

# IMPLEMENTACIÓN DE UNA NESTED PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS DE BOVINOS EN EL ECUADOR

Cevallos, O<sup>1</sup>; Rizzo, L<sup>1</sup>; Escobar, A<sup>2</sup>; López, M<sup>3</sup>; Cueva, T<sup>3</sup>; García, A<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Pecuarias; Universidad Técnica Estatal de Quevedo; km 7 vía Quevedo-El Empalme. C.P. 73. Mocache, Los Ríos, Ecuador. E-mail: [orlycevallos@hotmail.com](mailto:orlycevallos@hotmail.com)

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Naturales; Universidad de Guayaquil

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias; Escuela Superior Politécnica de Manabí. Manuel Feliz López

<sup>4</sup> Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio C-5, 1ª planta. 14071 Córdoba. España

## RESUMEN

Este estudio se lo realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. El objetivo de este trabajo fue comparar los índices de sensibilidad (IS) y especificidad entre las técnicas usadas para el diagnóstico de la brucelosis bovina. Para ello, se compararon las técnicas de PCR, Nested PCR (nPCR) y la prueba serológica Rosa de Bengala (RB). Un total de 40 muestras de sangre fueron recolectadas de cuatro hatos con una alta tasa de prevalencia histórica de brucelosis. Del total de las muestras analizadas  $\pm 35\%$  dio positivo para el análisis de RB, mientras tanto que con la PCR fue del  $\pm 45\%$ , lo que demuestra que la técnica molecular de PCR frente a la RB fue 12.5% más sensible. Los resultados obtenidos a partir de la PCR fueron confrontados con el diagnóstico de nPCR, los mismos que demostraron un incremento de positivos  $\pm 72.5\%$  y, con un IS para la nPCR del 38% superior a la PCR. En cuanto a la relación de los resultados obtenidos con la técnica de RB frente a la nPCR el IS de esta última fue del 52% superior. Los resultados de los IS demuestran que la detección de los animales positivos mediante la PCR y nPCR fueron superiores a los obtenidos por técnica Rosa de Bengala. Por lo tanto, en este trabajo se considera a la nPCR como una herramienta muy útil en el diagnóstico de *B.*

*abortus* y, su uso para futuros programas de prevención y erradicación de la enfermedad.

**Palabras claves:** Brucelosis, *Brucella abortus*, PCR, Rosa de bengala, cepa 19.

### **ABSTRACT**

This research was made in the Laboratory of Biotechnology of Quevedo State Technical University. The overall objective of this research was: to implement the PCR technique for diagnosis of *Brucella abortus* in Ecuador. In this study was to compare the technique of chain reaction (PCR) versus the serological test Rose Bengal (RB) in the diagnosis of bovine brucellosis. A total of 40 blood samples were collected from four herds with a high lifetime prevalence rate of brucellosis. An average of 35% tested positive for the analysis of RB, while with PCR was 45%, the rate of correlation between PCR vs RB gave an average of 30%, which suggest a package that PCR molecular technique versus the traditional RB is 22% more sensitive. In order to increase the sensitivity for detection of *Brucella abortus* in cattle blood, we designed primers for Nested PCR test. The correlation analysis with the results of PCR versus Nested PCR was 100%, while the rate of Nested PCR sensitivity was 37.9% more sensitive than PCR. As for the relationship of techniques RB and Nested PCR sensitivity index of the latter is 51.7% higher. The results show that the detection of positive animals by PCR and Nested PCR was more specific and sensitive serologic test Rose Bengal, therefore this paper considers the Nested PCR as a useful tool in the diagnosis *B. abortus* and its use for future programs of prevention and eradication of the disease.

Keywords: brucellosis, *Brucella abortus*, PCR rose bengal, and strain 19 vaccination

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa localizada a nivel mundial, reconocida prominentemente desde hace muchos años, asistiendo al incremento del problema sanitario y económico de gran importancia en la ganadería de nuestro país. Actualmente, la población de bovinos portadores de la enfermedad complica las rutas y, medidas de atenuar esta infección, en especial las preventivas (1). Esta enfermedad no presenta sintomatología clínica específica, por las cuales permitan una tipificación temprana de los animales infectados, lo que favorece estrictamente el desarrollo y el estado crónico de la enfermedad (2). La detección de este patógeno tradicionalmente se la realiza a través de pruebas de laboratorio ya sean de tipos serológicas o microbiológicas (2). Varios reportes han demostrado que esta bacteria puede ser aislada y, detectada a partir del cultivo de tejido sanguíneo infectado, lo cual anteriormente fue considerada como la técnica “gold standar” (3). Trabajos relacionados con el uso de herramientas de diagnóstico utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales, han demostrado que dichas técnicas no son eficientes para la detección específica del patógeno en estadios tempranos de la enfermedad, debido a la baja sensibilidad, reacción cruzada serológica y la inhabilidad para distinguir entre la infección activa e inactiva (4). Una de las técnicas de amplio uso en la ganadería del Ecuador es la prueba Rosa de Bengala, la cual por su bajo costo, rapidez y el manejo poco estricto para ser utilizada en el campo, potencializa el caso de animales portadores, ya que varios reportes han demostrado que esta prueba es escasamente específica y sensible.

En análisis clínicos de animales con histología determinan a la *Brucella abortus* como una de las especies bacterianas con especial afinidad por el endometrio grávido y por la placenta fetal, que esta a su vez condiciona que la principal manifestación clínica de la infección en los animales sea el aborto durante el último tercio de la gestación o el nacimiento de animales prematuros poco viable. En cuanto a la determinación y relación de los resultados obtenidos por las vías de los diagnósticos directos o indirectos, algunos reportes indican que muchos de los datos no se correlacionan de manera estricta con los observados clínicamente y microbiológicos,

por lo que varios autores sugieren el análisis con técnicas moleculares como la (PCR) Reacción en Cadena de la Polimerasa (5).

Este estudio tiene como plataforma *in silico* la implementación de la técnica de la Nested PCR, además de comparar la técnica molecular con la serológica «Rosa de Bengala», para ello se utilizaran muestras de sangre obtenidas de animales bovinos ubicados en la franja rural del cantón Quevedo en la provincia de Los Ríos, Ecuador.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material animal**

Para las muestras de tejido sanguíneo se utilizaron entre machos y hembras un total de 40 bovinos de cuatro localidades | El Empalme, Buena Fe, El Carmen y Quevedo| se extrajo un volumen total de 5 mL de sangre por cada animal seleccionado, de los cuales se tomó 3/5 mL para el análisis serológico RB y, 2/5 mL para la extracción de ADN. Como testigos de *Brucella abortus* se utilizó las cepas bacterianas comerciales C19 y C119. Estos aislados fueron cultivados en Agar de Tripticasa de soya y papa e incubados a 37 °C ± 2 por 48 horas.

### **Rosa de Bengala**

Para esta prueba se siguió el manual de procedimiento establecido por el Card Test (6). Los resultados de la prueba se los interpreta a los cuatro minutos posteriores a la evaluación del test. Se califica como reacciones positivas cuando se presenta aglutinación [grumos].

### **Purificación de ADN y nPCR**

La purificación y extracción de ADN para sangre se utilizó el método de TENS [50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl y 1% de SDS] (7) y mini extracción para los aislados bacterianos (9).

Utilizando Vector NTI Suite versión 11.5 se diseñaron cuatro cebadores (Tabla 1), dirigidos a flanquear la secuencia 16S ARNr reportada en el GenBank como EMBL-X13695.

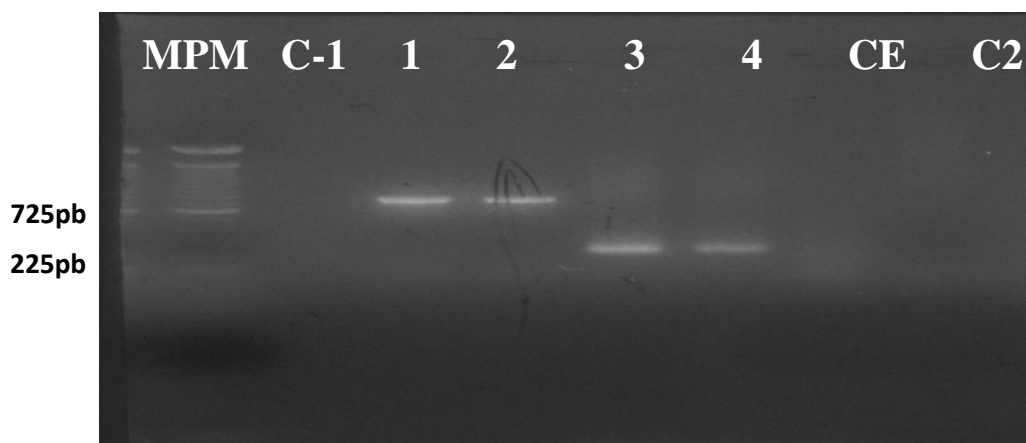
**Tabla 1.** Secuencias de los cebadores dirigidos a flanquear la secuencia 16S ARNr de *Brucella abortus*.

Cebadores	Secuencia	Tm (°C)	Horquillas/Dímeros
PB-1	5' GCGACGATCCATAGCTG 3'	52.9	1
PB-2	5' AACCATAGTGTCTCCACTAA 3'	50.2	2
PB-F	5' GTGGGGAGCAAACAGGATTA 3'	54.8	0
PB-R	5' CAAGGGCTGGTAAGGTTCTG 3'	55.6	0

Para la implementación de la nPCR se utilizó el protocolo establecido (8), considerando las temperaturas intrínsecas de hibridación para cada set de cebadores. Luego se visualizaron los productos de ADN utilizando el cartucho comercial de SBYR Green |Promega|.

## RESULTADOS

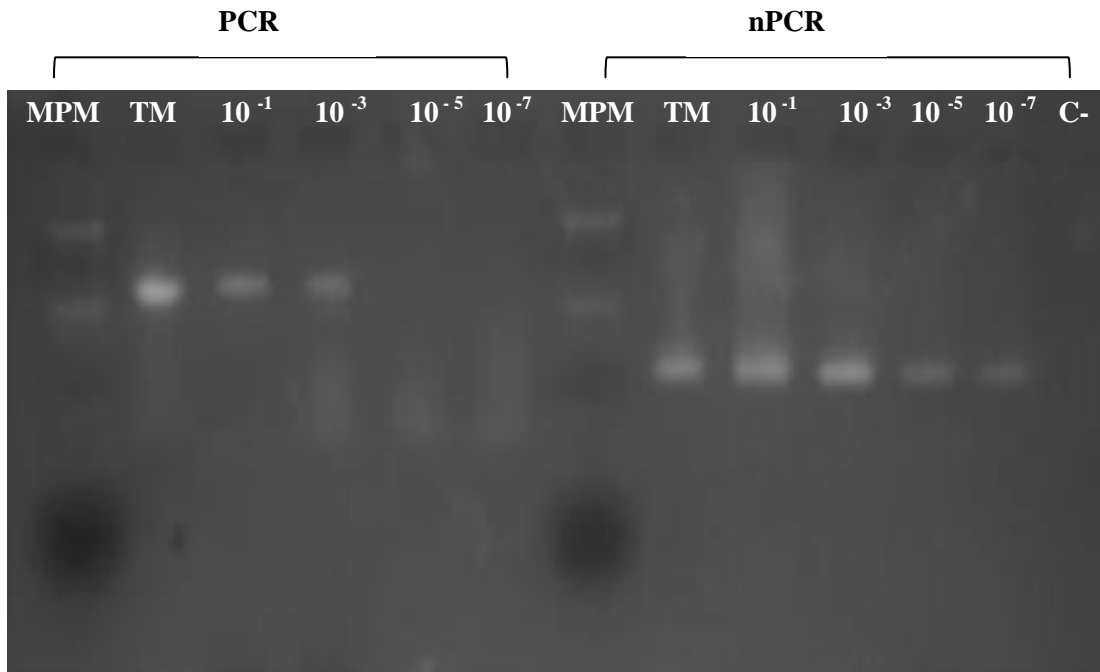
Se logró obtener ADN  $\pm 80$  ng/ $\mu$ L para cada una de las muestras del tejido sanguíneo. Para la amplificación de los fragmentos (Fig. 1) se evaluaron varias temperaturas de hibridación de los cebadores, teniendo como resultado para la PCR una banda definida de 725 pb y de 225 pb para la Nested PCR, concordando con los datos esperados para esta prueba.



**Figura 1.** Gel de electroforesis con productos de amplificación de *Brucella* spp. MPM, marcador de peso molecular; C-1, control negativo de extracción de ADN; línea 1, PCR de C19; 2, PCR de animal con signos clínicos de brucelosis; 3 y 4, nPCR de 1 y 2; CE y C-2, controles de los reactivos de la PCR y Nested-PCR respectivamente.

## Sensibilidad de la PCR frente a la nPCR

Para esta prueba se realizó diluciones seriadas a partir de ADNs obtenidos de los aislados bacterianos (Fig. 2), los mismos que fueron utilizados para la amplificación por nPCR. La sensibilidad demostrada por la nPCR fue  $10^4$  mayor que la PCR simple.



**Figura 2:** Nivel de amplificación de PCR y nPCR en diluciones seriadas de ADN desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ .

## Correlación entre las técnicas moleculares (PCR/nPCR) y la técnica serológica (RB)

Del total de las muestras analizadas el  $\pm 35\%$  fueron positivos para RB y, la PCR demostró el  $\pm 45\%$  (Tabla 2), lo que determina que la PCR fue 12.5% más sensible. A sí mismo, las muestras tanto negativas como positivas por PCR fueron amplificadas por la nPCR, determinando una correspondencia del 100% entre las dos técnicas evaluadas, además el IS para la detección de *Brucella spp.* por nPCR fue 38% superior a la PCR. Por otro lado, la relación entre la RB y la nPCR demostró un IS del 52% superior.

**Tabla 2.** Demuestra la correspondencia entre las técnicas de PCR, nPCR y RB en la detección de *Brucella abortus*.

<b>Localidades</b>	<b>RB %</b>	<b>PCR %</b>	<b>nPCR%</b>
El Empalme	50	60	100
Buena Fe	30	40	70
El Carmen	30	40	70
Quevedo	30	40	50
<b>Promedio</b>	<b>35</b>	<b>45</b>	<b>72.5</b>

## DISCUSIÓN

En el marco de estudio de la Brucelosis, se han descrito varios protocolos de PCR para la detección específica de la bacteria. Han sido diversos los tipos de iniciadores empleados, basados en secuencias de los genes 16S ARNr (8), omp2a (10), BCSP31 (12, 13, 14,15). En general los datos obtenidos y bibliográficos demuestran que la elección de iniciadores no afecta la sensibilidad de la prueba lo que concuerdan con (8, 13, 16,22) quienes han utilizados esta técnica en muestra de sangre, los cuales han tenido resultados similares a los que hemos obtenido. En este trabajo elegimos los cebadores dirigidos a amplificar un fragmento del gen 16S ARNr PB-1 – PB-2, descritos por (8), para la PCR, y diseñamos los cebadores PB-F y PB-R para la nPCR.

Primeramente se analizaron todas las muestras con la prueba serológica Rosa de Bengala, la cual según datos mostrados tuvo una alta detección de casos falsos negativos respecto a la PCR. Esto se debe posiblemente a que cuando la *Brucella* penetra en el organismo es fagocitada por los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos tisulares, donde puede multiplicarse en su interior, localizándose, finalmente, en los órganos del sistema retículo endotelial y el nivel de bacterias sea

no detectada. Otra de las vías puede ser en la producción de anticuerpos específicos, en cuanto a su magnitud y a su utilización en el diagnóstico serológico de la enfermedad, pero al ser un bacteria de tipo intracelular tiene una capacidad protectora limitada. La primera inmunoglobulina que se produce es la IgM, sus niveles comienzan a disminuir alrededor de los tres meses del inicio de la enfermedad. A partir de la segunda semana se elevan la IgG y la IgA que pueden permanecer aumentadas durante un largo período de tiempo con independencia de la evolución clínica de la enfermedad, por lo que la RB reconoce IgM. Estos resultados concuerdan varios investigadores (6,17) quienes manifiestan que no se puede descartar la posibilidad de diagnosticar *B. abortus* en animales seronegativos y que por las razones anteriormente comentadas, no fueron positivo en la inmunoprueba (RB). Y por otro lado (12, 13, 14, 16,18,) sugieren que el uso de la PCR en muestras de sangre ha sido más precisa en la detección de *B. abortus*, lo que concuerda con este trabajo. En la actualidad las pruebas serológicas son poco confiables cuando los animales se encuentran en la etapa intermedia, pero que sin embargo son utilizadas en el campo por su bajo costo pero poco efectivo (14). En este trabajo, se probó la especificidad de los dos juegos de iniciadores que se detallan en materiales y métodos que amplifican fragmentos de 225 y 725pb respectivamente, específicos del genoma de *Brucella* y que permiten la identificación y la diferenciación de *B. abortus* del resto de especies (8).

Se obtuvieron animales positivos con RB y analizados por PCR salieron negativos, existen varias posibles explicaciones para este hecho. En primer lugar, la presencia de factores transmembranales de otras bacterias gramnegativas (*E. coli*; *Vibrio cholera*; etc), que pueden ser reconocida por el antígeno RB, hacen que se obtengan resultado positivo con RB y que con la PCR estas muestras sean negativas. Estos resultados concuerdan con los reportados en otros estudios de inmunoprueba en la detección de *Brucella spp.* (4,5).

El protocolo empleado para la extracción de ADN de *Brucella* fue totalmente eficiente (22), quienes han demostrado que el empleo de una solución de lisis con altas concentraciones de Tris - EDTA y NaCl (solución tamponada eritrocito) y de altas



concentraciones de SDS y proteinasa K que ayuda a extraer eficientemente el ADN de *Brucella*.

Actualmente la creación de nuevas herramientas que permitan efectivizar el diagnóstico para la *Brucella ssp* en animales y la detección de la bacteria en el hombre por la relación zoonótica que presenta la bacteria y además por las pérdidas provocadas por eventos relacionados con la enfermedad a más de constituir en la actualidad alrededor del 17% de abortos en los hatos ganaderos en Ecuador, aún no se ha llegado a concienciar sobre los altos riesgos que provoca esta bacteria. En este trabajo y con la colaboración del equipo científico del Programa de Biotecnología y el equipo de Concepto Azul S.A. se logró implementar el primer estudio analítico por la técnica de PCR y nPCR para la detección de la *Brucella ssp*.

## CONCLUSIONES

Se logró obtener ADN  $\pm 80$  ng/ $\mu$ L para cada una de las muestras del tejido sanguíneo con el protocolo de Tens.

Se evaluaron varias temperaturas de hibridación de los cebadores, teniendo como resultado para la PCR una banda definida de 725 pb y de 225 pb para la Nested PCR.

La técnica de nPCR basado en sangre total demostró tener una alta sensibilidad y especificidad dándonos el resultado en seis horas.

El índice de sensibilidad para la detección de *Brucella spp.* por nPCR fue 38% superior a la PCR, por otro lado, la relación entre la RB y la nPCR demostró un IS del 52% superior.

La PCR demostró ser una herramienta útil para poder diferenciar un animal que está vacunado y un animal que está infectado naturalmente.

La sensibilidad y especificidad de la prueba de nPCR con los cebadores obtenidos de las secuencias 16S ARNr de *Brucella abortus* podría ser una técnica altamente efectiva para el diagnóstico de la brucelosis.

## LITERATURA CITADA

1. BLASCO, J. M. 1990. *Brucella ovis*. In: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Eds.), Animal Brucellosis. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 351-378.
2. DIAZ, R. & MORIYÓN I. 1989. Laboratory techniques in the diagnosis of human brucellosis. In: Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects. Young EJ, Corbel MJ (Eds), CRC Press, FL, USA, 73-83 (1989).
3. YOUNG, E. J. 1997. Especies de *Brucella*. In: Enfermedades Infecciosas Principios y práctica. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (Eds), Medica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 2300-2307.
4. AL – ATTAS, R. A.; AL –KHALIFA M.; AL- QURASHI A.R.; BADAWY M. Y AL-GUALY. 2000. Evaluation of PCR culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. Ann. Saudi. Med. 20 (3): 224 – 228.
5. BUSTAMANTE, S. J.; SALAZAR H.F.; DIAZ A. E.; MANZANO, C.C.; PEREZ, G.R; & HERNÁNDEZ, A. L. 2000. Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa C19 de *Brucella* spp.. Tec. Pecuaria. Mex. 38(1): 35- 42.
6. ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D. y VERGER I.M. 1988. Techniques for the Brucellosis.30. Laboratory Imprimerie Louis Jean, París.
7. FERREIRA, C. R.; AMORES, S.I. 2009. Extracción de ADN a partir de Muestras de Biopsias. Disponible en la página de internet. Consultado en marzo del 2009.
8. ROMERO, C.; PARDO, M.; GRILLO, J. M.; *et al.* 1995B. Evaluation of PCR and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on Milk Samples for Diagnosis of Brucellosis in Dairy Cattle. 33:12 3198-3200.
9. MOSQUERA, X.; BERNAL, C.; MUSKUS L. 2008. Detection of *Brucellas* spp. in blood and milk of dairy cattle by PCR method. Rev.MVZ Córdoba 13(3):1504-1513.
10. LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, I. O.; GARCÍA-CANTU.; *et al.* 2000. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella* spp. biovar 1 in infected goats. Veterinary Microbiology 75, 91-97.
11. BAILY, G. G.; J. B. KRAHN, B. S.; DRASAR, Y. N. G.; STOKER. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella* spp. by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg. 95: 271-275.

12. MATAR, G. M.; KHNEISSER I. A; ABDELNOOR, A. M.; 1996. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-Kilodalton antigen DNA. *J. Clin. Microbiol.* 34, 477-478.
13. QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; MORATA, P.; OCON P.; *et al.* 1997. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay, *J. Clin. Microbiol.* 35, 2927-2930.
14. MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, I. M.; COLMENERO, D. J. 2001B. PCR Assay for Dignosis of Human Brucellosis. P.1654 - 1655.
15. MOSQUERA, X.; BERNAL, C.; MUSKUS, L. 2008. Detection of Brucellas spp. in blood and milk of dairy cattle by PCR method. *Rev.MVZ Córdoba* 13(3):1504-1513.
16. SREEVATSAN, S.; BOOKOUT, B. J.; RINGPIS F, *et al.* 2000. A Multiplex Approach to Molecular Detection of *Brucella* spp. and/or *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *J. Clin. Microbiol.* 38. 2602-2610.
17. COLMENERO, J. D & MORATA P. 2001. Specificity of a Polymerase Chain Reaction Assay of a Target Sequence on the 31 – Kilodalton Brucella Antigen DNA Used to Diagnose Human Brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology.*20: 127 – 131.
18. MARTÍNEZ, O. I.; VÁSQUEZ, P. B.; MONTES, M. F, *et al.* 2000. Diagnóstico Simultáneo de brucelosis y tuberculosis mediante PCR múltiples. Vol.25 No. 2 Pág.53-57.
19. MARTÍNEZ-SORIANO, J. P.; CAB-BARRERA, E. L.; TAMEZ-GONZÁLEZ, R, *et al.* 1993. Detección de *Brucella* spp. por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica.* 18, 10-16.
20. MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, I. M.; REGUERA, M. J.; *et al.* 2001A. Diagnostic Yield of a PCR Assay in Focal Complications of Brucellosis. 39:10 3743-3746.
21. CORBEL, M. J.; BRINLEY-MORGAN, W. J. 1984. Genus *Brucella*, p. 377–388. En: N. R. Krieg (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams y Wilkins, Baltimore, Md.
22. LEAL-KLEVEZAS, D. S; MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, I. O.; LÓPEZ-MERINO, A.; *et al.* 1995B. Single step PCR for the detection of *Brucella* spp. From blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3087-3090.