el número mínimo de copias que la técnica fue capaz de detectar.

6.9 Determinación de sensibilidad diagnóstica

Se realizó un ensayo con 16 muestras de animales reactivos a rosa de bengala de las cuales se obtuvo el ADN mediante el kit Qiagen; igualmente se realizó otro ensayo utilizando 29 muestras de animales reactivos a rosa de bengala a los cuales se realizó extracción de ADN por protocolo de calentamiento.

6.10 Especificidad diagnóstica

Se realizó un ensayo de especificidad utilizando ADN de 25 muestras con otras cepas bacterianas diferentes a *Brucella* spp. El panel de muestras se describe en la siguiente tabla.

Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas para la determinación de la especificidad

Cepa	Número de muestras
<i>Staphylococcus</i> spp	10
<i>Escherichia coli</i>	6
<i>Streptococcus</i> spp	6
<i>Pseudomonas</i> spp	2
<i>Corynebacterium</i> spp	1
Total	25

6.11 Análisis estadístico

Para la determinación del límite de detección se empleó un modelo de regresión lineal simple, se calculó la sensibilidad diagnóstica, la especificidad, el índice de valides, el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo, todos con sus respectivos intervalos de confianza del 95%, los análisis se realizaron en software



EPIDAT 3.1, así como en la plataforma en línea Working in Epidemiology. Los datos fueron registrados en una hoja de Excel 2007 y los resultados se presentan en tablas.



7. RESULTADOS

En el ensayo de PCR y qPCR se obtuvieron mejores resultados con el cebador Cromosoma II, utilizando una mezcla con agua free nucleasas 3.5 μ l, Master mix 12.5 μ l, cebador 1 (cromosoma II F) 2 μ l, cebador 2 (cromosoma II R) 2 μ l y de ADN 5 μ l.

En la comparación de los métodos de extracción de ADN se obtuvieron 13/16 muestras positivas (sensibilidad 81.25%, IC 95%: 54.35 – 95.95) utilizando el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®), mientras que con método de calentamiento se obtuvieron 5/29 muestras positivas (sensibilidad 17.24%, IC 95%: 5.85 – 35.77).

En los resultados de PCR tanto convencional como qPCR para los diferentes tipos de muestras, se logró amplificar 5/7 muestras de sangre (incluyendo una muestra de feto no abortado), 9/27 muestras de linfonodos, 2/2 muestras de leche y 2/2 extracciones de rosa de bengala; no se logró amplificar ninguna de las 5 muestras de órganos provenientes del feto no abortado. En total se observó amplificación en 18/45 muestras (13/16 extraídas por kit y 5/29 extraídas por calentamiento).

En el ensayo de la PCR multiplex se lograron amplificar 11/22 muestras usando los cebadores: *B. abortus* spec F, *B. abortus* spec R, *B. su1* spec, *B. mel* spec y *B. ovi* spec (ver tabla 3), todas identificadas como *Brucella abortus* (498 pb).

Con respecto al límite de detección se determinó que la PCR convencional y la qPCR fueron capaz de amplificar el ADN objetivo después de 8 diluciones seriadas de base 10, a partir de la concentración inicial de 63 ng/ μ l, sin embargo en la última dilución se observó amplificación inespecífica, doble banda en PCR convencional (figura 9), doble pico de melting en qPCR (figura 8), por lo que se consideró que la concentración mínima para una amplificación específica fue en la séptima dilución que equivale a 2.3 EG/ μ l en la reacción tomando en cuenta que el valor de intercepción fue una C_T de 37.82.

En la figura 6 se muestra la curva de amplificación y en la figura 7 se muestra la curva estándar, construida con las diluciones seriadas de base 10, de una



concentración conocida de ADN, a partir de la cual; se obtuvo una eficiencia de 96.04% y una correlación elevada ($R^2=0,98$).

De las 16 muestras rectoras a rosa de bengala y cuyo ADN fueron extraído con el kit, 13 mostraron amplificación en el PCR y 3 no revelaron amplificación con el cebador cromosoma II, mientras que ninguna de 25 muestras perteneciente a otras bacterias diferentes de *Brucella* spp, mostraron positividad en la PCR (tabla 9). Estos datos proporcionan una sensibilidad diagnóstica de 81.25% (IC95%: 59 – 100), una especificidad de 100% (IC95%: 98 – 100) y un índice de validez de 92.68% (IC95%: 83.49 – 100), valor predictivo positivo de 100% (IC95% 96,15 – 100) valor predictivo negativo de 89,29% (IC95% 76,04 – 100) (tabla 10).

La sensibilidad y especificidad mostrada por el cebador cromosoma II para muestras de ADN extraídas por calentamiento donde amplificaron 5/29 y 25 muestras de las otras bacterias no amplifico ninguna (tabla 11). Obteniendo así una sensibilidad diagnostica de 17.24% (IC95%: 1.77 – 32.71), una especificidad de 100% (IC95%: 98 – 100) y un índice de validez de 55.56% (IC95%: 41.38 – 69.73), valor predictivo positivo 100% (IC % 90 – 100), valor predictivo negativo 51,02% (IC 95% 36 - 66,04) (tabla 12).



8. DISCUSIÓN

Actualmente los métodos serológicos para el diagnóstico de *Brucella* (rosa de bengala y rivanol) tienden a mostrar una reacción cruzada con otro tipo de agente debido a su baja especificidad, ya que muchos agentes pueden estimular la misma producción de anticuerpos tanto IgM como IgG según Padilla *et al* (38). Debido a que estas pruebas serológicas solo permiten detectar anticuerpos y no la presencia del agente patógeno por lo que se optó por estandarizar dos tipos de PCR para el diagnóstico de *Brucella* spp.

La PCR con el cebador Cromosoma II, utilizada en esta investigación, presentó un límite de detección de 2.3 EG por reacción, equivalente a 0.000063ng/μl, comparado con el estudio realizado por Rentería *et al* (8) donde obtuvieron un límite de detección de 1 ng/μl en muestras de leche, resultando que el PCR que se ensayó en este trabajo presentó un mejor límite de detección lo que es de gran importancia ya que para este cebador no es necesario una alta carga bacteriana para lograr una amplificación, también esto se podría atribuir a la técnica de purificación del ADN que fue realizada con el kit Qiagen. Sin embargo, es importante señalar que el ensayo se realizó con muestras de ADN extraídas de rosa de bengala.

La PCR y qPCR mostraron una buena sensibilidad de 86% y una especificidad de 100%, sin embargo, la sensibilidad fue inferior a la obtenida por Sánchez *et al* (10) y Rentería *et al* (8) quienes obtuvieron una sensibilidad de 100%. La baja sensibilidad obtenida en el ensayo con muestras a las cuales se les extrajo el ADN por calentamiento indica que para este tipo de agente no se recomienda dicha técnica, ya que se obtiene menor concentración, menor rendimiento del ADN y menor pureza, como lo indica Fraga *et al* (39) en su estudio de comparación de 5 métodos de extracción de ADN.

En este estudio, la PCR fue capaz de amplificar las 2 muestras de leche mostrando una banda clara y limpia de 150 pb, obteniendo mejores resultados que los mostrados por Rentería *et al* (8) quienes de 51 muestras de leche no lograron amplificar ninguna. Mientras que en las demás muestras de tejidos del órgano



reproductor no se logró amplificación con ninguna de las técnicas de PCR, lo que no concuerda con la teoría de que en este tipo de tejido es donde se aloja en mayor cantidad las bacterias de brucelas por su predilección por el eritritol. Cabe mencionar que, en las muestras de tejidos del órgano reproductor, la extracción de ADN se realizó por calentamiento, con la que no se logra purificar el ADN y la PCR puede ser inhibida por diversos contaminantes orgánicos y no orgánicas. Estos contaminantes actúan interfiriendo con la ruptura de la célula disminuyendo la sensibilidad de la técnica PCR como lo indica Moreira (40). Esto se vio reflejado en la baja sensibilidad obtenida con el ADN extraído por calentamiento, y en la alta sensibilidad obtenida con el kit Qiagen, ya que esta además de extraer el ADN, también realiza una purificación.

En el caso de las muestras de sangre procesadas, una de ellas era provenía de un feto de aproximadamente 4 meses, extraído del útero de una vaca reactiva a brucelosis, la sangre fue tomada mediante punción al corazón, dicha muestra presentó positividad a la PCR con una banda de 150 pb. Este resultado muestra que temprano en la gestación el producto ya está infectado por la bacteria y de no darse el aborto este quedará como portador y diseminador de este agente bacteriano.

La especificidad del PCR que se obtuvo fue del 100%, mostrada con el uso de ADN de otros agentes patógenos diferentes a *Brucella* que no fueron amplificados. Esto coincide con los ensayos realizados por Sánchez *et al* (10) quienes también obtuvieron una especificidad del 100%. Para asegurar una buena especificidad es necesario realizar un alineamiento de los cebadores en Basic Local Alignment Search Tool, una herramienta de Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) con el fin de verificar teóricamente que la unión de los cebadores se realiza en el amplicón para el agente deseado.



9. CONCLUSIONES

1. Las técnicas de diagnóstico molecular brindan un resultado confiable en dependencia de factores como el tipo de cebador, el protocolo de calentamiento y el tipo de agente en estudio.
2. La PCR en tiempo real ha mostrado ser una técnica diagnóstica sensible y específica para el diagnóstico de brucelosis.
3. La PCR sería útil como complemento de las pruebas serológicas o cuando no hay un resultado concluyente.
4. Fue más efectiva el kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®) que la técnica de extracción por calentamiento.



10. RECOMENDACIONES

- Promover el uso de la PCR como una técnica complementaria para un diagnóstico rápido de *Brucella* spp ya que esta nos permite detectar la presencia del agente patógeno en el organismo.
- Practicar la prueba de PCR antes del sacrificio de los animales reactivos a la técnica diagnóstica de rutina (rosa de bengala) debido a que esta puede dar reacción cruzada con otros agentes bacterianos.
- Se recomienda realizar la extracción de ADN mediante kit comercial ya que los ensayos por calentamiento no mostraron buenos resultados.
- Las muestras de elección para analizar mediante la técnica de PCR son los linfonodos, la sangre entera y la leche.
- Realizar un estudio de tipificación para determinar que biovarios de *Brucella* están presentes en Nicaragua.



11. BIBLIOGRAFÍA

1. Guzmán-Hernández RL, Contreras-Rodríguez A, Ávila-Calderón ED, Morales-García MR. Brucelosis: zoonosis de importancia en México. Rev Chil Infectol. diciembre de 2016;33(6):656-62.
2. FEDEGAN, Programa de Prevención, Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina Resolución ICA 1385 de marzo de 2013 [Internet]. 2017 [citado 12 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.fedegan.org.co/programas/programa-de-prevencion-control-y-erradicacion-de-la-brucelosis-bovina>.
3. Caione JC. Principales aspectos de la brucelosis bovina. Abril 28, 2015 Laboratorio 9 de Julio. [Internet]. 2017 [citado 12 de septiembre de 2017]. Disponible en: http://www.lab9dejulio.com.ar/informacion-tecnica/principales-aspectos-de-la-brucelosis-bovina_a342
4. OIRSA. Informe final consultoría regional para elaborar un estudio sobre la situación sanitaria de la brucelosis bovina, la tuberculosis. San Salvador, noviembre de 2014 [Internet]. 2017 [citado 12 de septiembre de 2017]. Disponible en: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:HNtmzG9AcKAJ:www.standardsfacility.org/sites/default/files/STDF_PG_358_Estudio_Situacion_Sanitaria.pdf+&cd=10&hl=es&ct=clnk&gl=ni
5. Corbel MJ. The relationship between the protective and cross-reacting antigens of *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica* 0:9 and *Salmonella* serotypes of Kauffmann-White group N. Contrib Microbiol Immunol. 1979;5:50-63.
6. Aguirre Arzola VE, Alvarado González M, Ibañez González JL, Leal Hernández M, Díaz Aparicio E, Nevárez Moorillón GV, et al. Diagnóstico rápido y efectivo de brucelosis bovina en sangre, mediante una reacción en cadena de la polimerasa doble. Téc Pecu En México [Internet]. 2008 [citado 22 de septiembre de 2017];46(2). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=61346204>
7. Lavaroni O, Aguirre N, Vanzini V, Lugaresi C, Torioni De Echaide S. Evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la brucelosis en un rebaño lechero infectado con *Brucella* spp. Rev Argent Microbiol. septiembre de 2004;36(3):101-6.
8. Rentería Evangelista TB, Organes De los Santos H, Licea Navarro AF, Medina Basulto GE, Nielsen K, Montañón Gómez MF, et al. Evaluación de la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina. Téc Pecu En México. 2005;43(1):117-26.



9. Mosquera CX, Bernal VC, Muskus LC, Berdugo GJ. Detection of brucella abortus in blood and milk of dairy cattle by pcr method. Rev MVZ Córdoba. septiembre de 2008;13(3):1504-13.
10. Sánchez-Jiménez MM, Cardona-Castro N. Diseño y evaluación de una prueba de PCR para detección de Brucella spp. y Brucella abortus. (Design and evaluation of a PCR test for detection of Brucella spp. and Brucella abortus). CES Med Vet Zootec. 10 de febrero de 2014;8(2):73-82.
11. Wilfert CM. Brucella. En: Zinsser, Microbiología. Joklik WK, Willet HP, Amos AB. 18 Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1986, p. 764-71.
12. Michaux-Charachon S, Bourg G, Jumas-Bilak E, Guigue-Talet P, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, et al. Genome structure and phylogeny in the genus Brucella. J Bacteriol 1997; 179 (10): 3244-9.
13. Institute for international cooperation in animal biologics. Brucelosis bovina: Brucella abortus [Internet]. College of Veterinary Medicine Iowa State University; 29 de Julio de 2009. Disponible en: www.cfph.iastate.edu/IICAB/
14. Castro HA, González SR, Prat MI. Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioquímica Clínica Latinoam. junio de 2005;39(2):203-16.
15. Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. Indian Journal of Medical Microbiology 2007; 25(3): 188-202.
16. Ariza Cardenal J. Brucelosis. En: Ferreras-Rozman, Medicina Interna. 13ra Edición. Barcelona: Mosby- Doyma libros S.A.; 1995, p. 2312-7.
17. Rivers R, Andrews E, González-Smith A, Donoso G, Oñate A. Brucella abortus: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. Arch Med Vet. 2006;38(1):7-18.
18. Moreno E. Brucellosis in Central America. Vet Microbiol. 20 de diciembre de 2002;90(1-4):31-8.
19. Spickler AR, Roth JA, Galyon J. Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales. CFSPH Iowa State University; 2011. 338 p.
20. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Tercera edición. Publ Científica Téc No 580. 2001;Volumen 1 Es. Bacteriosis y Micosis(3.ra. ed.):398pg.
21. Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goñi I, et al. Brucella abortus transits through the autophagic pathway



- and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun.* diciembre de 1998;66(12):5711-24.
22. López Vega CA, Ariza Andraca R, Rodríguez Weber LF. Brucelosis. Una infección vigente. *Acta Médica Grupo Ángeles.* 2008;6(4):158-65.
 23. Vadillo Machota S, Mateos Yanes EM, Píriz Durán S. Manual de Microbiología veterinaria. McGraw Hill Interamericana, 2002; 2002. 853 p.
 24. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica, 25 ed. Elsevier España; 2009. 960 p.
 25. Aparicio ED, Andrade LH, Díaz VO, Martínez JMB, Güemes FS. Evaluación de la prueba de rivanol para el diagnóstico de brucelosis en caprinos. *Vet México.* 2000;31(1):53-8.
 26. Dájer-Abimerhi A, Gutiérrez-Ruiz E, Zapata-Villalobos M, Sierra E, Cámara-Gamboa E. Evaluación de una prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de competencia (ELISA-C) para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. 2017.
 27. Ortiz de Urbina AF. Diagnóstico serológico de BRUCELLA [Internet]. [citado 13 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://coli.usal.es/web/abydl/biblioteca/bibelectro.alu/documentos/protocolos3/brucelosis/brucelosis.html>
 28. Perez de Castro AM. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). 2011 Universidad politecnica de valencia;
 29. Trangoni MD, Gioffré AK, Cucchi C, E M, Caimi KC, Ruybal P, et al. LAMP technology: Rapid identification of *Brucella* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Braz J Microbiol.* junio de 2015;46(2):619-26.
 30. MAGFOR. Acuerdo ministerial 008-2009.medidas sanitarias para el control y erradicacion de la brucelosis bovina en nicaragua. LA GACETA. 29 de junio de 2009;
 31. Dorneles EM, Sriranganathan N, Lage AP. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Vet Res* [Internet]. 2015 [citado 13 de noviembre de 2017];46(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4495609/>
 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.* 1 de julio de 1991;28(2):171-88.



33. Olsen SC, Stoffregen WS. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock: Expert Review of Vaccines: Vol 4, No 6 2005 [Internet]. [citado 13 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14760584.4.6.915>
34. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol.* marzo de 2004;42(3):1290-3.
35. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol.* noviembre de 1994;32(11):2660-6.
36. Allardet-Servent A, Bourg G, Ramuz M, Pages M, Bellis M, Roizes G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J Bacteriol.* octubre de 1988;170(10):4603-7.
37. dsDNA copy number calculator [Internet]. [citado 13 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>
38. Padilla R C, Montoya P Y, Carrillo P C. Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella* sp. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* abril de 2003;20(2):102-4.
39. Fraga Nodarse J, Rodríguez J, Fuentes O, Castex M, Fernández-Calienes A. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatómíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). *Rev Cubana Med Trop.* diciembre de 2004;56(3):203-7.
40. Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res.* 1 de julio de 1998;26(13):3309-10.



12. ANEXOS

Tabla 5. Protocolo de extracción

Kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®)

1. 20 μ l de proteinasa K en eppendorf.
 2. Agregar 200 μ l de la muestra.
 3. Agregar 200 μ l de buffer AL y dar vortex por 5 segundos.
 4. Incubar a 56 °C por 10 minutos.
 5. Centrifugar brevemente.
 6. Agregar 200 μ l de etanol (96 – 100%).
 7. Pasar la mezcla del paso 6 y colocarlo en un tubo de ensayo colector, procurando no tocar los bordes y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Cambiar el tubo colector descartando el contenido.
 8. Agregar en el centro de la columna 500 μ l de buffer AW1. Centrifugar por 8000 rpm por 1 minuto luego descartar tubo colector y el contenido, cambiando a un nuevo tubo colector.
 9. Agregar 500 μ l de buffer AW2 en el centro de la membrana y centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.
 10. Pasar la columna a eppendorf y centrifugar a velocidad máxima por 1 minuto.
 11. Pasar la columna a eppendorf y agregar 100 μ l de buffer AE incubar a temperatura ambiente por 1 minuto luego centrifugar a 8000 rpm por un minuto.
-



MEZCLAS Y PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN

Tabla 6. Mezcla para PCR múltiplex

Reactivo	Cantidad
Master Mix 2x	12.5µl
Agua libre de nucleasa	8µl
Cebador ab F	0.5µl
Cebador ab R	2µl
Cebador ov F	0.5µl
Cebador mel F	0.5µl
Cebador suis F	0.5µl
Muestra de ADN	0.5µl
Total	25µl

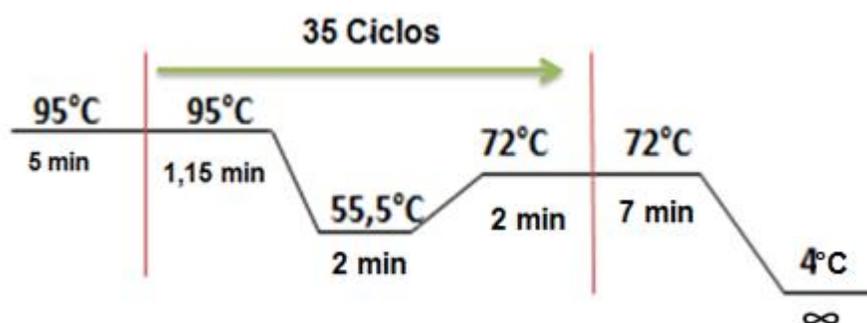


Figura 1. Protocolo de amplificación para ensayo de PRC Multiplex



MEZCLAS Y PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN

Tabla 7. Mezcla para el PCR y qPCR

Reactivo	Cantidad
Master Mix 2x / SYBR Green 2	12.5µl
Agua libre de nucleasa	3.5µl
Cromosoma II F	2µl
Cromosoma II R	2µl
Muestra de ADN	5µl
Total	25µl

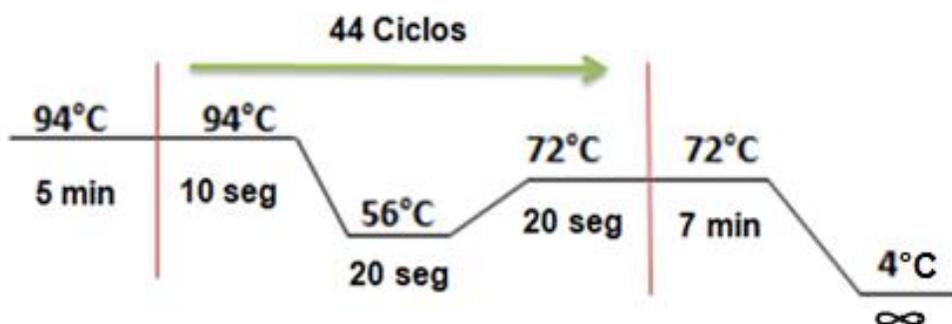


Figura 2. Protocolo de amplificación para ensayo de PRC convencional



Figura 3. Applied Biosystems 2720 thermal cycler



Figura 4. Applied Biosystems 7500 real time PCR system



Figura 5. Thermo Scientific Nanodrop lite



SENSIBILIDAD ANALÍTICA

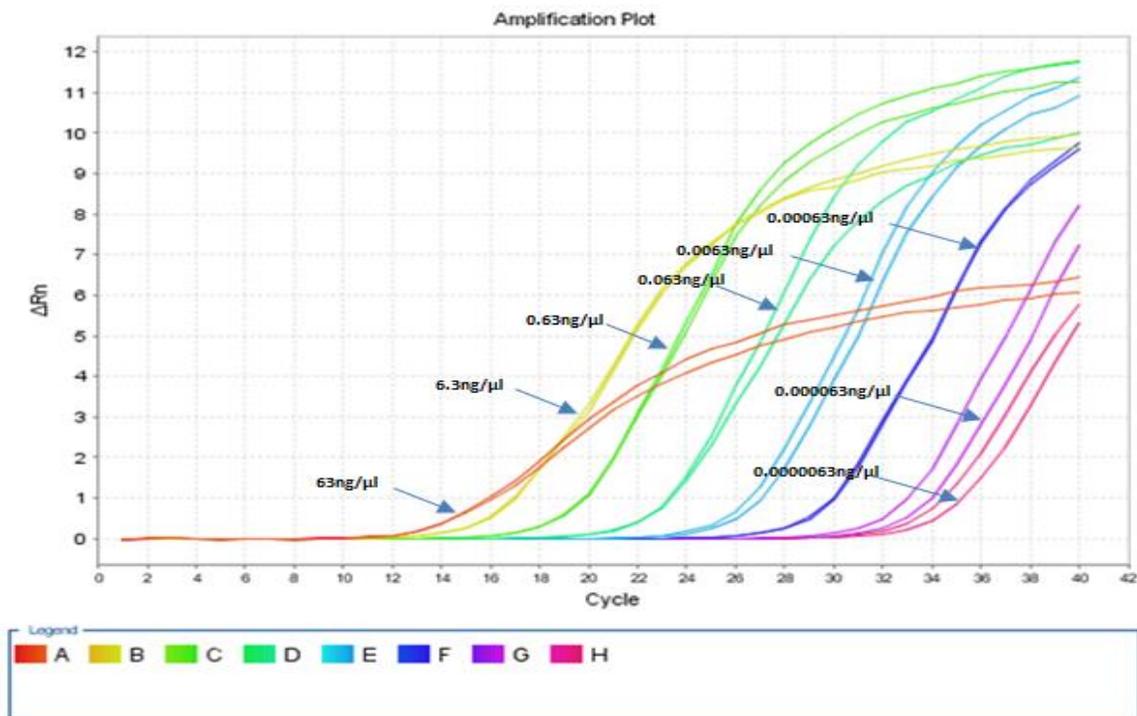


Figura 6. Determinación de la eficiencia del cebador Cromosoma II: se muestran los valores obtenidos en 8 diluciones seriadas de base 10, a partir de una concentración conocida de AND (63 ng/ μ l) obtenido a partir de una extracción de rosa de bengala.

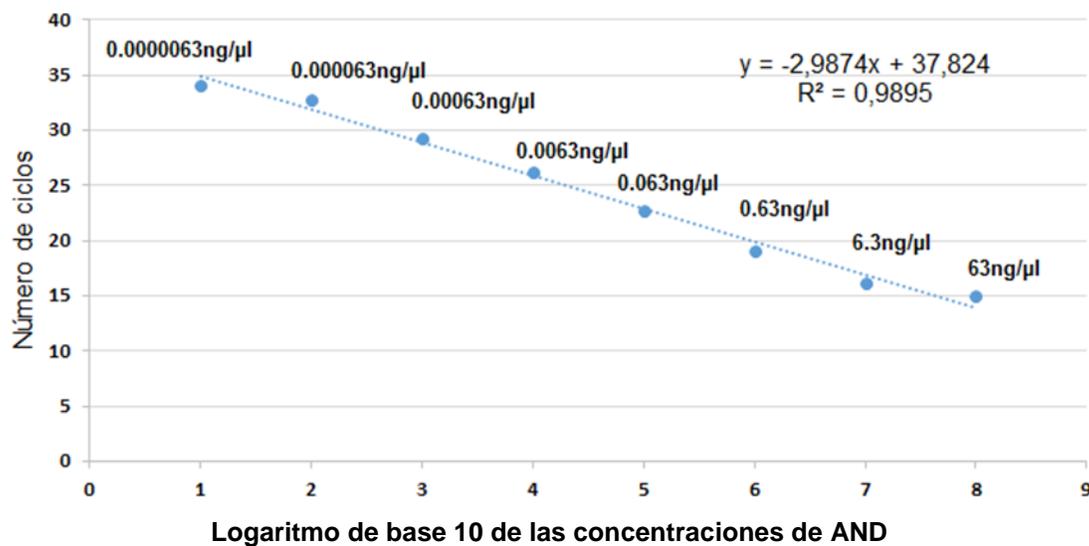


Figura 7. Curva estándar para las concentraciones de ADN y el número de ciclos en la qPCR Sybr Green

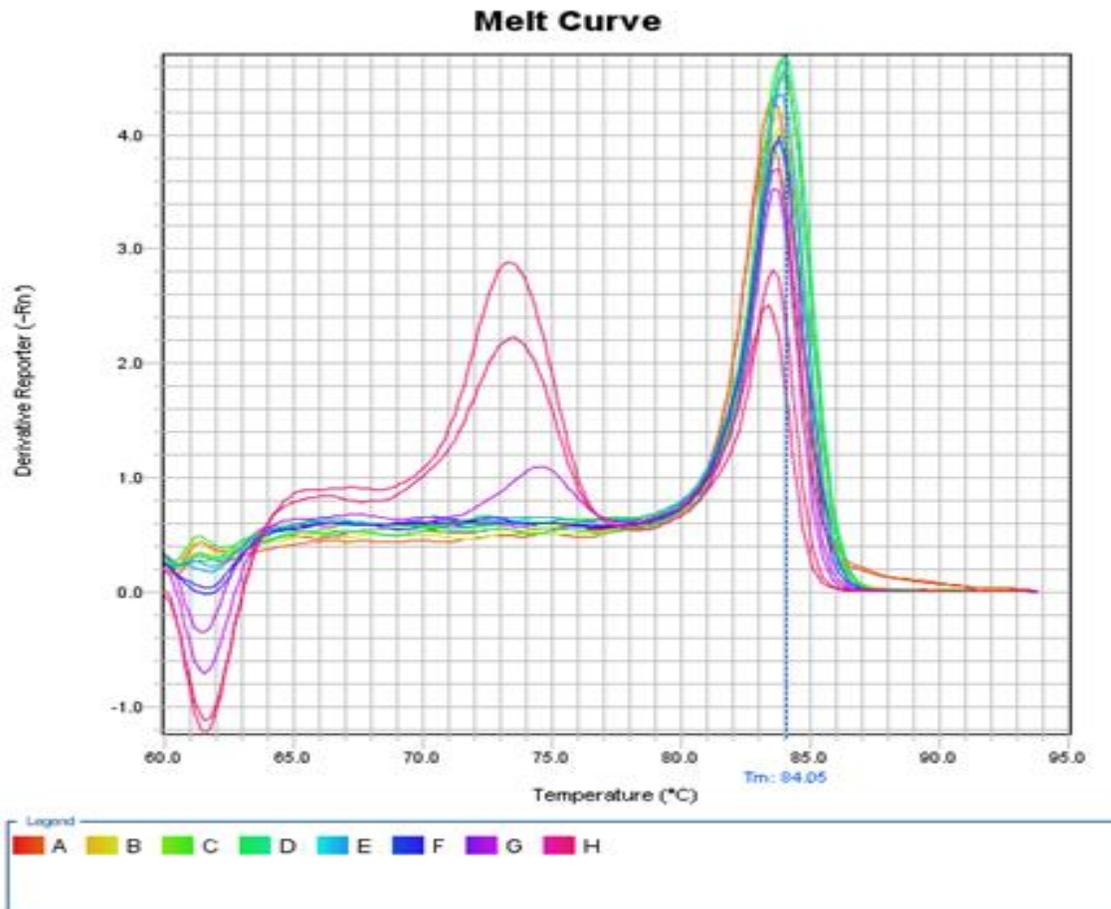


Figura 8. Curvas melting de las diluciones seriadas de base 10

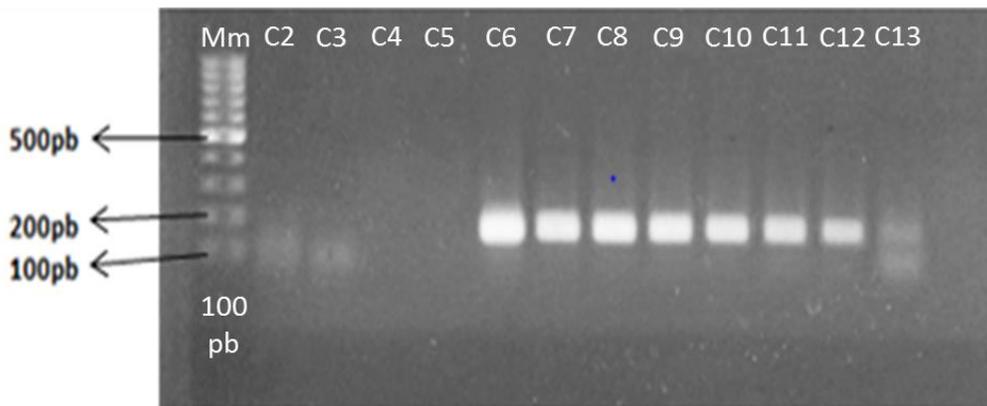


Figura 9. Gel de agarosa 1.3% teñido con bromuro de etidio. Límite de detección de cebador Cromosoma II. Mm 1: marcador de peso molecular de 100 pb, Carril (C) 2 y 3: control negativo, C 4 y 5: vacíos, C 6: dilución 1:10, C 7: 1:100, C 8: 1: 1,000, C 9: 1: 10,000, C 10: 1: 100,000, C 11: 1: 1, 000,000, C 12: 1:10, 000,000, C 13: 100, 000,000



RESULTADOS DE LAS MUESTRAS PROCESADAS POR PCR MULTIPLEX

Tabla 8. Resultados del ensayo de PCR Multiplex

Tipo de muestra	Total de muestras	Extracción por kit	Extracción por calentamiento
Sangre	6	4/6	-
Linfonodos	14	-	5/14
Rosa de bengala	2	2/2	-
Total	22	6/8	5/14

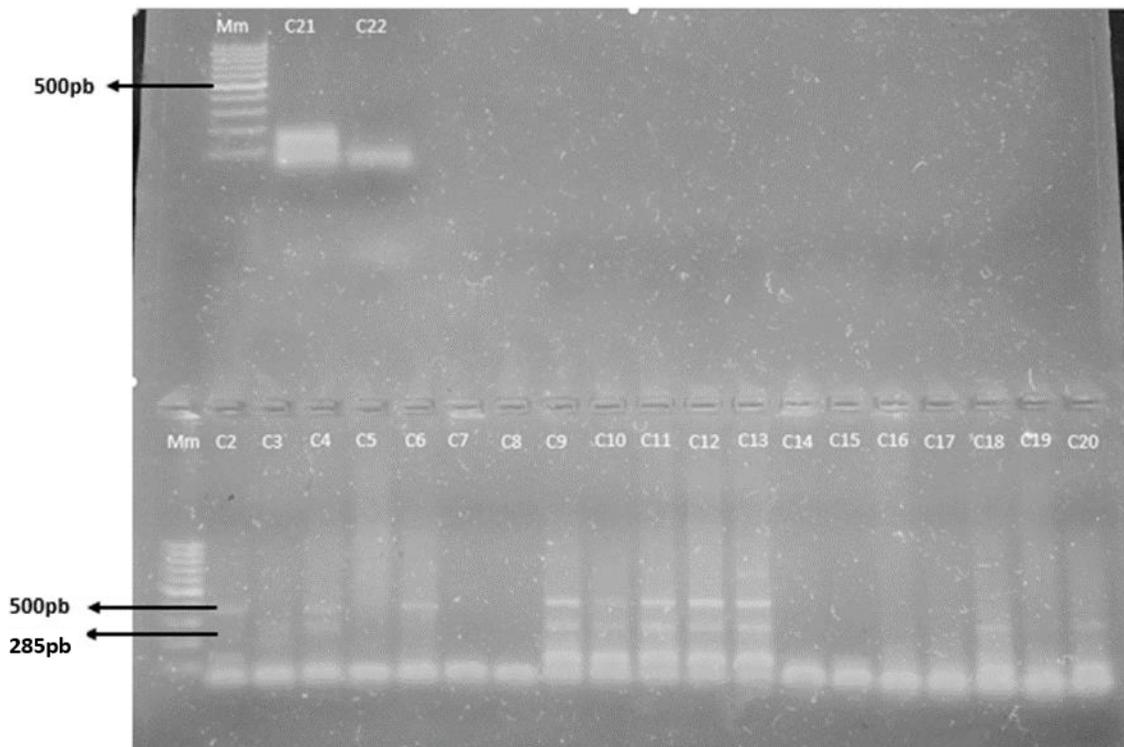


Figura 10: Gel de agarosa 1.3% teñido con bromuro de etidio. Ensayo de PCR Multiplex. Mm 1: marcador molecular de 100pb, carril (C) 2, 3, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 18 y 20 muestras de ADN positivas para *Brucella abortus* (498 pb) y *Brucella suis* (285 pb).



RESULTADOS DE LAS MUESTRAS PROCESADAS POR PCR Y qPCR

Tabla 9. Resultado de los ensayos de PCR y qPCR

Tipo de muestra	Positivas para PCR y qPCR	
	Extracción por kit Qiagen	Extracción por calentamiento
Sangre	4/6	-
Leche	2/2	-
Linfonodos mamarios	4/5	5/22
Glándula mamaria	-	0/2
Útero	-	0/1
Cotiledones	-	0/1
Sangre de feto no abortado	1/1	-
Pulmón de feto	-	0/1
Hígado de feto	-	0/1
Bazo de feto	-	0/1
Rosa de bengala	2/2	-
Total	13/16	5/29

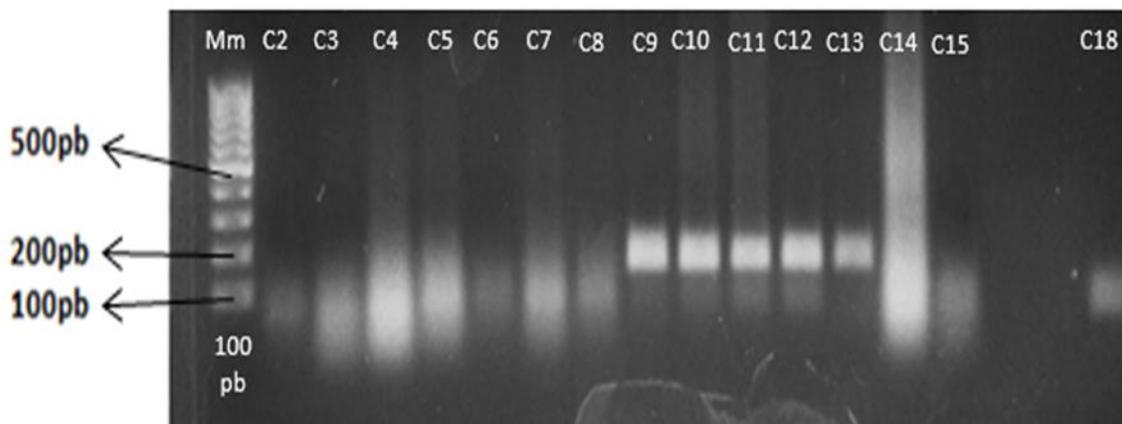


Figura 11. Gel de agarosa 1.3% teñido con bromuro de etidio. Ensayo de PCR con cebador Cromosoma II.) Mm 1: marcador molecular de 100pb, carril (C) 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14 y 15: muestras de órganos negativos (ADN extraído por calentamiento), C 9 y 12: muestras de sangre positivas, C 10: muestra de sangre de feto, C 11 y 13 muestras de leche positivas, (ADN extraído por kit Qiagen) C 18: control negativo.



Tabla 10. Cálculo de la sensibilidad y especificidad del cebador cromosoma II para las técnicas de PCR y qPCR, con muestras de ADN extraídas mediante kit Qiagen

		Gold standard		
		Positivo (R.B)	Control (-)	Total
PCR SYBR Green	Positivo	13	0	13
	Negativo	3	25	28
	Total	16	25	41

R.B: Rosa de Bengala

Tabla 11. Resultados de la sensibilidad y especificidad del cebador cromosoma II para las técnicas de PCR y qPCR, con muestras de ADN extraídas mediante kit Qiagen

	Valor (%)	IC (95%)	
Sensibilidad	81,25	59	100
Especificidad	100	98	100
Índice de validez	92,68	83,49	100
Valor predictivo +	100	96,15	100
Valor predictivo -	89,29	76,04	100

Tabla 12. Cálculo de la sensibilidad y especificidad del cebador cromosoma II para las técnicas de PCR y qPCR, para las técnicas de PCR y qPCR, con muestras de ADN extraídas por calentamiento

		Gold standard		
		Positivo (R.B)	Control (-)	Total
PCR SYBR Green	Positivo	5	0	5
	Negativo	24	25	49
	Total	29	25	54

R.B: Rosa de Bengala

Tabla 13. Resultados de la sensibilidad y especificidad del cebador cromosoma II para las técnicas de PCR y qPCR, con muestras de ADN extraídas por calentamiento

	Valor (%)	IC (95%)	
Sensibilidad	17,24	1,77	32,71
Especificidad	100	98	100
Índice de validez	55,56	41,38	69,73
Valor predictivo +	100	90	100
Valor predictivo -	51,02	36	66,04