

0.1672

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

2<sup>29</sup>.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA Y BACTERIOLOGÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Brucella*  
*melitensis* EN CAPRINOS VACUNADOS E INFECTADOS

TESIS

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
VETERINARIAS  
ÁREA MICROBIOLOGÍA

PRESENTA:

MVZ BEATRIZ ARELLANO REYNOSO

DIRECTORES DE TESIS: DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO  
DR. ALFREDO SAHAGÚN RUIZ  
DR. VÍCTOR RUBÉN TENORIO GUTIÉRREZ  
DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES

México, D. F

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

26 3776



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

Beatriz Arellano Reynoso.

## **Realización del trabajo**

El presente trabajo se realizó en los siguientes lugares:

Laboratorio de Bacteriología del CENID- Microbiología, del INIFAP- SAGAR; ubicado en el Km. 15.5 de la Carretera Mex- Tol. Col. Palo Alto, Cuajimalpa, D. F.

Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Inmunología y Microbiología Veterinaria de la F M V Z; ubicado en Ciudad Universitaria de la UNAM. D. F.

## **Financiamiento**

Este trabajo de tesis fue parcialmente financiado por:

- USA UDLP-AID. UNAM-Texas A & M University.
- Proyecto "Brucelosis en pequeños rumiantes" PAPITT-UNAM, IN504695.
- International Fundation of Science. Grant B/1539-2.
- Programa de Apoyo a la Investigación Científica de la FMVZ-UNAM.
- Proyecto CONACYT 3347PB.
- Proyecto CONACYT- INIFAP K0029.

El alumno de posgrado recibió una beca de maestría por CONACYT con No. de registro en la FMVZ 16961006.

## **Agradecimientos**

Expreso mi gratitud a mis asesores, quienes compartieron sus conocimientos, experiencia paciencia y tiempo conmigo:

Dr Efrén Díaz Aparicio

Dr Alfredo Sahagún Ruiz

Dr Victor R. Tenorio Gutiérrez

Dr Francisco Suárez Güemes.

Al Jurado que evaluó este documento y tan amablemente aportó valiosos comentarios que enriquecieron el trabajo:

Dr L. Garry Adams

Dr Ricardo Flores Castro

Dra Susana Mendoza Elvira

Dr Alejandro De la Peña Moctezuma.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias de la SAGAR y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

A las personas del CENID-Microbiología que me apoyaron para llevar a cabo los estudios de Maestría: Dr Diodoro Batalla Campero, Dr Juan García y Dra I. Carolina Ramírez.

A la QFB Laura Hernández Andrade del CENID-Microbiología, por su ayuda en la realización de la parte bacteriológica del trabajo.

Al M en C Dionisio Córdoba López, por la asesoría en el análisis estadístico.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología Molecular de la FMVZ que me permitieron trabajar eficientemente al proporcionarme el material necesario y brindarme además de su compañía, momentos muy agradables y su amistad.

## **Dedicatoria**

A Carlos Manuel, porque eres el móvil de mi vida.

A Efrén porque has dado un giro positivo a mi vida. Gracias por compartir conmigo tus conocimientos, amor y sobre todo... gracias por tu paciencia (que sé que te cuesta trabajo).

A mis padres Martín y Eduviges y a mis hermanos Martín, Poncho y Beto, porque lo que soy se lo debo a ellos.

## Resumen

Beatriz Arellano Reynoso. COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y BACTERIOLOGÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Brucella melitensis* EN CAPRINOS VACUNADOS E INFECTADOS. Bajo la dirección de: Efrén Díaz Aparicio, Alfredo Sahagún Ruiz, Víctor R. Tenorio Gutiérrez y Francisco Suárez Güemes.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los alcances del PCR como método diagnóstico, comparándolo con el estudio bacteriológico, para la detección de *Brucella melitensis* en muestras de tejidos de caprinos vacunados e infectados. Se probaron diferentes protocolos de extracción de ADN y posteriormente se utilizó este ADN para llevar a cabo tres metodologías de PCR con dos juegos de iniciadores diseñados a partir del gen *omp2* de *B. melitensis*. Estas metodologías fueron: PCR 1, con un juego de iniciadores que amplifica una banda de 940 pb; PCR 2, con un juego de iniciadores que amplifica una banda de 193 pb y PCR 3, que es un PCR anidado que utiliza ambos juegos de iniciadores en dos reacciones. Se determinó que el mejor método de extracción fue el de detergente CTAB y fenol, el cual propició una alta sensibilidad cuando se utilizó el PCR 3. Este protocolo de extracción de ADN y el PCR 3 se utilizaron para hacer la comparación del estudio bacteriológico con la técnica de PCR a partir de muestras de tejidos de caprinos divididos en cinco grupos experimentales. Los resultados fueron analizados con una prueba de concordancia de Kappa usando una tabla de contingencia de 2 x 2, para determinar si existía concordancia significativa entre los dos tipos de diagnóstico. Se determinó la sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR utilizando como prueba de referencia a) a la bacteriología y b) Asumiendo que todos los animales de los grupos desafiados y con serología positiva eran positivos. Los resultados obtenidos muestran que no hay concordancia entre los dos diferentes métodos diagnósticos; sin embargo, la técnica de PCR detectó animales positivos que a la bacteriología resultaron negativos de los grupos 2 y 5, los cuales habían sido desafiados. El hecho de que algunas muestras sean positivas al PCR y negativas a la bacteriología puede ser debido a la presencia de ADN de bacterias muestras o no cultivables en la muestra. Tomando como prueba de referencia a la bacteriología la sensibilidad del PCR fue muy baja, sin embargo, ésta resulta mayor a la sensibilidad de la bacteriología si se comparan ambas técnicas tomando como positivos a todos los animales desafiados. Estos resultados indican que la sensibilidad del PCR anidado propuesto en esta investigación es adecuada, sin embargo se deben hacer modificaciones para mejorar tanto la sensibilidad como la especificidad de la técnica.

Palabras clave: Brucelosis, caprinos y PCR.

## Summary

Comparison between the PCR and bacteriology techniques for the diagnosis in vaccinated and infected goats.

The objective of the present work was determined the scopes of the PCR technique as a diagnostic method, comparing it with the bacteriological study for the detection of *B. melitensis* in vaccinated and infected goat tissues samples. It was used the reference 16 M *B. melitensis* strain and the spleen of a guinea pig inoculated with a mexican field strain in order to assay different extraction protocols and thereafter to use them to carry out three PCR methodologies with two sets of primers designed from *B. melitensis* omp2 gene. These PCR methodologies were: PCR 1 with a set of primers that amplifies a 940 bp band, PCR 2 with a set of primers that amplifies a 193 bp band and PCR 3 wich is a nested PCR that uses both sets of primers in two reactions. It was determined that the best extraction method was with the CTAB detergent and phenol, the one wich resulted in a high sensibility with the nested PCR. This extraction protocol and nested PCR protocol were use to make the comparison between bacteriology study and the PCR technique as of six different goat tissues samples grouped in five groups of animals five each one: 1. Vaccinated with the *B. melitensis* Rev 1 strain, challenged with a mexican field strain and with the positive bacteriological isolation. 2. Vaccinated, challenged and with the negative bacteriological isolation. 3. Negative control group. 4. Challenged and with positive bacteriological isolation. 5. Challenged and without bacteriological isolation. The results were analyzed with a conformity test of kappa using a contingency table of 2 x 2 to determined if exists meaningful between the two tipes of diagnosis. It was determined the sensibility and the specificity of the test using as reference a) the bacteriology technique, and b) Assuming all goats from challenged groups as positives. The obtained results show that there is no conformity between the two diferent diagnostic methods; however, PCR technique detected positive animals that to the bacteriology resulted negative from the groups 2 and 5, those which had been challenged. In all challenged groups the PCR detected more samples as positives than bacteriology test; nevertheless, the specificity of the nested PCR technique was 70%, since it detected nine samples as positives in the negative control group (group 3). Assuming all challenged groups as positives, sensibility of the nested PCR was 80% for group 1, 79.3% for group 2, for group 4 was 53.3% and 83.3% for group 5, while for the bacteriology 76. 6% for group 1 and 33% for group 4. Using bacteriology as a reference test, the nested PCR showed an average sensibility of 67% for groups 1 and 4, while the average specificity from all groups was 31.4%

The fact that some samples are positive by the nested PCR and negative by bacteriology could be due to the presence of DNA from dead bacteria or no cultivable bacteria in the sample. This is an advantage for the nested PCR technique, since a positive culture is only obtained if viable and cultivable bacteria are present. The results showed that the sensibility of the test is adequate, but work has to be done to improve specificity.

Keywords: brucellosis, goat and PCR diagnosis.



## Tabla de contenido

<b>Realización del trabajo</b>	<b>II</b>
<b>Financiamiento</b>	<b>II</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>III</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>IV</b>
<b>Resumen</b>	<b>V</b>
<b>Summary</b>	<b>VI</b>
<b>Tabla de contenido</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de abreviaturas y siglas utilizadas</b>	<b>IX</b>
<b>I.- Introducción</b>	<b>1</b>
Biología del organismo	3
Prevención y control	4
Técnica de PCR	6
Utilización de la técnica de PCR para el diagnóstico de <i>Brucella</i>	8
<b>Justificación</b>	<b>10</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>10</b>
<b>Objetivos</b>	<b>10</b>
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
<b>II.- Material y Métodos</b>	<b>12</b>
Grupos de animales	12
Vacunación, desafío y sacrificio de animales	13
Colección de muestras de tejido	13
Estudio serológico	13
Estudio bacteriológico	14
Evaluación de los métodos de ruptura celular y extracción de ADN a partir de suspensiones de <i>B. melitensis</i> y del bazo de cuyes infectados con <i>B. melitensis</i>	16
Extracción de ADN de otros géneros bacterianos y del órgano de un cuye sano	19
Extracción de ADN de tejido de cabras	20
Cuantificación del ADN	20
Técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa	20

Evaluación del producto amplificado	23
Evaluación del PCR anidado con diferente concentración de ADN	24
Análisis Estadístico	24
<b>III.- Resultados</b>	<b>26</b>
Estudio serológico	26
Estudio bacteriológico	26
Extracción de ADN	27
Cuantificación del ADN	33
Resultados de los ensayos de PCR realizados con ADN de bacterias diferentes a <i>B. melitensis</i> , bazo de cuye negativo y diluciones de ADN de <i>B. melitensis</i>	33
Resultados del aislamiento bacteriológico y del PCR anidado evaluado en los tejidos de caprinos	34
Resultados de la sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR anidado aplicada al ADN de caprinos	38
<b>IV.- Discusión</b>	<b>41</b>
Estudio bacteriológico	41
Comparación de los métodos de ruptura de células y extracción de ADN para realizar las técnicas de PCR a partir de suspensiones de <i>B. melitensis</i>	41
Comparación de los métodos de ruptura de células y extracción de ADN para realizar las técnicas de PCR a partir de diluciones de bazo de cuye inoculado experimentalmente con <i>B. melitensis</i>	44
Ensayos de PCR realizados con ADN de las bacterias <i>V. cholerae</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. gallinarum</i> y <i>S. pullorum</i>	47
Comparación del PCR anidado con 200 ng ó 1µl de ADN, aplicado a los tejidos de caprinos	48
Comentarios finales	52
<b>V.- Apéndices</b>	<b>53</b>
Apéndice 1. Métodos de extracción de ADN	53
Apéndice 2. Soluciones y reactivos utilizados	60
Apéndice 3. Tablas	61
<b>VI.- Literatura consultada</b>	<b>79</b>

## Lista de abreviaturas y siglas utilizadas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
C	Grados Celsius
cbp	Cuanto baste para
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetil amonio
DHP	Dilución habitual de la prueba
DNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Acido etilendiamino tetracético.
ELISA	Inmunoensayo Enzimático
Fc	Fijación del complemento
kDa	Kilodaltones
LPS	Lipopolisacárido.
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSF	Solución salina fisiológica estéril
TBE	Tris-Borato-EDTA
U	Unidades
UI	Unidades internacionales
UFC	Unidades formadoras de colonias
g	gramos
µg	microgramo
ng	nanogramos
pg	picogramos
fg	fentogramos
µl	microlitro
mM	milimoles
µM	micromoles

## I.- Introducción

La brucelosis es una enfermedad del grupo de las zoonosis que afecta a los animales domésticos, particularmente cabras, bovinos y cerdos, y que en determinadas circunstancias puede transmitirse al hombre. Esta enfermedad es importante no solamente desde el punto de vista médico, sino por las graves pérdidas económicas que causa a la industria ganadera. Esta infección constituye un problema de carácter mundial, cuya importancia ha ido imponiéndose a pesar del lamentable descuido que se le ha tenido en muchos países (Acha et al, 1977; Ruiz, 1986).

La enfermedad en México continúa siendo uno de los problemas zoonosarios que mayormente impactan a la economía pecuaria nacional y a la salud pública. El primer aislamiento de *Brucella* se llevó a cabo en 1887 por David Bruce, pero tuvieron que transcurrir casi 20 años para que Zammit determinara que las cabras eran la fuente de infección a través de sus productos lácteos que se expendían sin pasteurizar ni hervir en la isla de Malta (López et al, 1991; Ruiz, 1986).

En México, el primer aislamiento del agente lo realizó Pláceres en 1921 en el estado de Puebla. Los primeros reportes formales de infección en humanos aparecieron a finales de los años treinta (López et al, 1991).

La brucelosis causada por *Brucella melitensis* es considerada la más relevante en el país por el gran número de casos humanos que genera, con tasas de 2.12 a 4.77 por cada 100,000 habitantes, para 1980 y 1990 respectivamente (López, 1996). La bacteria además de ser patógena para el hombre, en el ganado caprino se encuentra diseminada en todo el territorio nacional, sobre todo en las zonas áridas y semiáridas, ya sea dentro de sistemas de producción controlados o en forma de rebaños nómadas que se mueven en áreas extensas en busca de alimento o como parte integral de actividades de traspato. Si bien, *B. melitensis* afecta principalmente a los caprinos y en menor grado a los ovinos, es también fácilmente transmitida al ganado bovino que tiene contacto con esta especie. La importancia de la brucelosis en las cabras radica en las mermas económicas que ocasiona a través de la pérdida de cabritos y baja en la producción láctea, sin embargo, el mayor impacto resulta de la enfermedad en el hombre por el alto costo del tratamiento, la pérdida de horas de trabajo, costos de hospitalización y diagnóstico entre otros (Acha et al, 1977; López et al, 1991; Ruiz,

1986). Tan solo en 1997 se reportaron 3387 casos de brucelosis en México (Epidemiología, 1998), aunque la cifra se considera inferior a la realidad ya que la sintomatología del padecimiento no es específica y puede ser fácilmente confundida; también se ha reportado que en México se registran 30 defunciones cada año que tienen como causa directa de muerte la brucelosis<sup>1</sup>.

A pesar de lo anterior, a la brucelosis caprina no se le ha dado la importancia que realmente merece y casi toda la atención ha sido dirigida hacia el problema en el ganado bovino. Existen pocos datos actualizados sobre la situación de la enfermedad en caprinos, sin embargo, en el aspecto sanitario la brucelosis es uno de los principales problemas que afectan directamente la productividad; se ha calculado que tan solo por problemas reproductivos, representa para la ganadería nacional una pérdida de 22 millones de pesos anuales<sup>1</sup>. En los caprinos esta enfermedad ha perjudicado el valor de los productos lácteos, ya que la gente piensa que al consumirlos se enfermará; además de las pérdidas de cabritos debido a los abortos, que a su vez incrementan los costos de producción. De acuerdo a estimaciones de la Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis bovina y Brucelosis (CONETB), la prevalencia de la brucelosis caprina puede llegar a ser hasta del 12.9% en zonas endémicas.

A partir de 1993 se instituyó oficialmente la Campaña Nacional contra la Brucelosis Animal en México y se publicó en el Diario Oficial de la Federación el acuerdo por el cual se establece en todo el territorio nacional, con carácter obligatorio, general y permanente (CONASA, 1994).

El número estimado de cabezas de ganado caprino en 1991 fue de 10 millones y la cobertura de vacunación y diagnóstico no alcanzó el 1% del total. En 1993 esta cobertura aumentó solamente al 3% (CONASA, 1994; CONASA, 1995). En 1997 el Centro de Estadística Agropecuaria reportó un total de hembras vacunadas de 182,115 cabezas (Datos de la CONETB no publicados, 1997).

En México, la única vacuna disponible para caprinos es la cepa viva atenuada de *B. melitensis* Rev 1 desarrollada por Elberg en 1955. Esta vacuna es de una cepa lisa obtenida a partir de una cepa dependiente de estreptomycin de *B. melitensis*. Es de baja virulencia para

---

<sup>1</sup> Datos obtenidos del suplemento Lunes en la Ciencia, del Periódico La Jornada, 26 enero de 1998.

pequeños rumiantes, altamente antigénica y no revierte a patógena por pasajes continuos. Su uso está contraindicado en cabras gestantes ya que provoca abortos y puede persistir en nódulos linfáticos y eliminarse por leche durante 2 ó más lactaciones. Otro efecto indeseable es que los animales vacunados dan resultados positivos a las pruebas serodiagnósticas comunes, hecho que dificulta el buen desarrollo de los programas de control y erradicación de la enfermedad (Alton, 1992; Baer et al, 1971; CONASA, 1994; Schurig, 1994).

### **Biología del organismo**

*Brucella* es una bacteria cocobacilar gram negativa, aerobia, catalasa, oxidasa y ureasa positivas, algunas especies requieren de CO<sub>2</sub> para su desarrollo, especialmente en aislamiento primario. Se desarrolla entre 20-40 C, pero siendo su temperatura óptima de crecimiento 37 C (Corbel et al, 1984; Moyer y Hausler, 1991).

Los estudios de hibridación de ácido desoxirribonucleico (ADN) han puesto de manifiesto una gran similitud entre las distintas especies lisas, que se pueden agrupar en una sola especie genómica: *B. melitensis* (Verger et al, 1985). Para efectos prácticos, el subcomité de Taxonomía de *Brucella* mantiene seis especies nominales dentro del género: *B. melitensis* (con tres biotipos), *B. abortus* (con siete biotipos), *B. suis* (con cinco biotipos), *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*; aunque recientemente se han aislado cepas de animales marinos, por lo que se está considerando clasificarlas como una nueva especie (Corbel, 1997). Las cuatro primeras presentan las características de superficie propias del fenotipo liso ("smooth" o S) común a muchos gram negativos. Por el contrario las dos últimas se asemejan a *Haemophilus*, *Bordetella*, o *Neisseria* en cuanto que carecen de un auténtico lipopolisacárido (LPS) de tipo S (Corbel et al, 1984; Hitchcock et al, 1986). Por semejarse a los auténticos mutantes rugosos (R) de las especies lisas, se las conoce como especies rugosas naturales de *Brucella*.

Una revisión de componentes estructurales del género *Brucella* revela peculiaridades con respecto de muchos otros gérmenes gram negativos, como lo es su envoltura celular (Cherwonogrodzky et al, 1990; Martin y Hancock, 1990; Moriyón et al, 1987).

La envoltura celular de *Brucella* se distingue de las de otras gram negativas por ser resistente a la acción de detergentes y al ácido etilendiamino tetracético (EDTA). También lo es a la acción de la polimixina B, a la proteólisis por enzimas y a la digestión con lisozima. La molécula más abundante es el LPS o antígeno "O" específico, un polisacárido central y el lípido A. El LPS es una molécula que se encuentra expuesta hacia el exterior de la membrana externa, orientación que facilita la inducción de anticuerpos dirigidos contra el antígeno "O" y el oligosacárido central, que son de gran valor en el diagnóstico de la brucelosis y en la identificación serológica de las especies de *Brucella*. El antígeno "O" polisacárido de *B. abortus* 1119-3 está constituido de un homopolímero lineal de unidades de D-manopiranosil, 4-6 didesoxi, formamido ligadas por enlaces alfa 1-2 (López et al, 1991).

La estructura del polisacárido "O" de *B. melitensis* es también un homopolímero de D-manopiranosil, 4-6 didesoxi, 4-formamido (o perosamina) en apariencia similar al de *B. abortus*. Esta similitud estructural explica la reacción cruzada que existe entre estos microorganismos (Bundle and Perry, 1985; Cherwonogrodzky et al, 1990).

### **Prevención y control**

Los programas de control de la brucelosis se basan en pruebas diagnósticas, medidas profilácticas y sanitarias. La vacunación es una herramienta importante para interrumpir la difusión de la brucelosis. Sin embargo, la vacunación sólo disminuye el riesgo de contagio, sin eliminarlo por completo. Además, debe estar integrada en un programa de control que contemple el diagnóstico y medidas sanitarias (Blasco, 1990 a).

Se han utilizado contra la brucelosis una amplia variedad de vacunas, sin embargo, ahora la generalidad de los programas se basan en el uso de vacunas vivas atenuadas. Actualmente la única vacuna utilizada para el ganado ovino y caprino es la cepa atenuada de *B. melitensis* Rev 1, que induce una respuesta serológica semejante a la de la infección natural (Jiménez de Bagües et al, 1991).

La ocurrencia y persistencia de anticuerpos en el suero después de la vacunación es una desventaja del uso de la vacuna ya que puede existir interferencia en la identificación de animales infectados. En la persistencia de las respuestas serológicas posteriores a la

vacunación convencional (vía subcutánea, dosis completa) de cabritas existen discrepancias en los datos de distintos autores, ya que podría oscilar entre cuatro y veinte meses (FAO/OMS, 1986; Mancera et al, 1992). La existencia y persistencia de anticuerpos es debidas a diversos factores tales como la edad, dosis y tiempo posvacunal. Los tipos de pruebas usadas y la interpretación de resultados son muy importantes; al usar la vacunación con dosis reducida ( $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^4$  UFC.) en cabras adultas estas resultan negativas a las diversas pruebas serológicas entre los 3 y 7 meses después de la vacunación (Alton, 1972, 1979; Díaz et al, 1984).

El diagnóstico serológico se basa en la demostración de la presencia de anticuerpos específicos a antígenos de *B. melitensis*. Para ello se han aplicado una gran variedad de pruebas serológicas. Desde el punto de vista práctico, las pruebas con las que se obtienen mejores resultados son la Fijación del Complemento (FC) y al ELISA indirecto. La prueba de tarjeta con el antígeno de rosa de bengala, a una concentración celular del 3%, es utilizada como tamiz ya que tiene una sensibilidad del 98% y es fácil de realizar en el laboratorio o en el campo, además tiene la ventaja de ser económica (CONASA, 1994). El aislamiento del agente etiológico constituye el diagnóstico directo confirmatorio.

El empleo conjunto de las técnicas serológicas, bacteriológicas y la eliminación de los animales infectados del hato, disminuyen la incidencia de la enfermedad; sin embargo, hay ocasiones en que las pruebas diagnósticas ya mencionadas no concuerdan entre sí, confundiendo al propietario y volviéndolo renuente al sacrificio de los animales.

Recientemente se han sugerido métodos moleculares rápidos como herramientas de diagnóstico tales como hibridación con sondas genéticas, uso de enzimas de restricción y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Ficht et al, 1996; Herman et al, 1992; Hussein, 1993; Leal et al, 1992; O' Hara et al, 1985; Romero et al, 1995). Estos métodos hacen posible detectar diferencias muy pequeñas de cepas estrechamente relacionadas entre sí, como es el caso de género *Brucella*. La técnica de PCR detecta y multiplica una secuencia específica de ADN de la bacteria de la cual sospechamos y se puede realizar a partir de muestras de tejido y muestras clínicas como sangre, leche, orina y saliva (Brisson- Noël et al, 1990; Erlich et al, 1990, Fekete et al, 1992; Leal et al, 1995).



## Técnica de PCR

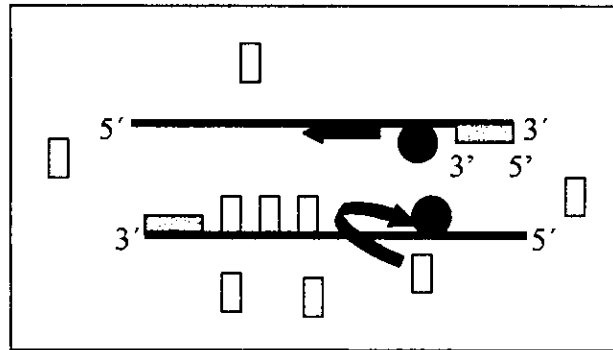
La técnica de PCR es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN, usando dos iniciadores los cuales son complementarios a un segmento de ADN molde en sus dos extremos, además de nucleótidos en exceso, la enzima Taq polimerasa, iones de  $Mg^{++}$  y una serie de ciclos repetitivos que incluyen: Desnaturalización de la doble cadena de ADN, unión de los iniciadores a los extremos del fragmento de ADN y la extensión de estos iniciadores sobre el ADN molde por la polimerasa termoestable, resultando en la acumulación exponencial de un fragmento específico cuya dimensión está definido por los finales 5' de los iniciadores. Ya que el producto de extensión sintetizada en un ciclo puede servir como molde del siguiente, el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo. Así, 20 ciclos de PCR resulta en una amplificación de un millón de veces (Erlich, 1989; Innis et al, 1990).

Para esta técnica se necesitan los siguientes reactivos y equipo en general:

El ADN que contiene el fragmento que queremos amplificar y que servirá de molde.

Los iniciadores que son fragmentos de ADN, de aproximadamente 20 pares de bases y son complementarios al extremo 3' de cada una de las dos cadenas del ADN molde. Una Taq polimerasa, enzima obtenida de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* y que resiste altas temperaturas sin desnaturalizarse. dNTPs: Deoxinucleótidos trifosfato (deoxiguanosin trifosfato dGTP, deoxicitocin trifosfato dCTP, deoxiadenin trifosfato dATP y deoxitimidin trifosfato dTTP), estos serán tomados por la Taq polimerasa para formar una nueva cadena de ADN. Todo lo anterior se mezcla en una solución amortiguadora que contiene iones de  $Mg^{++}$  para que la reacción se lleve a cabo adecuadamente.

Además se requiere de un termociclador, este aparato puede hacer variar las temperaturas de cada paso de la reacción de una forma muy rápida. Se necesita de una temperatura de 94 C por 20 s para la desnaturalización del ADN, es decir, la doble cadena se abre para que posteriormente se unan los iniciadores a una temperatura de 55 C por 20 s; y por último la extensión o síntesis de ADN a partir del extremo 3' de los iniciadores se lleva a cabo a una temperatura de 72 C por 30 s. Estas temperaturas se repiten con un total de 30 ciclos o más, según las características del ADN blanco como la cantidad de G + C en el fragmento a amplificar (Figura 1).



**Figura 1. Representación esquemática de la técnica de PCR, donde:**

- Taq polimerasa
- Iniciador
- dNTP
- ADN blanco

La técnica de PCR es muy específica, ya que solamente se amplifican los fragmentos de ADN delimitados por los iniciadores, no importando si hay otro tipo de ADN presente. El producto de amplificación del PCR se evalúa posteriormente en un gel de agarosa que hace evidente el segmento específico de un determinado tamaño en pares de bases (pb), de ADN. El PCR es muy sensible, partiendo de la teoría que puede detectar desde una sola molécula de ADN, sin embargo, se han encontrado obstáculos para amplificar pequeñas cantidades de ADN en muestras clínicas, por lo que se han hecho diversas modificaciones con el fin de obtener los resultados deseados, una de estas modificaciones es el PCR anidado, el cual consiste en llevar a cabo dos reacciones de PCR, la segunda a partir del producto de amplificación de la primera, ya sea con los mismos

iniciadores, o con otros diferentes que amplifican un producto interno y más pequeño que el primero (Leal et al, 1992, Matar et al, 1996, Gilbert et al, 1997).

Para que la reacción se lleve a cabo en forma adecuada, primero se debe estandarizar la técnica según la aplicación que se le vaya a dar. Se deben alicuotar los reactivos en cantidades pequeñas, usar pipetas limpias y puntas nuevas, separar físicamente las reacciones ya realizadas de las que todavía no se hacen para evitar contaminaciones con ADN de otros tubos e incluir siempre un testigo negativo y uno positivo.

### **Utilización de la técnica de PCR para el diagnóstico de *Brucella***

En el caso del género *Brucella*, existen diferencias en la secuencia de ADN del gen *omp2* específicas de especie (Ficht et al, 1996; Hussein, 1993). El locus *omp2* está compuesto de dos genes muy relacionados entre sí: *omp2a* y *omp2b*, que codifican para proteínas del tipo de las porinas de 33 y 36 kDa, respectivamente. Los dos genes *omp2a* y *omp2b* comparten aproximadamente el 85% de homología de ADN, aunque este último solamente se ha logrado expresar en el laboratorio y no en forma natural. De esta forma, se han empleado las diferencias en sus secuencias para generar sondas específicas e iniciadores para PCR que se pueden utilizar para distinguir entre las diferentes especies de *Brucella* por medio de hibridación con una región común en el gen *omp2a* seguido de su amplificación por medio de la técnica de PCR. Esta variación del locus *omp2* entre las especies permite que el género *Brucella* se divida en dos grupos:

1. - El grupo de *B. abortus* b5 y *B. melitensis*
2. - El grupo de *B. canis*, *B. ovis*, *B. suis* y *B. neotomae*.

En una primera reacción de PCR con 3 diferentes o iniciadores, *Brucella abortus* b5 y *B. melitensis* amplifican un producto de 940 pares de bases (pb), pero el grupo de *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis* y *B. suis* producen un fragmento de 440 pb, debido a las diferencias que existen entre especie en el gen *omp2a*. Cada especie de *Brucella* del grupo *B. canis*, *B. suis*, *B. ovis* y *B. neotomae* se puede diferenciar en forma independiente por medio de una segunda reacción de PCR. La *B. melitensis* y *B. abortus* requieren de un análisis con la enzima de restricción *Pst* 1 para diferenciarlas entre sí (Hussein, 1993).

Varios investigadores han experimentado con la técnica de PCR enfocada al

diagnóstico de la brucelosis. Algunos han utilizado una fracción del gen *omp2* de *Brucella* para amplificar fragmentos de diferentes tamaños que inclusive pueden diferenciar entre especies de *Brucella* (Ficht et al, 1996; Hussein, 1993). Leal et al. (1995) ha utilizado este mismo gen para elaborar iniciadores muy sensibles que amplifican un fragmento de 193 pb. Aplicando esta técnica a muestras clínicas como sangre y leche, los autores lograron amplificar ADN de *Brucella* a partir de menos de 10 unidades formadoras de colonias/ml. Por otra parte, diferentes autores han diseñado iniciadores específicos para *Brucella* a partir de la secuencia de inserción IS6501. Con esta técnica han logrado amplificar ADN de menos de 10 brucelas (Ovahrini-Bettache et al, 1996). Matar et al. (1996), diseñaron un PCR anidado que amplifica una banda de 223 pb, a partir de una secuencia de ADN que codifica para una proteína de 31 Kilodaltones (KDa). Este PCR se diseñó para ser utilizado en muestras de sangre de pacientes con infección aguda o crónica de brucelosis y detecta hasta 60 fg de ADN de *Brucella* ó 20 de unidades formadoras de colonias.

## **Justificación**

Las técnicas actuales para la determinación de una infección por *Brucella spp.* se basan en métodos indirectos como el encontrar anticuerpos contra la bacteria en suero, y en métodos directos, donde el aislamiento e identificación bacteriológica son las pruebas confirmatorias. Sin embargo, la bacteriología puede presentar falsos negativos ya que requiere que los microorganismos estén viables y accesibles para poder ser cultivados; asimismo, depende de la técnica que se use, el volumen que se tome y repeticiones de la muestra; además es una técnica laboriosa, cara y de alto riesgo para el técnico. Esta investigación planteó la evaluación de la técnica de PCR para proponerla como un método diagnóstico de *B. melitensis*, debido a que puede ser más sensible que la bacteriología, así como más rápida y segura.

## **Hipótesis**

La utilización de la técnica de PCR permite la identificación de caprinos infectados por *Brucella melitensis*, mismos que al estudio bacteriológico resultan negativos.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar los alcances del PCR como método diagnóstico, comparándolo con el estudio bacteriológico, para la detección de *Brucella melitensis* en muestras de tejidos de caprinos vacunados y/ o infectados.

### **Objetivos específicos**

1.- Establecer el método de extracción de ADN que permita el adecuado funcionamiento de la técnica de PCR aplicada a suspensiones de cultivos puros de *B. melitensis* y a tejidos de cuyes inoculados experimentalmente con *B. melitensis*.

2.- Conocer la cantidad mínima de unidades formadoras de colonias de *B. melitensis* que detecta la técnica de PCR.

3.- Evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR comparándola con el estudio bacteriológico.

4.- Comparar las técnicas de bacteriología y PCR para poner de manifiesto a *B. melitensis* en tejidos de caprinos a) no vacunados y b) vacunados con *B. melitensis* Rev 1; y posteriormente desafiados con una cepa de campo mexicana biotipo 1 de *B. melitensis*.

## II.- Material y Métodos

### Grupos de animales

Se trabajó con cinco grupos de cinco animales cada uno, integrados de la siguiente manera:

- I. Caprinos adultos vacunados con la cepa de *B. melitensis* Rev 1, desafiados con una cepa de campo mexicana de *B. melitensis*, biotipo 1 y con aislamiento bacteriológico positivo en por lo menos una de las muestras de los tejidos, después del desafío.
- II. Caprinos adultos vacunados con la cepa de *B. melitensis* Rev 1, desafiados con una cepa de campo mexicana de *B. melitensis*, biotipo 1 y con resultado negativo al aislamiento bacteriológico a partir de muestras de tejidos, después del desafío.
- III. Caprinos adultos no vacunados, sin desafiar y con resultado de aislamiento bacteriológico negativo a partir de muestras de tejidos.
- IV. Caprinos adultos no vacunados, desafiados con una cepa de campo mexicana de *B. melitensis*, biotipo 1 y con aislamiento bacteriológico positivo en por lo menos una de las muestras de los tejidos, después del desafío.
- V. Caprinos adultos no vacunados, desafiados con una cepa de campo de *B. melitensis*, biotipo 1, y sin aislamiento bacteriológico a partir de muestras de tejido.

Tabla 1 Grupos experimentales de caprinos			
TRATAMIENTOS			
Grupos	Vacunados <sup>1</sup> al día 0 con $1 \times 10^5$ UFC de la cepa Rev 1 de <i>B. melitensis</i>	Desafiados al día <sup>2</sup> 60 con $4 \times 10^5$ UFC con la cepa de campo mexicana biotipo 1 de <i>B. melitensis</i>	Bacteriología (aislamiento de <i>B. melitensis</i> )
1	+	+	+
2	+	+	-
3	-	-	-
4	-	+	+
5	-	+	+

<sup>1</sup> Vía subcutánea

<sup>2</sup> Vía conjuntival

## Vacunación, desafío y sacrificio de animales

Los animales de los grupos I y II fueron vacunados por vía subcutánea con una dosis de  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa vacunal Rev 1 de *B. melitensis*.

Los animales de los grupos I, II, IV y V, fueron desafiados por la vía conjuntival con la dosis de  $4 \times 10^5$  UFC de una cepa de campo mexicana biotipo 1 de *B. melitensis* (a los 60 días después de la vacunación, en caso de los grupos I y II) y se sacrificaron humanitariamente (UFAW, 1967) a los 60 días después del desafío. Los animales del grupo III se sacrificaron humanitariamente al mismo tiempo que los otros grupos.

## Colección de muestras de tejido

Posterior al sacrificio del animal se tomaron de forma aséptica los siguientes nódulos linfáticos y muestras de tejido de la canal: preescapulares, submaxilares, supramamarios, útero, bazo y glándula mamaria. En el caso de los machos del grupo negativo se tomaron los nódulos retrofaríngeos e inguinales. Estas muestras se colocaron en bolsas de plástico estériles y fueron guardados en congelación hasta el momento de la siembra bacteriológica y la extracción de ADN.

## Estudio serológico

Se obtuvieron muestras de sangre a los 0, 30, 60 días posvacunación y a los 0, 30 y 60 días posdesafío en tubos vacutainer sin anticoagulante, dejando reposar la muestra a temperatura ambiente para que se formara el coágulo; después se centrifugaron los tubos a  $800 \times g$  por 10 minutos, se colectó en forma estéril el suero obtenido y se guardó en congelación hasta su uso.

Se realizó el diagnóstico serológico para brucelosis por medio de la prueba de tarjeta con un antígeno comercial<sup>2</sup> de *B. abortus* 1119 a una concentración celular del 3% en una solución amortiguadora de lactato a un pH 3.6. La prueba se hizo en placas de vidrio, depositando 30  $\mu$ l de antígeno y 30  $\mu$ l de suero y agitando lentamente durante cuatro

---

<sup>2</sup>Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE).



minutos (Alton et al, 1988); se consideró una prueba positiva cuando se observó aglutinación.

### **Estudio bacteriológico**

Cada una de las muestras de tejidos antes mencionadas fue flameada con alcohol y se pasaron a bolsas de plástico estériles; los nódulos linfáticos se dejaron completos y del bazo, útero y glándula mamaria se tomaron aproximadamente 10 gramos de tejido. Se agregaron 20 ml de solución salina fisiológica estéril (SSF) por órgano y se trituraron en una maceradora de tejidos<sup>3</sup>. Se tomó de la suspensión de tejido con un hisopo y fue sembrado en un medio sólido selectivo de Farrell (Farrell, 1974; Blasco, 1990 b), e incubado a 37 C con 5-10 % de CO<sub>2</sub> (Alton, 1988). El resto del tejido macerado se guardó en congelación para la extracción de ADN.

Se observaron cuidadosamente las placas inoculadas de medio Farrell, durante 7 días, ya que en algunas ocasiones sólo crece una colonia por placa, vistas desde arriba las colonias se observaron convexas y de un color blanco azulado.

### **Identificación de *B. melitensis***

Se realizaron frotis de los cultivos sospechosos y se tiñeron por el método de Gram. Se sembraron las colonias en estría en placas de agar brucela para verificar la pureza del cultivo y se realizaron las pruebas bioquímicas de producción de ácido sulfhídrico, actividad de ureasa, utilización del citrato y actividad de la oxidasa. (Alton, 1988).

**a) Producción de H<sub>2</sub>S.** Para esta determinación, los cultivos se inocularon en un tubo inclinado de medio tripticasa soya agar y se colocó en la boca del tubo una tira de papel impregnada con una solución de acetato de plomo al 10% sin hacer contacto con el medio. Se incubó bajo condiciones apropiadas durante tres días. El oscurecimiento del papel indicó producción de H<sub>2</sub>S. Un ligero ennegrecimiento de la tira durante los primeros días no fue considerado positivo.

---

<sup>3</sup> Stomacher 400 Seward

**b) Actividad de ureasa.** Se inocularon las cepas aisladas por estría en tubos inclinados de agar con urea, se examinaron después de 15 min, 1 h, 2 h y 24 h. de haber sido inoculados e incubados a 37 C. La mayoría de las cepas de *B. abortus* y *B. melitensis* dan reacciones positivas en 1 h, mientras que *B. suis*, *B. canis* y *B. neotomae* producen una reacción positiva a los 15 min.

**c) Utilización del citrato.** Se evaluó inoculando la bacteria en el medio de citrato con un asa recta, se incubó a 37 C, y se examinó diariamente hasta 7 días para confirmar crecimiento y cambio de color.

**d) Actividad de la oxidasa.** Se determinó colocando 2 a 3 gotas de una solución de dehidrocloruro de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% en una rodaja de papel filtro, sin dejar que el reactivo se secase, se separó el microorganismo de prueba con una varilla de vidrio del medio para extenderse en el papel impregnado. Una reacción positiva estuvo indicada por el desarrollo dentro de 10 seg. de un color púrpura oscura.

#### **Crecimiento en presencia de colorantes**

Las especies de *Brucella* muestran una diferente sensibilidad a varias concentraciones de los colorantes como tionina, fucsina básica y safranina. Se usó agar tripticosa soya que contenía fucsina básica o tionina al 0.1% y que en el medio contenía una concentración final entre 10-40 µg/ml de medio (la concentración exacta requerida para obtener resultados satisfactorios debe ser determinada para cada lote del medio usando cepas de referencia de *Brucella*).

Las placas se dividieron en cuatro cuadrantes y una gota de cultivo fue aplicada en cada cuadrante y estriada cinco veces. Las placas se incubaron a 37 C durante cuatro días. El crecimiento en tres ó más estrías se consideró como resistencia al colorante. El crecimiento en una o dos estrías no se consideró significativo.

### **Serotipificación de *Brucella***

Las brucelas fueron aglutinadas por antisueros monoespecíficos de *B. abortus* y *B. melitensis* ya que pueden estar en forma lisa o rugosa. En un portaobjetos se colocó una gota de la dilución del suero y a cada una de ellas se le adicionó una gota de la suspensión bacteriana y se mezcló con un asa. Se observó si hubo aglutinación en un lapso de un minuto. Se utilizaron testigos de *B. abortus* biotipo 1 y *B. melitensis* biotipo 1.

### **Diferenciación de cepas vacunales de cepas de campo**

Se diferenció la cepa de *B. melitensis* Rev 1 vacunal de la cepa *B. melitensis* biovariedad 1, por el tamaño de las colonias ya que la cepa vacunal es más pequeña, además no crece en medios que contienen tionina (20 µg/ml), fucsina básica (20 µg/ml), penicilina (5UI/ml), pero se desarrolla en medios contengan estreptomicina (2.5 µg/ml), a diferencia de la cepa de campo de *B. melitensis* biovariedad 1.

### **Fagotipificación de Cepas**

Para el género *Brucella* se han descrito varios bacteriofagos activos. Observándose que estos fagos no lisan a otros géneros de bacterias por lo que son de valor taxonómico para la identificación del género y especie.

Para esto se realizaron las pruebas empleando dos concentraciones: la dilución habitual de la prueba (DHP) y una más concentrada (10000 x DHP). El agar y el caldo que se usó fueron los de tripticosa soya. Los fagos que se utilizaron fueron los siguientes: Tb (Tbilisi), Wb (Weybridge), IZ, y R/C donados por el Dr. José María Blasco de Zaragoza España.

### **Evaluación de los métodos de ruptura celular y extracción de ADN a partir de suspensiones de *B. melitensis* y del bazo de cuyes infectados con *B. melitensis***

Se realizaron diferentes protocolos de ruptura celular y extracción de ADN a partir de suspensiones de *B. melitensis* y del bazo de un cuye inoculado con *B. melitensis*, con el

fin de determinar el método de extracción que permitiera el mejor desempeño de la técnica de PCR y utilizarlo para la ruptura celular y la extracción de ADN a partir de los tejidos de los caprinos.

#### **A) Evaluación de los métodos de ruptura celular y extracción de ADN a partir de suspensiones de *B. melitensis***

Se hicieron nueve diluciones decuples de una suspensión de *B. melitensis* cepa 16 M en SSF estéril, en un volumen final de 40 ml. A estas suspensiones se les efectuó un conteo celular por el método de Miles y Misra para llegar a establecer el número de UFC/ ml (Alton 1988).

Se procedió a realizar la extracción de ADN a partir de cada una de las diluciones. Se tomaron 40 ml de cada dilución de *B. melitensis* para cada protocolo de extracción, se centrifugaron a 13800 x g, se tiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de TE (10:1) (apéndice 2) para continuar con cada metodología de extracción.

Los protocolos de ruptura celular y extracción de ADN utilizados para las diluciones de *B. melitensis* fueron los siguientes: (Descritos en el apéndice 1)

1. - Realización de las diferentes técnicas de PCR directamente del paquete celular, sin extracción de ADN, el cual sirvió como control de las diferentes extracciones.
2. - Ruptura de las células con arena estéril y vortex. Un minuto de agitación en vortex y un minuto de descanso colocando los tubos en hielo, con tres repeticiones por tubo.
3. - Sonicado de las muestras a 30 micrones<sup>4</sup>; se realizaron ocho repeticiones por tubo con un minuto de sonicado y un minuto de descanso, manteniendo los tubos en hielo para evitar el calentamiento de las muestras.
4. - Extracción fenólica (Sambrook et al, 1989).
5. - Extracción con tierra de diatomeas (Boom et al, 1990).
6. - Extracción con el paquete comercial "Gene releaser<sup>5</sup>", siguiendo las indicaciones del producto.

---

<sup>4</sup> Sonicador MSE, 30 micrones.

<sup>5</sup> Bioventures, Inc.

#### 7. - Extracción fenólica con el detergente CTAB (Ausubel et al, 1995).

El ADN obtenido a partir de los diferentes tratamientos aplicados a las suspensiones de brucelas en sus diferentes diluciones fueron evaluadas con las técnicas de PCR que se describen posteriormente. Con base en los resultados observados se utilizaron algunos de los métodos de ruptura y extracción para evaluarlos con el bazo de cuye infectado con *B. melitensis*. En algunos casos se combinaron los métodos de ruptura de células con los de extracción de ADN, con el fin de incrementar la recuperación de ADN.

#### **B) Evaluación de los métodos de ruptura celular y extracción de ADN a partir del bazo de cuyes infectados con *B. melitensis***

Se inoculó un cuye clínicamente sano con  $1 \times 10^9$  UFC/ ml de la cepa 16 M de *B. melitensis*, por vía intraperitoneal y se sacrificó a los 15 días posinoculación; se extrajo el bazo en forma aséptica, se flameó y se maceró en 10 ml de SSF. De este macerado se realizaron nueve diluciones decuples, con un volumen final de 15 ml y se llevó a cabo el aislamiento y el conteo bacteriológico por el método de Miles y Misra (Alton et al, 1988). Se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para corroborar que la cepa que se aisló fuera la misma del desafío. Las diluciones de las muestras se hicieron en tubos de polipropileno<sup>6</sup> y se inactivaron en baño maría a 90 C por 15 minutos. A las diluciones del tejido de cuye se les agregó un volumen de solución de tripsina- versene (apéndice 2) y se incubó por 1 ó 2 horas a temperatura ambiente y en agitación suave, ya que al inactivarlos se coagulaban, formando masas compactas que dificultaban la extracción.

Se usaron 2 ml de cada una de las diluciones del bazo de cuye inoculado con *B. melitensis* para aplicar los siguientes protocolos de extracción (Amplia descripción en el apéndice 1):

1. - Ruptura de los tejidos con arena estéril y vortex. Un minuto de agitación en vortex y un minuto de descanso, con tres repeticiones.
2. - Extracción fenólica (Sambrook et al, 1989).

---

<sup>6</sup> Falcon

3. - Sonicado de las muestras y extracción con el paquete comercial "Gene releaser" En este protocolo se trabajaron solamente 10 µl del macerado siguiendo las indicaciones del productor.

4. - Tratamiento con solución de lisis, seguido de ocho repeticiones de un minuto de sonicación a 30 micrones en hielo, alternando con un minuto de descanso. Finalmente se realizó extracción con tierra de diatomeas (Boom et al, 1990) a partir de 100 µl del sonicado.

5. - Sonicado de las muestras como se indicó en el punto 4, posteriormente extracción con tierra de diatomeas.

6. - Tratamiento con solución de lisis, posteriormente sonicado de las muestras como se indicó en el punto 4 y finalmente extracción fenólica con el detergente CTAB (Ausubel et al, 1995).

7. - Sonicado de las muestras como se indicó en el punto 4; seguido de extracción fenólica con el detergente CTAB.

### **Extracción de ADN de otros géneros bacterianos y del órgano de un cuye sano**

Se realizó la extracción de ADN con el método fenólico, a partir del bazo de un cuye clínicamente sano y de cultivos puros de las bacterias *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella typhi*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Escherichia coli* ETEC y *Vibrio cholerae* (donados por el laboratorio de Bacteriología del CENID-Microbiología, INIFAP y el laboratorio de Microbiología Molecular de la FMVZ, UNAM) que sirvieron como control negativo en la amplificación por la técnica de PCR. El ADN de tejido negativo sirvió para saber si interfería con la prueba. En cuanto a las bacterias se utilizaron para comprobar si había reacción cruzada, ya que están relacionadas filogenéticamente con el género *Brucella* o comparten algunos genes.

## **Extracción de ADN de tejido de cabras**

Los resultados anteriores sirvieron para establecer que para la ruptura celular y extracción de ADN de los tejidos de los diferentes grupos de caprinos, el método de sonicado y Fenol-CTAB era el adecuado. Esta extracción se realizó a partir de 2 ml del macerado del tejido.

## **Cuantificación del ADN**

Posterior a la extracción de ADN se cuantificó la cantidad obtenida en ng/ $\mu$ l de cada muestra: ADN concentrado de *B. melitensis*, tejidos de caprino, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*. La cuantificación se realizó en un fluorómetro, siguiendo las instrucciones del fabricante<sup>7</sup> con dos repeticiones por muestra y obteniendo el promedio.

## **Técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa**

Las técnicas de PCR descritas se basan en la utilización de iniciadores que forman parte del gen *omp2* de *Brucella melitensis*. Se evaluaron tres diferentes protocolos de PCR con dos juegos de iniciadores. El primer protocolo incluye una reacción de PCR con un juego de tres iniciadores (PCR 1), desarrollados por el Dr. Thomas Ficht, de la Universidad de Texas A & M; estos permiten la amplificación un fragmento de 940 pares de bases (Ficht et al, 1996). El segundo protocolo se realizó con dos iniciadores (PCR 2), desarrollados por el Dr. Juan Pablo Martínez Soriano del INIFAP y que amplifican un fragmento de 193 pares de bases (Leal et al, 1995). El tercer protocolo consistió en un PCR anidado para el cual se tomó 1  $\mu$ l a partir de la reacción de PCR 1, como fuente de ADN blanco, para agregarlo a una segunda reacción basada en los iniciadores del PCR 2 que permiten la amplificación del fragmento de 193 pares de bases.

La combinación de estas dos técnicas resulta en lo que se denomina PCR anidado, el cual permite aumentar la sensibilidad de la prueba detectando ADN de *Brucella* a partir de muestras clínicas con una limitada cantidad de bacterias ( Matar et al, 1996).

---

<sup>7</sup> DyNA Quant 200, Hoefer

Las premezclas para las reacciones de PCR se realizaron en una campana de seguridad clase II, en un sitio diferente de donde se realizaron las extracciones para evitar la contaminación con ADN extraño a la muestra.

Las muestras de ADN de las diluciones de *B. melitensis* y de los tejidos de cuyes obtenidas de las diferentes metodologías de extracción antes descritas, se trabajaron con los tres protocolos de PCR, en los casos de PCR 1 y PCR 2 se utilizó 1 µl de ADN de cada muestra. El ADN de los tejidos de caprinos se trabajaron solamente con el PCR anidado, ya que se determinó como el método más sensible.

Para cada metodología de PCR se evaluó también el ADN de las otras bacterias usadas como control negativo. Debido a que en el PCR anidado se observó reacción cruzada del ADN de *B. melitensis* con el ADN de algunas de las bacterias antes mencionadas, amplificando inclusive una banda del mismo tamaño que la esperada para *B. melitensis*; se procedió a evaluar diferentes concentraciones de ADN de *B. melitensis* y el de las otras bacterias diluyéndolas en agua mili Q estéril. Se hicieron las diluciones 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:20000 y 1:40000 a partir de 238 ng/µl tanto de ADN de *B. melitensis* como de las bacterias que amplificaban para corroborar hasta qué concentración amplificaba con el PCR anidado.

#### a) Reacción 1 (PCR 1)

Se realizó en un volumen final de 50 µl con los siguientes reactivos:

Solución amortiguadora de PCR (1.0 mM Tris-Cl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8.3)

100 µM de cada dNTP<sup>8</sup>.

200 nM de cada iniciador.

2 U de Taq polimerasa<sup>9</sup>.

La cantidad necesaria del ADN a evaluar, ya sea 1 µl ó 200 ng en el caso del ADN a partir de los tejidos de caprinos.

Se hizo una premezcla, incrementando la concentración de reactivos de acuerdo al número de muestras que se trabajaron. La premezcla contenía solución amortiguadora, dNTPs,

---

<sup>8</sup> Boheringer mannheim.



iniciadores y Taq polimerasa; posteriormente se agregó a un microtubo de 500  $\mu$ l la cantidad necesaria para cada muestra, más agua mili Q estéril cbp 49  $\mu$ l. El ADN se agregó al final. Se microcentrifugó brevemente y finalmente se añadieron 40  $\mu$ l de aceite mineral estéril.

El programa en el termociclador<sup>10</sup> fue el siguiente:

Una desnaturalización inicial a 94 C por 5 min , seguido de 32 ciclos a 94 C por 30 s, 58 C por 30 s, 72 C por 30 s; y una extensión final a 72 C por 15 minutos.

Secuencia de los iniciadores de esta reacción:

5'-GTTATCTCGCCTTTACCG -3'

5'-CTCGGATCGTAAAGGCT-3'

5'-ATCGTGTAATCGTTGTCAAC-3'

#### **b) Reacción 2 (PCR 2)**

Se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l con los siguientes reactivos:

Solución amortiguadora de PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 9.0, 0.1% Tritón X-100).

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

200  $\mu$ M de cada dNTP

150 nM de cada iniciador

2.0 U de Taq polimerasa<sup>7</sup>

1 $\mu$ l de ADN de la muestra

Se microcentrifugó brevemente y se añadieron 40  $\mu$ l de aceite mineral estéril.

El programa en el termociclador fue como sigue:

Una desnaturalización inicial a 94 C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94 C por 60 s, 60 C por 60 s y 72 C por 60 s, y una extensión final a 72 C por 3 min.

Secuencia de los iniciadores de esta reacción:

5'-GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA-3'

5'-ACCAGCCATTGCGGTCCGTA-3'

---

<sup>9</sup> Biotecnologías Universitarias, UNAM, México.

<sup>10</sup> PTC- 100 Programmable Thermal Controller, M. J. Research, Inc

### c) Reacción 3 (PCR Anidado)

Se realizó de la misma forma que el PCR 2, excepto que en lugar de agregar 1  $\mu$ l de ADN de la muestra, se agregó 1  $\mu$ l del producto de la primera reacción.

### Evaluación del producto amplificado

Se evaluó la calidad del producto amplificado por electroforesis en un gel de agarosa 1.0 % (peso/ vol. en TBE 0.5 x).

Una reacción positiva fue aquella que presentó bandas de 940 pb en el gel de agarosa, después del primer PCR; y una banda de 193 pb, después del segundo PCR y del PCR 3 o anidado, comparándolas con el marcador de peso molecular.

### Preparación del gel de agarosa

Se disolvió 1% de agarosa<sup>11</sup> en una solución de TBE 0.5 x y se calentó hasta ebullición. Cuando la solución estuvo a una temperatura aproximada de 40 C se le agregó bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) y se vació en el molde en la cámara de electroforesis horizontal<sup>12</sup>. Una vez que gelificó se agregó a la cámara solución TBE 0.5 x hasta cubrir ligeramente el gel.

Se mezclaron de 5  $\mu$ l de la muestra con 1  $\mu$ l de solución de carga y se colocó en el pozo (Erlich, 1989). Se utilizó además uno de estos marcadores de peso molecular en alguno de los pozos del gel: ADN del bacteriófago Lambda digerido con la enzima *Hind III*, para comparar el producto de 940 pb y el plásmido pUC 18 digerido con la enzima *Hae III*<sup>13</sup>, para comparar el producto de 193 pb.

Una vez concluida la electroforesis a 50-70 volts, el gel se observó sobre un transiluminador de luz ultravioleta<sup>14</sup>. Se tomaron fotos del gel con una cámara para fotografías instantáneas<sup>15</sup>.

---

<sup>11</sup> GIBCO BRL

<sup>12</sup> Horizon 58, Life Technologies, Gibco BRL

<sup>13</sup> Sigma

<sup>14</sup> Foto/ Prep1. Fotodyne

## Evaluación del PCR anidado con diferente concentración de ADN

Una vez que se determinó que el método de extracción más adecuado para el mejor funcionamiento de la técnica de PCR era el de sonicado, seguido de la extracción con Fenol-CTAB, se intentó mejorar la sensibilidad de la prueba incluyendo una cantidad determinada de ADN; ya que además se observó que una cantidad excesiva de ADN en el PCR puede inhibir la reacción. Por este motivo se probaron las muestras de ADN extraídas con el método antes señalado de los tejidos de caprinos y las bacterias gram negativas (estas últimas extracciones con el método de fenol solamente) con el PCR anidado incluyendo aproximadamente 200 ng de ADN en la primera reacción (Leal et al, 1995) y para la segunda reacción 1 µl de la primera reacción como ADN blanco.

### Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados con una prueba de concordancia de Kappa usando una tabla de contingencia de 2 x 2, para determinar si existía concordancia significativa entre los diferentes tipos de diagnóstico (Thompson et al, 1988).

Asimismo, se determinó la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas: estudio bacteriológico y técnica de PCR, utilizando las siguientes fórmulas: (Riegelman et al, 1992)

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{verdaderos positivos} \times 100}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos} \times 100}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}}$$

El estudio de sensibilidad y especificidad se realizó:

1. Analizando al PCR tomando como referencia a la bacteriología.

---

<sup>15</sup> Polaroid Mp4+. Fotodyne.

2. Analizando a la bacteriología y al PCR tomando a los animales desafiados de los grupos I, II, IV y V, y con serología positiva como animales positivos.

#### **Variables del estudio**

1. - Aislamiento e identificación de *B. melitensis*: Variable cualitativa nominal.
2. - Amplificación de un fragmento del genoma de *B. melitensis* por la técnica de PCR: Variable cualitativa nominal.
3. - Diagnóstico serológico de *Brucella* con la prueba de tarjeta: Variable cualitativa nominal.

#### **Clasificación del estudio**

Este fue un estudio experimental, comparativo, prospectivo y longitudinal.

### **III.- Resultados**

#### **Estudio serológico**

Las cabras de los grupos I (vacunadas, desafiadas y con aislamiento bacteriológico positivo) y II (vacunadas, desafiadas y con aislamiento bacteriológico negativo) comenzaron a presentar anticuerpos contra *B. melitensis* a partir del día 15 posterior a la vacunación, siendo el 100% de los animales positivos en el momento del desafío con la cepa de campo.

Las cabras de los grupos IV (desafiadas y con aislamiento bacteriológico positivo) y V (desafiadas y con aislamiento bacteriológico negativo) fueron serologicamente positivas a partir del día 15 posterior al desafío. Los animales vacunados de los grupos I y II continuaron con serología positiva después del desafío.

Los caprinos del grupo III (testigos negativos) resultaron serologicamente negativos hasta el día del sacrificio.

#### **Estudio bacteriológico**

##### **Aislamiento e identificación de *Brucella***

Se identificó la cepa de campo mexicana biotipo 1 utilizada para el desafío, después de realizar las pruebas bioquímicas correspondientes, de los caprinos de los grupos I (vacunados y desafiados) y IV (desafiados).

No se logró el aislamiento bacteriológico de los animales de los grupos II (vacunados y desafiados) y V (desafiados)

No se aisló ninguna cepa del grupo III, testigo negativo

No se logró el aislamiento de la cepa vacunal Rev 1 en ningún animal vacunado de los grupos I y II.

Se identificó la misma cepa 16 M de *B. melitensis* al realizar las correspondientes pruebas bioquímicas, a partir del bazo macerado del cuye inoculado.

No se aisló ninguna bacteria del bazo de cuye clínicamente sano.

### **Conteo de UFC/ml.**

#### **a) Concentración de la cepa 16 M de *B. melitensis* utilizada para determinar la sensibilidad del PCR**

La concentración de bacterias fue de  $15 \times 10^9$  UFC/ml en el tubo más concentrado y de  $1.5 \times 10^1$  UFC/ml en el tubo más diluido (dilución  $10^{-9}$ ).

#### **b) Cuye inoculado con la cepa 16 M de *B. melitensis***

La concentración de bacterias en el macerado sin diluir fue de  $34 \times 10^4$  UFC/ml. La última dilución donde se observó crecimiento bacteriano fue en la  $10^{-5}$ , donde se calcularon 3.4 UFC/ml. En las diluciones más altas no se observó crecimiento bacteriano.

### **Extracción de ADN**

#### **Resultados de las diferentes metodologías de ruptura de células y extracción de ADN con tres diferentes protocolos de PCR (PCR 1, PCR 2, PCR anidado)**

##### **A) Metodologías utilizadas para las suspensiones de *B. melitensis***

###### **1. - PCR directamente del paquete celular, sin extracción de ADN**

Al realizar el PCR directamente del paquete celular de *B. melitensis*, previamente inactivado con calor a 90 C por 15 minutos y sin efectuar algún método de extracción, la sensibilidad de los PCR 1 y PCR 2 fue baja, ya que amplificaron solamente con  $15 \times 10^6$  UFC/ml, correspondientes a la dilución  $10^{-3}$ , cuando se realizó el PCR anidado (PCR 3) no se obtuvieron resultados positivos,

###### **2. - Ruptura de las células con arena estéril y vortex**

Al romper las células con arena por agitación con el vortex se logró un pequeño aumento en la sensibilidad de los PCR 1 y PCR 2, los cuales consiguieron amplificar hasta

$15 \times 10^5$  UFC/ml de *B. melitensis*, correspondiente a la dilución  $10^{-4}$ . En el PCR anidado se observó amplificación hasta la dilución  $10^{-8}$ , que corresponde a  $15 \times 10^1$  UFC/ml

### **3. - Sonicado de las muestras**

Al aplicar este método para la ruptura de células se observó un aumento en la sensibilidad tanto en el PCR 1 ( $15 \times 10^3$  UFC/ml, dilución  $10^{-6}$ ) como en el PCR 2 ( $1.5 \times 10^1$  UFC/ml, dilución  $10^{-9}$ ), en comparación con los resultados de los tratamientos detallados anteriormente; sin embargo, la amplificación no fue constante en todas las diluciones ni en todas las repeticiones que se realizaron (Figura 2). En el PCR 3 anidado se observó amplificación constante de  $15 \times 10^1$  UFC/ml.

### **4. - Extracción fenólica**

Cuando se utilizó la extracción fenólica no se mejoró la sensibilidad del PCR en comparación con la obtenida por la ruptura con sonicación, ya que solamente se observó amplificación hasta  $15 \times 10^4$  UFC/ml correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ , tanto en el PCR 1 como en el PCR 2. En el PCR anidado se logró amplificar hasta  $1.5 \times 10^1$  UFC/ml correspondiente a la dilución  $10^{-9}$ , sin amplificar en forma constante todas las diluciones.

### **5. - Extracción con tierra de diatomeas**

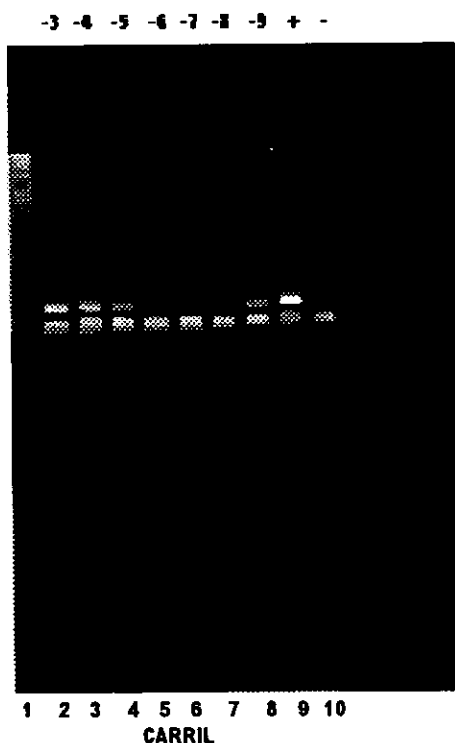
Las extracciones con el método de tierra de diatomeas solamente dieron resultados positivos con la muestra concentrada de *B. melitensis* ( $15 \times 10^9$  UFC /ml), tanto para los PCR 1, PCR 2 y el PCR anidado.

### **6. - Extracción con el paquete comercial Gene releaser**

Las extracciones con el método de Gene releaser solamente amplificaron cuando había más de  $15 \times 10^8$  UFC/ml, tanto para los PCR 1 y PCR 2. El PCR anidado no arrojó resultado positivo alguno.

### **7. - Extracción fenólica con el detergente CTAB**

Utilizando el ADN extraído con esta metodología, en los PCR 1 y PCR 2 se logró amplificar hasta  $15 \times 10^1$  UFC/ml, que corresponden a la dilución  $10^{-8}$ . En el PCR anidado se observó una banda clara en el gel de agarosa hasta  $1.5 \times 10^1$  UFC/ml que corresponden a la dilución  $10^{-9}$ . Sin embargo, presentó el problema de no ser constante la amplificación en todas las diluciones.



**Figura 2.** Amplificación del PCR 2 a partir de las diluciones de una suspensión de *B. melitensis* rotas por sonicación.

Carril 1. - Marcador de peso molecular Lambda *Hind III*.

Carril 8. - Dilución  $10^{-9}$  ( $1.5 \times 10^1$  UFC/ml).

**Figura 3.** Amplificación del PCR anidado de las diluciones del tejido de cuye inoculado con *B. melitensis*.

**Arriba:** Muestras sonicadas, posterior tratamiento con sol. de lisis y extracción con tierra de diatomeas.

Carril 1. - Marcador de peso molecular pUC 18 *Hae III*.

Carriles 2- 11. - Bazo sin diluir ( $34 \times 10^4$  UFC/ml) a la dilución  $10^{-9}$ .

Carril 12. - testigo (+).

Carril 13. - Testigo (-).

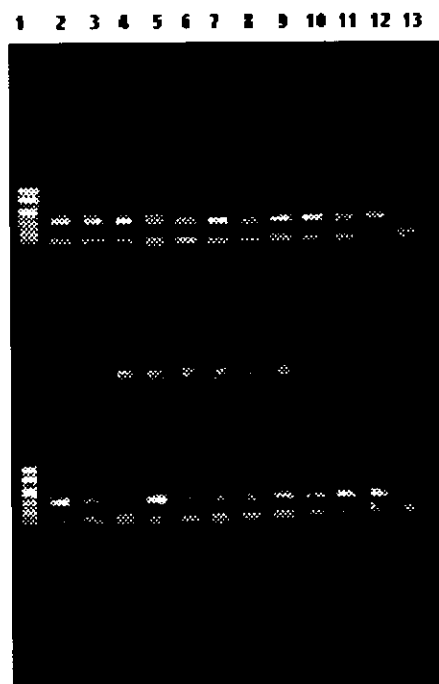
**Abajo:** Muestras tratadas con sol. de lisis, posteriormente sonicadas y finalmente extracción de ADN con tierra de diatomeas.

Carril 1. -pUC18 *Hae III*,

carriles 2- 11. - Bazo sin diluir ( $34 \times 10^4$  UFC/ml) a dilución  $10^{-9}$ .

Carril 12. - testigo (+).

Carril 13. - Testigo (-).





## **B) Metodologías utilizadas para el bazo de cuye inoculado con *B. melitensis***

### **1. - Ruptura de los tejidos con arena estéril y vortex**

No se observó amplificación cuando se utilizaron las muestras de ADN de las diluciones del bazo de cuye en el PCR 1 ó el PCR 2. Sometiendo estas mismas muestras al PCR anidado se observó la banda esperada en el gel solamente en el tejido sin diluir, que representa la cantidad de  $34 \times 10^4$  UFC/ml de *B. melitensis*.

### **2. - Extracción fenólica**

No se observó amplificación alguna cuando se llevó a cabo el PCR 1 ó PCR 2 con el ADN extraído con el método fenólico. El PCR anidado solo evidenció la banda en el gel en la muestra del tejido sin diluir, que corresponde a  $34 \times 10^4$  UFC/ml de *B. melitensis*.

### **3. - Sonicado de las muestras y finalmente extracción con el paquete comercial Gene releaser**

No existió amplificación cuando las muestras de ADN se trabajaron con el PCR 1 ó PCR 2, en el PCR anidado solo se observó amplificación hasta  $3.4 \times 10^1$  UFC/ml

### **4. - Tratamiento con solución de lisis, seguido de sonicado y finalmente la extracción con tierra de diatomeas**

Con el PCR 1 y PCR 2 no se observó amplificación alguna, sin embargo, al realizar el PCR 3 anidado amplifica inconstantemente hasta la dilución  $10^{-9}$ , donde ya no se obtuvo aislamiento bacteriológico de la muestra. Las bandas que se observaron para cada repetición en el gel variaron en intensidad en cada ensayo; es decir, para una determinada dilución la amplificación fue distinta en cuanto a la intensidad de la banda esperada en el gel, en cada intento (Figura 3).

### **5. - Sonicado de las muestras, seguido de tratamiento con solución de lisis y posteriormente extracción con tierra de diatomeas**

En el PCR 1 no se observó banda de amplificación alguna y en el PCR 2 solo presentó amplificación en el tejido concentrado, es decir  $34 \times 10^4$  UFC/ml. El PCR anidado amplificó hasta la dilución  $10^{-9}$  (menos de 3.4 UFC/ml), sin ser constante en todos los ensayos (Figura 3).

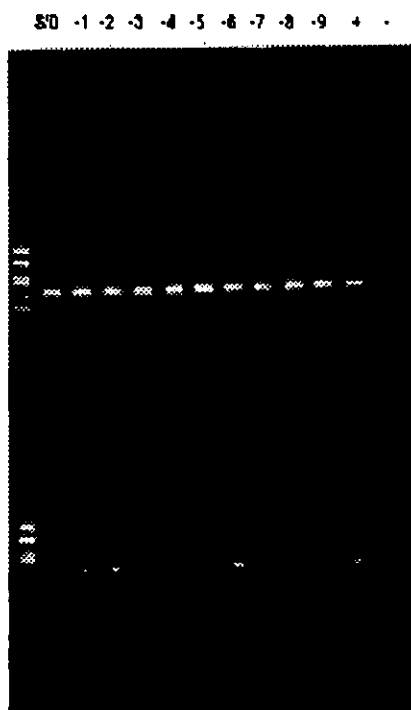
**6. - Tratamiento con solución de lisis, seguido de sonicado y finalmente extracción fenólica con el detergente CTAB**

Se presentó la banda esperada en el gel solo con la muestra de tejido sin diluir ( $34 \times 10^4$  UFC/ml), tanto para el PCR 1 y PCR 2. En el PCR 3 o anidado se observó amplificación hasta la dilución  $10^{-8}$  en forma inconstante (Figura 4).

**7. - Sonicado de las muestras y posteriormente la extracción fenólica con el detergente CTAB**

En el PCR 1 y PCR 2 se obtuvo amplificación solamente en el tejido concentrado con  $34 \times 10^4$  UFC/ml.

El PCR anidado amplificó constantemente hasta la dilución  $10^{-9}$  (menos de 3.4 UFC/ml) (Figuras 4 y 8).



**Figura 4.** – Amplificación del PCR anidado de las diluciones del tejido de cuye inoculado con *B. melitensis*.

**Arriba:** Bazo de cuye sonicado y posterior extracción con el protocolo de Fenol-CTAB.

Carril 1. – Marcador de peso molecular pUC 18 *Hae III*. Carriles 2- 11. – tejido sin diluir ( $34 \times 10^4$  UFC/ml) a la dilución  $10^{-9}$ . Carril 12. – testigo (+). Carril 13. - Testigo (-).

**Abajo:** Bazo de cuye tratado con sol. de lisis, posteriormente sonicado y finalmente extracción con el protocolo de Fenol-CTAB. Carril 1. – Marcador de peso molecular pUC18 *Hae III*.

Carriles 2- 11. – tejido sin diluir ( $34 \times 10^4$  UFC/ml) a la dilución  $10^{-9}$ . Carril 12. – testigo (+).

Carril 13. - Testigo (-).

## Cuantificación del ADN

De la Tabla 2 a la 7 (apéndice 3) se muestran los resultados de la cuantificación de ADN por medio del fluorómetro para los diferentes géneros bacterianos y los tejidos de caprinos.

### Resultados de los ensayos de PCR realizados con ADN de bacterias diferentes a *B. melitensis*, bazo de cuye negativo y diluciones de ADN de *B. melitensis*

No se observó amplificación en los diferentes ensayos cuando se utilizó el ADN del bazo de cuye negativo.

No se observó amplificación de las bacterias *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* O: 9, *Escherichia coli* ETEC, *Salmonella typhi*, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* cuando se aplicaron las técnicas de PCR 1 ó PCR 2, cuando se realizaron con 1µl de ADN total obtenido de la extracción. Sin embargo, cuando se utilizó el PCR 3 se observó amplificación inconstante en los diferentes ensayos habiendo amplificado por lo menos una vez cada una de los géneros referidos. En el gel se observó una banda del mismo tamaño que el esperado para *B. melitensis*; en el caso de *Salmonella typhi* se presentaron hasta 3 bandas más grandes que las esperadas y en cuanto a *Yersinia enterocolitica* en algunos ensayos se presentaron dos bandas diferentes de las esperadas para *B. melitensis* (Figura 5).

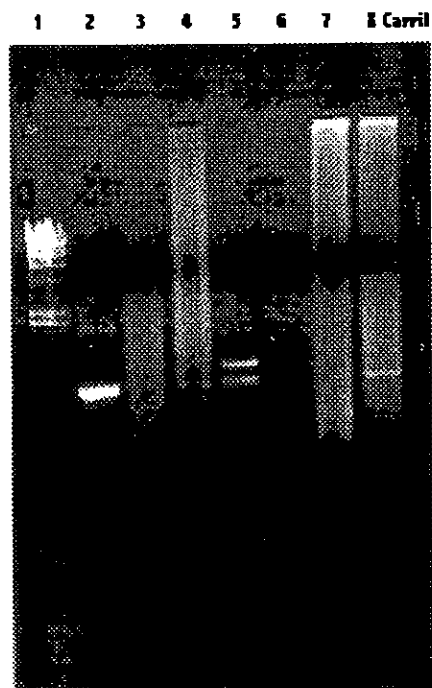
Al igualar las concentraciones de ADN de todas las bacterias incluyendo el ADN de *B. melitensis*, posteriormente hacer diluciones y finalmente evaluarlas con el PCR 1 y PCR 2 no se observó amplificación en *V. cholerae*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. gallinarum* ni *S. pullorum*. El ADN de *B. melitensis* amplificó hasta la dilución 1:100 que corresponde 2.3 ng para el PCR 1 (Figura 6) y en la dilución 1:1000 que corresponde a 230 pg para el PCR 2 (Figura 7). Sin embargo, en los ensayos con el PCR 3, amplificaron todas las muestras de ADN utilizando una concentración de 238 ng. Cuando se diluyó este ADN ya no amplificaron *V. cholerae*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. gallinarum* ni *S. pullorum* en ninguna de las repeticiones.

El ADN de *B. melitensis* amplificó en el PCR anidado hasta la dilución 1:20000 que corresponde a 12 pg de ADN, en todas las repeticiones y en forma constante. No se encontraron resultados positivos en la dilución 1:40000 (Figura 8).

### **Resultados del aislamiento bacteriológico y del PCR anidado evaluado en los tejidos de caprinos**

Las Tablas de la 8 a la 13 (apéndice 3) muestran los resultados obtenidos del aislamiento bacteriológico de los tejidos de caprinos de los diferentes grupos y del PCR anidado, cuando se utilizó 1  $\mu$ l de ADN blanco.

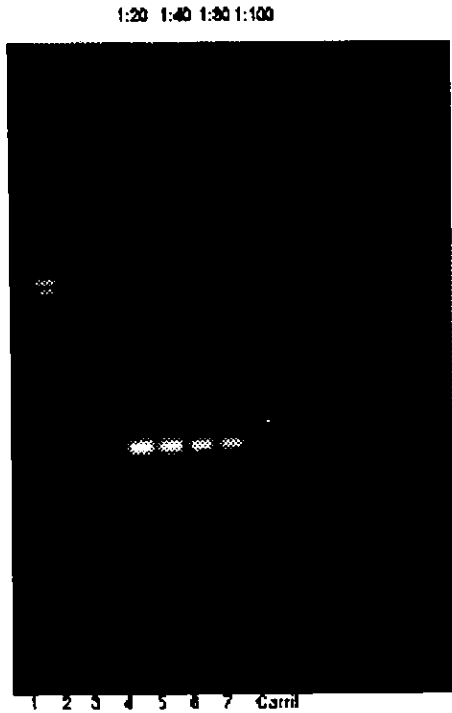
Las Tablas de la 14 a la 19 (apéndice 3) muestran los resultados del aislamiento bacteriológico y del PCR anidado (PCR 3) de los tejidos de caprinos de los diferentes grupos experimentales, cuando se utilizó una concentración de 200 ng de ADN blanco.



**Figura 5.** PCR anidado.

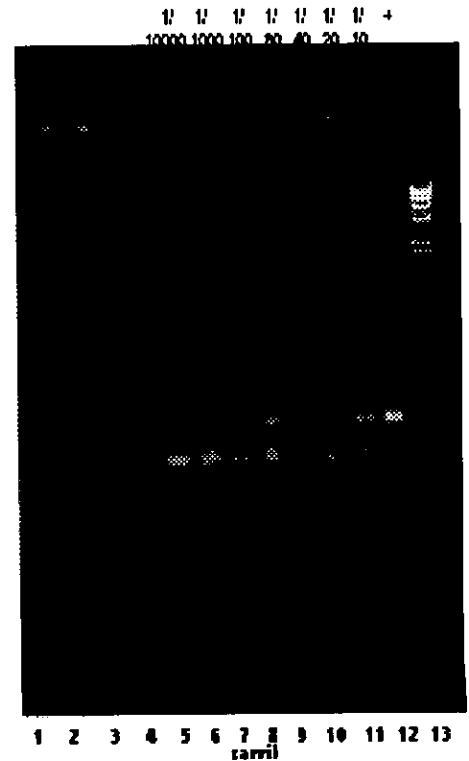
Carril 1. - Marcador lambda *Hind III*. 2. - Testigo (+). 3. - Testigo (-). 4. - Tejido de cuye negativo.

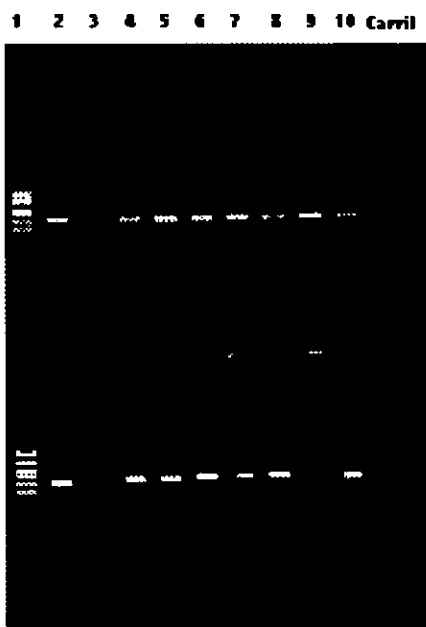
5. - *Salmonella typhi*, 238 ng. 6. - *Yersinia enterocolitica* 238 ng. 7. - Tejido de cuye negativo. 8. - Tejido de cuye positivo.



**Figura 6.** PCR 1 de las diluciones del ADN de *B. melitensis*. Carril 1. – Marcador de peso molecular *Lambda Hind III*. Carril 7. – dilución 1:100= 2.3 ng de ADN.

**Figura 7.** PCR 2 de las diluciones del ADN de *B. melitensis*. De izquierda a derecha: Carril 6. – Dilución 1:1000= 230 pg de ADN. Carril 13. – *Lambda Hind III*.





**Figura 8.** PCR anidado.

**Arriba:** ADN de las diluciones del tejido de cuye tratado con sonicación y posteriormente extraído con el método de CTAB-Fenol. Carril 1. - Marcador de peso molecular pUC 18 *Hae III*. 2. - Testigo (+).

3. - Testigo (-). Carriles 4- 10. - Diluciones  $10^{-3}$  ( $34 \times 10^1$  UFC/ml) a la dilución  $10^{-9}$ .

**Abajo:** Diluciones de ADN de *B. melitensis*. Carril 1. - pUC18 *Hae III*. 2. - testigo (+) = 238 ng de ADN.

3. - Testigo (-). 4. - Dilución 1:10 = 23. 8 ng. 5. - Dilución 1:100 = 2.3 ng. 6. - Dilución 1:1000 = 230 pg. 7. - Dilución 1:10000 = 23 pg. 8. -Dilución 1:20000 = 11 pg. 9. - Dilución 1: 40000 = 5 pg.

10. - Testigo (+) = 238 ng de ADN.



## Resultados de la sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR anidado aplicada al ADN de caprinos

### a) PCR anidado realizado con 1 µl de ADN

Las Tablas 20 y 21 muestran los resultados de sensibilidad y especificidad, tomando como referencia las diferentes pruebas.

Tabla 20		
Sensibilidad y especificidad del PCR anidado, tomando como prueba de referencia a la bacteriología.		
Grupos	Sensibilidad	Especificidad
1	4.34%	71%
2	*-----	69%
3	*-----	100%
4	30%	75%
5	*-----	73%

\*Los grupos II, III y V no presentan resultados de sensibilidad debido a que son grupos sin aislamiento bacteriológico, por lo que no puede ser calculado el valor de sensibilidad.

Tabla 21				
Sensibilidad y especificidad del PCR anidado y bacteriología. *Los grupos desafiados y con serología positiva fueron asumidos como positivos.				
Grupos	PCR anidado		Bacteriología	
	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad
1*	10%	-----	76.6%	-----
2*	31%	-----	0%	-----
3	-----	100%	-----	100%
4*	26.6%	-----	33%	-----
5*	26.6%	-----	0%	-----

**b) PCR anidado realizado con 200 ng de ADN**

Las Tablas 22y 23 muestran los resultados de sensibilidad y especificidad, tomando como referencia las diferentes pruebas.

Tabla 22 Sensibilidad y especificidad del PCR anidado, tomando como prueba de referencia a la bacteriología.		
Grupos	Sensibilidad	Especificidad
1	74%	0%
2	*-----	21%
3	*-----	69%
4	60%	50%
5	*-----	17%

\*Los grupos II, III y V no presentan resultados de sensibilidad debido a que son grupos sin aislamiento bacteriológico, por lo que no puede ser calculado el valor de sensibilidad.

Tabla 23 Sensibilidad y especificidad del PCR anidado y bacteriología. *Los grupos desafiados y con serología positiva fueron asumidos como positivos				
Grupos	PCR anidado		Bacteriología	
	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad
1*	80%	-----	76.6%	-----
2*	79.3%	-----	0%	-----
3	-----	70%	-----	100%
4*	53.3%	-----	33%	-----
5*	83.3%	-----	0%	-----

Los resultados del análisis estadístico de concordancia entre PCR y estudio bacteriológico para cada grupo, muestran que la concordancia de las proporciones negativas y positivas, bajo la prueba de Kappa fue en la mayoría de los casos menor al 30% y solo el grupo control negativo cuando se realizó el PCR con 1  $\mu$ l de ADN presentó una concordancia del 50%. A pesar de no existir concordancia entre ambas pruebas, en la Tabla 14 (apéndice 3) se muestra que la técnica de PCR detectó mayor número de muestras como positivas que la bacteriología.

## **IV.- Discusión**

### **Estudio bacteriológico**

Los resultados encontrados en el estudio bacteriológico de los caprinos son semejantes a los reportados en el trabajo de Renoux et al. (1956), donde estos autores trabajando un gran número de muestras de tejidos de caprinos infectados con *B. melitensis* encuentran que ningún órgano fue positivo al aislamiento de *Brucella* en el 100% de los casos; que de los nódulos linfáticos más próximos al sitio de la inoculación de la bacteria es de donde se aísla el microorganismo con más frecuencia y que cualquier órgano o tejido puede estar infectado.

Los resultados bacteriológicos a partir de los grupos de caprinos infectados experimentalmente en este estudio muestran que de ninguno de los tejidos estudiados se obtuvo un 100% de aislamientos, los nódulos linfáticos submaxilares fueron los que presentaron una mayor frecuencia de aislamientos de brucelas siendo estos nódulos los más cercanos al sitio de inoculación (vía conjuntival), por lo que coincide con lo señalado por Renoux et al, que en los nódulos más cercanos al sitio de la inoculación se tiene la mayor posibilidad de realizar aislamientos. Observaciones similares han sido reportadas por Villegas (1997) y por Mancera (1992), los cuales trabajaron con cabras desafiadas con *B. melitensis* y por Marín et al. (1995) trabajando con ovinos infectados por *B. melitensis* donde aislaron las bacterias de nódulos linfáticos cercanos al sitio de la inoculación con mayor frecuencia.

### **Comparación de los métodos de ruptura de células y extracción de ADN para realizar las técnicas de PCR a partir de suspensiones de *B. melitensis***

El método de extracción de ADN más utilizado para suspensiones celulares y muestras con *Brucella spp* ha sido el de fenol-cloroformo (Baily et al, 1992; Bricker et al, 1994; Fekete et al, 1992; Leal et al, 1995; Martínez et al, 1993). Sin embargo, en ensayos previos a este trabajo no se obtuvieron los resultados deseados en suspensiones bacterianas y tejidos de animales infectados con *B. melitensis*, como son una buena cantidad y calidad del ADN y resultados adecuados del PCR. Por estos motivos se evaluaron diferentes

estrategias de ruptura de células y extracción de ADN, que han sido utilizadas para otros fines con brucelas y/o otros géneros bacterianos como son la fabricación de sondas e identificación de especies.

Al realizar el PCR directamente del paquete celular de *B. melitensis* inactivado con calor a 90 C por 15 minutos y sin efectuar algún método de extracción, la sensibilidad de los PCR 1 y PCR 2 fue baja, ya que amplificaron solamente con  $15 \times 10^6$  UFC/ml, cuando se realizó el PCR anidado (PCR 3) no se obtuvieron resultados positivos, a pesar de que la concentración de la suspensión de brucelas era alta.

Una explicación posible a la pobre amplificación podría ser la presencia de detritus celulares que inhiben la reacción de PCR como son algunos polisacáridos ácidos (Monteiro et al, 1997), estos contaminantes se eliminan al utilizar métodos de extracción que purifican el ADN.

La extracción de ADN con arena y vortex se ha utilizado con éxito para la ruptura de células de *Mycobacterium* (Cornejo et al, 1998). En el presente estudio al romper las células con arena por agitación en el vortex se logró una mayor sensibilidad de los PCR 1 y PCR 2 que consiguieron amplificar hasta  $15 \times 10^5$  UFC/ml de *B. melitensis*. En el PCR anidado se observó amplificación hasta  $15 \times 10^1$  UFC/ml. Lo anterior demuestra que al someter a las brucelas a este tipo de tratamiento se consigue aumentar la sensibilidad de los PCR, posiblemente dada por una mayor ruptura de células que con la inactivación por calentamiento y también una mayor disponibilidad de ADN.

Otros autores han utilizado el método de sonicación para la ruptura de brucelas con buenos resultados (Herman et al, 1992). Un posible inconveniente de la metodología es que se fracciona en porciones pequeñas el ADN, lo que no es adecuado en el empleo de ADN para algunas técnicas moleculares; sin embargo, no interfiere con la técnica de PCR la cual no requiere que el ADN esté intacto.

Al aplicar el método de sonicación para la ruptura de células se observó un aumento en la sensibilidad tanto en el PCR 1 ( $15 \times 10^3$  UFC/ml) como en el PCR 2 ( $1.5 \times 10^1$  UFC/ml), en comparación con los resultados de los tratamientos anteriores, esto podría indicar que hubo mayor exposición y disponibilidad de ADN; sin embargo, la amplificación no fue

constante en todas las diluciones ni en todas las repeticiones que se realizaron, quizá por la presencia de detritus celulares como algunos polisacáridos ácidos (Monteiro et al, 1997).

Cuando se utilizó la extracción fenólica no se mejoró la sensibilidad del PCR en comparación con la obtenida por la ruptura con sonicación, ya que solamente se observó amplificación hasta  $15 \times 10^4$  UFC/ml, tanto en el PCR 1 como en el PCR 2. En el PCR anidado se logró amplificar hasta  $1.5 \times 10^1$  UFC/ml. Esta amplificación no fue constante en todas las repeticiones, ni en todas las diluciones y se atribuye a que no se realizó un tratamiento previo de ruptura que facilita el proceso de extracción (Cornejo et al, 1998).

Las extracciones con los métodos de Gene releaser y el de tierra de diatomeas dieron los mismos resultados entre sí, ya que solamente amplificaron la muestra concentrada de *B. melitensis* ( $15 \times 10^9$  UFC/ml), tanto para los PCR 1, PCR 2 y el PCR anidado. En el método de tierra de diatomeas los reactivos que utiliza esta técnica como el tiocianato de guanidina que es un agente caotrópico, pueden interferir en el correcto desempeño de las pruebas de PCR evaluadas (Monteiro et al, 1997), sin embargo, la extracción de ADN en micobacterias ha sido adecuada para la posterior amplificación con esta técnica (Velázquez et al, 1997). Del método de Gene releaser por ser una técnica comercial se omite la composición de los reactivos utilizados y aunque el fabricante lo recomienda para liberar el ADN de cultivos celulares, cultivos bacterianos, muestras clínicas como la sangre e inclusive tejidos animales, no fue efectivo para la extracción de ADN a partir de células de *B. melitensis*.

El protocolo de extracción con el detergente CTAB y fenol también ha sido utilizado con buenos resultados en la extracción de ADN de *Brucella* spp. para la técnica de PCR (Romero et al, 1995). El fenol es un solvente orgánico que se equilibra a un pH 8.0, el cual permite extraer las proteínas, lípidos y otro tipo de detritus celulares que contienen las células. El ADN por ser un ácido, con pH inferior al del fenol queda separado y disuelto en la fase acuosa.

El CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) es un detergente aniónico que libera el ADN, además, retira los polisacáridos y otras macromoléculas; y permanece en la fase fenólica.

En el caso del presente trabajo, este método fue el que propició una mayor sensibilidad en el PCR trabajando con ADN de suspensiones celulares de *B. melitensis*, alcanzando una similar sensibilidad a la reportada por Romero et al. (1995) ya que en su trabajo logran amplificar el equivalente a 20 UFC, en comparación con este experimento en el cual los PCR 1 y PCR 2 lograron amplificar hasta  $15 \times 10^1$  UFC/ml. El PCR anidado amplificó hasta  $1.5 \times 10^1$  UFC/ml. Sin embargo, presentó el problema de no ser constante la amplificación en todas las diluciones, ya que en los diferentes ensayos hubo saltos en las diluciones, por ejemplo se lograba amplificar en las tres primeras diluciones y no en la cuarta, pero si en las siguientes; pudiera interpretarse como un problema técnico, aunque también puede indicar que hacía falta todavía un tratamiento anterior a la extracción que permitiera mayor ruptura de células y que se expusiera así mayor cantidad de ADN. Este problema se resolvió al utilizar un tratamiento previo con sonicación al trabajar con los tejidos de los cuyes, esta mejora se consigue debido a que la sonicación rompe un gran número de células permitiendo por lo tanto una extracción mejor y más constante de ADN (Herman et al, 1992).

Con base en los resultados de sensibilidad con las diferentes técnicas de PCR se eligieron cuatro métodos de ruptura y extracción de ADN, para ser utilizados en el siguiente experimento de esta investigación, que fue la evaluación de los varios métodos de extracción de ADN a partir de tejidos de cuyes inoculados con *B. melitensis*.

### **Comparación de los métodos de ruptura de células y extracción de ADN para realizar las técnicas de PCR a partir de diluciones de bazo de cuye inoculado experimentalmente con *B. melitensis***

Las bacterias del género *Brucella* son intracelulares, lo que hace difícil el acceso al ADN de éstas a partir de órganos o muestras clínicas (Fekete et al, 1992; Leal et al, 1995). Además hay que tomar en cuenta que la cantidad de copias de ADN de *B. melitensis* que se encuentran en la muestra y se desean reproducir por medio de la técnica de PCR son mínimas en comparación a la cantidad total de ADN del tejido o muestra. Por estos motivos

en algunos casos se recurrió a una serie de metodologías para digerir los tejidos, por ejemplo con tripsina que incide sobre enlaces peptídicos de las proteínas de la matriz extracelular (Lehninger, 1991) y romper el mayor número de células posibles (sonicación o arena y vortex), antes de someterlos a la extracción de ADN.

Las diferentes metodologías que fueron evaluadas no partían de una misma cantidad de macerado ya que se respetaron los protocolos como lo indican los fabricantes o los diferentes investigadores que las han utilizado con esa cantidad precisa y con éxito (Velázquez et al, 1997).

Los protocolos utilizados para romper células y extraer el ADN de la bacteria a partir del bazo de cuye infectado propiciaron una sensibilidad en el PCR de  $34 \times 10^4$  UFC/ml, lo cual se aprecia como una baja sensibilidad. Estos resultados difieren con los obtenidos por Fekete et al, (1992), donde obtienen amplificación del ADN de *B. melitensis* con una sola reacción de PCR a partir de tejidos animales con una carga bacteriológica que va desde  $10^9$  UFC/g de tejido, a 50-100 UFC/g de tejido. La metodología de extracción que utilizaron fue la fenólica (Fekete et al, 1992) la cual tampoco arrojó resultados positivos en el presente trabajo ya que se observó que no era suficiente este tratamiento para obtener la cantidad y calidad adecuada de ADN a partir de tejidos para posteriormente realizar PCR.

Al trabajar con el PCR anidado (PCR 3), no mejoró la sensibilidad de la prueba cuando se utilizó la ruptura de los tejidos con arena estéril y vortex, tampoco cuando se usó ADN obtenido con el método fenólico, ya que solo se observó amplificación cuando había alta concentración de bacterias en el tejido ( $34 \times 10^4$  UFC/ml). Lo anterior puede indicar que además de un buen método de extracción es necesario una lisis más severa, previa a la extracción, aunque el tejido haya sido macerado; ya que en los casos de órganos como los nódulos linfáticos y útero hay gran cantidad de tejido conectivo, lo mismo sucede con la glándula mamaria que además posee gran cantidad de tejido adiposo.

También se observó que con el paquete comercial "Gene releaser" hubo mejoría en cuanto a la sensibilidad al obtenerse amplificación de hasta  $3.4 \times 10^1$  UFC/ml. Cabe mencionar que se hizo la extracción de una cantidad mínima del macerado de tejido (10  $\mu$ l), ya que así lo indica el fabricante y el paquete viene diseñado para trabajar específicamente



con esa cantidad; lo cual podría representar una desventaja en cuanto a los otros métodos de extracción. Por estos motivos no se puede afirmar que el método no es lo suficientemente bueno ya que las otras metodologías parten de una mayor cantidad de tejido.

En cuanto a los protocolos siguientes: a) Tratamiento previo con solución de lisis, sonicado y extracción con tierra de diatomeas. b) Sonicado y extracción con tierra de diatomeas y c) Tratamiento previo con solución de lisis, sonicado y extracción con CTAB y fenol, arrojaron resultados similares ya que aunque la sensibilidad fue alta y amplifican hasta las diluciones  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ , donde no se observó crecimiento bacteriano. Los diferentes ensayos mostraban amplificación de algunas diluciones altas y en otras muestras menos diluidas a veces la amplificación fue nula y como se comentó anteriormente esto puede deberse a una falla técnica o a una falta de ruptura constante de células para que sean liberadas las brucelas y pueda extraerse posteriormente el ADN de las mismas. También se señala el hecho de la desventaja de las extracciones con tierra de diatomeas respecto a la extracción con CTAB-fenol debido a la menor cantidad de material a partir del cual se parte para la extracción (100  $\mu$ l comparado con 2 ml).

Los protocolos en los que se utilizan tierra de diatomeas y CTAB-fenol se probaron con la solución de lisis, antes y después del sonicado para ver si la digestión previa mejoraba la extracción y viceversa y era suficiente someter al tejido a la acción de la tripsina para romper las células eucarióticas y dejar libres a las brucelas que entonces serían blancos de la solución de lisis que contiene lisozima y sacarosa. Como es bien sabido la lisozima incide sobre el peptidoglucano de la pared celular formando esferoplastos más susceptibles de romperse durante los siguientes pasos de la extracción (Conn et al, 1972; Lehninger, 1991). Cuando se utilizó la solución de lisis posterior al sonicado, tanto en el protocolo de tierra de diatomeas y el de CTAB-fenol, las bandas en el gel se observaron más intensas, esto debido a una mayor cantidad de copias multiplicadas, lo cual indica que sí es necesario someter a los tejidos a una ruptura severa por sonicación para que se permita la liberación de las brucelas y sea más adecuada la extracción de ADN.

El hecho de que se observara amplificación en las muestras de tejidos sin aislamiento bacteriológico probablemente se debió a que en la muestra pueden encontrarse

también microorganismos muertos o que son viables pero no cultivables ya que cuando se somete una muestra a un cultivo, las bacterias tienen que adaptarse a crecer en un ambiente que aunque es rico en nutrientes no tiene las características exactas de su hospedero natural (Akkermans et al, 1995; Stevenson, 1978). La técnica de PCR podría ser capaz de amplificar el ADN del microorganismo sin necesidad de que sea viable.

El método con el que se obtuvieron los mejores resultados fue con el de Sonicado y extracción con CTAB-fenol ya que amplifican las muestras hasta la dilución  $10^{-9}$  en forma clara e igual para cada ensayo. Los mismos resultados se observaron con las suspensiones de bacteria. Por este motivo se decidió utilizar esta técnica en la extracción del ADN de los tejidos de caprinos.

### **Ensayos de PCR realizados con ADN de las bacterias *V. cholerae*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. gallinarum* y *S. pullorum***

Se probó una batería limitada de bacterias que sirvieran como testigos negativos ya que se tomó la experiencia de los trabajos anteriores realizados por los autores que elaboraron y probaron los iniciadores que se estudiaron en esta serie de experimentos (Hussenein, 1993; Leal et al, 1995). Dichos autores obtuvieron resultados negativos con estas bacterias y con otras más. El hecho de que se haya encontrado amplificación en el PCR anidado realizado con 1  $\mu$ l de ADN de las bacterias ya mencionadas pudo deberse a la alta concentración del material que se colocó en la reacción, por este motivo se decidieron hacer diluciones del ADN. Se inició con 238 ng por reacción, ya que esa concentración de ADN es la que se disponía del ADN de *B. melitensis*, además esa cantidad entra en el rango utilizado por diferentes autores para diferentes reacciones de PCR donde utilizan de 10 a 250 ng de ADN blanco (Fekete et al, 1992; Leal et al, 1995); cuando se utilizó este rango de ADN no se observó amplificación. Es necesario señalar que en una muestra de tejido proveniente de caprinos, sería poco probable encontrar esta clase de bacterias, aun cuando *E. coli* y *Salmonella* spp afecta a un gran rango de hospederos (Díaz et al, 1987) y menos probable aún encontrarlas en gran cantidad, lo cual sería necesario para que se observara amplificación con estos iniciadores en esta técnica de PCR

## **Comparación del PCR anidado con 200 ng ó 1µl de ADN, aplicado a los tejidos de caprinos**

Aunque se ha desarrollado la técnica de PCR para poner de manifiesto a *Brucella* spp, pocos han sido los investigadores que han intentado adecuarla como método diagnóstico a partir de muestras clínicas (Matar et al, 1996; Leal et al, 1995) y menos aún los que han intentado identificar un fragmento de dicha bacteria a partir de tejidos (Fekete et al, 1992). En esos trabajos los resultados han sido satisfactorios cuando se trabajó con un juego de iniciadores para detectar a *B. abortus* a partir de tejidos maternos y fetales y han obtenido una alta sensibilidad (5 UFC/100 mg de tejido); sin embargo, también afirman que se deben hacer más ensayos y adecuaciones a la técnica antes de proponerla como técnica diagnóstica ya que a menudo también se presenta amplificación inespecífica, mostrando bandas del mismo tamaño que el esperado para una reacción positiva. T. Victor et al. (1993) demostraron la presencia de amplicones contaminantes en un laboratorio que trabaja PCR, que se hace cada vez mayor con el paso del tiempo. Los amplicones no son otra cosa que fragmentos amplificados con anterioridad, no necesariamente el ADN molde que se utiliza como blanco. Estos amplicones se dispersan por todo el laboratorio tan solo con abrir los tubos que contienen la reacción amplificada. Cabe señalar que durante el desarrollo del presente trabajo los testigos negativos sin ADN resultaron negativos, y en las pocas ocasiones en que hubo amplificación inespecífica en estas muestras, con solo repetir las fue suficiente para evitar esta amplificación no deseada; por lo que se descartó la posibilidad de que existiera contaminación por amplicones y se pensó que lo anterior se debió a un mal manejo de las muestras en ese momento.

No existen datos de la utilización de la técnica de PCR para detectar a *B. melitensis* a partir de tejidos de caprinos, tampoco se ha hecho una comparación de la sensibilidad del PCR con la sensibilidad de la bacteriología. En el presente trabajo, con los datos obtenidos de los ensayos con tejido de cuye se observó que el PCR anidado, utilizando primero el PCR 1 y posteriormente el PCR 2, era el adecuado para obtener una alta sensibilidad. El fragmento que genera el PCR 1 de 940 pb es lo suficientemente grande

como para servir de molde al producto del PCR 2 de 193 pb. Sin embargo, cuando se aplicó la metodología descrita al ADN de caprinos, no se obtuvo la sensibilidad esperada, inclusive hubo grupos de animales de los que en la mayoría de sus tejidos se había logrado aislamiento bacteriológico, pero al PCR resultaron negativos. Se pensó entonces en la posibilidad de que la cantidad de ADN era excesiva, ya que así se observó en los geles y no permitía desarrollar en forma adecuada a la técnica. Por experiencia de otros investigadores (Fekete et al, 1992; Leal et al, 1995) y por ensayos realizados con ADN de tejidos de los caprinos con aislamiento bacteriológico positivo, se determinó que la cantidad adecuada para una óptima amplificación era entre 8 y 300 ng de ADN, en este rango la amplificación en el PCR anidado fue constante y clara en todos los ensayos. Por estos motivos se decidió realizar el experimento con los tejidos de caprinos con 200 ng de ADN para realizar el PCR 1 y posteriormente llevar a cabo el PCR 3 como se indicó anteriormente.

Las concentraciones de ADN obtenidas difieren mucho entre muestra y muestra y esto se debió, en el caso de las bacterias a la cantidad de bacterias en cada paquete celular del cual se partió para realizar la extracción. En caso de los tejidos esta diferencia puede deberse a la naturaleza misma de los tejidos, siendo unos más duros y compactos que otros, lo que hace más fácil o más difícil la extracción y esto a su vez se refleja en la obtención de mayor o menor cantidad de ADN.

#### **Comparación de la sensibilidad y especificidad del PCR anidado realizado con 1 $\mu$ l de ADN y 200 ng de ADN de tejido de caprino**

Las pruebas de sensibilidad y especificidad se realizaron tomando como referencia las diferentes pruebas aquí evaluadas ya que en la mayoría de los trabajos de investigación el estudio bacteriológico es la prueba que demuestra la presencia del microorganismo; sin embargo, la técnica de PCR ha demostrado ser efectiva para poner de manifiesto la presencia del ADN bacteriano sin necesidad de que existan bacterias viables en la muestra analizada, por lo que puede resultar más sensible que la prueba de bacteriología.

### **a) Sensibilidad y especificidad del PCR anidado realizado con 1 µl de ADN**

Cuando la técnica de PCR se comparó con la bacteriología bajo estas condiciones, la sensibilidad de la técnica fue muy baja, ya que en los animales de los grupos I y IV, que resultaron con aislamiento positivo, dicha sensibilidad fue del 4 y 30 %, lo que demuestra que no es una buena prueba diagnóstica bajo estas condiciones.

En los grupos con aislamiento negativo II y V, hubo pocos animales detectados como positivos con la técnica de PCR (17 órganos de 59). La especificidad del PCR cuando se hizo con 1 µl de ADN, en los animales testigos negativos del grupo III fue del 100 % ya que no arrojaron resultado positivo alguno y en los demás grupos la especificidad oscila entre el 68 y 73 % lo cual no es muy adecuado para una prueba diagnóstica. (Tabla 18)

Si se toma a todos los animales desafiados como positivos y se determina la sensibilidad y especificidad de la bacteriología y PCR, se observa baja sensibilidad en ambas técnicas y alta especificidad (Tabla 19).

### **b) Sensibilidad y especificidad del PCR anidado realizado con 200 ng de ADN**

La sensibilidad del PCR aumenta considerablemente al realizarse con una cantidad específica de ADN (200 ng); sin embargo, a pesar de esto, tampoco mostró ser la adecuada para una prueba diagnóstica, ya sea cuando se tomó como prueba de referencia diagnóstica a la bacteriología (en promedio 67%), o cuando se asumió que todos los animales desafiados eran positivos (en promedio 73%), aunque en este último caso superó con mucho a la bacteriología, ya que la prueba bacteriológica presentó una sensibilidad promedio de 36%. (Tabla 21)

La especificidad se modificó al realizar el PCR con 200 ng de ADN, disminuyendo en comparación de los resultados obtenidos cuando se trabajaron las mismas muestras pero añadiendo 1 µl de ADN que contiene una mayor concentración de ADN. Además los resultados no fueron los adecuados, ya que en el grupo testigo negativo se presentaron casos positivos al PCR anidado y la especificidad que presentó fue del 70%. Este grupo de caprinos provenía de un hato que estaba libre de brucelas, ya que ha sido monitoreado bacteriológicamente y serológicamente desde el año 1994 con resultados siempre negativos. Sin embargo, en el mes de enero de 1998 se presentó un brote de brucelosis en

dicho hato, presentándose inclusive abortos, con aislamiento bacteriológico a partir de muestras de leche, exudado vaginal y tejidos fetales. Estos hechos podrían indicar que cuando los caprinos del grupo negativo fueron sacrificados la enfermedad se encontraba en periodo de incubación, ya que este periodo en la enfermedad de brucelosis puede variar entre 14 y 180 días, prolongándose hasta la aparición de anticuerpos o de los primeros síntomas (Crespo, 1994).

En el resto de los grupos la especificidad varió del 17% al 50%, lo cual tampoco es adecuado para una prueba diagnóstica.

El hecho de que la especificidad del PCR haya sido mejor cuando se realizó dicha técnica con 1  $\mu$ l de ADN (concentración mayor a 200 ó 300 ng) puede deberse a que en realidad no estuviera funcionando correctamente, ya que el exceso de ADN puede impedir que se lleve a cabo la reacción.

### **Prueba estadística**

Los resultados de la prueba de concordancia de Kappa muestran que entre el diagnóstico con PCR y el estudio bacteriológico no existe una buena concordancia ya que en la mayoría de los grupos este resultado fue menor al 30% que es considerada como muy baja y solo el grupo control negativo presentó una concordancia regular del 50% cuando la prueba de PCR se llevó a cabo con 1  $\mu$ l de ADN; una concordancia perfecta daría como resultado un valor del 100%. Bajo este análisis solo se demuestra que no se obtienen los mismos resultados en ambas pruebas, sin embargo no prueba que sea mejor una que otra con respecto a las muestras que obtuvieron resultados de PCR (+) y bacteriología (-). No se descarta la posibilidad de que al utilizar otros iniciadores la técnica de PCR concuerde con la bacteriología e inclusive pueda superarla.

## Comentarios finales

La técnica de PCR anidado evaluada y practicada a los tejidos de caprinos, no obtuvo resultados tan satisfactorios como cuando se usó en las suspensiones bacterianas o en el tejido de cuye inoculado; sin embargo no se puede afirmar que no sea útil en el diagnóstico de la brucelosis caprina. Así como se ha tenido éxito con la técnica de PCR para el diagnóstico de otras enfermedades que afectan a los animales (Rodríguez, 1997), es posible que la metodología aquí propuesta pueda modificarse en cuanto a las concentraciones de reactivos utilizados y programa en el termociclador para hacerlo útil como prueba diagnóstica y que además presente una sensibilidad y especificidad aceptable. En este trabajo puede mostrarse una mayor sensibilidad de la técnica de PCR que la bacteriología ya que detecta más muestras como positivas. Se propone seguir investigando al respecto, ya que esta técnica es una buena herramienta diagnóstica que se puede implementar en un laboratorio; además tiene la ventaja de poder inactivar las muestras desde un principio, evitando que puedan llegar a infectar a la persona que trabaja en el laboratorio y es posible obtener un resultado en dos o tres días, lo cual no sucede con la bacteriología, ya que un resultado confirmatorio puede tardar hasta 15 días.

El costo por muestra no resulta más elevado que otras herramientas diagnósticas (de 30 a 100 pesos/ muestra) dependiendo de la cantidad de muestras trabajadas.

En este trabajo se pudo corroborar que es posible que la técnica de PCR detecte muestras que a la bacteriología fueron negativas, ya que dichos animales fueron inoculados experimentalmente con *B. melitensis* y se puede asumir que eran positivos a brucelosis.

Algunos de los inconvenientes de esta técnica son la facilidad con la que se pueden contaminar las muestras con ADN externo, que aunado a su alta sensibilidad, puede resultar en falsos positivos. Es necesario que la persona que trabaje esta técnica sea altamente capacitada y minuciosa, como sucede con otras herramientas moleculares. El laboratorio donde se implemente la técnica debe contar con el equipo especializado como lo es el termociclador y centrifugas donde se puedan trabajar con volúmenes muy pequeños (microlitros).

## V.- Apéndices

### Apéndice 1. Métodos de extracción de ADN

El material utilizado para las extracciones fue nuevo y estéril para evitar acarrear ADN ajeno que contamine las muestras.

#### Extracción fenólica-CTAB

Del tejido previamente macerado se tomaron 2 ml, se colocaron en un tubo de polipropileno<sup>16</sup> de 50 ml; de las diluciones de bacterias se tomaron 40 ml de cada una, se inactivaron todas las muestras a 90 C por 15 minutos en baño maría. Las diluciones de bacteria se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron<sup>17</sup> a 13800 x g por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2 ml de TE 10:1. Se llevaron a cabo los siguientes pasos: (Técnica descrita en Ausubel et al, 1995; con modificaciones)

1. - A los tejidos se les agregó un volumen de solución de Tripsina-Versene (apéndice 2).
2. - Se sonicó la muestra a 30 micrones; 1 minuto de sonicado con 1 minuto de descanso, con ocho repeticiones. Se evitó que la punta del sonicador tocara las paredes del tubo. El tubo se colocó en un recipiente con hielo para evitar que se calentaran las muestras. En uno de los protocolos este paso se realizó en tercer lugar, posterior al tratamiento con la solución de lisis (protocolo de extracción número seis)
3. - Se agregaron 5 volúmenes de solución de lisis, y se añadió lisozima (20 mg/ml) a una concentración final de 0.8 mg/ml. Se incubó 1 hora a 37 C.
4. - Se agregó SDS al 10%, a una concentración final de 0.5%.
5. - Se añadió proteinasa K (20 mg/ml), a una concentración final de 0.1 mg/ml; incubando 1 h. a 37 C en baño maría.
6. - Se agregó NaCl 5 M a una concentración final de 0.7 M
7. - Se puso CTAB-NaCl, a una concentración final del 1%; mezclándose e incubándose a 65 C, 10 min.

---

<sup>16</sup> Falcon.



8. - Se agregó 1 volumen de Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se mezcló 10 min y se centrifugó por 5 min a 3500 x g.
9. - Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo, resistente al fenol, sin tomar la interfase.
10. - Se añadió un volumen de Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 (Fenol equilibrado con Tris-HCl, pH 8.0). Se mezclaron 10 min y centrifugaron 5 min/ 3500 x g.
11. - Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.
12. - Se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló suavemente hasta que el ADN precipitó (aproximadamente 15 minutos).
13. - Se centrifugó 15 min a 13800 x g, y posteriormente se tiró el sobrenadante cuidando de no tirar la pastilla y se agregó 1 ml de etanol al 70 %. Se cambió a un microtubo nuevo y estéril.
14. - Se microcentrifugó<sup>18</sup> 5 min a 20000 x g y se tiró el sobrenadante. Se dejó secar.
15. - Se resuspendió en solución amortiguadora TE 10:1, se agregó de 200 a 1000 µl de solución, según el tamaño de la pastilla de ADN. Se guardó a 4 C.

### Soluciones

- Solución de lisis.

15 % Sacarosa

50 mM de Tris base

50 mM EDTA pH 8.0

- CTAB-NaCl.

10% CTAB

0.7 M NaCl

Calentar para disolver

---

<sup>17</sup> Centrifuga Beckman J2-21.

<sup>18</sup> Microcentrifuga Jouan A-14.

### **Extracción fenólica**

1. - Se transfirieron 2 ml del macerado a un tubo de polipropileno con tapa, se inactivó y se le agregaron 10 volúmenes de solución amortiguadora de extracción (TES); se incubó a 37 C por 24 horas.
  2. - Se añadió proteinasa K a una concentración final de 100  $\mu$ l/ml. Se agitó suavemente y se incubó en baño maría a 50 C, por tres horas.
  3. - Se permitió que la solución se enfriara a temperatura ambiente y se transfirió a un tubo de teflón de 50 ml (resistente al fenol) y se agregó un volumen de fenol equilibrado, pH 8.0 y extrajo con inversión suave por 10 minutos a temperatura ambiente.
  4. - Se centrifugó a 3500 x g por 10 min. Con una micropipeta de 1000  $\mu$ l, se tomó la fase acuosa superior y se pasó a otro tubo de teflón. Se repitió la extracción con fenol y centrifugó como se indica arriba.
  5. - Cuidadosamente se tomó la fase acuosa superior con una micropipeta de 1000  $\mu$ l y se pasó a otro tubo de teflón. Se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) y se mezcló por inversión y extrajo de 10-15 min.
  6. - Se centrifugó a 3500 x g por 10 min. Se tomó la fase acuosa superior y se repitió la extracción con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v).
  7. - Se centrifugó a 3500 x g por 10 min. Se tomó la fase acuosa superior y se transfirió a otro tubo.
  8. - Se agregó acetato de sodio a 0.3 M final y se precipitó con dos volúmenes de etanol frío, manteniéndolo a - 20 °C toda la noche.
  9. - Se centrifugó 20 minutos a 13800 x g a 4 C y se desechó el sobrenadante.
  10. - Se lavó con etanol al 70%, frío.
  11. - Se centrifugó 15 minutos a 13800 x g y se desechó el sobrenadante.
  12. - La pastilla se dejó secar y se resuspendió en 200-1000  $\mu$ l de TE (10:1), según el tamaño de la pastilla. Se conservó a 4 C.
- Fueron tomados 5  $\mu$ l para correrlo en un gel de agarosa (1.0 % en TBE 0.5x).

### **Soluciones**

- Solución amortiguadora de extracción (TES)  
10 mM Tris-Cl (pH 8.0)  
0.1 M EDTA  
20 µg/ ml RNAsa pancreática (agregar al momento)  
0.5 % SDS

### **Extracción de ADN con tierra de diatomeas**

Este tipo de extracción se basa en la unión del ADN a las paredes celulares fosilizadas de algas unicelulares llamadas diatomeas, en presencia de altas concentraciones de un agente caotrópico como el tiocianato de guanidina (GuSCN). Este último también ha mostrado ser un poderoso agente en la purificación y detección de ADN y ARN debido a su potencial de lisar células combinado con su potencial de inactivar nucleasas.

1. - Se tomaron 100 µl del tejido macerado, se colocaron en un tubo eppendorf de 1.9 ml y se le agregaron 500 µl de solución amortiguadora de lisis más 25 µl de lisozima (20 mg /ml). Se incubó 30 minutos a 37 C en baño maría. En el protocolo número cuatro, posterior a este paso se realizó sonicado de la muestra. En el protocolo número cinco, el sonicado se llevó a cabo previo a la solución de lisis.
2. - Se agregaron 210 µl SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10% más 8 µl de proteinasa K (10 mg /ml). Se incubó 30 minutos a 37 C, en baño maría.
3. - Se agregaron 950 µl de solución de lisis de tiocianato de guanidina (GuSCN), más 50 µl de tierra de diatomeas; se agitó brevemente en el vortex y se dejó reposando 10 minutos.
4. - Se centrifugó 20 segundos a 15000 g y se tiró el sobrenadante.
5. - Se agregaron 200 µl de solución de lavado y se agitó brevemente en el vortex.
6. - Se centrifugó a 15000 g y se tiró el sobrenadante. Se repitió una vez más el lavado.
7. - Se realizó un lavado con etanol frío al 70%, centrifugando a 15000 x g. Se tiró el sobrenadante.

8. - Se repitió el lavado con etanol frío a -20 C y se centrifugó a 15000 x g por 20 minutos. Se tiró el sobrenadante.
9. - Se hizo un lavado con acetona fría a -20 C. Se tiró el sobrenadante, teniendo cuidado de no tirar la arenilla de diatomeas.
10. - Se secó por una hora a 56 C en estufa o toda la noche a temperatura ambiente.
11. - Eluir el ADN con 60 µl de agua mili Q estéril o TE 10: 1. Se agitó en vortex y se incubó en baño maría a 45- 55 C por cinco minutos.
12. - Se centrifugó a 20000 x g por 10 minutos.
13. - Se retiró el sobrenadante cuidadosamente, sin tomar la arenilla y se pasó a un tubo nuevo, se conservó a 4 C. Este sobrenadante contiene el ADN; antes de hacer PCR se volvió a centrifugar a 20000 x g por 10 minutos para evitar por completo tomar alguna arenilla de diatomea.

### **Soluciones**

- Solución amortiguadora de lisis (1 L)

15% de sacarosa

50 mM de Tris base

50 mM EDTA pH 8.0

- Solución de lisis de GuSCN

10 M de GuSCN.

0.1 M Tris-Cl pH 6.4

0.65% Tritón X-100 (vol./ vol.)

22 mM EDTA

Calentar (60-65 C), no hervir, agitando suavemente para disolver. Almacenar a temperatura ambiente, como máximo por 15 días.

- Solución de lavado de GuSCN

10 M de GuSCN

0.1 M Tris-Cl (pH 6.4).

- Tierra de diatomea

50 ml de H<sub>2</sub>O mili-Q

500 μl de HCl 32% (p/v)

10 g de Celite<sup>19</sup> grado analítico

Agitar en vortex y alicuotar en viales de plástico, no de vidrio ya que se adhiere (agitar constantemente para evitar que se sedimente)

Esterilizar por autoclave.

### **Extracción de ADN con Gene releaser**

Este método de extracción libera el ADN de sangre, tejidos y bacterias. La lisis se lleva a cabo directamente en el termociclador en el mismo tubo en donde se realiza también la amplificación. Se lisa 1 μl en un volumen total de 20 μl y se añaden subsecuentemente los reactivos para iniciar la amplificación. El Gene releaser secuestra los productos de lisis de las células, los cuales podrían inhibir a la polimerasa y permite la adecuada amplificación del ADN blanco.

1. - Se tomaron 10 μl del tejido macerado, se colocaron en un tubo de 0.5 ml y se añadieron 25 μl de TE 10:1.
2. -Se tomó 1 μl del tejido previamente homogeneizado con pequeños golpes de dedo y se transfirió a otro tubo de 0.5 ml
3. - Se resuspendió la mezcla de Gene releaser agitando en el vortex 2-3 segundos.
4. - Se añadieron 20 μl de la suspensión de Gene releaser al tubo con el tejido y se agitó en vortex por 2-3 s.
5. - Se cubrió la mezcla con 50 μl de aceite mineral estéril. El tubo cerrado se colocó en una gradilla de polipropileno o polietileno y esta a su vez en el centro de un horno de microondas.
6. - Se encendió el microondas a la máxima potencia durante 5 minutos.

---

<sup>19</sup> Janssen Chimica, Beerse, Belgium.

7. - Los tubos se colocaron en el termociclador precalentado a 80 C y se permitió que se estabilizara la temperatura de los tubos durante 5 minutos.
8. -Se inició la amplificación en el termociclador con la adición de 80  $\mu$ l de la premezcla con los componentes para el PCR a una concentración 1.25 X.

## Apéndice 2. Soluciones y reactivos utilizados

- **Solución de Tripsina-Versene**

8.0 g NaCl

4 g KCl

0.58 g NaHCO<sub>3</sub>

1.0 g Dextrosa

0.5 g Tripsina

0.2 g Versene (EDTA)

Cbp 1 L agua mili-Q. Esterilizar por filtración.

- **Solución TE 10:1**

10 mM Tris-Cl pH 7.5 a 8.0

1mM EDTA pH 8.0.

- **TBE 5x**

54 g Tris base

27.5 g ácido bórico

20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

cbp 1 L. Esterilizar en autoclave.

- **Solución amortiguadora de carga para el corrimiento de la muestra en gel de agarosa**

0.25% de azul de bromofenol

0.25% de xilencianol F. F

30% de glicerol en agua

Almacenar a 4 C.

### Apéndice 3. Tablas

Tabla 2. Cuantificación del ADN de diferentes bacterias.

Bacteria	ADN, ng/ $\mu$ l
<i>Vibrio cholerae.</i>	472
<i>Escherichia coli</i> ETEC.	831
<i>Yersinia enterocolitica</i> O: 9.	338
<i>Salmonella gallinarum</i> 383.	890
<i>Salmonella typhi.</i>	967
<i>Salmonella pullorum.</i>	977
<i>B. melitensis</i> 16 M.	238



**Tabla 3.** Cuantificación del ADN de los tejidos de los caprinos del grupo I.

Identificación del animal	tejido	ADN, ng/ $\mu$ l
2-04	útero	2656
	bazo	5950
	glándula mamaria	3535
	nódulo (n) preescapular	5938
	n. submaxilar	1275
	n. supramamario	1267
2-14	útero	2383
	bazo	5232
	glándula	5240
	n. preescapular	5242
	n. submaxilar	2888
	n. supramamario	3008
7-09	útero	4982
	bazo	5238
	glándula	3051
	n. preescapular	2914
	n. submaxilar	2133
	n. supramamario	5248
5-07	útero	5226
	bazo	5160
	glándula mamaria	3079
	n. preescapular	5240
	n. submaxilar	5796
	n. supramamario	626
8-50	útero	5756
	bazo	4892
	glándula mamaria	3273
	n. preescapular	3024
	n. submaxilar	90
	n. supramamario	5944

**Tabla 4.** Cuantificación del ADN de los tejidos de caprinos del grupo II.

Identificación del animal	tejido	ADN, ng/ $\mu$ l
0-91	útero	4
	bazo	3693
	glándula mamaria	1291
	nódulo (n) preescapular	1839
	n. precrural	681
3-117	útero	381
	bazo	3
	glándula	1201
	n. preescapular	908
	n. submaxilar	751
	n. supramamario	1890
Nieta	útero	2004
	bazo	929
	glándula	2534
	n. preescapular	2182
	n. submaxilar	873
	n. supramamario	4588
2-06	útero	1879
	bazo	4687
	glándula mamaria	2314
	n. preescapular	7201
	n. submaxilar	2099
	n. supramamario	1516
8-68	útero	5279
	bazo	7202
	glándula mamaria	6159
	n. preescapular	7201
	n. submaxilar	4703
	n. supramamario	6908

**Tabla 5.** Cuantificación del ADN los tejidos de caprinos del grupo III.

Identificación del animal	tejido	ADN, ng/ $\mu$ l
hembra S/N	útero	3840
	bazo	6681
	glándula mamaria	1855
	nódulo (n) preescapular	2123
	n. submaxilar	1701
	n. supramamario	3889
67	útero	486
	bazo	2083
	glándula	234
	n. preescapular	492
	n. submaxilar	894
	n. supramamario	2909
S-18	útero	1057
	bazo	3180
	glándula	173
	n. preescapular	685
	n. submaxilar	1097
	n. supramamario	387
	bazo	6878
Macho 1 S/N	n. preescapular	3704
	n. submaxilar	586
	n. inguinal	3690
	n. retrofaringeo	2412
	bazo	6885
Macho 2 S/N	n. preescapular	2856
	n. submaxilar	2844
	n. inguinal	2242
	n. retrofaringeo	786

**Tabla 6.** Cuantificación del ADN de los tejidos de caprinos del grupo IV.

Identificación del animal	tejido	ADN, ng/ $\mu$ l
07	útero	409
	bazo	1198
	glándula mamaria	420
	nódulo (n) preescapular	1710
	n. submaxilar	768
	n. supramamario	563
0-77	útero	3677
	bazo	6030
	glándula	1629
	n. preescapular	519
	n. submaxilar	409
	n. supramamario	2258
14-A	útero	889
	bazo	1042
	glándula	448
	n. preescapular	2258
	n. submaxilar	2679
	n. supramamario	1353
3-24	útero	4880
	bazo	6019
	glándula mamaria	2223
	n. preescapular	6028
	n. submaxilar	1763
	n. supramamario	1130
17-A	útero	1373
	bazo	2811
	glándula mamaria	1550
	n. preescapular	2267
	n. submaxilar	5226
	n. supramamario	2485

**Tabla 7.** Cuantificación del ADN de los tejidos de caprinos del grupo V.

Identificación del animal	tejido	ADN, ng/ $\mu$ l
11	útero	336
	bazo	2323
	glándula mamaria	583
	nódulo (n) preescapular	656
	n. submaxilar	545
	n. supramamario	1499
93	útero	1300
	bazo	890
	glándula	1154
	n. preescapular	1789
	n. submaxilar	148
	n. supramamario	944
20-A	útero	1946
	bazo	3651
	glándula	3115
	n. preescapular	1416
	n. submaxilar	3534
	n. supramamario	2376
15-A	útero	810
	bazo	2477
	glándula mamaria	2749
	n. preescapular	2119
	n. submaxilar	918
	n. supramamario	648
03-A	útero	1729
	bazo	1321
	glándula mamaria	862
	n. preescapular	2567
	n. submaxilar	1029
	n. supramamario	1146

Tabla 8			
Muestras positivas por bacteriología y PCR utilizando 1µl de ADN			
Grupo	Animales desafiados con serología positiva	PCR anidado, muestras positivas	Muestras positivas a cultivo bacteriológico.
1	+	3/30	23/30
2	+	9/29	0/30
3	-	0/30	0/30
4	+	8/30	10/30
5	+	8/30	0/30

**Tabla 9.** Resultados del estudio bacteriológico y del PCR 1 y PCR 3 utilizando 1 µl de ADN obtenido por sonicado y extracción fenólica-CTAB, de los órganos de los caprinos del grupo I: Vacunados con la cepa Rev 1 de *B. melitensis* y desafiados con cepa de campo biotipo 1 de *B. melitensis*.

IDENTIFICACIÓN	ORGANO	PCR 1	PCR 3 anidado	AISLAMIENTO BACTERIOLOGICO
Cabra 2-04	útero	-	-	-
	bazo	-	-	+
	glándula mamaria	-	-	+
	nódulo(n) preescapular	-	-	+
	n. submaxilar	-	-	+
	n. supramamario	-	-	+
2-14	útero	-	-	-
	bazo	-	-	+
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	-	+
	n. submaxilar	-	-	+
	n. supramamario	-	-	+
7-09	útero	-	-	+
	bazo	-	-	+
	glándula mamaria	-	-	+
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	+
	n. supramamario	-	-	+
5-07	útero	-	-	+
	bazo	-	-	+
	glándula mamaria	-	-	+
	n. preescapular	-	-	+
	n. submaxilar	-	-	+
	n. supramamario	-	+	-
8-50	útero	-	-	-
	bazo	-	+	-
	glándula mamaria	-	-	+
	n. preescapular	-	-	+
	n. submaxilar	-	+	+
	n. supramamario	-	-	+

**Tabla 10.** Resultados del estudio bacteriológico y del PCR 1 y PCR 3 utilizando 1 µl de ADN obtenido por sonicación y extracción fenólica-CTAB, de los órganos de los caprinos del grupo II: Vacunados con la cepa Rev 1 de *B. melitensis* y desafiados con cepa de campo biotipo 1 de *B. melitensis*.

IDENTIFICACION	ÓRGANO	PCR 1	PCR 3 anidado	AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO
Cabra 0-91	útero	+	+	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	+	-
	nódulo(n) preescapular	-	-	-
	precrural	-	-	-
3-117	útero	-	+	-
	bazo	-	+	-
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	+	-
Nieta	n. supramamario	-	-	-
	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	-	-
2-06	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	-	-
	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	+	-
8-68	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	-
	n. supramamario	-	-	-
	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-



**Tabla 11.** Resultados del estudio bacteriológico y del PCR 1 y PCR 3 utilizando 1 µl de ADN obtenido por sonicación y extracción fenólica-CTAB, de los órganos de los caprinos del grupo III: No vacunados y sin desafiar.

IDENTIFICACIÓN	ÓRGANO	PCR 1	PCR 3 anidado	AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO
Cabra Hembra S/N	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	-	-
	nódulo(n) preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	-
	n. supramamario	-	-	-
67	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	-
	n. supramamario	-	-	-
203	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	-
	n. supramamario	-	-	-
212	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	-
	n. supramamario	-	-	-
Macho S/N	bazo	-	-	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	-
	n. inguinal	-	-	-
	n. retrofaríngeo	-	-	-

**Tabla 12.** Resultados del estudio bacteriológico y del PCR 1 y PCR 3 utilizando 1µl de ADN obtenido por sonicación y extracción fenólica-CTAB, de los órganos de los caprinos del grupo IV: No vacunados y desafiados con cepa de campo biotipo 1 de *B. melitensis*.

IDENTIFICACIÓN	ÓRGANO	PCR 1	PCR 3 anidado	AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO
Cabra 07	útero	-	-	-
	bazo	-	-	+
	glándula mamaria	-	+	-
	nódulo(n) preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	+
	n. supramamario	-	+	-
0-77	útero	-	-	-
	bazo	-	-	+
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	+
	n. supramamario	-	-	-
14-A	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	+
	n. supramamario	-	-	-
3-24	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	+	+
	n. supramamario	-	-	+
17-A	útero	-	+	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	+	+
	n. preescapular	-	-	+
	n. submaxilar	-	-	+
	n. supramamario	-	-	-

**Tabla 13.** Resultados del estudio bacteriológico y del PCR 1 y PCR 3, utilizando 1µl de ADN obtenido por sonicación y extracción fenólica-CTAB, de los órganos de los caprinos del grupo V: No vacunados y desafiados con cepa de campo biotipo 1 de *B. melitensis*.

IDENTIFICACIÓN	ÓRGANO	PCR 1	PCR 3 anidado	AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO
Cabra 11	útero	-	+	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	+	-
	nódulo(n) preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	-	-
	n. supramamario	-	-	-
93	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	-	-
20-A	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	-
	n. supramamario	-	+	-
15-A	útero	-	+	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	+	-
03-A	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	-
	n. supramamario	-	-	-

Tabla 14			
Muestras positivas por bacteriología y PCR utilizando 200 ng de ADN			
Grupo	Animales desafiados con serología positiva	PCR anidado, muestras positivas	Muestras positivas a cultivo bacteriológico.
1	+	24/30	23/30
2	+	23/29	0/30
3	-	9/30	0/30
4	+	16/30	10/30
5	+	25/30	0/30

**Tabla 15.** Resultados del estudio bacteriológico y del PCR 1 y PCR 3 utilizando 200 ng de ADN obtenido por sonicación y extracción fenólica-CTAB, de los órganos de los caprinos del grupo I: Vacunados con la cepa Rev 1 de *B. melitensis* y desafiados con cepa de campo biotipo 1 de *B. melitensis*.

IDENTIFICACION	ORGANO	PCR 1	PCR 3 anidado	AISLAMIENTO BACTERIOLOGICO
Cabra 2-04	útero	-	+	-
	bazo	-	+	+
	glándula mamaria	-	-	+
	nódulo(n) preescapular	-	+	+
	n. submaxilar	-	+	+
	n. supramamario	-	+	+
2-14	útero	+	+	-
	bazo	-	+	+
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	-	+
	n. submaxilar	-	+	+
	n. supramamario	-	+	+
7-09	útero	-	+	+
	bazo	-	-	+
	glándula mamaria	-	+	+
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	-	+
	n. supramamario	-	+	+
5-07	útero	-	-	+
	bazo	-	-	+
	glándula mamaria	-	+	+
	n. preescapular	-	+	+
	n. submaxilar	-	+	+
	n. supramamario	-	+	-
8-50	útero	-	+	-
	bazo	-	+	-
	glándula mamaria	-	+	+
	n. preescapular	-	+	+
	n. submaxilar	-	+	+
	n. supramamario	-	+	+

**Tabla 16.** Resultados del estudio bacteriológico y del PCR 1 y PCR 3 utilizando 200 ng de ADN obtenido por sonicación y extracción fenólica-CTAB, de los órganos de los caprinos del grupo II: Vacunados con la cepa Rev 1 de *B. melitensis*, y desafiados con cepa de campo biotipo 1 de *B. melitensis*.

IDENTIFICACIÓN	ORGANO	PCR 1	PCR 3 anidado	AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO
Cabra 0-91	útero	+	+	-
	bazo	-	+	-
	glándula mamaria	-	+	-
	nódulo(n) preescapular	-	-	-
	precrural	-	+	-
3-117	útero	-	+	-
	bazo	-	+	-
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	+	-
Nieta	útero	-	+	-
	bazo	-	+	-
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	+	-
2-06	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	+	-
8-68	útero	-	-	-
	bazo	-	+	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	+	-

**Tabla 17.** Resultados del estudio bacteriológico y del PCR 1 y PCR 3 utilizando 200 ng de ADN obtenido por sonicación y extracción fenólica-CTAB, de los órganos de los caprinos del grupo III: No vacunados y sin desafío experimental.

IDENTIFICACIÓN	ÓRGANO	PCR 1	PCR 3 anidado	AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO
Cabra Hembra S/N	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	+	-
	nódulo(n) preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	-	-
67	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	-
	n. supramamario	-	+	-
203	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	-	-
	n. submaxilar	-	-	-
	n. supramamario	-	+	-
212	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula	-	-	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	-	-
Macho S/N	bazo	-	-	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	-	-
	n. inguinal	-	-	-
	n. retrofaringeo	-	-	-

**Tabla 18.** Resultados del estudio bacteriológico y del PCR 1 y PCR 3 utilizando 200 ng de ADN obtenido por sonicación y extracción fenólica-CTAB, de los órganos de los caprinos del grupo IV: No vacunados y desafiados con cepa de campo biotipo 1 de *B. melitensis*.

IDENTIFICACIÓN	ÓRGANO	PCR 1	PCR 3 anidado	AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO
Cabra 07	útero	-	-	-
	bazo	-	-	+
	glándula mamaria	-	+	-
	nódulo(n) preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	-	+
	n. supramamario	-	+	-
0-77	útero	-	+	-
	bazo	-	-	+
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	+
	n. supramamario	-	-	-
14-A	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	+
	n. supramamario	-	-	-
3-24	útero	-	+	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	+
	n. supramamario	-	+	+
17-A	útero	-	+	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	+	+
	n. preescapular	-	+	+
	n. submaxilar	-	-	+
	n. supramamario	-	-	-



**Tabla 19.** Resultados del estudio bacteriológico y del PCR 1 y PCR 3 utilizando 200 ng de ADN obtenido por sonicación y extracción fenólica-CTAB, de órganos de los caprinos del grupo V: No vacunados y desafiados con cepa de campo biotipo 1 de *B. melitensis*.

IDENTIFICACIÓN	ÓRGANO	PCR 1	PCR 3 anidado	AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO
Cabra 11	útero	-	+	-
	bazo	-	+	-
	glándula mamaria	-	+	-
	nódulo(n) preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	+	-
93	útero	-	-	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	-	-
20-A	útero	-	+	-
	bazo	-	+	-
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	+	-
15-A	útero	-	+	-
	bazo	-	-	-
	glándula mamaria	-	+	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	+	-
03-A	útero	-	+	-
	bazo	-	+	-
	glándula mamaria	-	-	-
	n. preescapular	-	+	-
	n. submaxilar	-	+	-
	n. supramamario	-	+	-

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## **VI.- Literatura consultada**

**Acha N P, Szyfres B.** Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y animales. *Organización Panamericana de la Salud* 1977; Publicación Científica No. 354. Washington, D.C. E.U.A, 6-22.

**Akkermans A D L, Mirza M J, Harmsen H J M, Blok H J, Herron P R, Sessitsch A, Akkermans W M.** Molecular ecology of microbes: A review of promises, pitfalls and true progress. *FEMS Microbiology Reviews* 1995; 15: 185-194.

**Alton G G.** *B. melitensis* Rev 1 and *B. abortus* 45/20 vaccine in goats: Immunity. *Am. J. Res* 1972; 33: 1747-1750.

**Alton G G.** Vaccination of goats with reduced dosis of Rev 1 *B. melitensis* vaccine. *Res. Vet. Science* 1979; 11: 54-59.

**Alton G G, Jones L M, Agnus R D, Verger J M.** Techniques for the Brucellosis Laboratory. *Institute National de la Recherche Agronomique* 1988; Paris, 34-71.

**Alton, G G.** *B. melitensis* Rev 1 and *B. abortus* 45/20 vaccine in goats: Immunity. *Am. J. Vet. Res* 1992; 33: 1747-1750.

**Anónimo.** Report of the International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1988; 38: 450-452.

**Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K.** Short Protocols in Molecular Biology. 3<sup>rd</sup> edition. U. S. A: Wiley, pp 2.11- 2.12, 1995.

**Baer M G, Flores C R, Cortés N A Morales S H.** Comparación de la eficacia de dos vacunas vivas atenuadas contra la brucelosis caprina en México. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 1971; 215-220.

**Baily G G, Krahn B S, Drasar B S, Stoker N G** Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. of Tropical Medicine and Hygiene* 1992; 95 : 271- 275.

**Barrios G H B, Sahagún R A, Lazo G E, Suárez G F.** Selección de proteínas recombinantes a partir de una biblioteca genómica de *Mycobacterium bovis* en el vector Lambda Zap Express. Memorias de la XXXIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 1997, Veracruz, México. 1997: 316.

**Blasco J M** Control y Profilaxis. *Ovis* 1990 a; 8: 51-64.

**Blasco J M.** *Brucella ovis*. En K. Nielsen y J. R. Duncan, editores. Animal Brucellosis, pp. Boca Ratón: *Press. Inc.*, 1990 b: 351-378.

**Boom R, Sol C J A, Salimans M M M, Jansen C L, Wertheim-Van Dillen P M E, Van Der Noordaa J.** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. of Clinical Microbiology* 1990; 28: 3. 495-503.

**Bricker B J, Halling S M.** Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. by PCR. *J. of Clinical Microbiology* 1994; 32: 11. 2660-2666.

**Brisson- Noël A, Lecossier D, Nassif J, Gicquel B, Lévy-Frébault V, Hance A J.** Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of Mycobacterial DNA in clinical samples. *The Lancet* 1989; Nov 4. 1069-1071.

**Bundle D R, Perry M B** Structure and serology of the *Brucella abortus* O- antigen. *Biochem. Soc. Transac* 1985; 13: 980-982.

**Corbel M J, Brinley-Morgan W J.** Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173, En N. R. Krieg y J. G. Holt, editores. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Baltimore: *The Williams & Wilkins Co.* 1984: 377-387.

**Corbel M J.** Recent advances in Brucellosis. *J. Med. Microbiol* 1997, 46 :101- 103.

**Cherwonogrodzky J W, Dubray G, Moreno E, Mayer H.** Antigens of *Brucella*, en K Nielsen y J R Duncan editores. Animal Brucellosis. Boca Ratón: *Press Inc.* 1990: 19-64.

**CONASA.** Perspectivas de la investigación sobre brucelosis caprina. *Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias*; 1994; Acapulco, México. 1994: 515-517.

**CONASA.** Norma y operatividad de la campaña contra la Brucelosis caprina. *Memorias de la IV reunión anual del CONASA*; 1995; México. 1995: 189- 211.

**Conn E E, Stumpf P K.** *Outlines of Biochemistry*. 3a edición. U. S. A: John Wiley & Sons, Inc. 1972: 138, 189.

**Cornejo B J, Sahagún-Ruiz A, Suárez-Güemes F, Thornton Ch G, Chávez- Gris G, Ficht T A, Adams G.** Comparison between the use of C<sub>18</sub>- Carboxypropylbetaine (CB-18) and glass beads as extraction methods for *Mycobacterium bovis* in bovine milk samples. Enviado para su publicación a: *Appl. Environ. Microbiology*, 1998.

**Crespo L F.** Brucelosis ovina y caprina. Office International des epizooties; 1994 Paris, Francia; 103.

- Díaz A E.** Diagnóstico serológico de la brucelosis caprina. Tesis doctoral. Navarra, España. *Universidad de Navarra*. 36, 1993.
- Díaz A E, Jaramillo M L, Aguilar R F, Cárdenas L S.** Aislamiento e identificación de Salmonelas en caprinos de México. *Técnica Pecuaria en México* 1987; 25: 49- 51
- Díaz A E, Prado A F, Ontiveros C M L, Batalla C D.** Evaluación serológica de anticuerpos posvacunales en cabras adultas vacunadas con dosis reducida de Rev 1 en una zona enzótica de brucelosis. *Técnica Pecuaria México* 1984; 47:128-132.
- Erllich H A,** editor. PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification. U.S.A: *Stockton press*, 8-16. 1989.
- Epidemiología. Sistema Nacional de vigilancia epidemiológica.* México, 15: 2 . 14, 1998.
- FAO/OMS. Comité Expertos de Brucelosis,** 6o. Informe Ginebra. *Serie de Informes Técnicos* No. 464, 1986.
- Farrell I D.** The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res. Vet. Sci* 1974; 16: 280-286.
- Fekete A, Bantle J A, Halling S M.** Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest* 1992; 4: 79-83.
- Ficht T A, Hussein H S, Derr J, Bearden S W.** Species -specific sequences at the omp2 Locus of *Brucella* Type strains. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996; 46:1, 329-331.
- Gilbert S A, Timoney P J, McCollum W H, Deregt D.** Detection of Equine arteritis Virus in the semen of carrier stallions by using a sensitive nested PCR assay. *J. of Clin. Microbiol* 1997; 35: 8, 2181-2183.
- Herman L, De Ridder H.** Identification of *Brucella* spp. by using the Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 1992; 58: 6, 2099- 2101.
- Hitchcock P L, Leiven P, Mäkelä H, Rietschel E T, Trittmatter W, Morrison D C.** Lipopolisaccharide nomenclature past, present and future. *J. Bacteriol* 1986; 166:699-705.
- Hussein H S.** Genetic variation Among *Brucella* Species at the omp2 locus. Tesis Ph. D. Vet. Sci. Egypt: *Cairo University*, Egypt. 1993.
- Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J,** editors. PCR Protocols, a guide to Methods and Applications. U. S. A: *Academic Press, Inc.* 399-403, 1990.

**Jiménez de Bagües M P, Marín C M, Blasco J M, Moriyón Y, Gamazo C.** An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjuntival *B. melitensis* Rev 1 vaccination. *Vet. Microbiol* 30: 233-241 ).

**Leal K D S, López M A, Martínez S J P.** Molecular detection of *Brucella* spp: Rapid identification of *B. abortus* biovar I using PCR. *Archives of Medical Research* 1992; 26: 3. 263-267.

**Leal K D S, Martínez V I O, López M A, Martínez S J P.** Single-Step PCR for detection of *Brucella* spp from blood and milk of infected animals. *J. of Clinical Microbiology* 1995; 33:12. 3087-3090.

**Lehninger A L.** Bioquímica. 2ªedición. Barcelona, España: Ediciones Omega, S. A, 1991.

**López M A, López R, Ocampo D A, Hernández Y, González F.** Brucelosis: Avances y perspectivas, *Publicación técnica del INDRE*. México, México 1991: No. 6, 2-22.

**López M A.** Desarrollo y control de vacunas contra la Brucelosis, experiencias de vacunación en humanos. Memorias de la V reunión anual del Consejo técnico consultivo nacional de salud animal, 1996 noviembre 26-29; México. 1996: 272- 273.

**Mancera M A, Díaz A E, Vázquez N J, Velázquez Q F, Suárez G F, Flores C R.** Vacunación de cabras con la cepa REV-1 de *Brucella melitensis* en diferentes dosis: Evaluación serológica y desafío. *Veterinaria México* 1992; 23: 2, 117-123.

**Martin N L, R E W Hancock.** Function and structure of the major components of the outer membrane of gram-negative bacteria; En: L G Adams editor., *Advances in brucellosis research*. U.S.A: *Texas A & M University Press*, College Station, 1990, 55-75.

**Matar G M, Khneisser I A, Abdelnoor A M.** Rapid laboratory confirmation of human Brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31- kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J. of Clin. Microbiol* 1996; 34:2. 477-478.

**Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry K G, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud F.** Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. of Clin. Microbiol* 1997; 35:4. 995-998.

**Moriyón I, Gamazo C, Díaz R.** Properties of the outer membrane of *Brucella* *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol* 1987; 138: 89-91.

**Moyer P N, Hausler W J Jr.** The Prokaryotes. A Handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology. Isolation Identification Applications, 1991.

- O' Hara M J, Collins D M, De Lisle G W.** Restriction endonuclease analysis of *Brucella ovis* and other *Brucella* species. *Vet. Microbiol* 1985; 10: 425-429.
- Ouahrani-Bettache S, Soubrier M P, Liautard J P.** IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. *J. Of Applied Bacteriology* 1996; 81: 154-160.
- Renoux G, Alton G, Amaransinghe A, Saquet E.** Presence et repartition de *B. melitensis* dans les tissus et les organes des caprins artificiellement infectes. *Ext. Arch. Inst. Pasteur. Tunis* 1956; 33: 397-402.
- Riegelman R K, Hirsch R P.** Cómo estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica. *Organización Panamericana de la Salud*. 2a edición. E.U. A, 29-36, 1992.
- Rodríguez J M.** Detection of animal pathogens by using the Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Veterinary Journal* 1997; 153: 3. 287- 305.
- Romero C, Gamazo C, Pardo M, López Goñi I.** Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. of Clinical Microbiology* 1995; 33: 3 .615-617.
- Ruiz C M.** Brucelosis. 3a. edición. México: *La Prensa Médica Mexicana*, 1-13, 1986.
- Sambrook, Fritsch, Maniatis.** Molecular Cloning, A laboratory manual. Book 2, Second edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 9.16- 9.19. 1989.
- Schurig G G.** Important immunological considerations for the development of an effective vaccine using *Brucella abortus* strain RB51 as a model. Simposio Internacional de Actualización en Brucelosis. México. Sin páginas, 1994.
- Stevenson L H.** A case for bacterial dormancy in aquatic systems. *Microbial Ecology* 1978; 4: 127-133.
- Thompson D W, Walter D S.** A reappraisal of the kappa coefficient. *J Clin Epidemiol* 1988; 41(10): 949-958.
- UFAW.** Humane Killing of Animals. *The Universities Federation for Animal Welfare*. p. 8, 1967.
- Velázquez B G, García C L, Banda R V, Santillán F M A, Ramírez C C, Sánchez Z L M, Toledo O P, Reyes S J A, Acosta B A P, Arriaga D C.** Diagnóstico diferencial de micobacterias por la reacción en cadena de la polimerasa. Memorias de la XXXIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Veracruz, México, 1997: 293.