

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**EVALUACION DE PCR TIEMPO REAL COMO HERRAMIENTA
DIAGNOSTICA DE *Brucella spp*, EN UN HATO LECHERO CON
ANTECEDENTES DE BRUCELOSIS BOVINA**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA

JOANNA PATRICIA SAAVEDRA AYALA

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MEXICO.

AGOSTO 2015

**Evaluación de PCR Tiempo Real como Herramienta Diagnóstica de
Brucella spp, en un Hato Lechero con Antecedentes de Brucelosis Bovina**

**Como requisito parcial para obtener el grado de: Maestro en Ciencias
Veterinarias**

Dr. Tomás Benjamín Rentarías Evangelista
Director de Tesis

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto
Asesor

Dra. Sawako Oshima
Asesora

Dra. Rosa María Bermúdez Hurtado
Asesora

Dr. Gilberto López Valencia
Asesor

Mexicali, Baja California, México. Agosto de 2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios la oportunidad que me dio de alcanzar una meta más en el camino que ha trazado para el logro de los objetivos más importantes de mi vida.

Al CONACYT y al IICA por el ofrecimiento hecho a mi país, para permitirnos a los funcionarios del sector agropecuario elevar nuestro nivel de formación académica y así fortalecer nuestras instituciones y propender por el desarrollo y mejoramiento de la producción pecuaria en condiciones de sanidad e inocuidad.

A la institución en la cual laboro, el Instituto Colombiano Agropecuario ICA, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a la Presidencia de la Republica de Colombia, por el apoyo brindado para que esta oportunidad pudiese ser compartida con las personas más importantes de mi vida: Mi Familia.

Al equipo humano del IICV-UABC por hacer posible mi proceso de formación académica, tanto mis maestros desde las aulas y los laboratorios, como a los administrativos desde las oficinas; al grupo de Investigadores del CENID Microbiología, en Ciudad de México, por sus valiosas enseñanzas y aportes al desarrollo del proyecto.

A todos aquellos que obraron como piedra de tropiezo, porque en las manos de Dios fueron herramientas usadas para fortalecerme y contribuyeron para que la culminación de este proyecto de vida fuese hoy una realidad.

A mis amigos verdaderos, aquellos que siempre creyeron en mí, y que nunca se “rajaron”: a ti Alfonso Díaz, que pusiste más que tu fe en que lo lograría, a ustedes mis “hijos putativos” Karla Michelle, Jerry y Aris, que me ofrecieron su afecto honesto e incondicional, que amaron a mis hijos y a mi madre como si fuesen su propia sangre, nunca los olvidare.

A mis compañeros, Erika, Enrique, José, Coral, que me recibieron y aceptaron tal cual soy y me permitieron compartir tantos momentos de alegría.

A ti Tomás Cárdenas, por todas las lecciones de vida aprendidas, no dudes que me ayudaste a crecer enormemente.

A mis hijos y mi madre por la paciencia que tuvieron todo este tiempo.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis hijos José David y María Gabriela, por ser el motor de mi vida, la razón que Dios me dio, para seguir luchando y superando cada uno de los obstáculos que se me presentan en la vida.

*Porque en cada batalla
no hay una dificultad
sino una victoria por lograr*

RESUMEN

Se evaluó la PCR en tiempo real a partir de sangre y leche, para el diagnóstico de *Brucella spp*, frente a los métodos oficiales y tradicionales. Los métodos evaluados fueron Rosa de Bengala en serie con Rivanol (RB-RV) y Fluorescencia Polarizada en suero, Cultivo microbiológico en leche (CM-L) y PCR en tiempo real en leche (qPCR-L) y leucocitos de sangre (qPCR-S).

La prueba CM-L diagnosticó como positivos a un número menor de animales (19/104) en comparación con las pruebas de RB-RV (39/104), qPCR-S (88/104) y qPCR-L (55/104). Todos los animales positivos por CM-L también fueron positivos por qPCR-L, mientras que de 53 animales positivos a qPCR-L, 35 fueron negativos a CM-L, por lo tanto, la sensibilidad del qPCR-L con respecto a CM-L fue del 100%, con una especificidad del 59% (kappa: 0.33) y grado de concordancia bajo.

La sensibilidad de la qPCR-S con respecto a RB-RV fue del 84%, mientras que la especificidad fue del 21% (kappa 0,03), con un grado de acuerdo Insignificante y $G^2=0.37$ (P: 0.058), esto probablemente, no se debe a reacciones falsos positivos de la prueba de qPCR-S, sino más bien a una mayor sensibilidad de esta, lo que sugiere la necesidad de reevaluar las pruebas diagnósticas oficiales que conforman el programa de control y erradicación de la brucelosis bovina en México.

ABSTRACT

Real time PCR was evaluated from blood and milk, for diagnosis of *Brucella spp*, compared with official and traditional methods. The methods evaluated were Rose Bengal in series with Rivanol (RV-RB) and fluorescence polarization in serum, microbiological culture in milk (CM-L) and real-time PCR in milk (qPCR-L) and blood leukocyte (qPCR- S).

The CM-L test diagnosed as positive fewer animals (19/104) compared with tests RB-RV (39/104), qPCR-S (88/104) and qPCR-L (55/104). All positive animals by CM-L were also positive by qPCR-L, while of 53 positive animals by qPCR-L, 35 animals were negative by CM-L, therefore, the sensitivity of qPCR-L with respect to CM- L was 100%, with a specificity of 59% (kappa: 0.33) and low degree of concordance.

qPCR-S sensitivity with respect to RB-RV was 84%, while the specificity was 21% (kappa 0.03), with a degree of agreement Negligible and $G^2 = 0.37$ (P: 0.058), this result probably not due to false positive reactions test qPCR-S, but rather to greater sensitivity of this, suggesting the need to reassess the official diagnostic tests that make up the program of control and eradication of bovine brucellosis in Mexico.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA.....	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
CONTENIDO.....	viii
1 INTRODUCCION	1
2 ANTECEDENTES	7
3 JUSTIFICACION	10
4 HIPOTESIS	12
5 OBJETIVOS	13
5.1.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
5.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
6 REVISION DE LITERATURA	14
6.1 Métodos indirectos para el diagnóstico de brucelosis bovina.....	15
6.1.1 Aglutinación lenta en tubo de Wright (SAT).....	19
6.1.2 Prueba de aglutinación con y sin 2-mercaptuetanol (2-ME)	20
6.1.3 Reacción de Huddleson.....	20
6.1.4 Prueba de Rosa de Bengala.....	21
6.1.5 Antígeno Tamponado en Placa (BPA).....	21
6.1.6 Prueba de Coombs.....	22
6.1.7 Fijación de complemento.....	22
6.1.8 Inmunofluorescencia indirecta	23
6.1.9 ELISA	23
6.1.10 Polarización de fluorescencia (FPA).....	24
6.1.11 Prueba de Inmunodifusión en agar (IDAG).....	25
6.2 Métodos Directos para el diagnóstico de la Brucelosis bovina.....	25
6.2.1 Tinción	27
6.2.2 Cultivo Microbiológico	29
6.2.3 Métodos basados en la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 32	

7	MATERIALES Y METODOS	45
7.1	Materiales y Equipos	45
7.2	Metodología	48
7.2.1	Diagrama de flujo metodológico	48
7.2.2	Localización del área de estudio.....	49
7.2.3	Duración del estudio	49
7.2.4	Origen de la información.....	50
7.2.5	Variables evaluadas	51
7.2.6	Muestras.....	51
7.2.7	Pruebas Diagnósticas.....	52
7.2.8	Análisis Estadístico.....	86
8	RESULTADOS Y DISCUSION	91
8.1	Resultados	91
8.1.1	Pruebas serológicas	91
8.1.2	Cultivo microbiológico.....	92
8.1.3	Pruebas moleculares	94
8.1.4	Muestras incluidas en el análisis.	96
8.1.5	Comparación de las distintas pruebas analíticas.....	97
8.1.6	Concordancia entre las distintas pruebas analíticas.....	99
8.1.7	Evaluación de las pruebas analíticas.....	102
8.2	Discusión.....	110
9	CONCLUSION	115
10	LITERATURA CITADA	116

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Especies que integran el género <i>Brucella</i> , hospedadores conocidos y algunas características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades. A y M: configuraciones alternativas del PSO, R: LPS de las cepas rugosas	31
Cuadro 2 Hallazgos genéticos utilizados para la diferenciación de las especies de <i>Brucella</i>	35
Cuadro 3 Genes empleados con más frecuencia en el diseño de cebadores para la identificación de <i>Brucella</i> a nivel de género, especie y cepa.....	36
Cuadro 4 Listado de Materiales, Equipos y Reactivos empleados durante la ejecución del proyecto.....	45
Cuadro 5 Cebadores seleccionados	57
Cuadro 6 Fórmulas y algoritmos utilizados por las aplicaciones web para las predicciones de T_m , T_a , Θ , K_a	59
Cuadro 7 Condiciones hipotéticas de reacción para la qPCR y predicción teórica de valores de T_m , T_a y Θ	60
Cuadro 8 Resultados de PCR en Tiempo Real con Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG para el gen <i>Omp2</i> con los cebadores JP-F y JP-R.....	68
Cuadro 9 Resultados de PCR en Tiempo Real con PerfeCTa®SYBR® Green FastMix, Rox™ para el gen <i>Omp2</i> con los cebadores JP-F y JP-R	69
Cuadro 10 Resultados de PCR en Tiempo Real con PerfeCTa®SYBR® Green FastMix, Low Rox™ para el gen <i>Omp2</i> con los cebadores JP-F y JP-R.....	70
Cuadro 11 Cantidades por componente para la preparación de la mezcla maestra	72
Cuadro 12 Cálculos empleados por los métodos para la determinación del Umbral Analítico	78
Cuadro 13 Valores calculados para definición de punto de corte.....	79
Cuadro 14 Criterios para la interpretación de los resultados de qPCR	85
Cuadro 15 Grado de acuerdo en función del índice kappa (Landis y Koch, 1977)	88
Cuadro 16 Datos de Análisis de concordancia entre los resultados emitidos por las distintas pruebas diagnósticas.....	100
Cuadro 17 Consolidado de los parámetros calculados para la evaluación de las pruebas analíticas en contraste con las pruebas asignadas como referencia	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribución mundial de <i>Brucella abortus</i> 2014	1
Figura 2: Estatus Sanitario Actual de México en Brucelosis bovina.	2
Figura 3 Focos de Brucelosis bovina 2011.....	3
Figura 4 Concentración en suero de IgG1 e IgG2a en ratas, evaluados de 0-56 días después de la infección con <i>Brucella abortus</i> . Tomado del Artículo “Characteristics of the immune response during acute brucellosis in Sprague-Dawley rats” (Khatun et al., 2009)	16
Figura 5 Vías de citoquinas estimuladas por <i>B. abortus</i>	17
Figura 6 Modelo esquemático de la invasión de <i>Brucella abortus</i> y transporte intracelular.....	27
Figura 7 Dendograma derivado de MLEE	33
Figura 8 Productos de PCR AMOS, empleando 19 biovariedades de <i>Brucella</i>	39
Figura 9 Perfiles electroforéticos obtenidos para las distintas especies de <i>Brucella</i>	40
Figura 10 Diferenciación de todas las especies de <i>Brucella</i> y S19, RB51 y cepas vacunales Rev.1 por Bruce-ladder multiplex PCR. Tomado del Artículo “Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All <i>Brucella</i> Species, Including the Vaccine Strains” (López-Goñi et al., 2008)	41
Figura 11 Diagrama de flujo metodológico	48
Figura 12 Predicción curva de disociación del amplicón	61
Figura 13 Predicción perfil de disociación del amplicón	61
Figura 14 Predicción pico de disociación del amplicón	62
Figura 15 Predicción teórica del perfil dinámico de disociación para el amplicón del gen <i>Omp2</i>	63
Figura 16 Perfil térmico inicial para la PCR tiempo real del gen <i>Omp2</i>	65
Figura 17 Curvas de amplificación con los reactivos evaluados	66
Figura 18 Curvas de disociación con los reactivos evaluados	66
Figura 19 Curva de Picos de disociación del amplicón con los reactivos evaluados	67
Figura 20 Resultados de PCR en Tiempo Real con PerfeCTa®SYBR® Green FastMix, Low Rox™ y Rox™ para el gen <i>Omp2</i> con los cebadores JP-F y JP-R	71
Figura 21 Variación del ciclo umbral (cq) en relación a la concentración de los cebadores.....	73
Figura 22 Variación del ciclo umbral en relación a la temperatura de alineación	74
Figura 23 Perfil térmico definitivo para la PCR en tiempo real del gen <i>Omp2</i> ..	75
Figura 24 Gráfico del ruido de fondo de la fluorescencia	76
Figura 25 Gráfico de la Substracción del ruido de fondo de la fluorescencia ...	77
Figura 26 Puntos de corte superior e inferior para la amplificación	81
Figura 27 Histograma de frecuencia de las Tm.....	83
Figura 28 Curva de calibración para la PCR tiempo real del gen <i>Omp2</i> de <i>Brucella</i> spp.....	85

Figura 29 Parametros de evaluación de las pruebas frente a prueba de referencia	89
Figura 30 Comparación de criterios diagnosticos emitidos por RB vs FP a las muestras analizadas	91
Figura 31 Analisis comparativo de las distintas pruebas analíticas	97
Figura 32 Porcentaje de bovinos diagnosticados positivos o negativos de acuerdo a cada una de las pruebas análíticas	99
Figura 33 Porcentaje de bovinos diagnosticados como Positivos por cada una de las pruebas analíticas.....	99
Figura 34 Porcentaje de coincidencia entre los resultados emitidos por las distintas pruebas diagnósticas.	101
Figura 35 Indice kappa para los diagnósticos emitidos por cada una de las pruebas en acuerdo con cada otra.....	102
Figura 36 Porcentajes de sensibilidad de las pruebas frente a la prueba designada como referencia	105
Figura 37 Porcentajes de especificidad de las pruebas frente a la prueba designada como referencia	106
Figura 38 Porcentajes de VPP de las pruebas frente a la prueba designada como referencia.....	107
Figura 39 Porcentajes de VPN de las pruebas frente a la prueba designada como referencia.....	108

1 INTRODUCCION

La Brucelosis bovina es una enfermedad de distribución mundial (Figura 1), zoonótica, infectocontagiosa, de curso subagudo o crónico, que principalmente ocasiona eventos de falla reproductiva, tales como: abortos, mortinatos, nacimientos prematuros, retención de placenta, orquitis, epididimitis. (WHO, 2006).

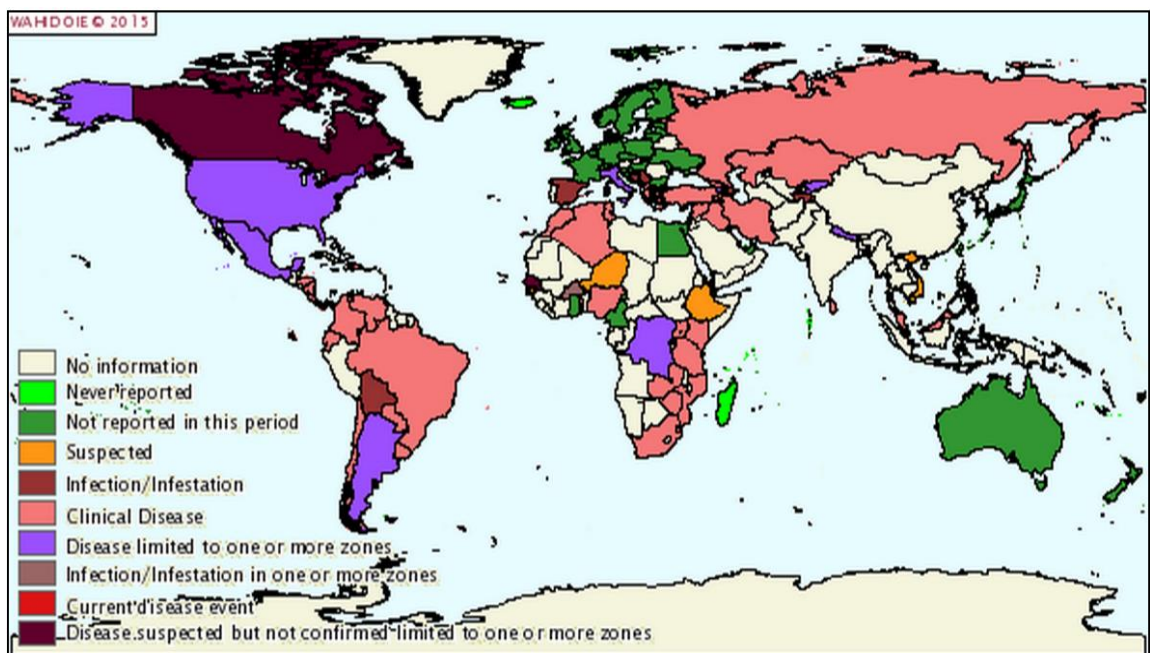


Figura 1: Mapa de distribución mundial de Brucella abortus 2014
Fuente: World Animal Health Information Database (WAHID) – Version 1

En México, debido a las pérdidas económicas en el sector pecuario (Xolalpa Campos et al., 2010), así como al impacto en la salud pública ocasionadas por la Brucelosis (López-Goñi, 2012), se diseñó e implemento un

Programa de Vigilancia, Control y Erradicación, denominado Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales (SAGARPA, 1995).

No obstante su implementación en el año 1995, y de acuerdo a los datos publicados por SENASICA, el país permanece en fase de control en más del 70% de su extensión geográfica, el 27.66% en erradicación y tan solo en el 8.14% se ha alcanzado el estatus de libre para *Brucella abortus*, sin embargo se mantiene la presencia de *Brucella melitensis* y *Brucella ovis* (Figura 2, Figura 3).



Figura 2: Estatus Sanitario Actual de México en Brucelosis bovina.
Fuente: SENASICA



Figura 3 Focos de Brucelosis bovina 2011
Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

Este programa de control y erradicación, se apoya en tres estrategias fundamentales: 1. La vigilancia epidemiológica, cuya principal herramienta es el diagnóstico a través de pruebas de laboratorio, 2. La erradicación, mediante el sacrificio de animales reactivos, y 3. La aplicación de vacunas.

En México la Norma oficial establece el uso de pruebas serológicas para el diagnóstico de la Brucelosis, iniciando con la prueba de Tarjeta o Rosa de Bengala, posteriormente la prueba de Rivanol y como prueba confirmatoria de las anteriores, se emplea la Fijación de Complemento.

La definición del estado sanitario del hato o zona evaluada, se fundamenta en el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en el conjunto de las pruebas aplicadas (SAGARPA, 1995).

Sin embargo estas pruebas presentan desventajas que pueden repercutir negativamente para alcanzar y mantener los estatus de “erradicación y libre”.

- Resultados falsos positivos (Kittelberger et al., 1995, Mindy L. Rawlins¹, 2005, Naves et al., 2012), que conllevan de manera obligada y rutinaria la realización de pruebas confirmatorias, elevando los costos del programa.
- Resultados falsos negativos (Muma et al., 2007); (Cypress, 2009), los cuales no se confirman, pudiendo constituir una de las causas de seroconversiones, aumentando los tiempos de saneamiento, y por tanto las pérdidas económicas para el productor (Ortega, 1993, Xolalpa Campos et al., 2010).

Un estudio realizado en hatos lecheros en Michoacán estableció que, tanto en hatos con historial de brucelosis, como en hatos libres, el primer caso de seroconversión se detectó a los tres meses desde la exposición ((Rivera, 2010)), lo cual implica que durante este tiempo los animales fueron

considerados sanos, permaneciendo en el hato, y por tanto constituyéndose en fuente de diseminación de la enfermedad para los otros animales.

Afortunadamente, la evolución de las tecnologías de secuenciación de DNA, asociadas a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y la genómica comparativa, han impulsado el desarrollo de nuevas pruebas para la detección e identificación de microorganismos (Hall, 2007).

Las pruebas basadas en PCR, son técnicas de análisis directo, robustas, que pueden proveer resultados confirmatorios (Hall, 2007), con altos porcentajes de sensibilidad y especificidad (OIE, 2012); su uso en el diagnóstico de la Brucelosis humana (Alikhani et al., 2013, Colmenero et al., 2011, Queipo-Ortuño et al., 2005, Mitka et al., 2007) ha arrojado excelentes resultados, y los acercamientos que se han realizado en Brucelosis bovina a partir de muestras clínicas (Leal-Klevezas et al., 1995, Mosquera C et al., 2008, Renteria Evangelista et al., 2005, Mukherjee et al., 2007) evidencian su gran potencial como herramienta diagnóstica, bajo diferentes escenarios epidemiológicos.

El objetivo de este proyecto de investigación fue evaluar de forma preliminar el desempeño de la PCR en Tiempo Real como herramienta diagnóstica de *Brucella spp*, a partir de muestras de leche (qPCR-L) y leucocitos en sangre (qPCR-S), de animales procedentes de un hato con

antecedentes de brucelosis bovina; los resultados obtenidos mostraron que la qPCR-S, diagnosticó mayor número de animales como Positivos a *Brucella spp*, que las pruebas serológicas oficiales, lo cual evidencia la necesidad de implementación, dentro de los programas de control y erradicación de la enfermedad, de nuevas tecnologías diagnósticas, que logren una mejor definición del estatus sanitario, y permitan el diseño de estrategias de manejo, control y erradicación de la enfermedad más eficientes, y por tanto de mayor impacto epidemiológico, logrando disminuir sustancialmente los tiempos de saneamiento de los hatos, así como el riesgo biológico asumido por el analista, todo esto con mínimos requerimientos logísticos para su ejecución.

2 ANTECEDENTES

La utilización de técnicas de Biología molecular para el diagnóstico de Brucelosis, requirió de la secuenciación del genoma completo y la búsqueda de polimorfismos que pudiesen ser implementados para discriminar las especies, dentro de la limitada diversidad genética exhibida por *Brucella*, (Gándara et al., 2001) y (Bricker and Halling, 1994), describieron el polimorfismo generado por la localización del elemento genético IS711, posteriormente, (García-Yoldi et al., 2006), emplearon las diferencias entre los genes omp31, omp25, wboA-wboB, Ery, rpsL, y deleciones en Cromosomas 1 y 2.

La rápida evolución de las técnicas moleculares y el diseño de nuevos marcadores para la genotipificación de *Brucella*, permitió incrementar la resolución a nivel de especie entre aislamientos estrechamente relacionados (Le Flèche et al., 2006).

La genómica comparativa ha facilitado el hallazgo de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), los cuales pueden ser usados para describir exactamente el marco filogenético de una especie. Las comparaciones entre los genomas de *Brucella* revelaron 20.154 polimorfismos de SNPs ortólogos, que fueron compartidos en todos los genomas (Foster et al., 2009) y la diferenciación de clases basada en SNPs en housekeeping, ha sido incorporada en una prueba de PCR-Tiempo real para identificar especies de *Brucella* (Foster et al., 2008).

Estos desarrollos han tomado como muestra de partida los aislamientos bacterianos, no obstante se espera que la proyección de los mismos sea su implementación en el diagnóstico clínico, forense o en aplicaciones evolutivas, a partir de otro tipo de muestras, tales como tejidos, leche, sangre y fluidos corporales entre otros.

Algunos autores han evaluado el uso de PCR y qPCR a partir de muestras clínicas, reportando resultados exitosos tanto en clínica humana como veterinaria (Sidor et al., 2013, Navarro et al., 2006, Hekmatimoghaddam et al., 2013, Mirnejad et al., 2013). Estudios en Humanos reportan especificidad del 100%, y niveles de sensibilidad desde 95.5% hasta 100% (Mitka et al., 2007).

En relación a su aplicación como herramienta de diagnóstico en Brucelosis bovina es poca la bibliografía reportada y la existente llega a ser contradictoria, (O'Leary et al., 2006), evaluaron el uso de PCR y qPCR a partir de sangre, leche y tejidos linfáticos de animales infectados naturalmente, arrojando como resultado la indetectabilidad de la presencia de DNA de *Brucella* en sangre, y un comportamiento semejante al cultivo microbiológico a partir de las muestras de leche y tejidos linfáticos.

(Mukherjee et al., 2007), evaluaron tres marcadores genéticos: omp2, bscp y 16S rRNA, reportando que las muestras de sangre de bovino fueron

insensitivas cuando se empleó como marcador el gen 16S rRNA; con bscp obtuvieron mayor sensibilidad que con omp2, sin embargo la concordancia de los resultados obtenidos por ambos marcadores frente a los resultados por Elisa, fue semejante ($k=0.37$ y $k=0.34$ respectivamente). Este grado de concordancia mejoró cuando se realizó el análisis conjunto de las PCR frente a ELISA ($k=0.5$), indicando que el uso de más de un marcador genético parece ser un enfoque más confiable para el diagnóstico en animales de campo.

En México investigadores han realizado pruebas implementando PCR convencional a partir de los fluidos corporales, a saber, la sangre y la leche de animales infectados naturalmente, concluyendo que esta es eficaz en la detección de *Brucella spp* (Leal-Klevezas et al., 1995), con una proporción de detección en leche mayor que la del aislamiento microbiológico ($P<0.05$) (Rentería Evangelista et al., 2005), reportando niveles de sensibilidad y especificidad diagnóstica en sangre del 96.3% y 100% respectivamente (Aguirre Arzola et al., 2008), sugiriendo la PCR como herramienta de uso rutinario, por ser un método altamente seguro, sensible y específico.

3 JUSTIFICACION

Las pruebas diagnósticas basadas en el uso de la PCR, constituyen técnicas más robustas y sensibles que las pruebas serológicas, además de que proveen resultados confirmatorios, que permiten la determinación no solo del género sino de la especie de *Brucella* involucrada, con un alto porcentaje de especificidad (OIE, 2012), resultados que no pueden ser obtenidos con ninguna de las pruebas serológicas existentes.

En brucelosis bovina, se han realizado pruebas de PCR punto final, a partir de muestras clínicas de sangre, leche, semen, y queso, logrando la detección del ADN de *Brucella*; estos resultados indican el potencial de este tipo de tecnologías para ser implementadas dentro de la vigilancia epidemiológica en los programas de Control y erradicación.

La PCR en tiempo real ha mostrado ser más eficiente que la PCR de punto final en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, debido a la instrumentación que permite la amplificación del gen objetivo dentro de un sistema cerrado, lo que disminuye el riesgo de contaminación cruzada y por tanto el porcentaje de falsos positivos; el sistema de detección y cuantificación por fluorescencia ofrece una mayor sensibilidad, y la emisión de resultados mediante la implementación de un software, facilita los procesos de validación y estandarización de la prueba y por tanto la obtención de resultados más confiables.

Así mismo mediante un diseño adecuado de la prueba, se puede lograr la detección, identificación y genotipificación de distintas especies de *Brucella* a partir de una misma muestra, lo cual permitiría la construcción de un mapa epidemiológico, mediante el cual se pueda establecer la distribución geográfica por especie de *Brucella* y por huésped, así como la relación existente entre las especies genotipadas según su origen.

Evaluar el rendimiento de la PCR en tiempo real en el diagnóstico de brucelosis bovina a partir de muestras de leche y leucocitos en sangre, provenientes de un hato lechero infectado naturalmente, constituye una valiosa aproximación hacia el establecimiento de la misma, como una alternativa diagnóstica y confirmatoria, y una potencial herramienta epidemiológica.

4 HIPOTESIS

La PCR en tiempo real a partir de leucocitos en Sangre y leche, ofrece una mayor sensibilidad y especificidad, que las pruebas serológicas oficiales y las pruebas de referencia tradicionales, lo cual permitirá detectar de manera oportuna la presencia del agente patógeno en muestras clínicas de los animales aún antes de la seroconversión.

5 OBJETIVOS

5.1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad de la PCR en tiempo real (qPCR), como herramienta de diagnóstico de *Brucella spp*, en un hato lechero con antecedentes de brucelosis bovina.

5.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar y describir el comportamiento de la qPCR, en el diagnóstico de brucelosis bovina en animales infectados naturalmente en un hato lechero.
2. Determinar el porcentaje de animales seronegativos con resultados positivos a qPCR.
3. Evaluar la concordancia de los resultados obtenidos mediante las pruebas de Rosa de Bengala en serie con Rivanol (RB-RV) o con Inmunodifusión radial con Hapteno nativo (RB-IDR) y su concordancia con los resultados obtenidos mediante la prueba de Fluorescencia polarizada (FP).
4. Evaluar la concordancia de los resultados obtenidos por qPCR en leche de animales infectados naturalmente, frente a los resultados obtenidos en el cultivo microbiológico de leche (CM-L).

6 REVISION DE LITERATURA

El diagnóstico de la brucelosis bovina ha sido ampliamente estudiado, y actualmente se cuenta con gran cantidad de procedimientos de laboratorio los cuales pueden ser directos o indirectos de acuerdo al fundamento biológico de cada prueba.

De acuerdo con la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) son métodos directos aquellos capaces de generar un diagnóstico confirmatorio de la enfermedad.

En brucelosis el cultivo microbiológico es considerado como la prueba diagnóstica definitiva, sin embargo, la baja sensibilidad, el alto riesgo biológico, la complejidad en la identificación y la exigencia de un ambiente con nivel de bioseguridad mayor o igual al nivel 3, han generado la necesidad de buscar alternativas diagnósticas, dando como resultado el desarrollo de una gran cantidad de procedimientos indirectos, como las pruebas serológicas, las cuales son las más comúnmente utilizadas.

No obstante estas se ven afectadas por la aplicación de vacunas, principalmente aquellas consistentes en cepas de *Brucella* vivas atenuadas, como la Cepa S19, que generan una respuesta inmunológica humoral, debido a la presencia del LPS O, dificultando la diferenciación entre anticuerpos vacunales y anticuerpos infecciosos.

6.1 Métodos indirectos para el diagnóstico de brucelosis bovina

Consisten en la detección indirecta de la presencia del patógeno, mediante la medición y evaluación de la respuesta inmune humoral específica del hospedero contra el agente infeccioso.

La sensibilidad y especificidad de los métodos indirectos para el diagnóstico de brucelosis se ve influenciada por la respuesta inmunológica del huésped, la vacunación, el estadio de desarrollo de la enfermedad (fase aguda o crónica) y la clase de anticuerpo predominante; así como las posibilidades de reacción cruzada con otros microorganismos relacionados a *Brucella*.

La respuesta contra las infecciones por *Brucella* genera una respuesta integral del sistema inmune, desde una respuesta inmune natural o innata hasta la inmunidad adaptativa resultante de la estimulación de las células presentadoras de antígeno (APC), células NK, células T CD4⁺, su diferenciación en Th1 y Th2, células T CD8⁺, células B y producción de inmunoglobulinas .

Estudios realizados en ratones han mostrado la relevancia de las interleucinas IL-10 y IL-12 en la estimulación de los linfocitos B para la producción de anticuerpos contra *Brucella*. *Brucella spp* desencadena la liberación de IL-12 por parte de las APC, la cual induce la diferenciación de células Th0 en células Th1 que secretan IFN- γ , el cual causa la conmutación de la inmunoglobulina IgG2a en el ratón e IgG3 en humanos; este isotipo es capaz de fijar el complemento y se asocia con una efectiva protección contra virus y bacterias intracelulares. (Golding B, 2001).

Empleando como modelo la rata se demostró que la respuesta tipo Th1 fue significativamente dominante en el curso de la infección aguda comparado con la respuesta tipo Th2 (Khatun et al., 2009)

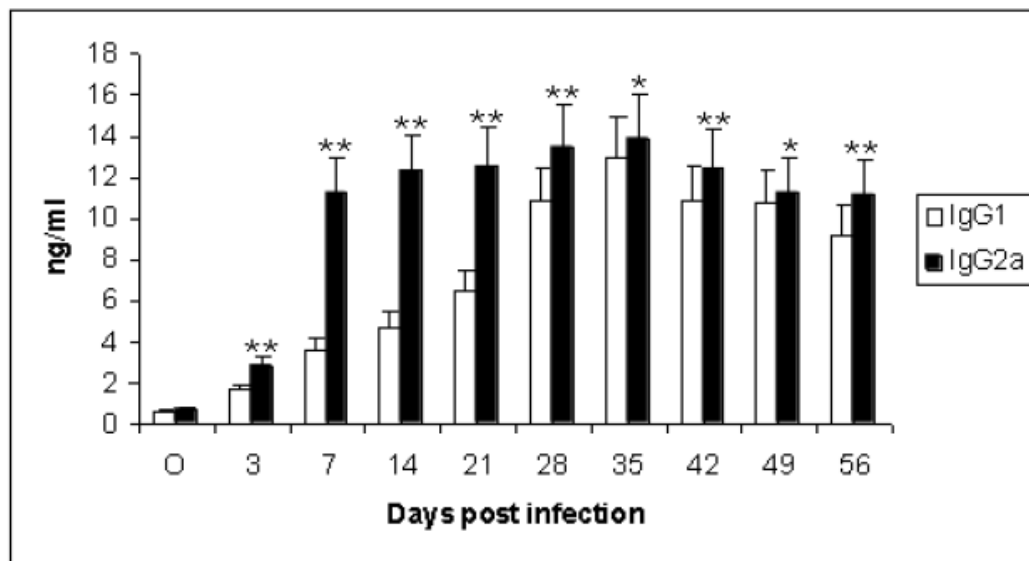


Figura 4 Concentración en suero de IgG1 e IgG2a en ratas, evaluados de 0-56 días después de la Infección con *Brucella abortus*. Tomado del Artículo “Characteristics of the immune response during acute brucellosis in Sprague-Dawley rats” (Khatun et al., 2009)

Datos publicados muestran que la inoculación de *Brucella abortus* en ratones es seguida por un incremento del mRNA para IL-10 (Svetić et al., 1993), la IL-10 interfiere en la diferenciación de Células Th0 a Th1, favoreciendo la diferenciación hacia Th2, que subsecuentemente favorece la producción de IgG1, la cual tiene su efecto a nivel de microorganismos extracelulares.

Investigaciones realizadas exponiendo ratones por periodos prolongados de tiempo a antígeno crudo de *Brucella*, mediante inmunizaciones repetidas vía intraperitoneal, mostraron una pérdida en la capacidad del

antígeno para desarrollar una respuesta linfoproliferativa en vitro. Así mismo se evidenció una tendencia decreciente de la población linfoide para producir interferón- γ cuando son estimulados en cultivo con antígeno. En relación a la respuesta humoral, el incremento de inmunizaciones generó una producción más específica de anticuerpos IgM e IgG1 (Oñate et al., 2000)

Se considera que este patrón Th1/Th2 IgG2a/IgG1 explicaría la resistencia y/o susceptibilidad de los huéspedes a *Brucella* y constituiría la estrategia del patógeno para distraer al sistema inmune, evadir la acción lítica del sistema complemento y establecerse dentro del retículo endoplásmico dando lugar a la infección crónica.

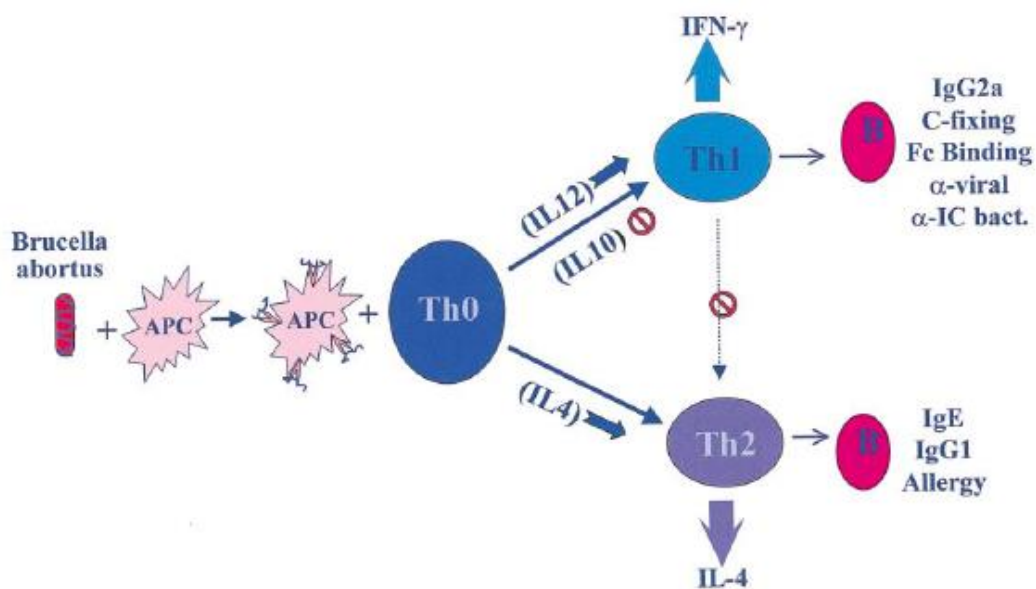


Figura 5 Vías de citocinas estimuladas por *B. abortus*
Tomada del Artículo Immunity and protection against *Brucella abortus* (Golding B, 2001)

La posibilidad de detectar la presencia de Inmunoglobulinas en el suero del huésped mediante su reacción con antígenos de la superficie bacteriana como el LPS-O, que es la fracción más antigénica de *Brucella* y contra la cual

se expresa la mayor reacción inmunológica, ha permitido el desarrollo de diversas técnicas serológicas tales como las reacciones de aglutinación en placa, aglutinación lenta en tubo, prueba de fijación de complemento, distintos ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) y fluorescencia polarizada, entre otras.

El primer método serológico empleado para diagnóstico de brucelosis se fundamenta en el uso de células bacterianas como fuente de antígeno, las cuales se mezclaban con suero de pacientes sospechosos de haber adquirido la enfermedad conocida como fiebre de Malta. (Wright, 1897). No obstante la baja especificidad de este método debido a reacciones cruzadas con otros microorganismos, la prueba constituyó el inicio de un proceso de búsqueda e investigación permanente para el diagnóstico serológico de *Brucella*.

Posteriormente, la implementación de programas de vacunación empleando cepas atenuadas o inactivadas de *Brucella abortus*, tales como la cepa S19, añadió un nuevo reto al diagnóstico serológico ya que esta cepa posee el LPS-O y por lo tanto los anticuerpos inducidos interfieren con la mayoría de técnicas serológicas diagnósticas.

Se han desarrollado otras vacunas como la cepa 45/20 y la RB51, provenientes de cepas rugosas de brúcela que no inducen anticuerpos contra la cadena O del LPS pero que han sido reportadas como causa de abortos en vacas adultas vacunadas durante la preñez, confirmándose por aislamiento y cultivo microbiológico, identificación por PCR y evidencia histopatológica de la bacteria en tejidos bronquiales y placenta (Dougherty et al., 2013). De igual

manera se requiere que las técnicas de diagnóstico empleadas sean capaces de detectar las reacciones cruzadas con otros microorganismos Gram negativos tales como *Salmonella* Grupo N, *Escherichia coli* O:157, *E. coli* O116, *Pseudomonas maltophilia* y *Yersinia enterocolitica* O:9.

La mayoría de las pruebas de laboratorio utilizan como antígenos suspensiones de *Brucella* en fase S o R, según la cepa bacteriana. Las cepas indicadas por la OIE para la preparación de los mismos son *B. abortus* 1119-3 o 99S (OIE, 2012). Estos antígenos permiten detectar anticuerpos anti *Brucella abortus*, *suis* y *melitensis*, mientras que para anticuerpos contra *Brucella canis* y *Brucella ovis* se necesitan antígenos específicos de especie.

Pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico de brucelosis

6.1.1 Aglutinación lenta en tubo de Wright (SAT)

Es la más antigua (1897) y la más utilizada aún para el diagnóstico de brucelosis animal y humana.

Bases metodológicas: se realizan diluciones crecientes del suero a investigar que se enfrentan con cantidades constantes de antígeno observándose la presencia o no de aglutinación luego de un período de incubación. De esa forma se determina el título como la máxima dilución aglutinante.

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

Anticuerpos: IgM, IgG₁ e IgG₂.

Título significativo: no existe consenso en cuanto al título que indica una infección activa, por lo que debe establecerse regionalmente.

6.1.2 Prueba de aglutinación con y sin 2-mercaptuetanol (2-ME)

Es una variante de la anterior que emplea el tratamiento previo con 2-ME como agente reductor que inactiva los anticuerpos de clase IgM.

Bases metodológicas: se realizan simultáneamente las pruebas de aglutinación en tubo con y sin tratamiento del suero con 2-ME.

La diferencia de título obtenida entre ambas pruebas corresponde a los anticuerpos IgM.

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

Anticuerpos: IgG e IgM.

Título significativo: mayor de 1:20.

6.1.3 Reacción de Huddleson

Es una reacción de aglutinación rápida en placa.

Bases metodológicas: se enfrentan cantidades decrecientes del suero a investigar con cantidades constantes de antígeno y se observa la presencia o ausencia de aglutinación. Existe una escala de títulos establecida que permite la expresión de resultados.

Antígeno: suspensión de *B. abortus* al 3-10% de gérmenes en fenol con verde brillante y cristal violeta.

Anticuerpos: IgM, IgG₁, IgG₂ e IgA.

Título significativo: mayor de 1:40. En ocasiones se observa el fenómeno de prozona, donde puede estar ausente la aglutinación en los títulos más altos a causa de un exceso de anticuerpos. Este hecho debe tenerse en cuenta para evitar resultados falsos negativos por esa causa.

6.1.4 Prueba de Rosa de Bengala

Es una prueba rápida en placa utilizada como tamiz.

Bases metodológicas: se pone en contacto una alícuota del suero (30µL) con 30µL de antígeno y se observa la presencia de aglutinaciones.

Antígeno: suspensiones de *B. Abortus* al 8,5%, ajustadas a pH ácido, con el agregado del colorante Rosa de Bengala.

Anticuerpos: IgM e IgG₁.

Sensibilidad: 1000 ng/ml

Se informa como positiva o negativa.

6.1.5 Antígeno Tamponado en Placa (BPA)

Es otra de las pruebas tamices que se realiza en placa.

Bases metodológicas: Se ponen en contacto 80 µL de suero con 30 µL de antígeno y se observa la presencia de aglutinación.

Antígeno: Suspensión de *B. abortus* al 11% con cristal violeta y verde brillante.

Anticuerpos: IgM e IgG₁.

Se informa como positiva o negativa según el resultado de la aglutinación.

6.1.6 Prueba de Coombs

Es una prueba de aglutinación en tubo que permite detectar tanto anticuerpos completos como incompletos.

Bases metodológicas: Se realizan diluciones seriadas del suero a investigar, que se incuban con una suspensión antigénica de *B. abortus* para que se produzca la aglutinación mediada por los anticuerpos. Las suspensiones correspondientes a las diluciones mayores se lavan adecuadamente y se agrega suero antiespecie para detectar la aglutinación mediada por los anticuerpos.

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

Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes de la tipo IgG.

Título significativo: Como mínimo el de la aglutinación de la primera etapa y frecuentemente más elevado. Este incremento es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos no aglutinantes o incompletos.

6.1.7 Fijación de complemento

Es una prueba altamente específica y es la prueba de referencia internacional.

Bases metodológicas: En la primera etapa de la reacción se incuban diluciones del suero inactivado con el antígeno y el complemento. En la segunda etapa se agrega el sistema hemolítico y se compara la hemólisis con los estándares correspondientes a 0, 25, 50, 75 y 100% de lisis.

Antígeno: Puede utilizarse una dilución 1:200 del antígeno empleado en la reacción de Huddleson o un antígeno soluble denominado HS que se prepara a partir de una suspensión bacteriana tratada con solución salina caliente.

Anticuerpos: IgG₁.

Título significativo: Mayor de 1:20.

6.1.8 Inmunofluorescencia indirecta

Es una prueba de interacción primaria.

Bases metodológicas: Se incuban diluciones crecientes del suero a investigar sobre una impronta de *Brucella*. Se agrega el anticuerpo anti-especie marcado con una sustancia fluorescente y se observa en un microscopio de fluorescencia determinándose el título.

Antígeno: suspensión de bacterias fijadas a un portaobjeto.

Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes.

Título significativo: mayor de 1:80 (39).

6.1.9 ELISA

Es una técnica altamente sensible, específica y versátil (40), emplea una cantidad muy pequeña cantidad de suero (41) y da muy buenos resultados aun en presencia de hemólisis.

6.1.9.1 ELISA indirecto (ELISA-I)

Bases metodológicas: El antígeno se fija a placas de poliestireno, luego se incuba con el suero a investigar, posteriormente se incuba con un

anticuerpo anti-especie conjugado con una enzima, se agrega el sustrato correspondiente y se mide el color desarrollado a la longitud de onda determinada. Pueden usarse conjugados que reconozcan las distintas clases de inmunoglobulinas.

Antígeno: Los antígenos pueden ser particulados o solubles, LPS u otras proteínas bacterianas. Se ha obtenido un antígeno libre de LPS denominado antígeno CP, que es altamente eficaz en detectar la respuesta a IgG durante una infección activa evitando al mismo tiempo las reacciones cruzadas debidas al LPS (42).

Anticuerpos: Aglutinantes y no aglutinantes.

La interpretación de esta prueba debe ser aún convalidada.

6.1.9.2 ELISA competitivo (ELISA-C)

Bases metodológicas: se emplea un anticuerpo monoclonal que reconoce el epítotope O del LPS-S, que compite con los anticuerpos del suero por la unión al antígeno fijado en la placa. El revelado se efectúa con un anticuerpo anti-ratón conjugado con una enzima.

Antígeno: LPS-S.

Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes.

Se consideran positivos aquellos sueros con un porcentaje de inhibición mayor del 28%

6.1.10 Polarización de fluorescencia (FPA)

Esta técnica puede realizarse en sangre entera y leche.

Bases metodológicas: Los anticuerpos al unirse al antígeno cambian la velocidad de rotación de la molécula. Si se hace incidir un haz de luz fluorescente polarizada, el ángulo de difracción cambia en función del anticuerpo unido. Este cambio es medido por un detector que lo traduce en una señal.

Antígeno empleado: PSO de *B. abortus* conjugado con isotiocianato de fluoresceína. La interpretación de esta prueba es similar al ELISA-I.

6.1.11 Prueba de Inmunodifusión en agar (IDAG)

Es una técnica de doble difusión en geles.

Bases metodológicas: Se efectúa la reacción de doble difusión del suero a investigar frente a un suero control observando las reacciones de identidad.

Antígeno: Antígeno soluble HS.

Anticuerpos detectados: IgG e IgM.

Los métodos sugeridos por la OIE para el estudio de brucelosis en bovinos son BPA, Rosa de Bengala, fijación de complemento, ELISA-I, ELISA-C, FPA.

6.2 Métodos Directos para el diagnóstico de la Brucelosis bovina

Se basan en la detección del microorganismo o sus productos en diversas muestras biológicas, mediante visualización y/o aislamiento, identificación de un componente antigénico específico estructural como pared

celular o extracelular como las toxinas o por detección de secuencias de ácido nucleico específicas.

La característica más significativa en brucelosis, es la habilidad del patógeno para persistir en el huésped y generar infecciones crónicas. Esta se encuentra relacionada con dos características claves de la virulencia del patógeno: la capacidad de invadir a las células sobreviviendo al medio intracelular y la replicación en el mismo.

El Sistema Regulatorio BvrR/BvrS le permite a *Brucella* coordinar la transición del medio ambiente externo al medio intracelular de los fagocitos profesionales y no profesionales (López-Goñi et al., 2002), una vez fagocitada, la vacuola que la contiene (BCV), interactúa con los compartimientos tempranos pero no con los tardíos de la vía endocítica, adquiriendo marcadores ER durante su maduración y redireccionando el tráfico vesicular para fusionarse con el retículo endoplásmico, en el cual ocurre una extensiva multiplicación, permitiendo la expansión bacteriana y la subsecuente transmisión a nuevas células del huésped. Estas interacciones son dependientes del sistema de secreción tipo IV (virB) (Celli et al., 2003).

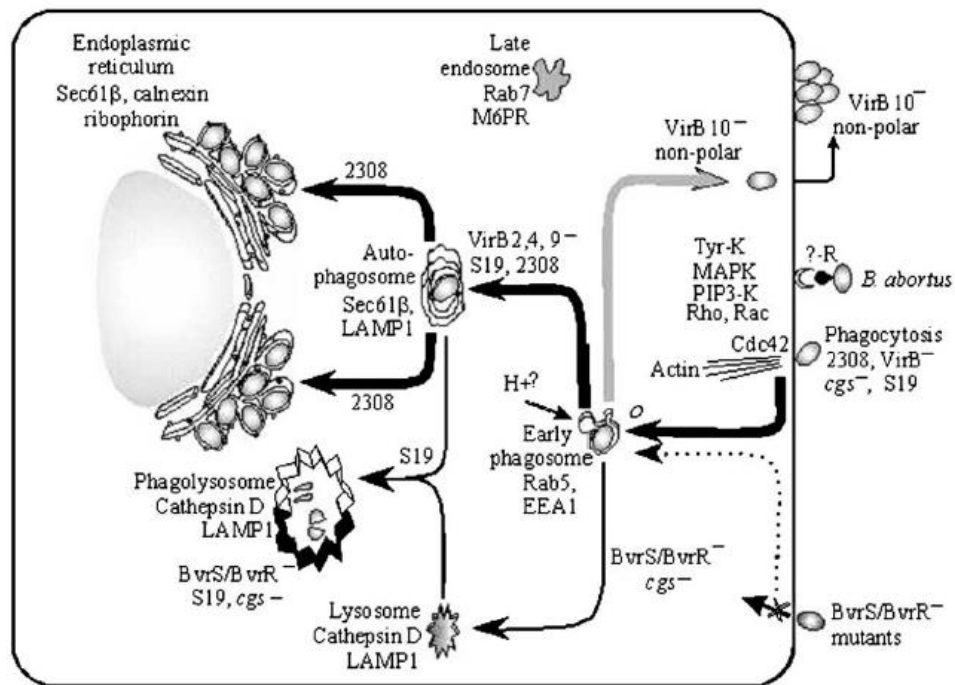


Figura 6 Modelo esquemático de la invasión de *Brucella abortus* y transporte intracelular Tomado del artículo "Brucella intracellular life: from invasión to intracellular replication" Gorvel, J.P. 2002

La persistencia de *Brucella* en el huésped es detectada mediante las siguientes técnicas:

6.2.1 Tinción

6.2.1.1 Método de Zielh-Neelsen modificado por Stamp

Se realiza a partir de frotis de órganos o líquidos biológicos; se fundamenta en las propiedades de resistencia de la pared celular bacteriana a la decoloración por ácidos débiles.

Deben tenerse en cuenta las características morfológicas de *Brucella* como son cocobacilos o bacilos cortos Gram negativos, intracelulares, no esporulados, inmóviles, sin flagelos, ni fimbrias, sin capsula verdadera, que miden entre 0,6–1,5 μm de largo por 0,5–0,7 μm de ancho. Generalmente su

morfología es constante, aunque hay pequeñas variaciones entre especies de *Brucella*, siendo *B. melitensis* la expresa mayor de número de formas coccas mientras que *B. abortus* y *B. suis* presentan más formas bacilares.

La sensibilidad de esta técnica se ve afectada por varios factores, entre los cuales se encuentra la presencia de sustancias interferentes en algunos líquidos corporales, como los glóbulos de grasa en la leche, y la concentración bacteriana en los tejidos y/o líquidos a estudio, así como la experiencia y experticia del analista.

La interpretación de los resultados obtenidos es de tipo presuntiva, ya que otros microorganismos causantes de aborto tales como: *Chlamydia abortus* o *Coxiella burnetii*, poseen características morfológicas y tintoriales semejantes a *Brucella*.

Los resultados tanto Positivos como Negativos deben ser confirmados.(OIE, 2012)

6.2.1.2 Inmunofluorescencia directa

Constituye una alternativa de diagnóstico diferencial aplicado a los métodos de tinción como la tinción de Zielh-Neelsen y Köster y cultivo bacteriano, mediante la implementación de anticuerpos obtenidos a partir de suero de conejos hiperinmunizados marcados con isocionato de fluoresceína y contraste por contratinción del tejido (Corbel, 1973). Estudios realizados en frotis de loquios han reportado una sensibilidad del 82% y especificidad del 94% (Alberts and Erasmus, 1995).

No obstante, estos niveles de sensibilidad y especificidad pueden verse afectados por el tipo de tejido y corte seleccionado, como se ha descrito en análisis de tejidos de pulmón e hígado de fetos abortados (Pérez et al., 1998). Se puede considerar que la fluorescencia directa tiene especificidad superior a la de las técnicas de tinción convencionales, permitiendo la diferenciación de *Brucella* y otras especies de interés como *Coxiella burnetii*. Una ventaja de esta técnica es el corto tiempo requerido para el montaje y lectura de la prueba, que puede tomar aproximadamente dos horas frente a seis días que requiere el cultivo microbiológico.

6.2.2 Cultivo Microbiológico

Fue la primera técnica empleada por Bruce en 1887 para la identificación del agente causal de la denominada fiebre de Malta, logrando su aislamiento y descripción. El cultivo microbiológico de brúcela es considerado como prueba de oro para el diagnóstico de brucelosis y se compone de dos fases:

6.2.2.1 Aislamiento y cultivo

Brucella puede aislarse de varios tipos de muestras como tejidos provenientes de placenta o fetos abortados, medula ósea, leche y sangre. Debido a que las bacterias del género *Brucella* son de crecimiento lento, deben

mantenerse en incubación un tiempo no menor a 30 días en condiciones de microaerofilia con 10% de CO₂. En el caso de las muestras hemáticas, se ha implementado el uso de frascos herméticamente cerrados con medios de cultivo bifásicos, que pueden estar acoplados a sistemas automatizados de detección de crecimiento, permitiendo detectar más del 95% de los cultivos positivos antes del séptimo día de incubación (Koneman, 2006).

En general los cultivos deben realizarse en medios enriquecidos para lograr una alta sensibilidad y selectividad mediante el uso de antibióticos para obtener alta especificidad, no obstante estudios comparativos recientes han demostrado que medios altamente enriquecidos permiten el crecimiento de biota contaminante acompañante que enmascara y reduce el porcentaje de recuperación y aislamiento de *Brucella* a partir de muestras contaminadas; por el contrario, medios altamente selectivos, terminan por inhibir algunas especies tales como *Brucella ovis*, *Brucella melitensis* y algunas biovariedades de *Brucella abortus*.

A partir de estos análisis se han propuesto nuevas formulaciones que logren superar estas limitaciones. Ahora se tiene disponibilidad de un nuevo medio de cultivo que según los estudios publicados ha demostrado un alto rendimiento diagnóstico en el aislamiento de todas las especies de *Brucella* a partir de diferentes tipos de muestras (De Miguel et al., 2011)

6.2.2.2 Identificación

Algunas de las especies de *Brucella* incluyen distintos biotipos, que mediante las técnicas convencionales, se diferencian por un análisis de aproximadamente veinticinco características fenotípicas, siendo las más importantes el requerimiento de CO₂ para crecimiento, producción de ureasa y H₂S, sensibilidad a tinciones como fuchina, tionina y azul de tionina y fagos, reacción de aglutinación con anticuerpos monoclonales para antígeno A o M, y algunas otras características metabólicas evaluadas mediante pruebas bioquímicas.

Cuadro 1 Especies que integran el género *Brucella*, hospedadores conocidos y algunas características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades. A y M: configuraciones alternativas del PSO, R: LPS de las cepas rugosas

Especie	Hospedador	Biovariedad	H ₂ S	Necesidad de CO ₂	Sensibilidad a los colorantes		Aglutinación con sueros monoespecífico		
					Tionina	Fuscina	A	M	R
B. melitensis	Cabras, bovinos, ovino, cánidos, hombre	1	-	-	+	+	-	+	-
		2	-	-	+	+	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	+	-
B. abortus	Bovinos Canidos, hombre	1	+	+	-	+	+	-	-
		2	+	+	-	-	+	-	-
		3	+	+	+	+	-	-	-
		4	+	+	-	+	-	+	-
		5	-	-	+	+	-	+	-
		6	-	-	+	+	+	-	-
		7	+	-	+	+	+	+	-
		8	-	+	+	+	+	+	-
		9	+	+	+	+	-	+	-
B. suis	Cerdos, canidos, hombre	1	-	-	+	-	+	-	-
		2	-	-	+	-	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	-	-
		4	-	-	+	-	+	+	-
		5	-	-	+	-	-	+	-

B. canis	Canidos. hombre	ND	-	-	+	-	-	-	+
B. neotomae	Roedores	ND	+	-	-	-	+	-	-
B. ovis	Ovinos	ND	-	+	+	-	-	-	+
B. pinnipedial e	Focas, leones marinos, morsas	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B. cetaceae	Ballenas, marsopas y delfines	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tomado del Artículo "Brucelosis: una revisión práctica" (Castro et al., 2005)

Como apoyo al diagnóstico microbiológico se han implementado técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de especies y biovariedades de brúcela aisladas en cultivo (Bricker and Halling, 1994), así mismo, se ha reportado el uso de técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FSH), asociada a hemocultivos para el diagnóstico de brucelosis en humanos (Wellinghausen et al., 2006).

Sin embargo, el mayor inconveniente del cultivo microbiológico de *Brucella* radica en el riesgo zoonótico asociado a la manipulación de este microorganismo, que ha sido clasificado dentro del grupo de riesgo III en el Manual de Bioseguridad para los laboratorios elaborado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), con requerimientos de bioseguridad nivel de contención 3 o superior, ya que la brucelosis es una de las enfermedades que con mayor facilidad se contraen en el laboratorio (OIE, 2012)

6.2.3 Métodos basados en la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La implementación y uso de técnicas analíticas basadas en PCR para el diagnóstico de la Brucelosis bovina tuvo como principal dificultad la diferenciación entre especies de *Brucella* debido a la limitada diversidad genética exhibida por estos microorganismos.

En general, una especie diferente es reconocida si se observa una distancia genética mayor que 0.5; estudios realizados mediante electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), han demostrado que la distancia genética entre las especies de *Brucella* es inferior a 0.5. y han determinado la existencia de dos subgrupos, uno conformado por *Brucella marina*, *B. abortus*, *B. neotomae* y *B. ovis*; y el otro por *B. canis*, *B. suis* y *B. melitensis* (Gándara et al., 2001).

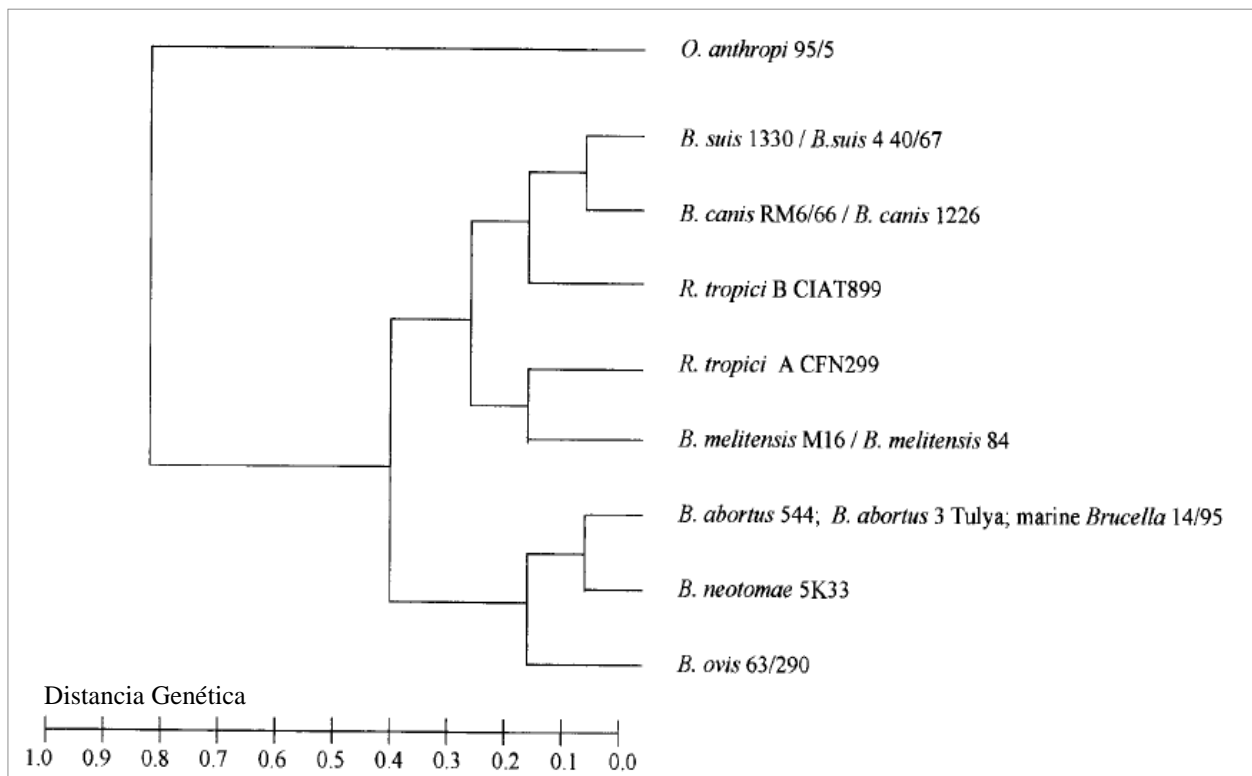


Figura 7 Dendrograma derivado de MLEE
Tomado del Artículo "Limited genetic diversity of *Brucella* spp" (Gándara et al., 2001)

Es por esta razón que las primeras PCRs desarrolladas para *Brucella* identificaban el género pero no lograban realizar discriminación entre especies (Baily et al., 1992a, Fekete et al., 1990, Herman and De Ridder, 1992).

No obstante, y en general, las técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, presentan alta especificidad en el diagnóstico e identificación de *Brucella*; sin embargo, el éxito de estas pruebas depende de la efectividad de las técnicas de extracción de ácido nucleico y los cebadores empleados.

6.2.3.1 Extracción de ADN de *Brucella*

Existen protocolos normalizados para la extracción de ADN a partir de diferentes tipos de muestras tales como: Cultivos microbiológicos (Wen-ping and Tsong-teh, 1993), Leche (R. Poutou, 2005, Murphy et al., 2002) y Sangre (Leal-Klevezas et al., 1995), o kits comerciales como: QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit, PROMEGA Wizard® Genomic DNA Purification Kit, DNAzol® BD, entre otros.

La extracción de ADN desde aislamientos microbiológicos de *Brucella* ha sido la más utilizada para las pruebas de PCR, mas no la única, también se ha obtenido ADN de *Brucella* a partir de muestras biológicas tales como: tejidos de hígado, riñón, ganglios linfáticos (Qasem et al., 2015), recién nacidos o fetos abortados (Guler et al., 2003, SOLMAZ et al., 2014), leche, sangre entera

(O'Leary et al., 2006), suero (Al-Ajlan et al., 2011), semen (Junior et al., 2013) y alimentos tales como queso (Tina S et al., 2013).

6.2.3.2 Genes empleados en el diseño de cebadores para detección e identificación de ADN de *Brucella*

El diseño de cebadores para ser empleados en PCR de *Brucella*, fue dirigido inicialmente hacia la identificación del género, estos genes se caracterizan por estar bien conservados en todas las especies de *Brucella*; los más citados en la bibliografía consultada fueron el gen *bscp31* (William S. Probert and Graves, 2003, Baily et al., 1992b, Al Dahouk et al., 2007, Gopaul et al., 2008, Aguirre Arzola et al., 2008) y el gen *Omp2* (Leal-Klevezas et al., 1995, Aguirre Arzola et al., 2008).

Posteriormente y a partir del descubrimiento del polimorfismo que surge en las especies de *Brucella* debido a la localización del elemento IS711 en el cromosoma, el cual permitió la diferenciación genética de algunas especies de *Brucella* (Bricker and Halling, 1994), el diseño de cebadores se enfocó en la búsqueda de polimorfismos en diversos genes, para la diferenciación entre especies y biovares, así como entre cepas vacunales y cepas silvestres (García-Yoldi et al., 2006).

Cuadro 2 Hallazgos genéticos utilizados para la diferenciación de las especies de *Brucella*

Gen	Hallazgo	Especie
<i>Omp31</i>	Delección de 25,061	<i>Brucella abortus</i>

(<i>BMEI1826-BMEI10850</i>)	bp	biovariedades
WboA (<i>BMEI10998</i>)	Inserción de IS711	<i>Brucella abortus</i> RB51
EryC (<i>BMEI10427-BMEI10428</i>)	Delección de 702 bp	<i>Brucella abortus</i> S19
rpsL (<i>BMI0752</i>)	Mutación puntual	<i>Brucella melitensis</i> Rev 1
bp26 (<i>BMEI0535-BMEI0536</i>)	Inserción de IS711	<i>Brucella</i> aisladas de mamíferos marinos
Polysaccharide Deacetylase (<i>BME1435</i>)	Delección de 976 bp	<i>Brucella canis</i>
ABC proteínas transportadoras (<i>BR0951-BR0955</i>)	Delección de 2,653 bp	<i>Brucella. melitensis</i> y <i>Brucella. abortus</i>
Familia CRP (<i>BMEI10986-BMEI10988</i>)	Delección de 2,203 bp	<i>B. neotomae</i>
WboA (<i>BMEI10993-BMEI1012</i>)	Delección de 15079 bp	<i>Brucella ovis</i>

Tomado del Artículo "Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains"(López-Goñi et al., 2008)

Actualmente se han determinado nuevos polimorfismos, siendo los hallazgos más recientes aquellos originados por mutaciones puntuales en genes específicos, denominados Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (Foster et al., 2008, Gopaul et al., 2008, Gopaul et al., 2010). En las tablas siguientes y de acuerdo a la bibliografía consultada, se listan los genes más empleados para la detección e identificación de ADN de *Brucella*, tanto a nivel de género como de especie.

Cuadro 3 Genes empleados con más frecuencia en el diseño de cebadores para la identificación de Brucella a nivel de género, especie y cepa

Específicos para género		
Gen	Proteína	Referencia
<i>Bscp31</i>	Proteína inmunogénica	(Baily et al., 1992a)
<i>Omp2</i>	Porina	(Leal-Klevezas et al., 1995)

<i>rsmA</i>	16SrRNA	(Gopaul et al., 2008)
<i>IS711</i>	Elemento de inserción	(Wattiau et al., 2011)

<i>Específicos para especie</i>		
<i>Gen</i>	<i>Proteína</i>	<i>Referencia</i>
<i>IS711</i>	Elemento de inserción	(Bricker and Halling, 1994)
<i>abc</i>	Proteína transportadora de unión de ATP	(Foster et al., 2008)
<i>alkB</i>	Alkylated DNA repair	(William S. Probert and Graves, 2003)
<i>aroA</i>	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	(Gopaul et al., 2008, Whatmore et al., 2007)
<i>aroE</i>	Shikimate 5-deshidrogenasa	(Foster et al., 2008)
<i>bcbp31</i>	Proteína inmunogénica	(William S. Probert and Graves, 2003)
<i>BMEI1162</i>	Proteína no caracterizada	(William S. Probert and Graves, 2003)
<i>cysW</i>	Proteínas ABC transportadoras de sulfato	(Foster et al., 2008)
<i>dnaK</i>	Proteína chaperona	(Whatmore et al., 2007)
<i>fbaA</i>	Fructosa-bifosfato-aldolasa	(Gopaul et al., 2008)
<i>gap</i>	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	(Gopaul et al., 2008, Whatmore et al., 2007)
<i>gdh</i>	NAD-glutamato deshidrogenasa	(Foster et al., 2008)
<i>glk</i>	Glucocuinasa	(Scott et al., 2007, Winchell et al., 2010, Whatmore et al., 2007)
<i>groEL</i>	Chaperonina	(Foster et al., 2008)
<i>gyrB</i>	DNA girasa Subunidad β	(Whatmore et al., 2007)
<i>omp25</i>	Proteína 25 de membrana externa	(Scott et al., 2007, Foster et al., 2008, Gopaul et al., 2008, Whatmore et al., 2007)
<i>omp31</i>	Proteína de 31 kd de membrana externa	(García-Yoldi et al., 2006)
<i>pip</i>	Proline iminopeptidasa	(Foster et al., 2008)
<i>prpE</i>	propionate--CoA ligase	(Gopaul et al., 2008)

Específicos para especie		
Gen	Proteína	Referencia
<i>rpoB</i>	Subunidad β de la RNA polimerasa	(Foster et al., 2008)
<i>trpE</i>	Antranilato sintasa	(Scott et al., 2007, Foster et al., 2008, Gopaul et al., 2008, Whatmore et al., 2007)
<i>int-hyp</i>	Proteína hipotética	(Winchell et al., 2010, Whatmore et al., 2007)
<i>wboA</i>	Glicosiltransferasa	(RAMESH VEMULAPALLI, 1999, Vemulapalli et al., 1999, García-Yoldi et al., 2006)
<i>wboB</i>	Glicosiltransferasa	(García-Yoldi et al., 2006)
<i>eryD</i>	Regulador de la expresión del operon ery	(Gopaul et al., 2010, Renteria Evangelista et al., 2005)

ESPECIFICOS PARA CEPA		
GEN	FUNCION	REFERENCIA
<i>lysR</i>	Familia de reguladores de la transcripción	(Gopaul et al., 2010)
<i>clpX</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	(Gopaul et al., 2010)
<i>BAB1</i>	Glutathione S-transferase	(Gopaul et al., 2010)
<i>rpsL</i>	Proteina ribosomal S12	(Gopaul et al., 2010)
<i>proA</i>	Gamma-glutamil fosfato reductasa	(Gopaul et al., 2010)

6.2.3.3 PCR convencional o de Punto final

La PCR convencional fue implementada para la identificación de especies de aislados de Brucella, recibiendo gran aceptación por parte de la comunidad científica, dado que constituyó un valioso aporte a la microbiología,

minimizando el número de pruebas a realizar y por tanto los riesgos asumidos por los analistas.

La PCR denominada AMOS, permitió la identificación y diferenciación de las cuatro principales especies de *Brucella* que afectan la producción pecuaria: *Brucella abortus* (A), *Brucella melitensis* (M), *Brucella ovis* (O) y *Brucella suis* (S) y algunas biovariedades de estas (Bricker and Halling, 1994), posteriormente con el fin de distinguir las cepas vacunales de las cepas silvestres, se adicionaron nuevos cebadores (Bricker and Halling, 1995).

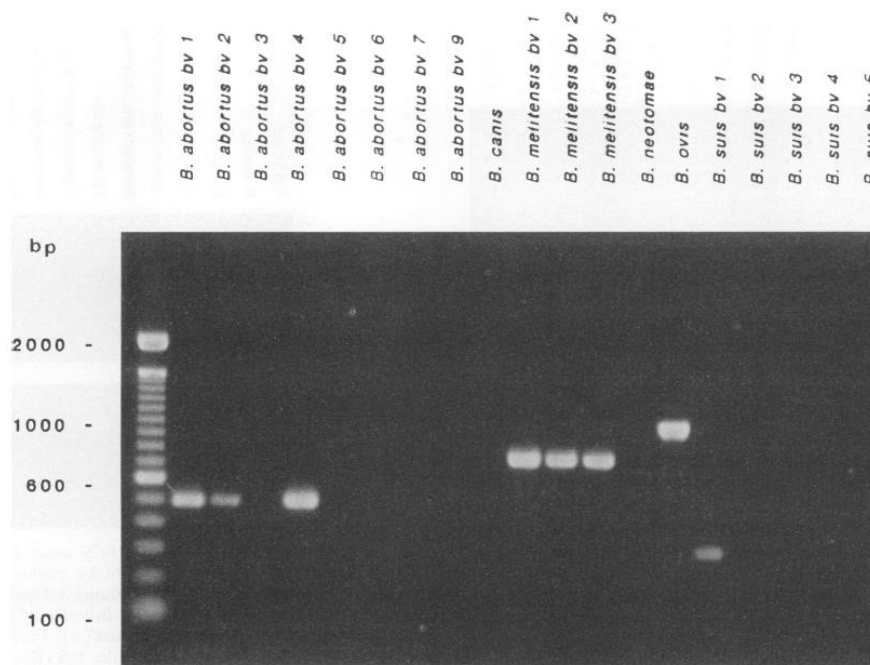


Figura 8 Productos de PCR AMOS, empleando 19 biovariedades de *Brucella*
Tomado del Artículo "Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*,
Brucella ovis, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR" (Bricker and Halling, 1994)

Posteriormente y basados en análisis previos que demostraron la existencia de fragmentos de DNA únicos para cada especie de *Brucella*, se diseñó una prueba de PCR múltiplex con el uso de ocho pares de cebadores,

obteniendo un perfil único para cada especie de *Brucella* analizada. (García-Yoldi et al., 2006)

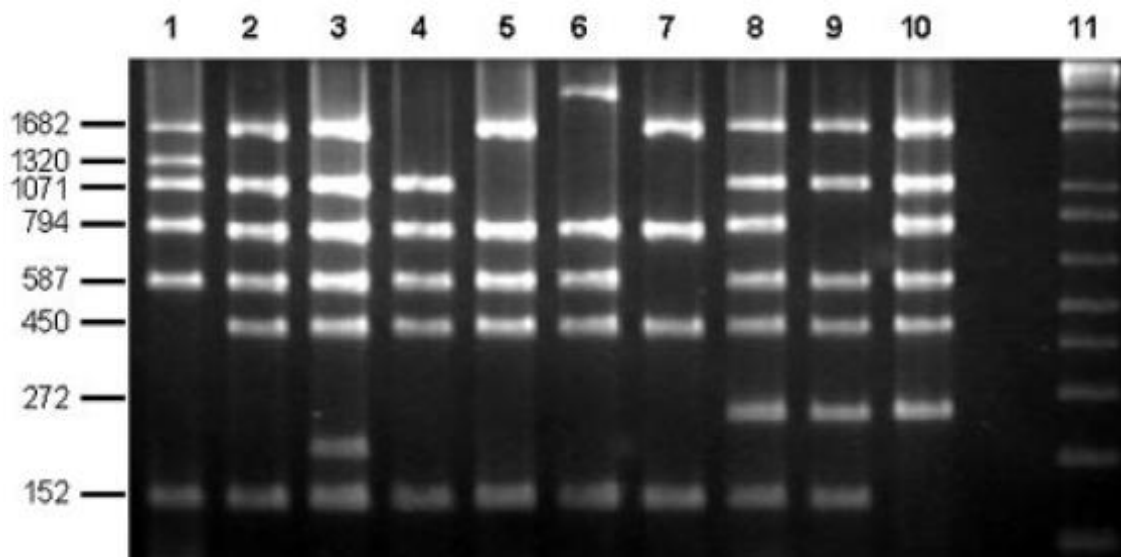


Figura 9 Perfiles electroforéticos obtenidos para las distintas especies de *Brucella*. Tomado del Artículo "Multiplex PCR Assay for the Identification and Differentiation of all *Brucella* Species and the Vaccine Strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1" (García-Yoldi et al., 2006)

- Línea 1: *Brucella* aislada de mamíferos marinos
- Línea 2: *Brucella melitensis*
- Línea 3: Cepa vacunal *Brucella melitensis* Rev1
- Línea 4: *Brucella ovis*
- Línea 5: *Brucella abortus*
- Línea 6: Cepa vacunal *Brucella abortus* RB51
- Línea 7: Cepa vacunal *Brucella abortus* S19
- Línea 8: *Brucella suis*
- Línea 9: *Brucella canis*
- Línea 10: *Brucella neotomae*
- Línea 11: Marcador de tamaño molecular de 1 kb (DNA ladder Invitrogen Ltd)

Esta prueba fue validada en siete laboratorios de Europa, empleando un total de 6254 cepas de diferentes especies de *Brucella*, aisladas de diferentes orígenes geográficos y a partir de diferentes especies incluyendo aislamientos de origen humano.

La identificación se basó en el número y tamaño de siete productos amplificados por PCR, que se visualizaron mediante patrones de bandas

claramente específicos para cada una de las especies analizadas, con excepción de algunas cepas de *B. canis* que mostraron el mismo perfil de *B. suis*. (López-Goñi et al., 2008)

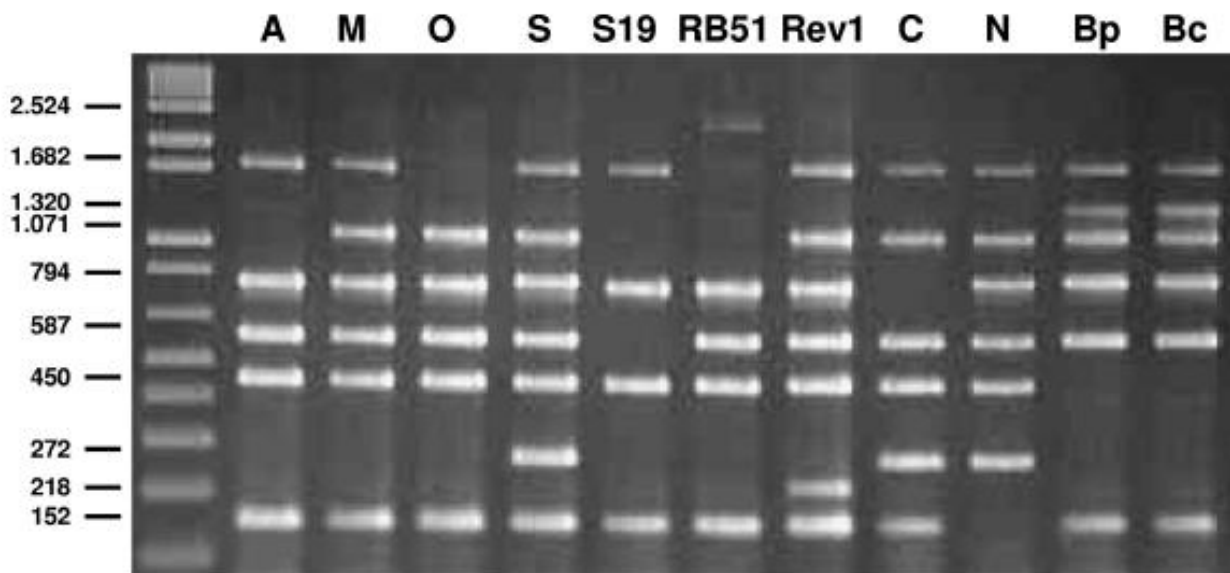


Figura 10 Diferenciación de todas las especies de *Brucella* y S19, RB51 y cepas vacunales Rev.1 por Bruce-ladder multiplex PCR. Tomado del Artículo "Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains" (López-Goñi et al., 2008)

- Línea 1: *Brucella abortus*
- Línea 2: *Brucella melitensis*
- Línea 3: *Brucella ovis*
- Línea 4: *Brucella suis*
- Línea 5: Cepa vacunal *Brucella abortus* S19
- Línea 6: Cepa vacunal *Brucella abortus* RB51
- Línea 7: Cepa vacunal *Brucella melitensis* Rev1
- Línea 8: *Brucella canis*
- Línea 9: *Brucella neotomae*
- Línea 10: *Brucella pinnipedialis*
- Línea 11: *Brucella ceti*

Sin embargo, (Kang et al., 2011)), introdujeron nuevos set de cebadores, para sustituir algunos de los empleados en la Técnica Bruce-ladder, logrando la diferenciación entre *B. canis* y *B. suis*.

Esta técnica aunque es muy eficiente en términos de diferenciación entre especies ya que todas las cepas de la misma especie presentan el mismo perfil (patrón de bandas), no logra diferenciar entre biotipos de una misma especie, no obstante si logra la diferenciación entre cepas vacunales S19 y RB51, y cepas aisladas en procesos infecciosos naturales (López-Goñi et al., 2008) , aspecto de gran importancia en la definición del status sanitario de un hato o rebaño.

6.2.3.4 PCR en Tiempo Real qPCR

Desde su introducción, la PCR en tiempo real ha generado un impacto positivo en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, Su éxito ha sido debido a la desarrollo de nuevos químicos y la instrumentación que permite la detección de productos de PCR sobre una base en tiempo real dentro de un sistema cerrado en un rango de mayor numero de ciclos, lo cuales se realizan en menor tiempo comparado con los termocicladores convencionales, el sistema de detección mediante flurocromos ofrece una mayor sensibilidad debido a la mayor sensibilidad de la detección fluorescente sistema, ofrece un rango dinámico mucho más amplio en comparación con la PCR convencional y el sistema de detección incorporado ofrece la confirmación y cuantificación de productos, con un salida de resultado electrónica que se presta a alta notificación electrónica puesto a través.

6.2.3.4.1 Análisis de datos obtenidos del PCR tiempo real

En el análisis de resultados de la PCR en tiempo real se emplean varios métodos, dependiendo del tipo de experimento realizado, en los experimentos de PCR tiempo real cuantitativa (qPCR), se emplea la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa (Livak and Schmittgen, 2001).

Para lograr el aseguramiento de la calidad y confiabilidad de los resultados emitidos, independientemente del tipo de experimento y del método aplicado, se requiere que los análisis de los datos obtenidos desde varias muestras sean comparables entre si y frente a muestras controles, tales como: Controles positivos, Controles Negativos y Estándares; la precisión final del estudio dependerá de que esta comparación sea hecha correctamente.

Los equipos de acuerdo al fabricante, difieren considerablemente entre sí, en varios aspectos, incluyendo las fuentes de luz y el enfoque de la adquisición de datos de fluorescencia, así como en el software y los métodos de comparación, lo cual influye tanto en la precisión como en la estabilidad, esto se hace más evidente cuando la señal de detección es débil.

En los últimos años y con el objetivo de incrementar la significancia de los datos obtenidos mediante PCR en tiempo real, con las consecuentes aplicaciones en la investigación y el diagnóstico, los científicos y los representantes de los fabricantes de equipos intentan unificar y estandarizar

los procedimientos tanto para el diseño del experimento, como para el análisis de los resultados (Rebrikov and Trofimov, 2006).

7 MATERIALES Y METODOS

7.1 Materiales y Equipos

Cuadro 4 Listado de Materiales, Equipos y Reactivos empleados durante la ejecución del proyecto

	PCR-RT	CULTIVO	SEROLOGIAS	MUESTREO
EQUIPOS	Termociclador en Tiempo Real <i>CFX Connect</i> de <i>Bio-Rad</i>	Incubadora con atmosfera de CO ₂	Lámpara de lectura	Centrifuga
	Lector de qPCR	Refrigerador de 4 °C a 8°C	Agitador Orbital de placas	Refrigerador de 4 °C a 8°C
	Agitador vortex	Congelador: de 0 °C a -20 °C	Cronómetro	Congelador: de 0 °C a -20 °C
	Micropipeta multicanal 2 µl	Congelador: de -80 °C	Micropipeta monocanal 5-50 ul	Congelador: de -80 °C
	Micropipeta monocanal 5-10 µl	Cabina de bioseguridad clase II tipo A2	Cronómetro	
	Micropipeta monocanal 100-1000 µl	Placas de calentamiento con agitación magnética	Equipo de lectura de fluorescencia	
	Platina caliente (50 °C) para tubos 0.5 y 0.2 ml	Mechero Buchner de gas LP, VWR	Refrigerador o cámara de refrigeración: de 0 °C a 4 °C	
	Micro centrífuga capacidad 14 000 RPM	autoclave/esterilizador de vapor a presión		
	Estufa incubadora capacidad 37 °C	Microscopio óptico		
	Campana de seguridad Air-Clean System			
MATERIALES	Tiras de tubos para PCR claras. Cat: TLS0801. Control: 29669 Biorad	Cajas Petri 100x15 mm, sin divisiones de plástico. VWR	Placas de vidrio	Aguja para toma múltiple 20G x 38 mm
	Tapas ópticas planas para tubos de PCR. Cat:	Erlenmeyer 500 ml	Puntas para micropipeta de 5-50 ul	Solución de yodo desinfectante

	PCR-RT	CULTIVO	SEROLOGIAS	MUESTREO
	TCS0803. Orden: 480000268. Biorad Tubos para micro centrífuga de 1.5 ml esterilizados. WVR	Erlenmeyer 250 ml	Palillos	Holder desechable
	Gradilla para tubos de PCR y 1.5 ml	Tubos de centrifuga cónicos estériles VWR, 25 mL	Sueros de referencia	Alcohol im potable 70°
	Contenedor térmico/frío	Puntilla para micropipeta desechable 100-1000 uL, con filtro, estériles, Neptune	Gradilla para tubos	algodón
	Puntas para pipeta con filtro, estériles. WVR.	Tubos eppendorf 1 ml, libres de DNAsa		Tubos tapa lila (EDTA)
	Lentes de seguridad	Tubos eppendorf tapa rosca de 1.5 ml libres de DNAsa		Tubos tapa roja
	Guantes de nitrilo			Guantes de látex
	Bata de laboratorio			Lentes de bioseguridad
				Overoles
				Tapa bocas
				Gorros desechables
				Tubos de centrifuga cónicos VWR, 50 mL
				Tubos eppendorf 2 ml, libres de DNAsa
				Hielera
			Refrigerantes	
			Bolsas rojas autoclavables	
			Papel secante	
			Contenedor corto punzantes	
REACTIVOS	Quiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, Cat:69506 , Lote:136260897	Suplemento selectivo Brucella Oxoid	Antígeno Rosa de bengala al 8%. Aba Test tarjeta, de Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. Lote: 3720623	Cloruro de benzalconio

	PCR-RT	CULTIVO	SEROLOGIAS	MUESTREO
	Promega Kit Wizard Genomic DNA purification. Ref: A1120. Lote: 138667	Tanque de CO2 medicinal	Antígeno Rosa de bengala al 4% Aba Test Rivanol, de Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. Lote: 3720265	
	Pares de Cebadores	Agar triptosa soya	Kit de Fluorescencia Polarizada "Brucella S antibody test kit", de Diachemix. Ref: B1001. Lote: 124	
	Cepas vacunales de Brucella abortus S19 y RB51	Colorantes de Gram	Solución Rivanol al 1% de Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. Lote: 3740008	
		Colorante Zielh- Nielsen modificado	Suero de referencia para Brucelosis POSITIVO	
	Componentes sanguíneos	Suplemento selectivo Oxoid para el aislamiento de Brucella Ref: SR0083	Suero de referencia para Brucelosis NEGATIVO	

7.2 Metodología

7.2.1 Diagrama de flujo metodológico

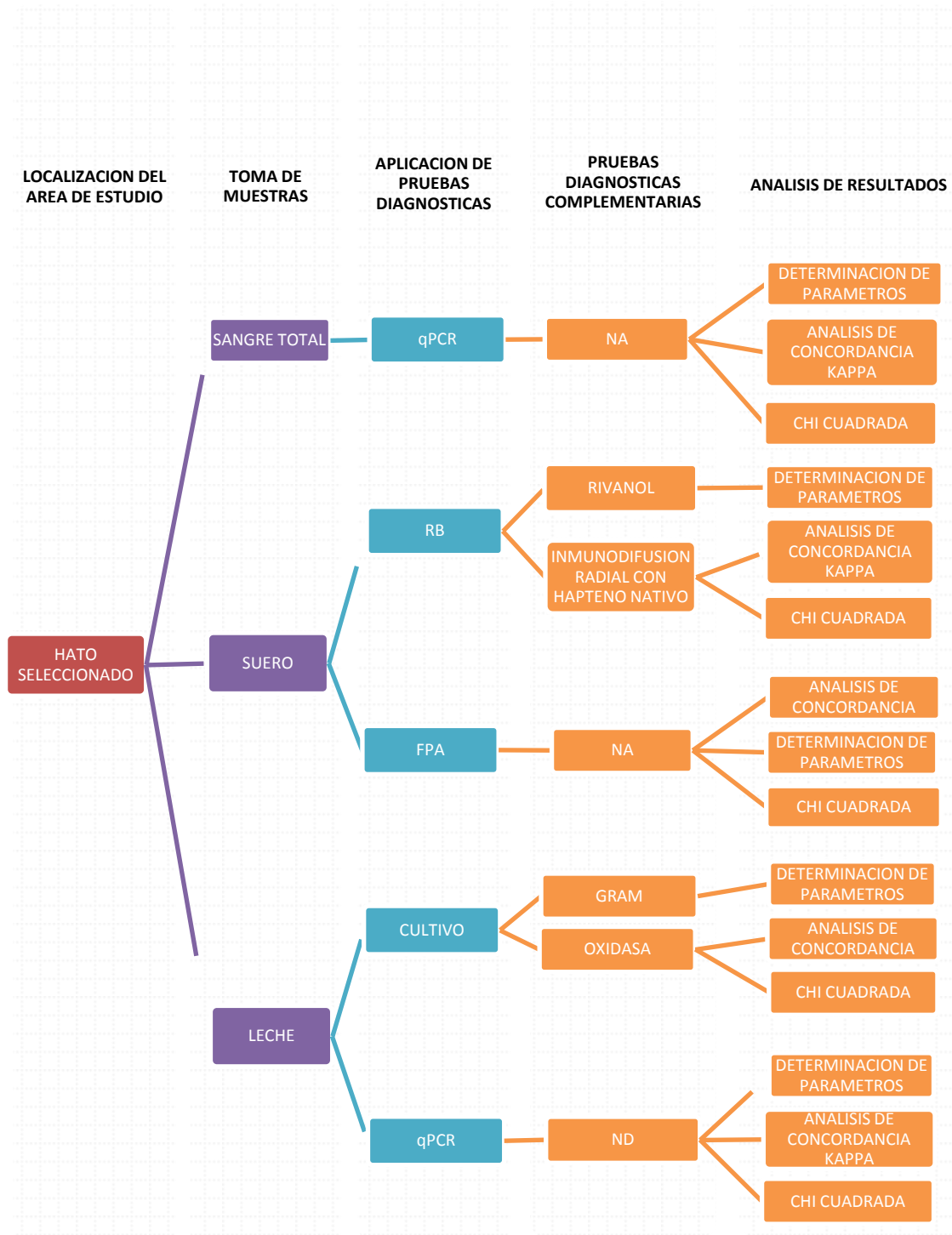


Figura 11 Diagrama de flujo metodológico

7.2.2 Localización del área de estudio

7.2.2.1 Actividades de Campo

Las actividades del proyecto relacionadas con la toma de muestras se realizaron en un hato ganadero, ubicado en jurisdicción del municipio de Tijuana, el cual fue seleccionado por conveniencia, teniendo en cuenta que el mismo presenta historial de diagnóstico serológico de brucelosis bovina, y se contó con el apoyo y aprobación del productor.

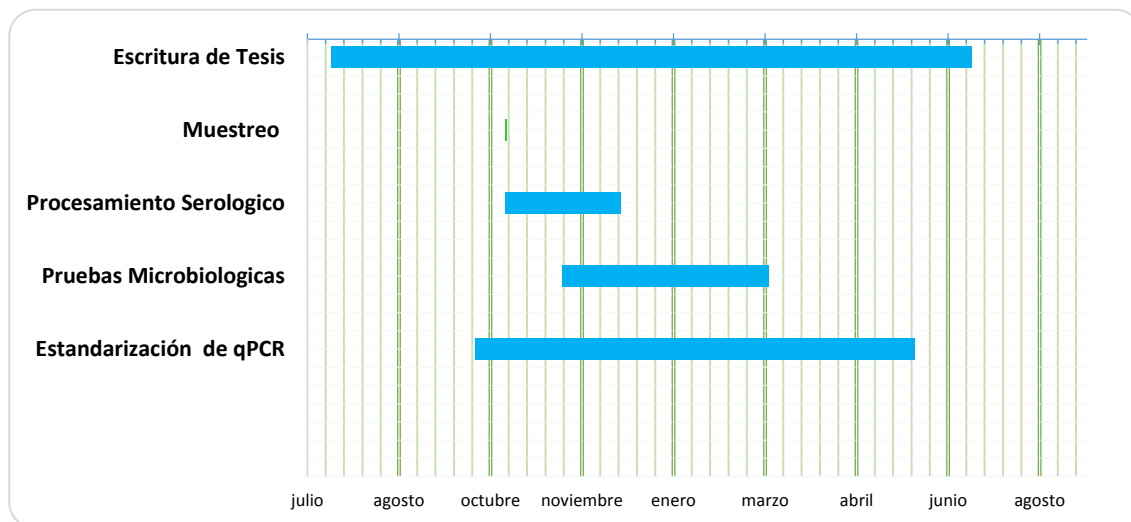
7.2.2.2 Actividades de laboratorio

Las actividades correspondientes a procesamiento de muestras, ejecución de procedimientos y protocolos de pruebas diagnósticas, fueron realizadas en los laboratorios de Brucelosis y Tuberculosis, y Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de investigación del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California IICV-UABC.

7.2.3 Duración del estudio

Las actividades concernientes a la escritura de la tesis se iniciaron desde el periodo 2013-2 y continuaron hasta finalizar el periodo 2015-1. En relación a las actividades propias de la ejecución del proyecto (procesamiento serológico, pruebas microbiológicas y estandarización de qPCR), estas fueron iniciadas una vez se autorizó el muestreo el día 17 de Octubre de 2014, y se

continuaron de forma ininterrumpida hasta finalizar la totalidad del procesamiento de la muestras.



7.2.4 Origen de la información

Los datos generales del Hato fueron obtenidos mediante el diligenciamiento de un formato diseñado para tal fin, y los de cada uno de los animales muestreados se obtuvieron a partir del informe sistematizado arrojado por el software de control de actividades veterinarias con que cuenta el productor.

Los datos correspondientes al estatus sanitario del hato y la definición de la presencia o ausencia de Brucelosis en cada uno de los animales, se obtuvieron de acuerdo a lo establecido en la norma oficial mexicana NOM-045-1995 Campaña nacional contra la brucelosis en los animales, mediante la aplicación de las pruebas de diagnóstico serológico Rosa de Bengala y

Rivanol, así mismo se aplicaron las pruebas de Inmunodifusión Radial y Fluorescencia polarizada.

7.2.5 Variables evaluadas

Las variables evaluadas por ser de relevancia para el análisis de los resultados fueron: Vacunación, tipo de vacuna empleada, periodo de gestación, abortos, meses transcurridos desde el parto o aborto, promedio diario de leche por animal, tiempo e intervalo de partos.

7.2.6 Muestras

7.2.6.1 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se definió por conveniencia, siendo la totalidad de los animales en producción, sometidos a ordeña.

7.2.6.2 Toma y preparación de las muestras

1. Muestras de suero: Fueron tomadas en tubos vacutainer sin anticoagulante (tapa roja) y almacenados en una cava con refrigerantes, hasta su llegada al laboratorio del IICV-UABC, centrifugándose a 3500 rpm durante 15 minutos, separando el suero en tubos eppendorf de 1.5 ml, almacenándolos a -20°C hasta el momento de su procesamiento.
2. Muestras de sangre: Fueron tomadas en tubos vacutainer con anticoagulante EDTA (tapa lila) y almacenados en una cava con refrigerantes, hasta su llegada al laboratorio del IICV-UABC,

almacenándose a 4°C, hasta el día siguiente para proceder a la obtención de los leucocitos mediante la lisis de los eritrocitos de acuerdo a la metodología publicada por Aguirre Arzola (Aguirre Arzola et al., 2008), almacenándolos en tubos eppendorf de 1.6 ml a -80°C, hasta su procesamiento final.

3. Muestra de leche: Se tomaron en tubos estériles cónicos de centrifuga, de 50 ml, previa desinfección de la ubre, antes de iniciar el procedimiento de ordeña, y almacenadas en una cava con refrigerantes hasta su llegada al laboratorio del IICV-UABC, alicuotandose en tubos cónicos de centrífuga de 15 ml, los cuales fueron almacenados a -20°C, hasta su procesamiento microbiológico; y en tubos eppendorf de 1.6 ml, los cuales fueron centrifugados a 14000 gx durante 15 minutos, procediendo a extraer el suero ubicado entre la capa de grasa y el sedimento, y posteriormente fueron almacenados a -20°C, hasta su procesamiento para extracción de ADN.

7.2.7 Pruebas Diagnósticas

7.2.7.1 Pruebas Serológicas

Para el procesamiento de las muestras por las técnicas de Rosa de bengala, Rivanol e Inmunodifusión radial con Hapteno nativo se implementó el protocolo de la OIE, publicado en el capítulo 2.4.3 del Manual de pruebas diagnósticas y vacunas para Animales Terrestres 2013 (OIE, 2012) y para la

prueba de Fluorescencia polarizada se siguió el inserto de la casa comercial, Biotech.

Las pruebas Rivanol e Inmunodifusión radial con Hapteno nativo, se utilizaron únicamente como pruebas confirmatorias en muestras con resultados positivos previos a la prueba Rosa de Bengala.

7.2.7.2 Pruebas microbiológicas

Para el aislamiento y cultivo de *Brucella* a partir de las muestras de leche, se tomó como guía el protocolo de la OIE, publicado en el capítulo 2.4.3 del Manual de pruebas diagnósticas y vacunas para Animales Terrestres 2013 (OIE, 2012). Empleando como medio de aislamiento selectivo el Agar Tripticasa Soya, con adición del Suplemento *Brucella* de Oxoid Ref SR0083 y 5% de Suero Bovino inactivo, de animales negativos a *Brucella*, sin vacunación.

Las siembras fueron incubadas a 37°C bajo condiciones de 10% de CO₂, durante un periodo de 8 a 15 días.

Los aislamientos iniciales fueron repicados en Agar Tripticasa Soya enriquecido con Suero bovino inactivado al 5%, posteriormente se realizó Gram, catalasa y oxidasa, definiendo como aislamientos sugestivos a *Brucella*, aquellos en los cuales se observó bacilos Gram negativos, con reacción positiva a la catalasa y a la oxidasa.

7.2.7.3 Pruebas Moleculares

7.2.7.3.1 Métodos de extracción de ADN.

1. En leche: Para la extracción de ADN a partir de las muestras de leche se evaluaron tres protocolos in house (Murphy et al., 2002, Leal-Klevezas et al., 1995, Odumeru et al., 2001) frente al Quiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, seleccionando este último por su practicidad y la consistencia de los resultados almacenando las muestras a -20°C, hasta su procesamiento por qPCR.
2. En colonias bacterianas: La extracción de ADN a partir de las colonias sugestivas de *Brucella* spp. se realizó con el kit Quiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, iniciando con el protocolo “Pretratamiento para Bacterias Gram Negativas” y continuando en el paso 2 del protocolo “Purificación de DNA total desde tejidos de animales”, almacenando las muestras a -20°C, hasta su procesamiento por PCR tiempo real.
3. En leucocitos: La extracción de ADN a partir de los leucocitos se realizó con el kit Wizard Genomic DNA purification, de Promega, almacenando las muestras a -20°C, hasta su procesamiento por PCR tiempo real.

7.2.7.3.2 PCR en tiempo real (RT-PCR)

Se tomó como guía para el diseño y desarrollo de la prueba de PCR en tiempo real, los capítulos 1.1.4 “Principios de Validación para las Pruebas de Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas” y 1.1.5 “Validación y Control de Calidad de los Métodos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizados para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas” del Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los Animales Terrestres, de la OIE; El Protocolo de Validación del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline (CLSI Document EP12-A), así como los aspectos relevantes y experiencias del uso de PCR aplicada al diagnóstico, descritos en el Libro “PCR for Clinical Microbiology, an Australian and International Perspective (Schuller et al., 2010)”.

7.2.7.3.2.1 Definición de los parámetros esenciales del PCR en tiempo real.

7.2.7.3.2.1.1 Control y aseguramiento de la calidad

Con el propósito de garantizar la calidad y confiabilidad de los resultados obtenidos se utilizaron tres tipos de controles:

1. Control interno (OIE, 2006): Para detectar la presencia de inhibidores de la polimerasa y evitar resultados falsos negativos se utilizaron genes constitutivos del hospedador (ADNmt bovino), amplificando la región génica CytB, mediante el empleo de

primers específicos para la especie bovina (Aranguren-Méndez et al., 2009).

GEN	ESPECIE	CEBADORES	SECUENCIA 5´-3´	TAMAÑO DE FRAGMENTO (pb)
12S ARNr	Bovina	Bov-F	AGCCTGTTCTAT	221
		Bov-R	AATCGATA GTTATTGGTTTC ATAATAACG	

2. Control de No ADN: Agua destilada estéril.
3. Control Negativo: ADN extraído de muestras de leche y sangre, de vacas con resultados negativos en las pruebas serológicas Rosa de bengala y Fluorescencia Polarizada, provenientes de un hato libre de Brucelosis sin vacunación.
4. Control Positivo: ADN extraído de muestras de sangre y leche de vacas con resultados negativos en las pruebas serológicas Rosa de bengala y Fluorescencia Polarizada, provenientes de un hato libre de Brucelosis sin vacunación, adicionadas con una concentración conocida de UFC de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19.

7.2.7.3.2.1.2 Sistema de detección de producto.

La selección del sistema de detección de producto se realizó por conveniencia, de acuerdo a los reactivos disponibles en el laboratorio de Biología Molecular, los cuales emplean tecnología SYBR GREEN.

7.2.7.3.2.1.3 Pares de Cebadores

Mediante el análisis de la bibliografía se realizó una selección inicial de cebadores empleados para la identificación de aislados de *Brucella* spp, *Brucella abortus*, *Brucella abortus* cepa RB51 y *Brucella abortus* cepa S19; así mismo se estudiaron cebadores empleados en el diagnóstico de Brucelosis a partir de muestras clínicas tanto en humanos como en bovinos.

Se tomó como criterio de selección, que los mismos hubiesen sido validados, determinando su especificidad y sensibilidad, y que estuviesen dirigidos hacia la detección de los genes mayormente empleados para la detección e identificación de ADN de las distintas especies de *Brucella*.

En el caso de los cebadores empleados en PCR punto final, se tuvo en cuenta que el tamaño esperado de la banda estuviese entre los 60 pb y 200 pb, los cuales pudiesen ser empleados en PCR tiempo real, mediante tecnología SYBR Green.

En el siguiente cuadro se relacionan los cebadores seleccionados:

Cuadro 5 Cebadores seleccionados

ESPECIFICOS DE GENERO						
GEN	PROTEINA	ESPECIE	CEBADORES	SECUENCIA 5´-3´	TAMAÑO FRAGMENTO (pb)	REFERENCIA
omp -2	Proteína inmunogéni ca de la membrana	<i>Brucella</i> spp	<i>JP-F</i>	GCG CTC AGG CTG CCG ACG CAA	193	(<i>Leal- Klevezas et al., 1995</i>)

ESPECIFICOS DE GENERO						
GEN	PROTEINA	ESPECIE	CEBADORES	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO FRAGMENTO (pb)	REFERENCIA
	externa (Porina)		<i>JP-R</i>	ACC AGC CAT TGC GGT CGG TA		
wbo A	Glicosil transferasa	Brucella abortus RB51	RB51 I	TTA AGC GCT GAT GCC ATT TCC TTC AC	1298	(Vemulapalli et al., 1999)
			RB51 II	GCC AAC CAA CCC AAA TGC TCA CAA		
			Otras especies de Brucella		456	
glk	Glucosina sa	<i>Brucella abortus Brucella ovis</i>	<i>Boa-F</i>	GAC CTC TTC GCC ACC TAT CTG G	163	<i>(Winchell et al., 2010, Probert et al., 2004)</i>
			<i>Boa-R</i>	CCT TGT GCG GGG CCT TGT CCT		

Se realizaron los cálculos para la predicción teórica de las temperaturas de disociación (T_m) y alineación (T_a) para los cebadores, mediante la aplicación web OligoAnalyzer 3.1, disponible en la dirección electrónica <http://www.idtdna.com/calc/analyzer> de Integrated DNA Technologies; así mismo se realizaron los cálculos para la predicción de las temperaturas de disociación (T_m) para los amplicones, y se obtuvieron las gráficas de predicción teórica de las curvas y picos de disociación, mediante la aplicación web

uMELT, disponible en la dirección electrónica <https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html> de University of UTAH.

Las fórmulas empleadas en los cálculos por estas aplicaciones se presentan en el cuadro siguiente:

Cuadro 6 Fórmulas y algoritmos utilizados por las aplicaciones web para las predicciones de T_m , T_a , Θ , K_a

Parámetro	Fórmula
T_m Cebadores	$T_m(^{\circ}C) = \left\{ \frac{\Delta H^{\circ}}{\Delta S^{\circ} + R \ln[C]} \right\} - 273.15$
T_a Cebadores	$T_a(^{\circ}C) = \frac{\Delta H^{\circ}}{\Delta S^{\circ} + R \ln \left([C] - \frac{[ADN]}{2} \right)} - 273.15$
% Hibridación (Θ) Cebadores	$\theta = 1 - \left(\frac{K_a([ADN] - [C]) - 1}{2K_a[ADN]} + \frac{\sqrt{K_a([C] - [ADN])^2 + 2K_a([C] - [ADN]) + 1}}{2K_a[ADN]} \right)$
Factor de estabilidad	$K_a = \frac{e^{-(\Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ})}}{RT}$
Análisis de disociación del amplicón (DNA)	$I \geq 2 + \ln 2N$ $B_n = e^{n-I}$ $A_n = e^{1-\alpha(I-n)} - \sum_{m=1}^{n-1} A_m \exp(1 - e^{m-n})$
Donde:	ΔH° : Entalpia ΔS° : Entropía R: 1.987 calK-1mole-1 T: Temperatura de hibridación en Kelvins [C]: Concentración de un Oligo [ADN]: Concentración del ADN molde. N: longitud del amplicón I: Intensidad de la luz A: absorbancia

En la tabla siguiente se muestra las predicciones de los valores teóricos para la qPCR del gen Omp2, empleando los cebadores JP-F y JP-R, bajo las condiciones de reacción hipotéticas definidas.

Cuadro 7 Condiciones hipotéticas de reacción para la qPCR y predicción teórica de valores de T_m , T_a y Θ .

Condiciones de Reacción		Parámetro	Resultado		
Elemento	Unidad de medida				
<i>Cebador</i>	10 μ M	T_m JP-F	79.9°C +/-1.4°C (Allawi '97)		
		T_m JP-R	75.4°C +/-1.4°C (Allawi '97)		
Na^+	50 mM	T_a JP-F	79.8°C +/-1.4°C (Allawi '97)		
		T_a JP-R	75.3°C +/-1.4°C (Allawi '97)		
Mg^{++}	6 mM	%	T_a :79.8°C	50%	
			Hibridación (Θ) JP-F	T_a :65°C	100%
			T_a :60°C	100%	
<i>dNTPs</i>	1 mM	%	T_a :75.3°C	50%	
			Hibridación (Θ) JP-R	T_a :65°C	99%
			T_a :60°C	100%	
<i>DMSO</i>	9%	T_m Omp2	88°C		

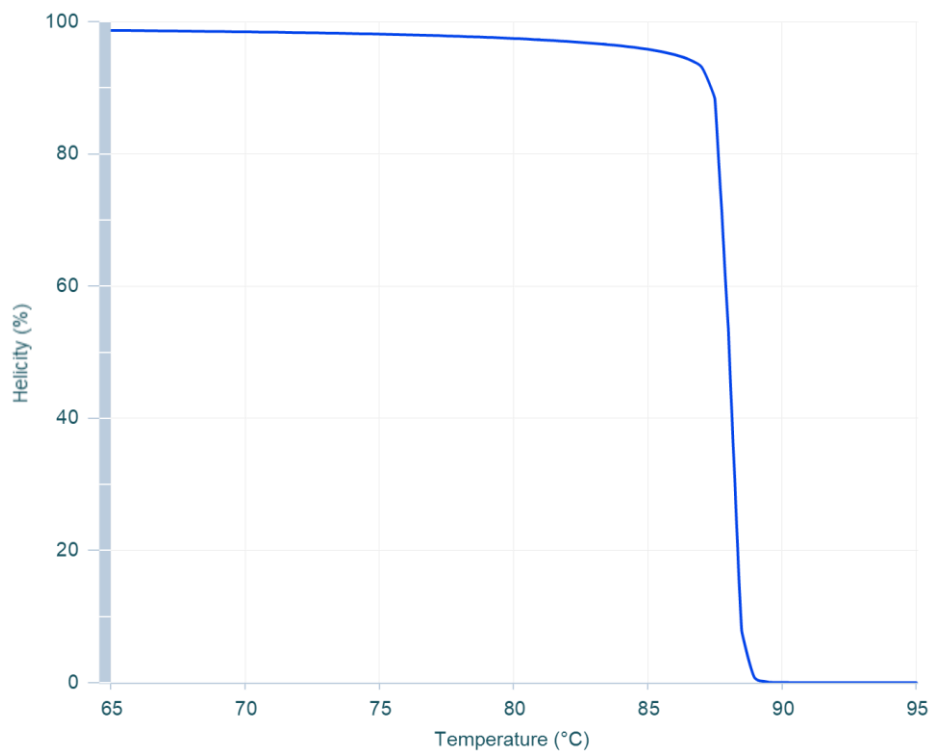


Figura 12 Predicción curva de disociación del amplicón

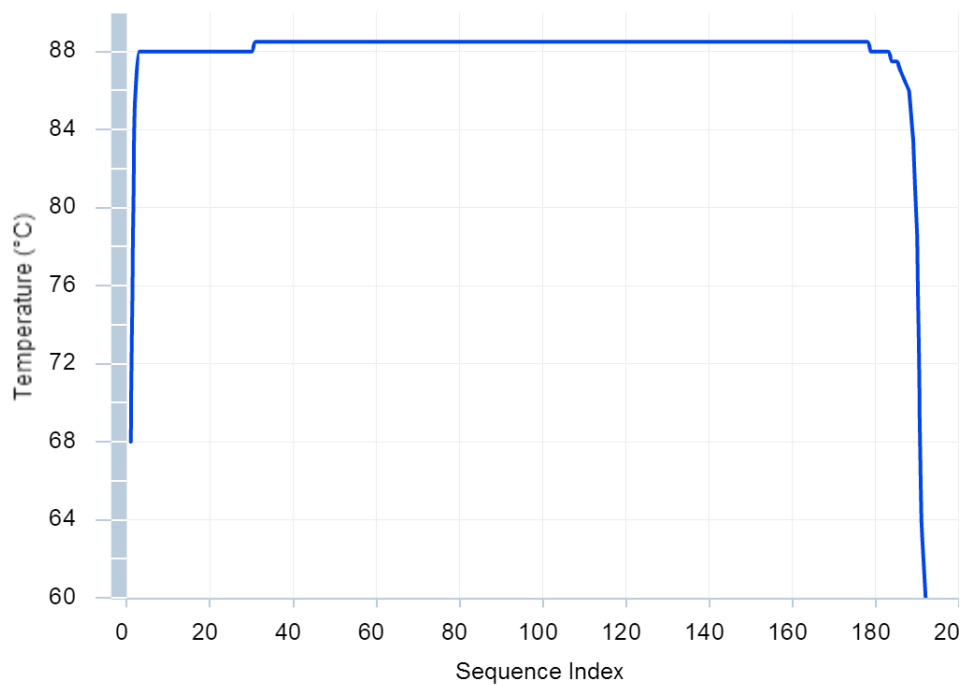


Figura 13 Predicción perfil de disociación del amplicón

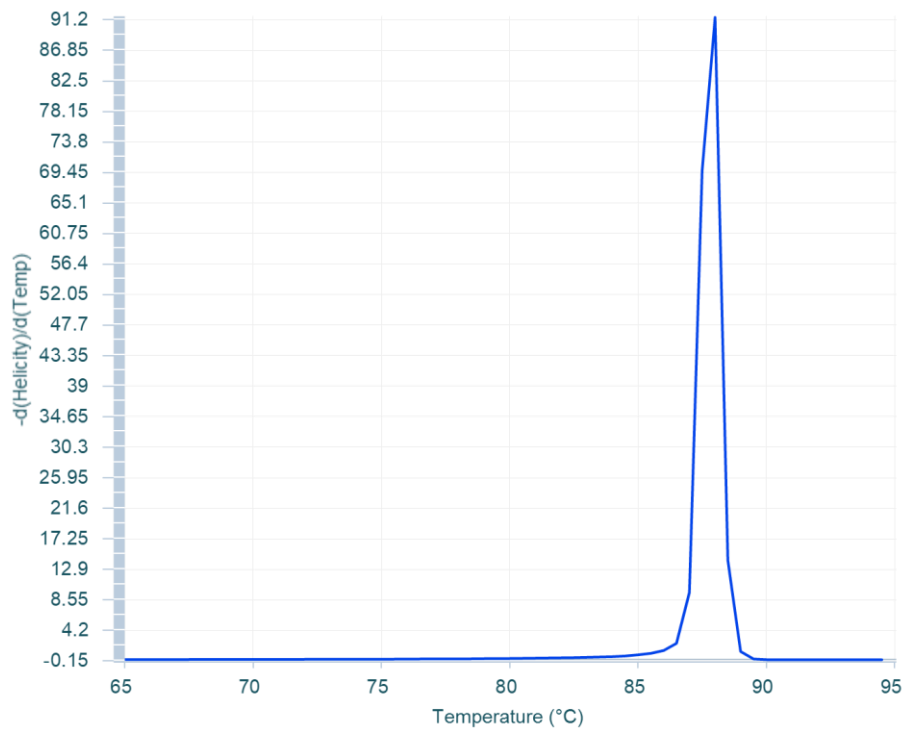
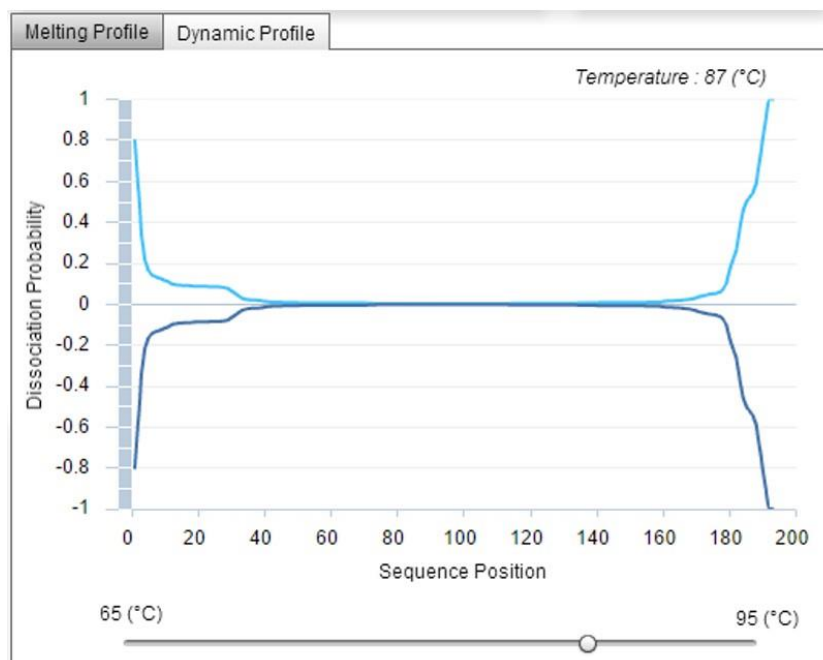


Figura 14 Predicción pico de disociación del amplicón



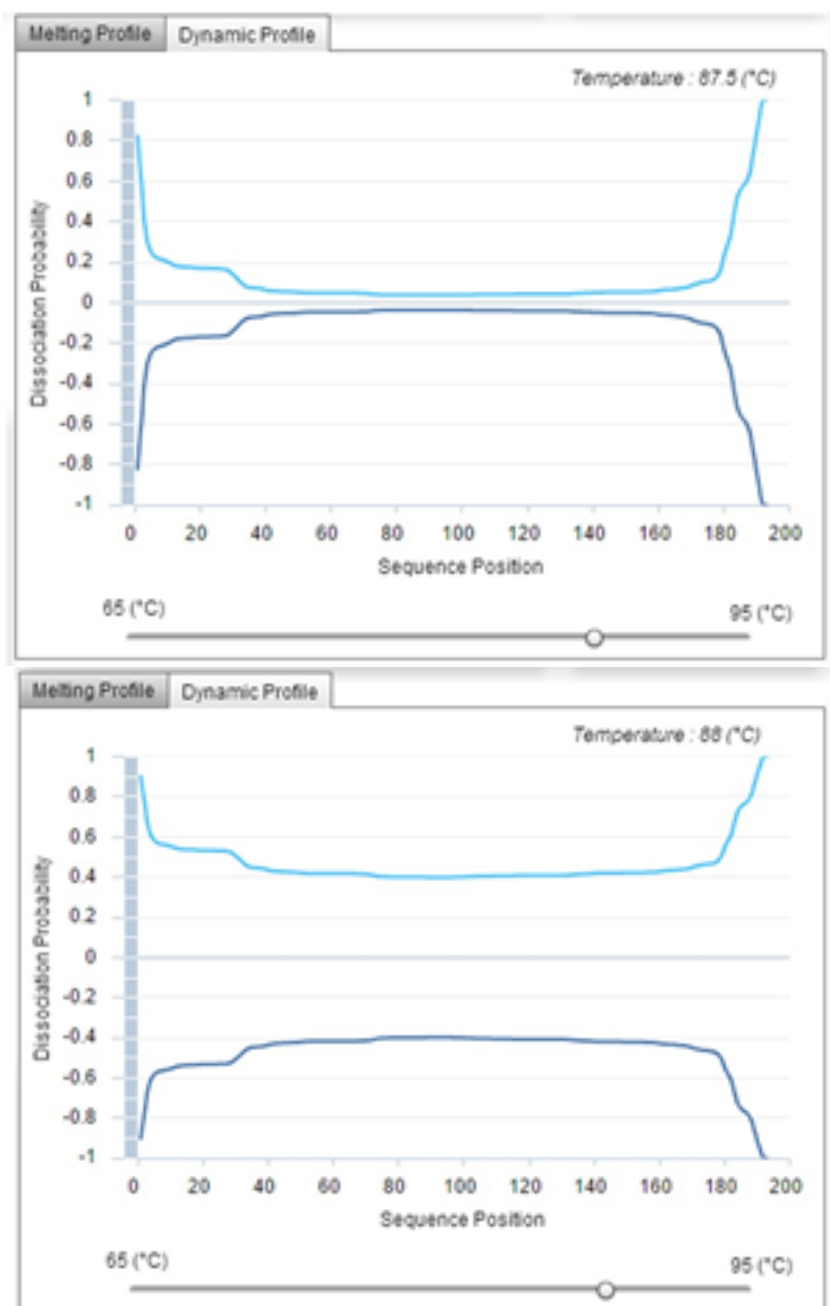


Figura 15 Predicción teórica del perfil dinámico de disociación para el amplicón del gen Omp2

7.2.7.3.2.2 Optimización de las características operativas del ensayo para la amplificación e identificación del gen Omp2 de *Brucella spp* mediante los cebadores JP-F y JP-R

7.2.7.3.2.2.1 Evaluación y selección de los reactivos.

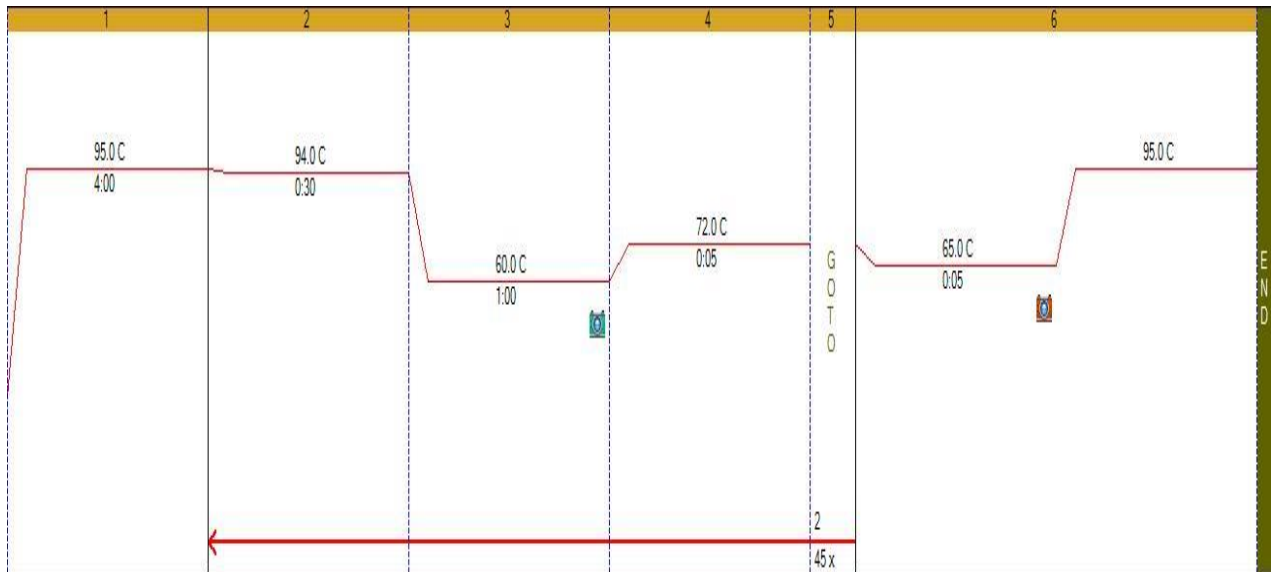
Se evaluaron dos productos de la marca comercial Quanta Biosciences:

1. SYBR GREEN PERFECTA QUANTA LOW ROX, P/N 84020, Lote: 10946 y
2. SYBR GREEN PERFECTA QUANTA ROX, P/N 84013, Lote: 10945; y uno de la marca comercial INVITROGEN: PLATINUM SYBER GREEN qPCR SUPERMIX – UDG, empleando ADN de extraído de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19 y los pares de cebadores JP (Leal-Klevezas et al., 1995), dirigidos contra el gen Omp2, para *Brucella spp*.

Las reacciones de PCR en tiempo real, se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, en tiras de tubos de polipropileno de 8 pozos, transparentes, con tapa de polipropileno plana transparente; en el termociclador CFX 96 de Biorad; Las condiciones del termociclador para la amplificación se definieron adaptando las condiciones publicadas por Leal-Klevezas para PCR punto final a la tecnología de PCR en tiempo real, teniendo en cuenta los valores teóricos calculados previamente, así:

1. Preincubación: 95°C por 4 minutos;
2. Amplificación: 45 ciclos de 94°C por 3 minutos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 5 segundos;
3. Curva de disociación de 65°C a 95 °C, incrementando 0.5°C por 50

segundos.



Se evidenció la amplificación del gen *Omp2*, cuyo amplicón exhibió una temperatura de disociación (T_m) que varió según el reactivo empleado; esto es debido a que las concentraciones de los iones monovalentes Na^+ , k^+ y del ion divalente Mg^{++} , así como el porcentaje de DMSO varían según la casa comercial y estos son factores que determinan la T_m .

Figura 16 Perfil térmico inicial para la PCR tiempo real del gen *Omp2*

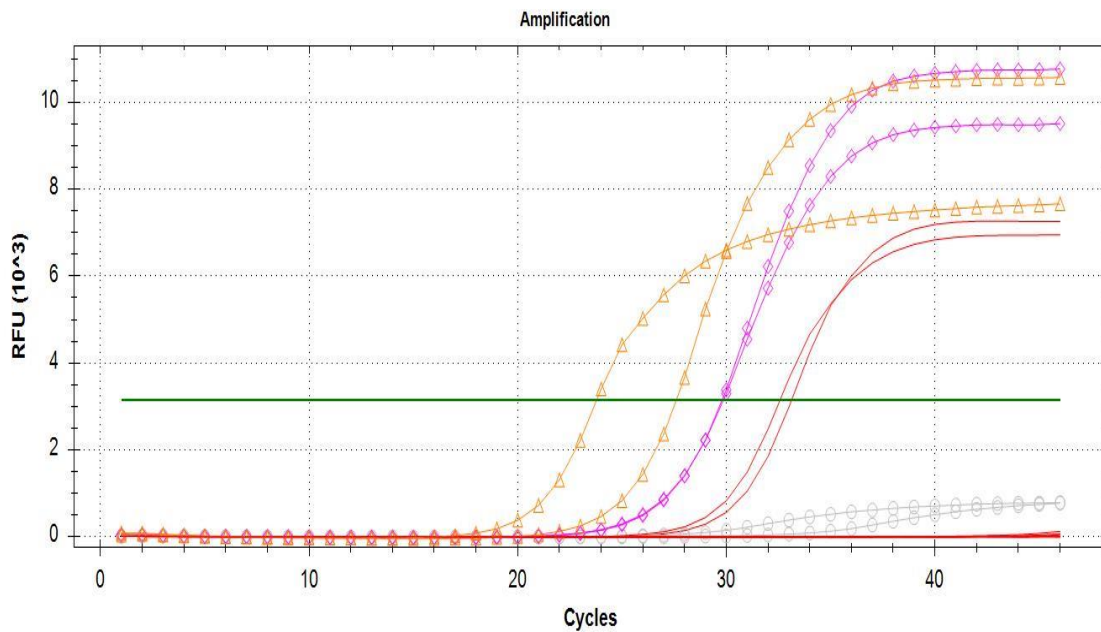


Figura 17 Curvas de amplificación con los reactivos evaluados

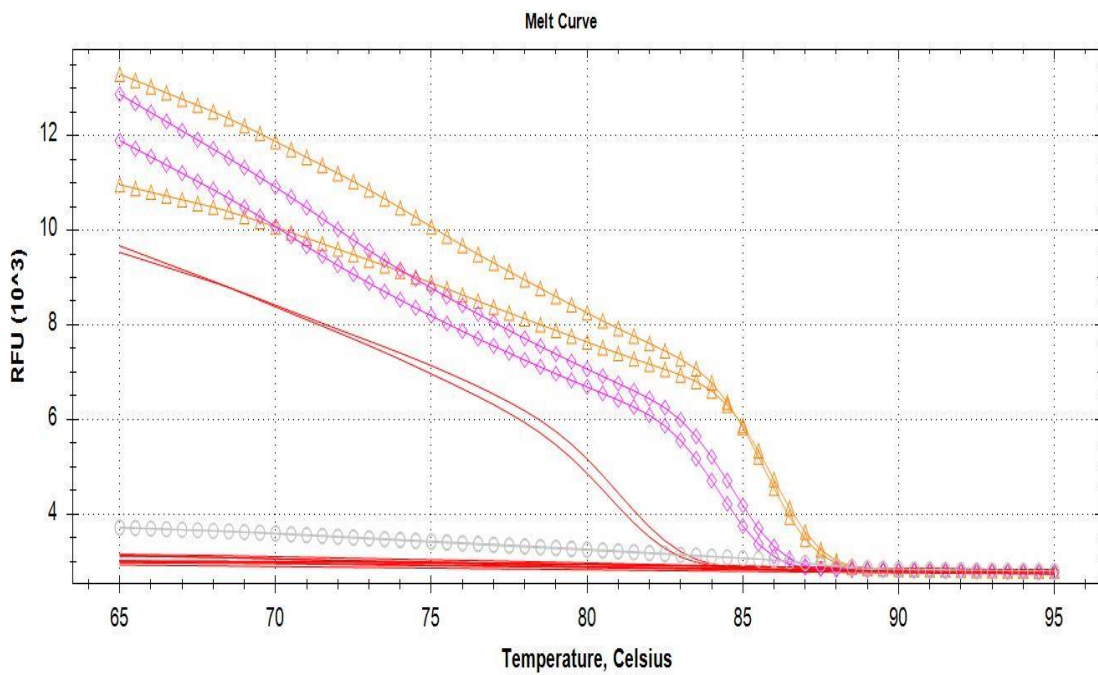


Figura 18 Curvas de disociación con los reactivos evaluados

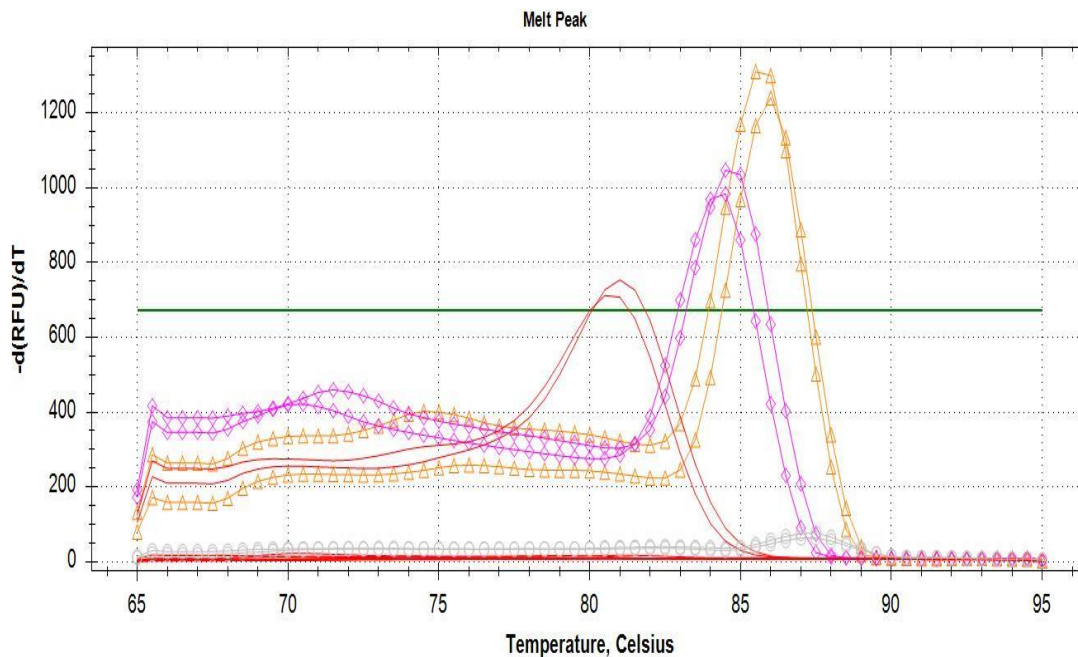
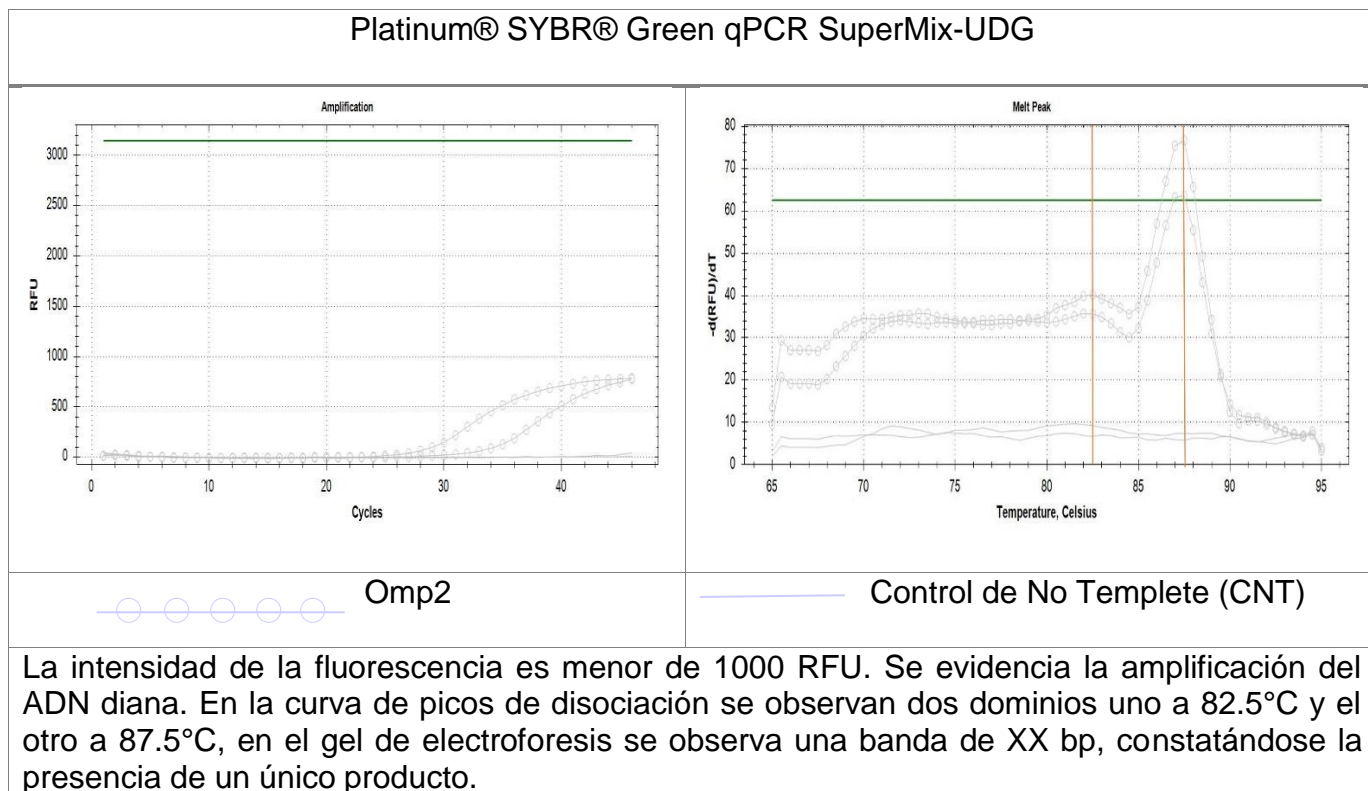


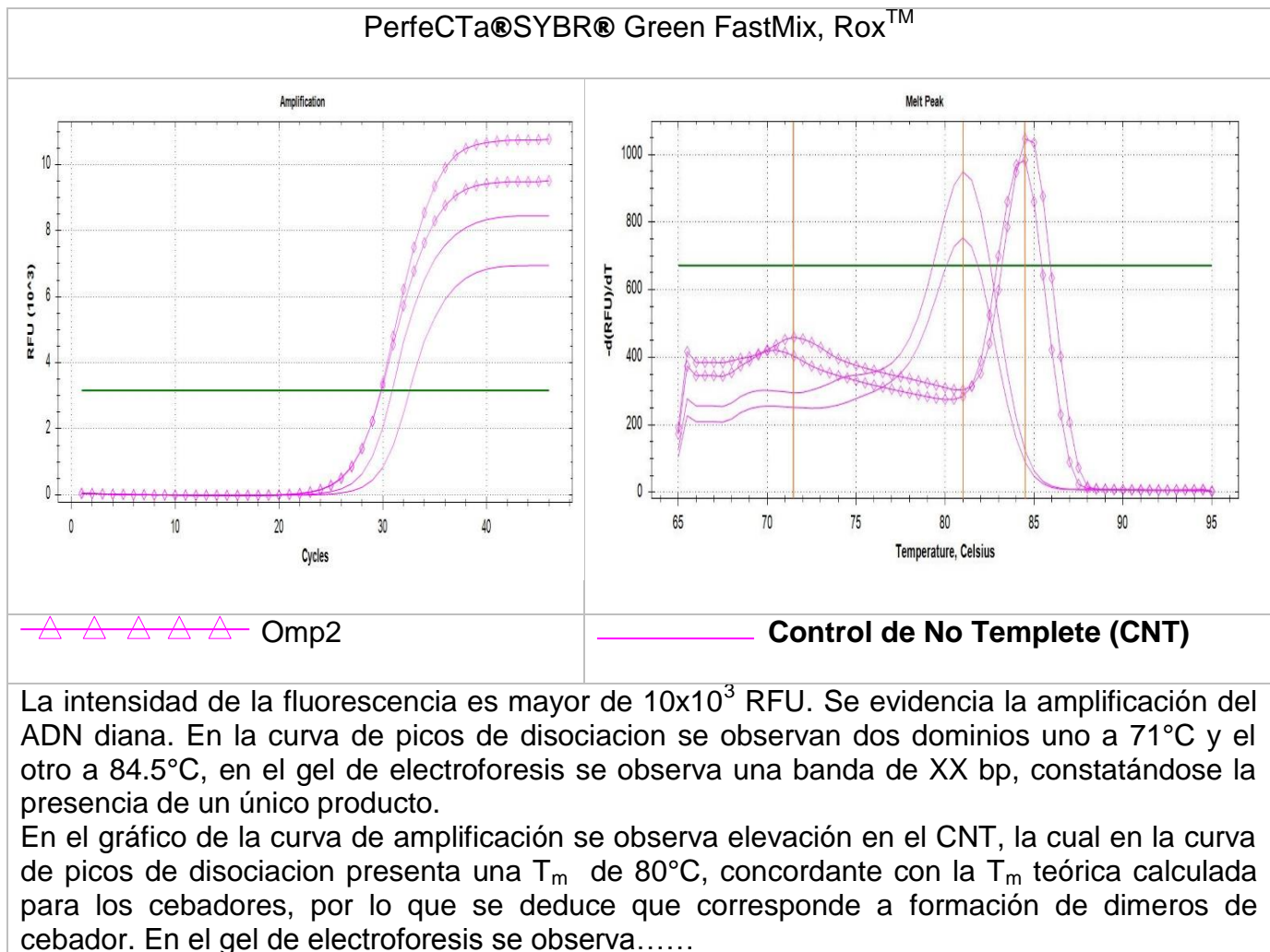
Figura 19 Curva de Picos de disociación del amplicón con los reactivos evaluados

Se evaluó la intensidad de la señal fluorescente emitida por cada uno de los reactivos y se seleccionaron aquellos que presentaron mayor intensidad en la señal, medida esta como Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU) y que permitieron la detección del ADN diana.

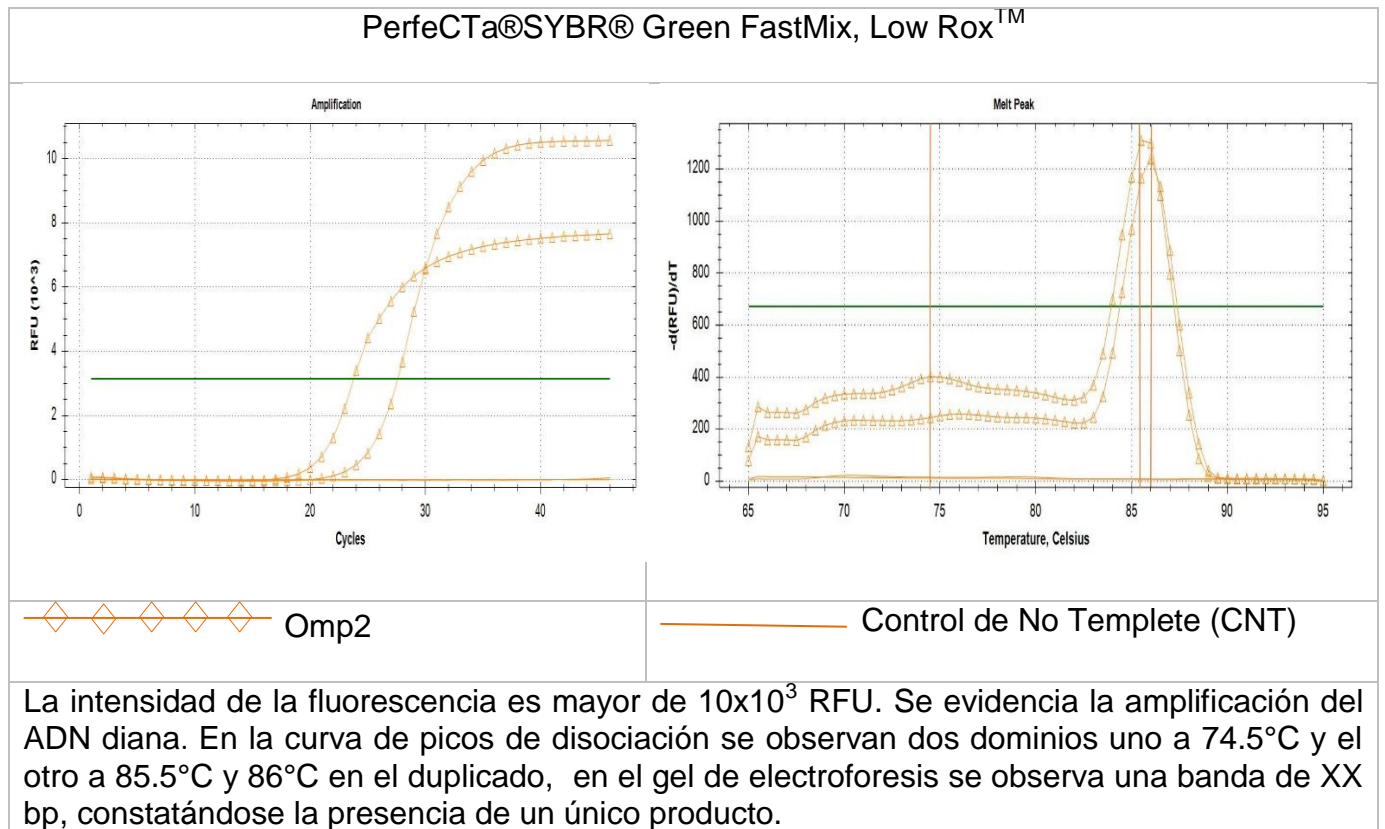
Cuadro 8 Resultados de PCR en Tiempo Real con Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG para el gen Omp2 con los cebadores JP-F y JP-R



Cuadro 9 Resultados de PCR en Tiempo Real con PerfeCTa®SYBR® Green FastMix, Rox™ para el gen Omp2 con los cebadores JP-F y JP-R



Cuadro 10 Resultados de PCR en Tiempo Real con PerfeCTa®SYBR® Green FastMix, Low Rox™ para el gen Omp2 con los cebadores JP-F y JP-R



Se seleccionaron los reactivos PerfeCTa®SYBR® Green FastMix, Low Rox™ y Rox™, por presentar las mejores características de desempeño durante el desarrollo de la qPCR, y se probaron las unidades disponibles para cada uno verificando la intensidad de la fluorescencia y la detección del amplicón.

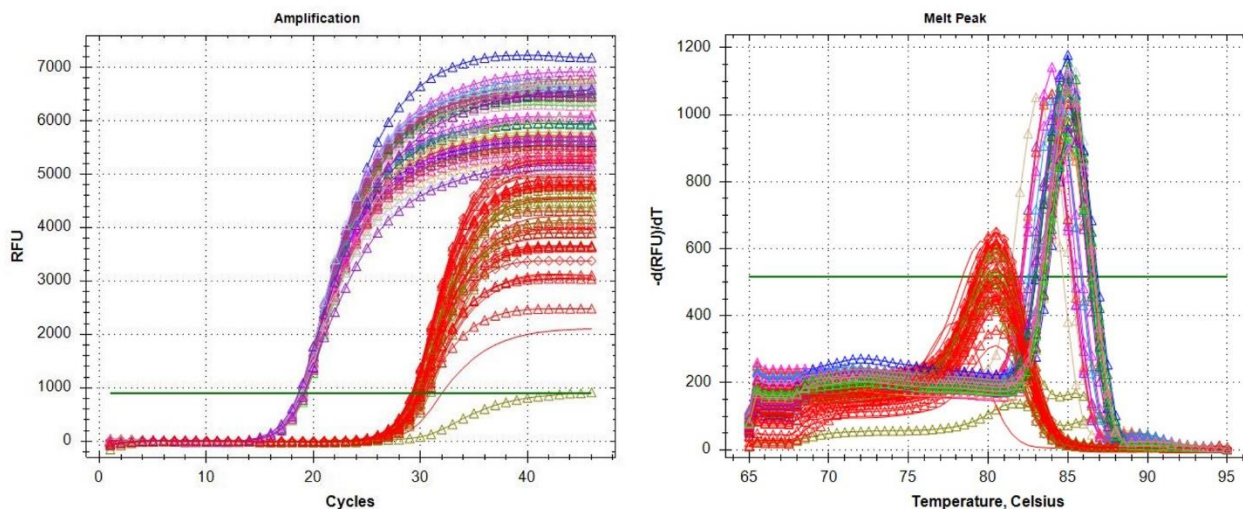


Figura 20 Resultados de PCR en Tiempo Real con PerfeCTa®SYBR® Green FastMix, Low Rox^{IM} y Rox^{IM} para el gen Omp2 con los cebadores JP-F y JP-R

Se decidió utilizar el reactivo PerfeCTa®SYBR® Green FastMix, Low RoxTM, en el desarrollo de la PCR en tiempo real para la amplificación del gen Omp2 de Brucella a partir del ADN extraído de las muestras de sangre y leche obtenidas de bovinos procedentes de un hato con historial de Brucelosis, infectados naturalmente.

7.2.7.3.2.2 Mezcla de la reacción

El reactivo seleccionado es una mezcla en concentración 2X, lista para usar, que contiene concentraciones optimizadas de MgCl₂, dNTPs, AccuFast Taq DNA Polymerase, colorante SYBR Green I, colorante de referencia ROX y estabilizadores.

Las cantidades de los componentes para la mezcla maestra se enlistan en la siguiente tabla:

Cuadro 11 Cantidades por componente para la preparación de la mezcla maestra

SYBR GREEN PERFECTA QUANTA LOW Rox	
COMPONENTE	CANTIDAD POR POZO
<i>AGUA:</i>	3 μ L
<i>SYBR green Perfecta low row:</i>	6.25 μ L
<i>JP-F 1000 nM</i>	1 μ L
<i>JP-R 1000 nM</i>	1 μ L
TOTAL	11.25 μL
<i>ADN (H₂O en NTC):</i>	1.25 μ L
VOLUMEN TOTAL POR POZO	12.5 μL

7.2.7.3.2.2.3 Optimización de la concentración de cebadores

Se evaluaron tres concentraciones finales de cebadores: 100 nM, 90 nM y 80 nM, en igual proporción de cebador directo y reverso, empleando como ADN molde, cuatro diluciones seriadas en proporción 1:10, del ADN extraído de la Cepa Vacunal *Brucella abortus* S19.

Las muestras fueron procesadas por duplicado, a un volumen final de 12.5 μ l, tomando el Ciclo umbral determinado de forma automática por el software Biorad CFX manager, como parámetro de evaluación en la eficiencia de la amplificación.

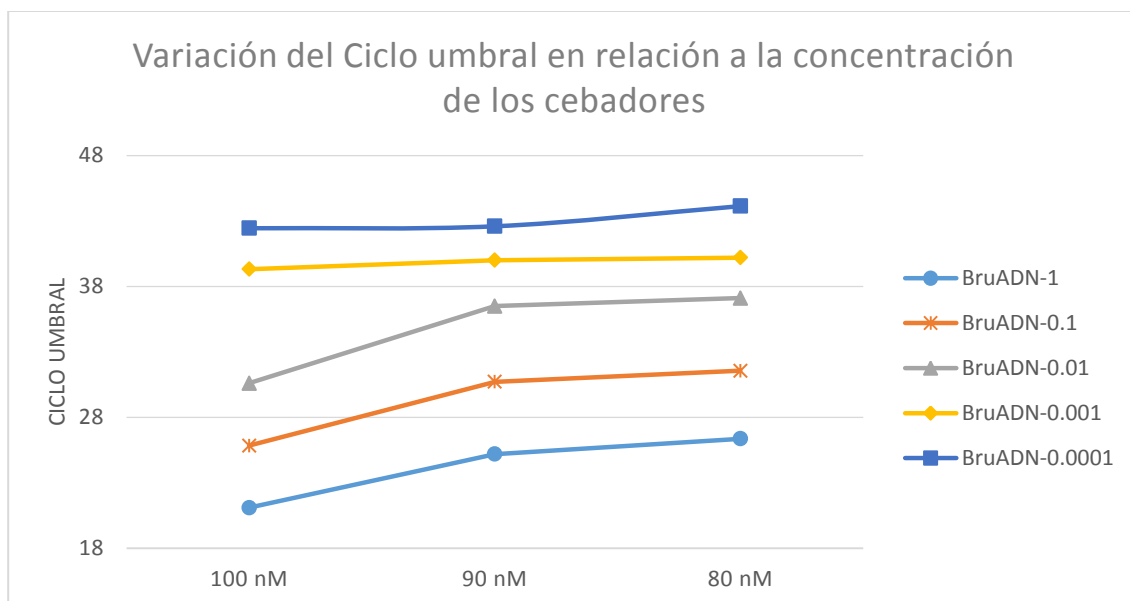


Figura 21 Variación del ciclo umbral (cq) en relación a la concentración de los cebadores

La concentración de cebadores a la cual se obtiene el menor ciclo umbral (cq) para las primeras tres diluciones es la de 100 nM, a menor concentración del cebador, mayor cq en la curva de amplificación, bajo este criterio se seleccionó esta concentración para la realización de las PCR en tiempo real de las muestras provenientes de animales infectados naturalmente.

7.2.7.3.2.2.4 Optimización de la temperatura de alineación

Teniendo en cuenta las predicciones calculadas para los porcentajes de hibridación de los cebadores JP-F y JP-R y con el propósito de minimizar la formación de dímeros de cebadores, se evaluaron dos temperaturas de alineación: 65°C y 68°C, reduciendo el tiempo de alineación de 1 minuto a 15 segundos.

Las muestras fueron procesadas por duplicado, a un volumen final de 12.5 μ L, tomando el Ciclo umbral (cq), como parámetro de evaluación en la eficiencia de la amplificación.

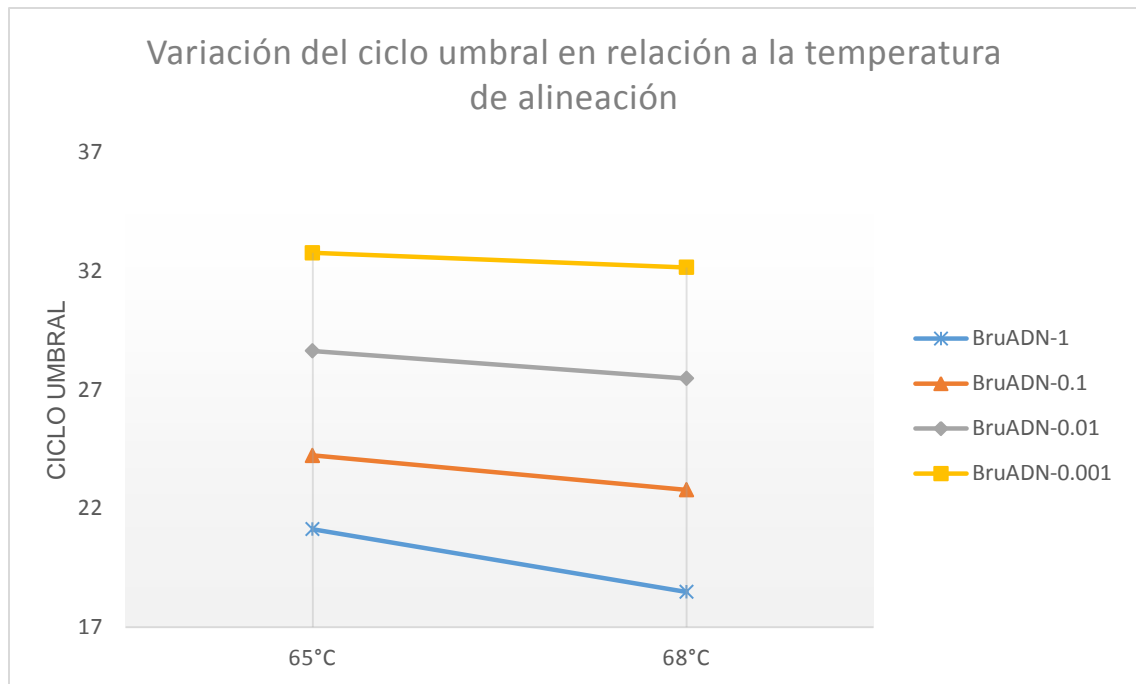


Figura 22 Variación del ciclo umbral en relación a la temperatura de alineación

El perfil térmico definitivo de la PCR tiempo real para el gen *Omp2* de *Brucella spp* fue el siguiente:

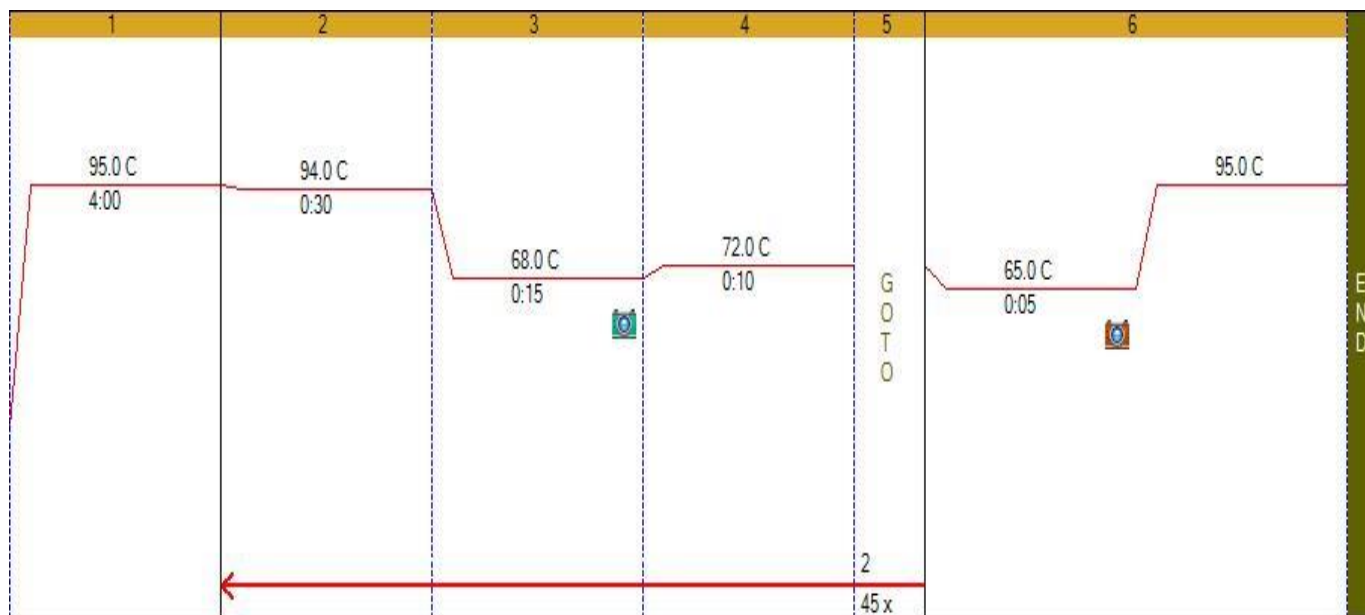


Figura 23 Perfil térmico definitivo para la PCR en tiempo real del gen *Omp2*

1. Preincubación: 95°C por 4 minutos;
2. Amplificación: 45 ciclos de 94°C por 3 minutos, 68°C por 15 segundos,
72°C por 5 segundos;
3. Curva de disociación: de 65°C a 95 °C, incrementando 0.5°C por 50 segundos.

7.2.7.3.2.2.5 Substracción del ruido de fondo de fluorescencia en la amplificación.

Para minimizar la posible distorsión de los resultados debido al ruido de fondo, se realizó la substracción del mismo, analizando las curvas de amplificación de manera individual para cada una de las muestras procesadas,

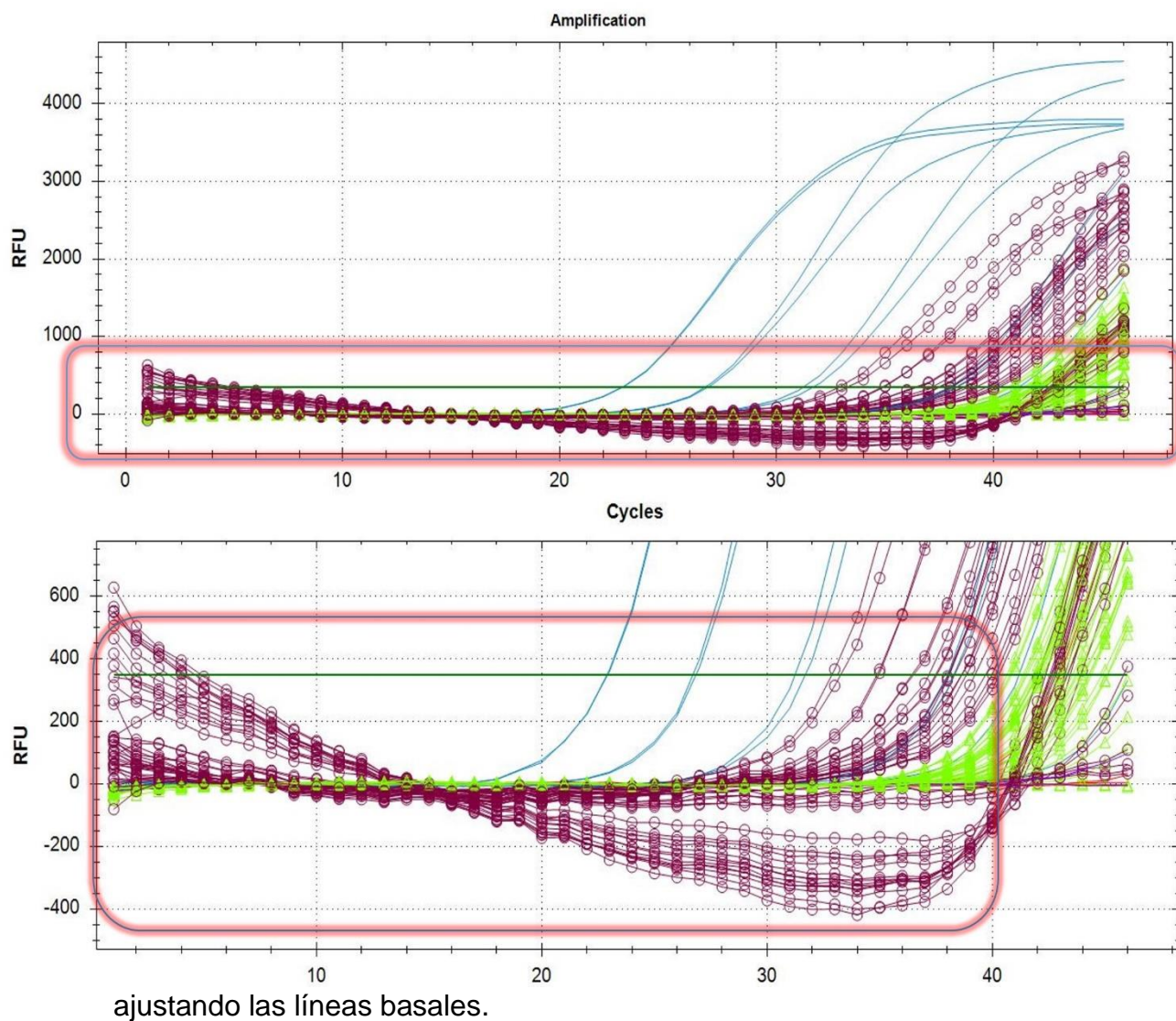


Figura 24 Gráfico del ruido de fondo de la fluorescencia

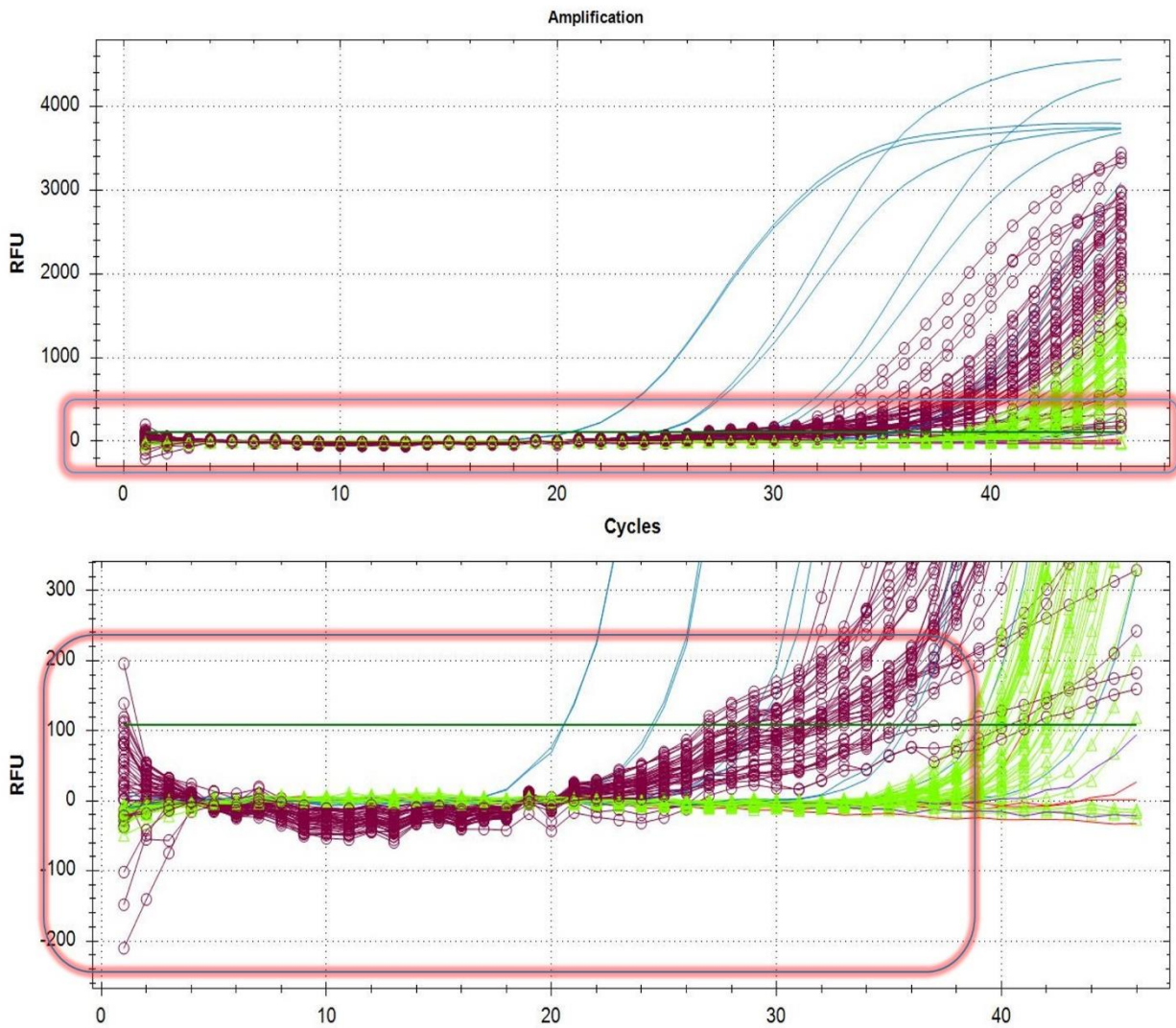


Figura 25 Gráfico de la Substracción del ruido de fondo de la fluorescencia

7.2.7.3.2.2.6 Determinación del Umbral analítico de amplificación.

Para la determinación del Umbral Analítico (UA), se evaluaron tres métodos, basados en el uso de Controles de No ADN durante la extracción (CDN), Controles de No ADN durante la corrida de PCR tiempo real (CNT) y muestras negativas al ADN objetivo; dos métodos IUPAC (Bregu et al., 2013): Método 1 IUPAC 1976 y Método 2 IUPAC 1995; y un método propuesto por el grupo de científicos trabajando en métodos de análisis de ADN del FBI: el Método 3 (FBI, 2010): SWGDAM.

Cuadro 12 Cálculos empleados por los métodos para la determinación del Umbral Analítico

METODOS	CALCULOS
1. IUPAC 1976	UA_A
2. IUPAC 1995	UA_A
3. SWGDAM	$UA_A = 2(Y_{max} - Y_{min})$
<p>UA: Umbral analítico \bar{Y}_{CN}: Promedio de RFU de muestras negativas s_{CN}: Desviación estándar de RFU de muestras negativas. k: Constante de Kaiser = 3 $t_{1-\alpha, v}$: valor de la tabla de student con 99% de confianza = 2.46 Y_{max}: Valor máximo en RFU de las muestras negativas. Y_{min}: Valor mínimo en RFU de las muestras negativas.</p>	

Se emplearon los promedios de las lecturas en Unidades de Fluorescencia (RFU) de los últimos seis (6) ciclos de un total de veinte (20) muestras de ADN extraído de sangre total con anticoagulante y leche de bovinos seronegativos a *Brucella spp*, procedentes de un hato libre de Brucelosis sin vacunación; ocho (8) muestras de Controles de No ADN (CDN) empleados durante la extracción de ADN, cuatro (4) durante la extracción a partir de Sangre total con anticoagulante y cuatro (4) durante la extracción a partir de leche, las cuales se corrieron por duplicado, en PCR tiempo real bajo las condiciones optimizadas para el gen Omp2 de *Brucella spp*; y once (11) Controles de no ADN (CNT) empleados cada uno por corrida de PCR tiempo real y la desviación estándar de los mismos.

Los valores calculados para estas muestras se evidencian en la siguiente tabla:

Cuadro 13 Valores calculados para definición de punto de corte

Parámetro	Valor
<i>Desviación estándar de los controles negativos (s_{CN})</i>	30.0876808
<i>Media del control negativos (\bar{Y}_{CN})</i>	5.88
<i>Máximo valor en RFU de los controles negativos (Y_{max})</i>	97.48
<i>Mínimo valor en RFU de los controles negativos (Y_{min})</i>	-43.17
$Y_{max} - Y_{min}$	140.65
Método	UA_A
<i>IUPAC 1976</i>	96.142
<i>IUPAC 1995</i>	79.895
<i>SWGDM</i>	281.30

7.2.7.3.2.2.7 Determinación del punto de corte de amplificación.

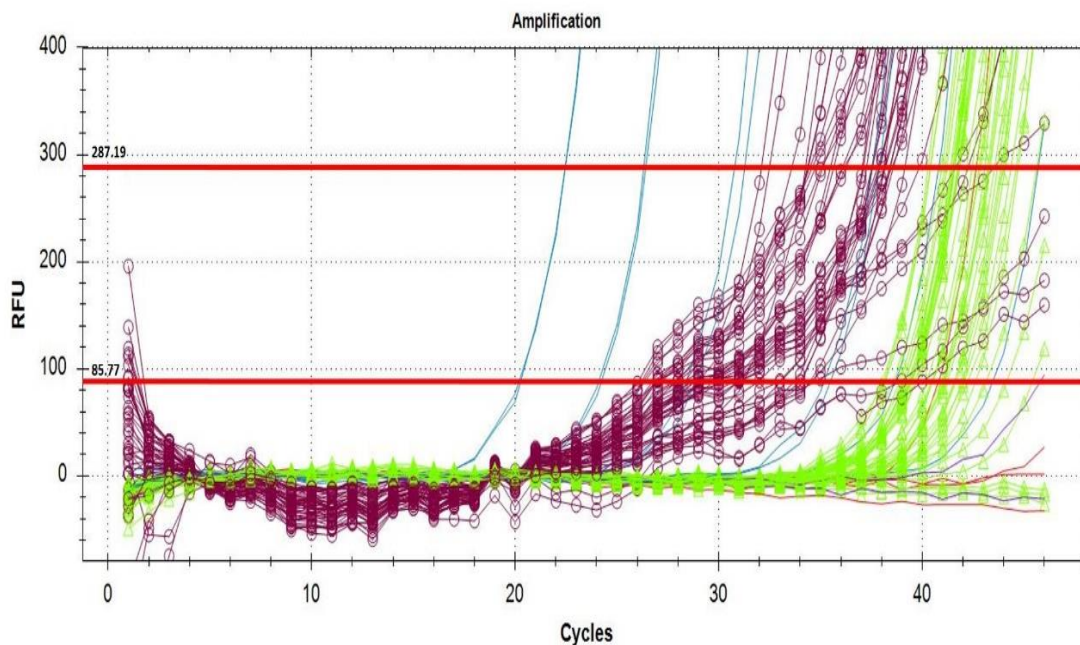
Para la determinación del punto de corte de amplificación en RFUs, se utilizaron los cálculos propuestos por el software Biorad CFX Manager 3.1 provisto por los fabricantes del termociclador CFX 96, empleado para la realización de la prueba de PCR en tiempo real.

$$\text{Punto de Corte} = \bar{Y}_{CN} + UA_A$$

Se calculó el punto de corte para cada uno de los umbrales analíticos calculados previamente:

Método	Punto de corte
<i>IUPAC 1976</i>	102.02
<i>IUPAC 1995</i>	85.77
<i>SWGDM</i>	287.19

Se seleccionó el punto corte con el valor más bajo, obtenido por el Método IUPAC 1995.



7.2.7.3.2.2.8 Determinación del umbral analítico de los picos de disociación (UA_{PM}).

Para definir la validez de la altura del pico de disociación, se determinó un valor umbral, mediante el cálculo del promedio más tres veces el valor de la desviación estándar, de las lecturas de la primera derivada negativa de la fluorescencia frente a la temperatura ($-dRFU / dT$), en la curva de picos disociación de la PCR en Tiempo real, para veinte (20) muestras de ADN extraído de sangre total con anticoagulante y leche, de bovinos seronegativos a

Figura 26 Puntos de corte superior e inferior para la amplificación *Brucella spp*, procedentes de un hato libre de Brucelosis sin vacunación; ocho (8) muestras de Controles de No ADN (CDN) empleados durante la extracción

de ADN, cuatro (4) durante la extracción a partir de Sangre total con anticoagulante y cuatro (4) durante la extracción a partir de leche, las cuales se corrieron por duplicado, en PCR tiempo real bajo las condiciones optimizadas para el gen Omp2 de *Brucella spp*; y once (11) Controles de no ADN (CNT) empleados cada uno por corrida de PCR tiempo real.

$$UA_{PM} = \bar{Y}_{CN} + 3S_{CN}$$

Los valores calculados para se evidencian en la siguiente tabla:

Parámetro	Valor
Promedio de $-dRFU / dT$ de los controles negativos	17.8641758
Desviación estándar	17.3750661
Umbral de Picos de disociación	69.9893741

7.2.7.3.2.2.9 Especificidad analítica.

La especificidad analítica de la amplificación del gen Omp2 de *Brucella spp*, se determinó mediante el cálculo del intervalo de confianza de la temperatura media de disociación (T_m) del amplicón, en la curva de disociación de la PCR en Tiempo real, mediante la siguiente fórmula:

$$\bar{Y} \pm t_{n-1, 1-\alpha/2} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Para este cálculo, se verificó la posible distribución normal de las mediciones de la temperatura media de disociación, mediante la elaboración de un histograma de frecuencia, observándose una curva de distribución aproximadamente normal.

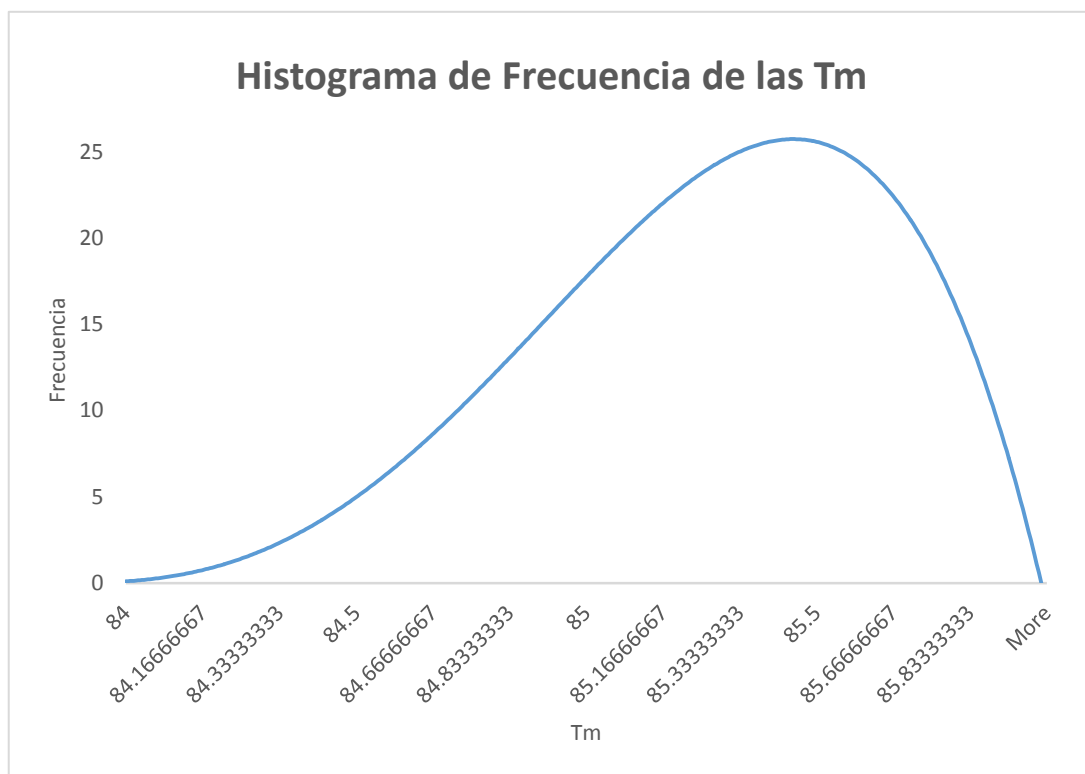


Figura 27 Histograma de frecuencia de las T_m

Se promediaron los valores de T_m de los amplicones (\bar{Y}), de cada una de las diluciones del ADN de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19, desde 10⁰ hasta 10⁻⁵, así como de los valores de T_m de los amplicones, del ADN extraído a partir de las diluciones de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19, desde 10⁰ hasta 10⁻¹⁰, sin matriz y con la matrices leche y sangre total con anticoagulante, que superaron el UA_{PM}.

Se calculó la desviación estándar de los datos ($\frac{s}{\sqrt{n}}$), y el valor de t para un 99% de confianza.

$$\bar{Y}: 85.25$$

$$\frac{s}{\sqrt{n}}: 0.38$$

$$t_{n-1,1-\alpha/2}: 2.60792$$

Se reemplazaron en la fórmula obteniendo el siguiente intervalo para el amplicón:

$$85.25 \pm 0.99 (84.26, 86.24)$$

7.2.7.3.2.2.10 Curva de calibración

La curva de calibración o curva de amplificación de los estándares fue generada utilizando una dilución seriada de ADN de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19, hasta cinco diluciones, en proporción 1:10; cada dilución fue procesada por triplicado, bajo los parámetros optimizados para la PCR en tiempo real del gen Omp2 de *Brucella* spp.

Los cálculos de los parámetros de desempeño de la reacción de PCR tiempo real: Coeficiente de correlación (R^2), y-Intercepto (y-int), Pendiente (slope) y Eficiencia, fueron realizados mediante el software Biorad CFX manager.

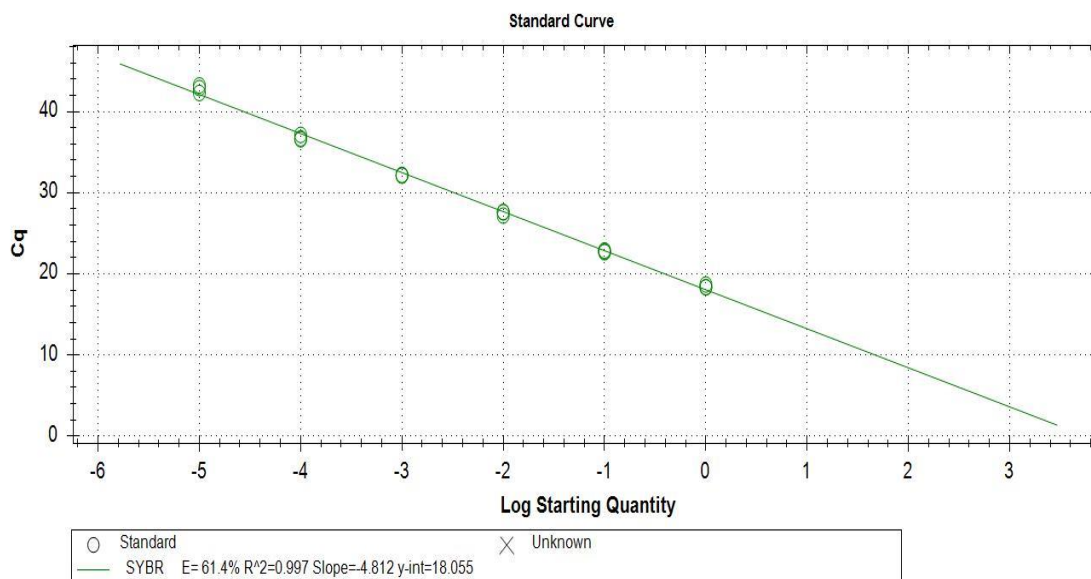


Figura 28 Curva de calibración para la PCR tiempo real del gen Omp2 de Brucella spp

7.2.7.3.2.2.11 Criterios para la interpretación de resultados

Para establecer el criterio de interpretación de los resultados obtenidos, se tuvo en cuenta tres aspectos de la prueba de PCR en tiempo real para la interpretación de los resultados:

1. RFUs finales en relación al punto de corte de amplificación calculado.
2. Altura de Pico de disociación en relación al umbral del pico de disociación calculado para el amplicón del gen Omp2.
3. Temperatura media de disociación (T_m), en relación al intervalo de T_m calculado para el amplicón del gen Omp2.

Cuadro 14 Criterios para la interpretación de los resultados de qPCR

INTERPRETACION	RFUs finales	T_m	Altura de Pico de disociación
POSITIVO	≥85.7	85.25±0.99°C	≥70

<i>SOSPECHOSO</i>	<85.7	85.25±0.99°C	≥70
<i>NEGATIVO</i>	<85.7	≠85.25±0.99°C	<70
<i>NEGATIVO</i>	≥85.7	≠85.25±0.99°C	≥70

La interpretación para cada uno de los resultados obtenidos a partir del procesamiento de las muestras mediante la PCR en tiempo real para el gen Omp2 de *Brucella* spp, se realizó mediante hoja de cálculo de Excel, con la implementación de las siguientes fórmulas:

<i>Criterio</i>	<i>Fórmula</i>
<i>Amplificación</i>	=IF(EndRFUs>85.77,"AMPLIFICÓ","NO AMPLIFICÓ")
<i>Especificidad</i>	=IF(AND(Tm>=84.26,Tm<=86.24,HTm>=70),"ESPECIFICA","NO ESPECIFICA")
<i>Interpretación</i>	=IF(AND(F692="AMPLIFICÓ",K692="ESPECIFICA"),"POSITIVO",IF(AND(F692="NO AMPLIFICÓ",K692="ESPECIFICA"),"SOSPECHOSO","NEGATIVO"))

7.2.8 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando los software estadístico InfoStat/L (Di Rienzo J.A. et al.) y Minitab 17, El nivel de significancia estadística se estableció al 1% ($p < 0,001$).

7.2.8.1 Descripción de las variables de estudio

Los datos fueron sintetizados mediante la oportuna tabulación en una base de datos de Access 2007 y en un libro de Excel 2007, y representados gráficamente.

Las variables cualitativas se describieron mediante su frecuencia absoluta y porcentaje. Las variables categorizadas nominales se analizaron en tablas de contingencia 2 X 2.

Las variables cuantitativas continuas se resumieron en su media, desviación estándar (DE) e intervalo de confianza.

Los criterios de normalidad de las variables se comprobaron mediante la realización de histograma de frecuencia.

7.2.8.1 Estudio de la concordancia entre dos pruebas

Con el fin de determinar hasta qué punto la concordancia observada fue superior a la que es esperable obtener por puro azar y medir el grado de acuerdo entre dos ensayos, se calculó la proporción de coincidencias frente al total de muestras analizadas.

Se estimó el índice de concordancia kappa mediante la ecuación

$$k = \frac{\text{Pr}(a) - \text{Pr}(e)}{1 - \text{Pr}(e)}, \text{ donde Pr}(a) \text{ es el acuerdo observado relativo entre}$$

los criterios diagnósticos emitidos por las pruebas, y Pr (e) es la probabilidad hipotética de acuerdo por azar.

El Grado de acuerdo se definió en función del índice kappa obtenido:

Cuadro 15 Grado de acuerdo en función del índice kappa (Landis y Koch, 1977)

Kappa	Grado de acuerdo
< 0	Sin acuerdo
$0 - 0,2$	Insignificante
$0,2 - 0,4$	Bajo
$0,4 - 0,6$	Moderado
$0,6 - 0,8$	Bueno
$0,8 - 1$	Muy bueno

7.2.8.2 Cálculo de los parámetros de evaluación de las pruebas analíticas.

Los resultados obtenidos mediante las pruebas analíticas empleadas, se tabularon en tablas de contingencia y se evaluaron mediante el cálculo de los parámetros: Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VPP), Valor Predictivo Negativo (VPN), Razón de Probabilidad Positiva (RPP), Razón de Probabilidad Negativa (RPN), Exactitud (seguridad global) y Odds Ratio (discriminación global), empleando diferentes pruebas como patrón de referencia:

1. La prueba Rosa de Bengala (tarjeta) confirmada por la prueba Rivanol, establecida (RB-RV) por la norma oficial mexicana NOM-041-ZOO-1995 para el diagnóstico de Brucelosis en bovinos.

2. El cultivo microbiológico, prueba tradicionalmente considerada como estándar por organismos internacionales como la OIE;

3. Finalmente se evaluaron frente a la PCR tiempo real en sangre, prueba que presentó el más alto número de individuos diagnosticados como positivos.

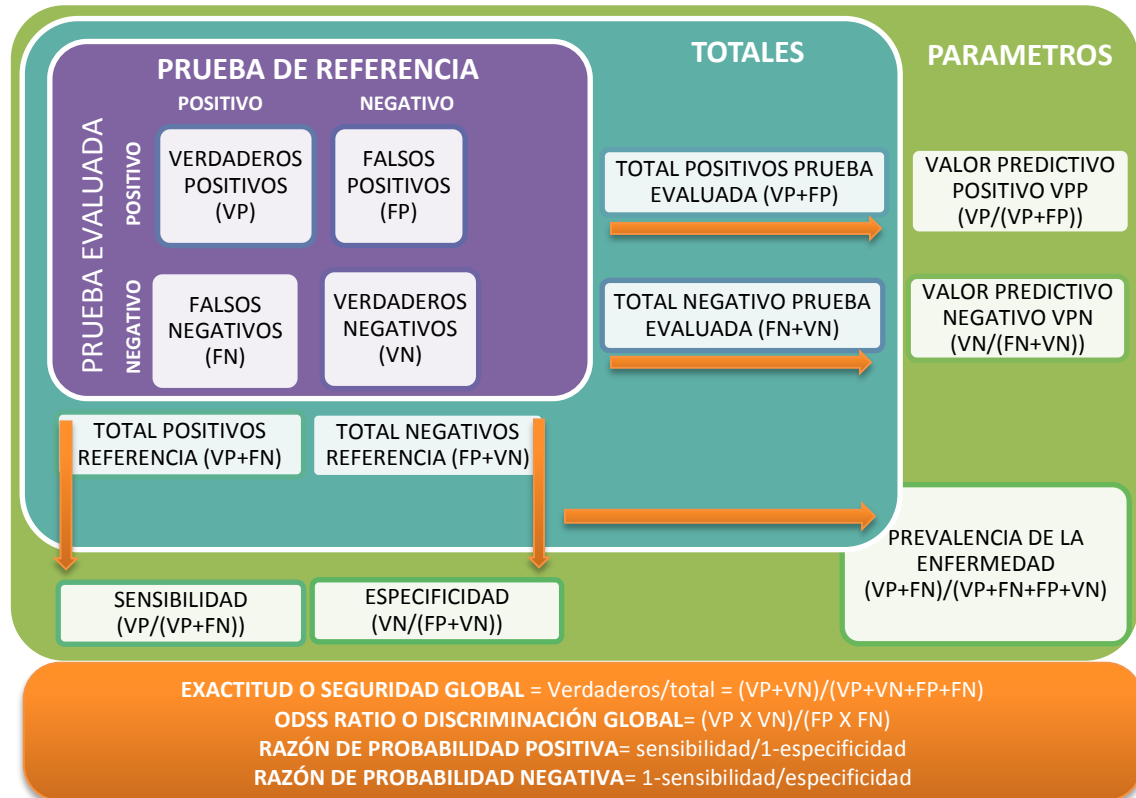


Figura 29 Parámetros de evaluación de las pruebas frente a prueba de referencia

7.2.8.1 Contraste mediante Chi-cuadrado máximo verosímil (G^2) entre las pruebas evaluadas y la prueba de referencia

Para contrastar los criterios diagnósticos asignados por las pruebas evaluadas y la prueba seleccionada “de referencia”, se utilizó el estadístico Chi-cuadrado máximo verosímil (Chi cuadrado MV- G^2), denotado como $G^2 = 2 \sum_I \sum_J n_{ij} \log(n_{ij}/\hat{m}_{ij})$, donde n_{ij} representa al recuento muestral de la celda ij y \hat{m}_{ij} es el estimador de la frecuencia absoluta esperada. El estadístico se

distribuye (bajo la hipótesis nula), para muestras grandes, como una Chi cuadrado con $(i - 1)(j - 1)$ grados de libertad.

La Hipótesis nula de que los criterios diagnósticos asignados por la prueba evaluada y los criterios diagnósticos asignados por la prueba de referencia son diferentes, se rechazará si el valor P del estadístico de prueba es menor o igual, al grado de significancia de la prueba ($P \leq 0.01$).

8 RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 Resultados

8.1.1 Pruebas serológicas

210 muestras de suero provenientes de bovinos de un hato con historial de Brucelosis, se procesaron bajo las pruebas de Rosa de Bengala (RB) y Fluorescencia Polarizada (FP), de forma paralela y bajo el criterio de muestras ciegas -desconociendo el resultado obtenido en la otra prueba-.

Para la prueba Rosa de Bengala se obtuvieron un total de 80 resultados positivos y para FP 71 Positivos y 9 con criterio diagnóstico Sospechoso.

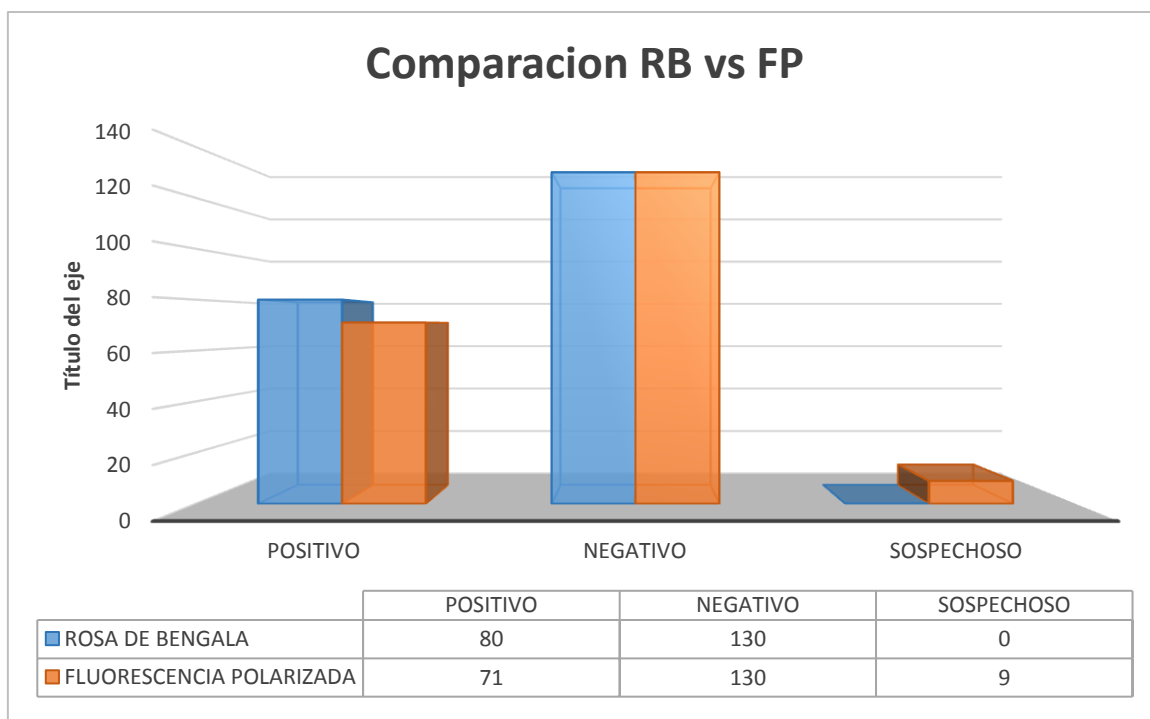
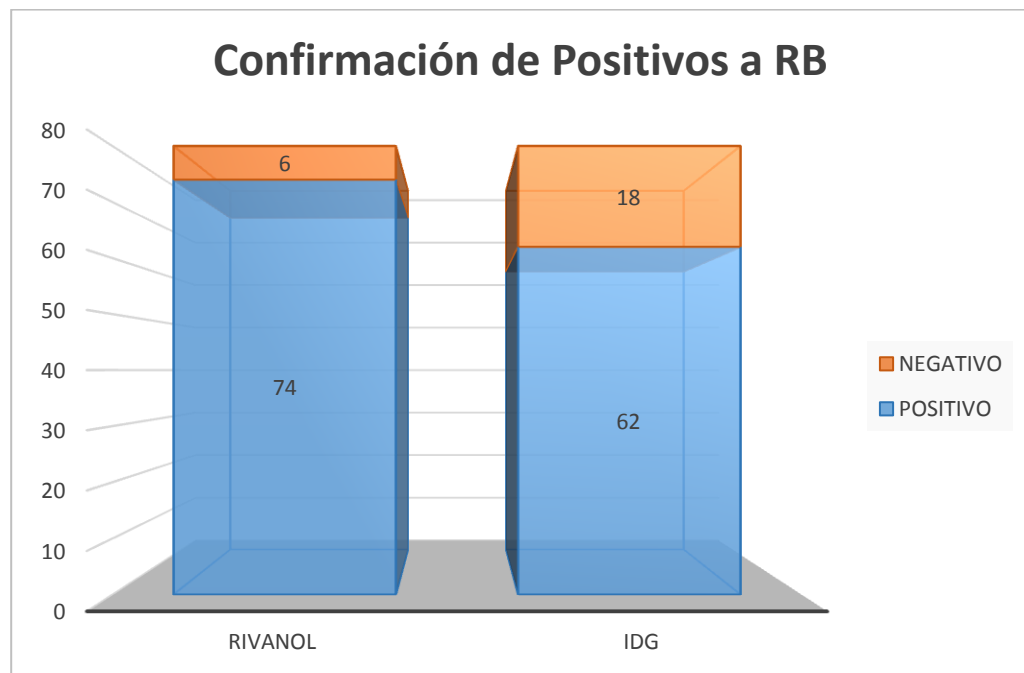


Figura 30 Comparación de criterios diagnosticos emitidos por RB vs FP a las muestras analizadas

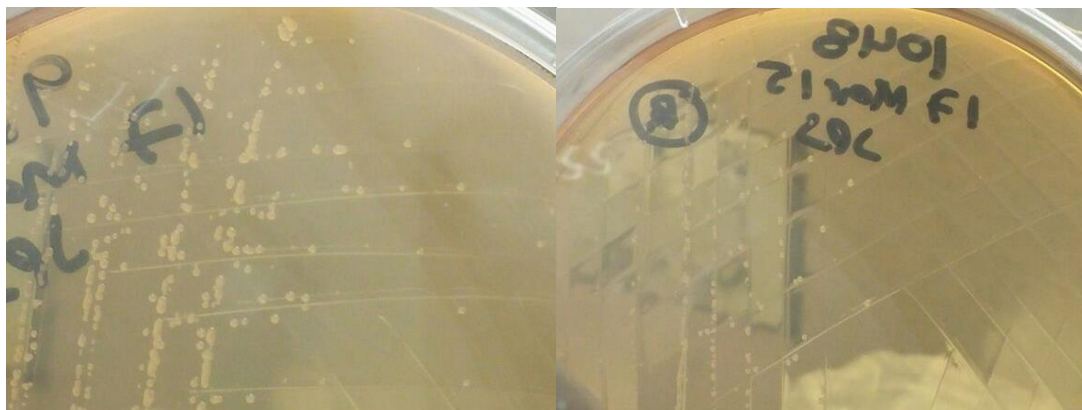
Las 80 muestras que arrojaron resultados Positivos a la prueba RB, fueron sometidas a confirmación mediante las pruebas Rivanol (RV) e Inmunodifusión Radial con Hapteno Nativo (IDR), procesando estas muestras de forma paralela obteniendo un 92.5% de criterio diagnóstico Positivo confirmado por RV y 77.5% por IDR.



8.1.2 Cultivo microbiológico

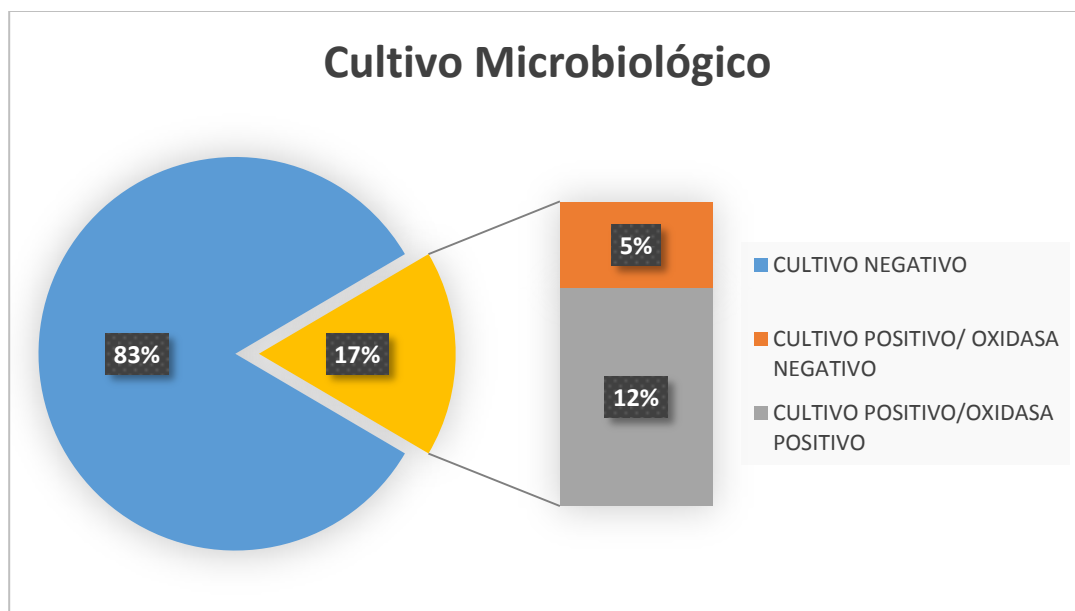
Se procesaron un total de 215 muestras de leche para el aislamiento microbiológico, las muestras fueron sembradas de manera paralela a la realización de la pruebas serológicas sin previo conocimiento de los resultados de estas.

Se obtuvo crecimiento bacteriano en 106 de las muestras sembradas, de las cuales 35 presentaron características de morfología de las colonias sugestivas a *Brucella* spp.



Al Gram se observaron Bacilos Gram Positivos y/o Bacilos Gram variables en todos los aislamientos seleccionados.

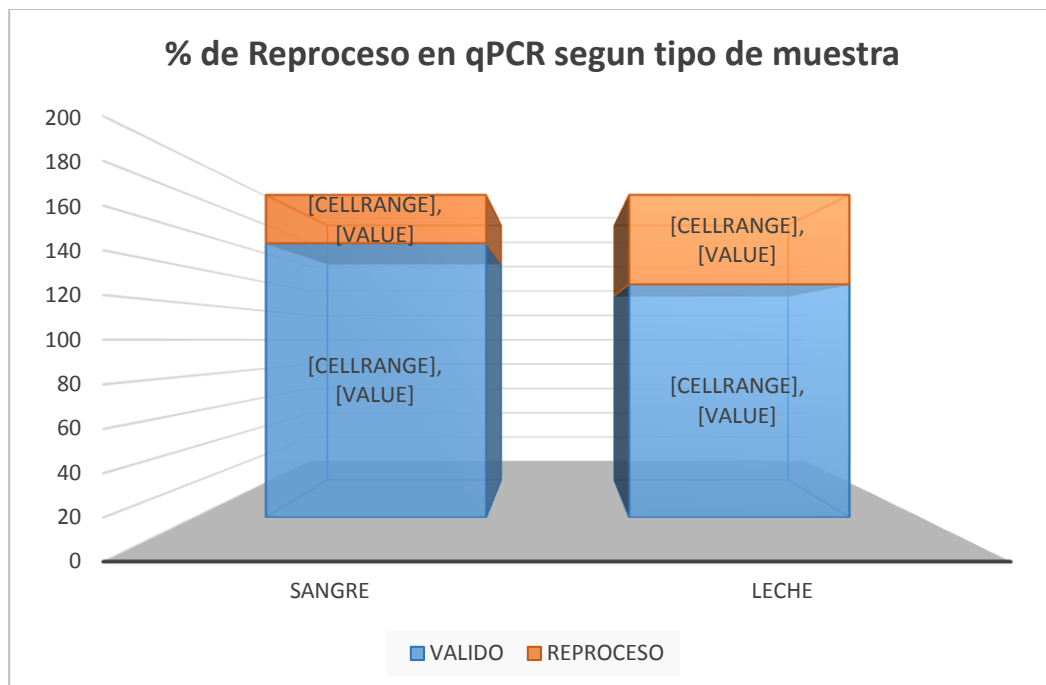
De los 35 aislamientos 10 presentaron resultados negativos a la prueba de Oxidasa, estableciéndose presuntamente el aislamiento de *Acinetobacter* spp en estas muestras. Los 25 aislamientos restantes presentaron resultados Positivos a la prueba de Oxidasa, estableciéndose el resultado: “Aislamientos sugestivos a *Brucella* spp”, para efectos de los análisis de denominará como Positivo.



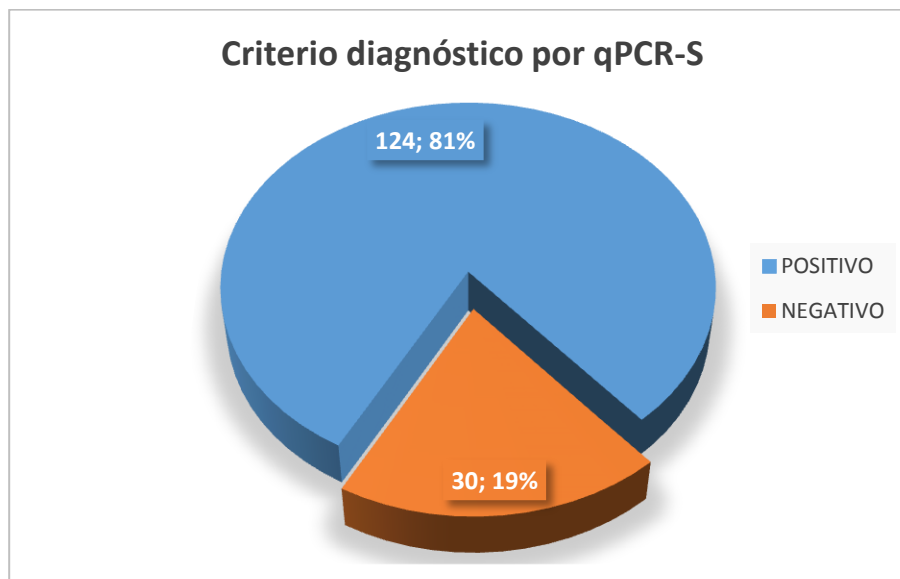
8.1.3 Pruebas moleculares

Mediante el protocolo de PCR tiempo real (qPCR) optimizado para el gen *Omp2* de *Brucella* spp, se procesaron muestras de ADN extraído de sangre y leche de 181 bovinos procedentes de un hato con antecedentes de Brucelosis. Las muestras fueron procesadas por duplicado, validando el resultado obtenido en aquellas que presentaron datos concordantes en sus réplicas; las muestras que no concordaron en sus réplicas fueron separadas del análisis y etiquetadas como “muestras para reproceso”.

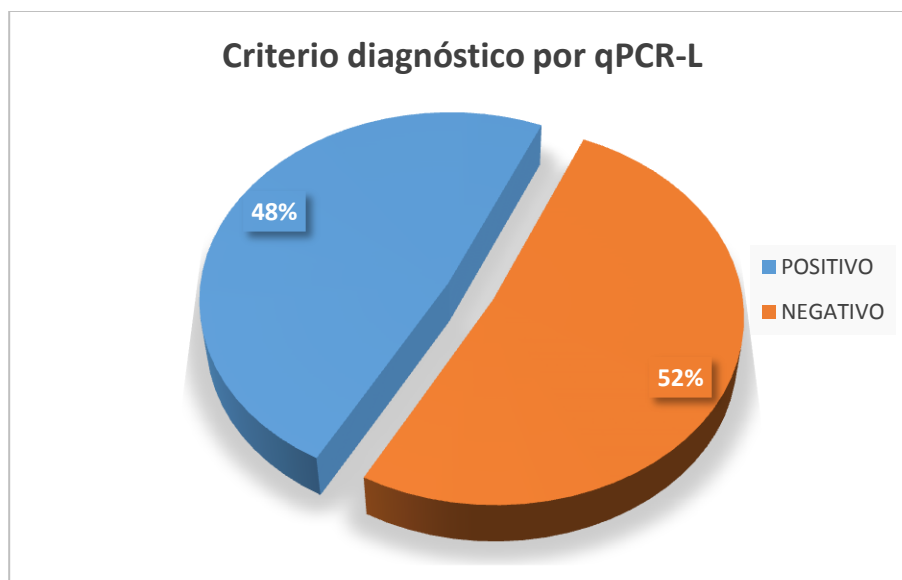
La qPCR a partir de muestras de ADN extraídas de leche arrojó un 13% más de muestras para reproceso que la qPCR de muestras de ADN extraídas de sangre.



De las 154 muestras validadas procedentes de sangre, 124 (81%) arrojaron criterio diagnóstico Positivo y 30 (19%), criterio diagnóstico negativo.



Las muestras procedentes de leche presentaron menor porcentaje de muestras asignadas con criterio diagnóstico Positivo 48%.



8.1.4 Muestras incluidas en el análisis.

Para el análisis comparativo de las pruebas diagnósticas, se descartaron por errores de muestreo consistentes en ausencia de una o más de los tipos de muestras requeridas, a saber: sangre total sin anticoagulante, sangre total con anticoagulante o leche, 66 de los 218 bovinos sometidos a muestreo; 42 bovinos, cuyas muestras fueron procesadas en su totalidad, no pudieron ser incluidos en el análisis de los datos por requerir reproceso en la prueba de PCR tiempo real, el cual no pudo ser realizado por limitaciones impuestas al uso del equipo; 6 bovinos obtuvieron criterio diagnóstico sospechoso en las pruebas de FP y qPCR-L debiendo ser excluidos de los cálculos para los parámetros de evaluación de las pruebas en contraste con la prueba de referencia, quedando un total de 104 animales para este análisis.

8.1.5 Comparación de las distintas pruebas analíticas

El análisis comparativo del número de animales identificados como positivos y negativos por cada una de las pruebas: Rosa de Bengala (RB), Fluorescencia Polarizada (FPA), Cultivo Microbiológico en Leche (CM-L), PCR tiempo real en Sangre (qPCR-S) y PCR tiempo real en Leche (qPCR-L), y de los resultado conjuntos de las pruebas Rosa de Bengala más Rivanol (RB+RV) y Rosa de Bengala más Inmunodifusión Radial con Hapteno Nativo (RB+IDR), evidencia que qPCR-S identificó mayor número de animales como positivos que las demás pruebas. Figura 25.

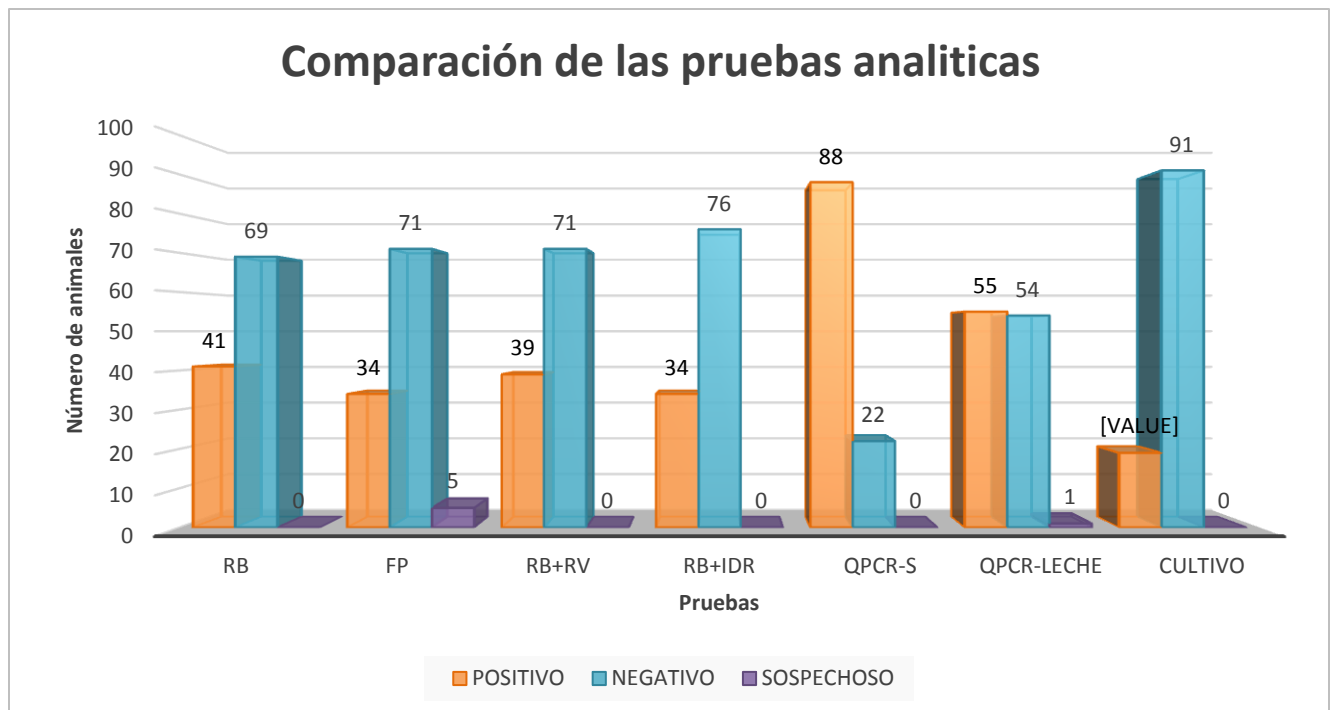


Figura 31 Analisis comparativo de las distintas pruebas analíticas

De los 110 bovinos evaluados, RB como prueba única, diagnosticó como positivos a 41 (37%), este número disminuyó al ser analizada de forma conjunta con las pruebas confirmatorias RV e IDR, a 39 (35%) y 34 (31%) respectivamente.

La prueba de FP se realizó a la totalidad de las muestras disponibles de forma paralela al procesamiento por RB, sin conocer previamente el resultado de esta, asignando como positivos a 34 (31%) de los animales evaluados, presentado valores semejantes a los exhibidos con RB+RV y RB+IDR.

El cultivo a partir de leche, diagnosticó como positivos a 19 (17%) bovinos, siendo el valor más bajo obtenido con respecto todas las demás pruebas.

Las pruebas de qPCR determinaron como positivos a un mayor número de bovinos, qPCR-L a 55 (50%) y qPCR-S a un 30% más que qPCR-L (88) y aproximadamente entre 43% y 49% más que las pruebas restantes. Figura 26

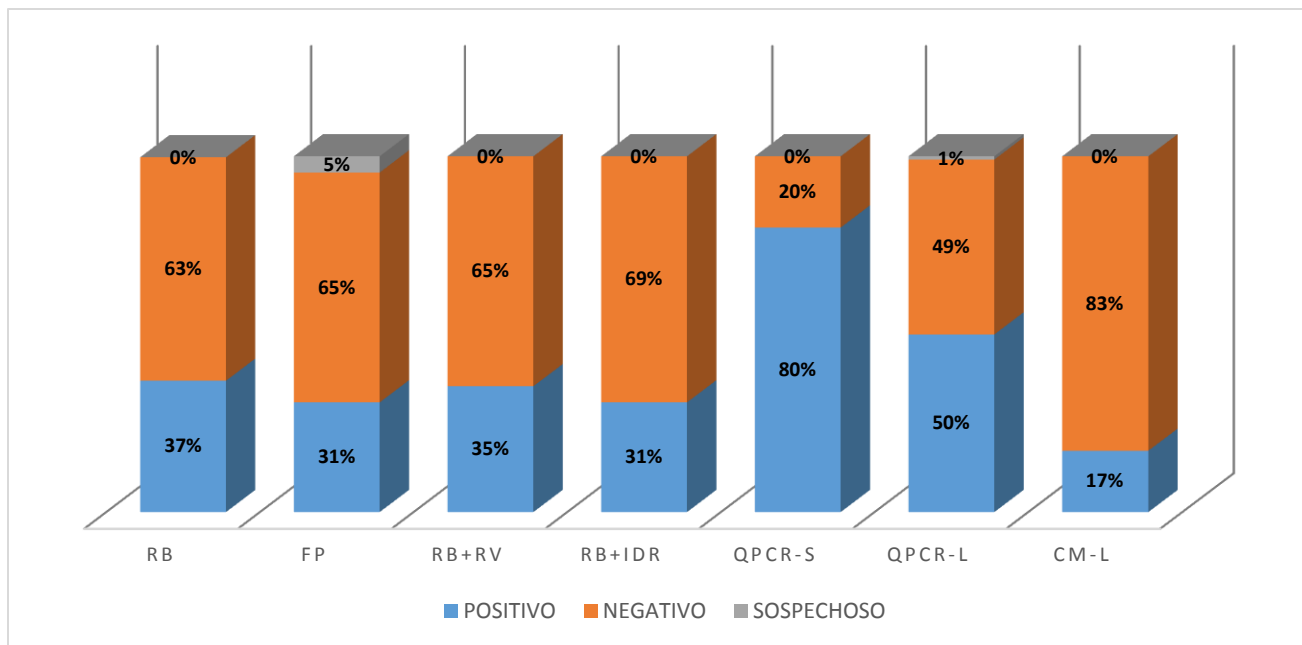


Figura 32 Porcentaje de bovinos diagnosticados positivos o negativos de acuerdo a cada una de las pruebas analíticas

8.1.6 Concordancia entre las distintas pruebas analíticas.

Se realizó el análisis de concordancia entre los diagnósticos emitidos para los 110 bovinos procedentes de un hato lechero con antecedentes de Brucelosis, por las distintas pruebas aplicadas: RB, RB+RV, RB+IDR, FP, qPCR-L, qPCR-S y CM-L, se calculó el porcentaje de coincidencia y su respectivo intervalo de confianza al 99% (IC) y se determinó el grado de acuerdo mediante el cálculo del Índice Kappa.

Los datos obtenidos se consolidaron en la siguiente tabla:

Cuadro 16 Datos de Análisis de concordancia entre los resultados emitidos por las distintas pruebas diagnósticas.

<i>Pruebas evaluadas</i>	<i>Orden</i>	<i>Coincidencia (%)</i>	<i>IC (Li, Ls)</i>	<i>Atributo Diagnóstico</i>	<i>kappa de Cohen</i>	<i>Grado de acuerdo</i>
<i>RB / FP</i>	1	87.27	77.02, 94.15	POSITIVO NEGATIVO	0.77 0.76	Bueno Bueno
<i>RB+RV / FP</i>	2	88.18	78.13, 94.77	POSITIVO NEGATIVO	0.81 0.76	Muy Bueno Bueno
<i>RB+IDR / FP</i>	3	88.18	78.13, 94.77	POSITIVO NEGATIVO	0.83 0.73	Muy Bueno Bueno
<i>RB+RV / RB+IDR</i>	4	93.64	85.13, 98.11	POSITIVO NEGATIVO	0.86 0.86	Muy Bueno Muy Bueno
<i>RB / qPCR-S</i>	5	44.55	32.35, 57.22	POSITIVO NEGATIVO	0.037 0.037	Insignificante Insignificante
<i>RB-RV / qPCR-S</i>	6	42.73	30.67, 55.43	POSITIVO NEGATIVO	0.024 0.024	Insignificante Insignificante
<i>RB-IDR / qPCR-S</i>	7	40	28.18, 52.71	POSITIVO NEGATIVO	0.023 0.023	Insignificante Insignificante
<i>FP / qPCR-S</i>	8	39.09	27.36, 51.80	POSITIVO NEGATIVO	0.023 0.024	Insignificante Insignificante
<i>RB / qPCR-L</i>	9	52.73	40.12, 65.09	POSITIVO NEGATIVO	0.054 0.076	Insignificante Insignificante
<i>RB-RV / qPCR-L</i>	10	50.91	38.37, 63.37	POSITIVO NEGATIVO	0.018 0.041	Insignificante Insignificante
<i>RB-IDR / qPCR-L</i>	11	50.91	38.37, 63.37	POSITIVO NEGATIVO	0.036 0.024	Insignificante Insignificante
<i>FP / qPCR-L</i>	12	48.18	35.77, 60.76	POSITIVO NEGATIVO	0.036 0.005	Insignificante Insignificante
<i>RB / CM-L</i>	13	59.09	46.38, 70.99	POSITIVO NEGATIVO	0.012 0.012	Insignificante Insignificante
<i>RB-RV / CM-L</i>	14	59.09	45.47, 70.16	POSITIVO NEGATIVO	-0.017 -0.017	Sin acuerdo Sin acuerdo
<i>RB-IDR / CM-L</i>	15	65.45	52.84, 76.69	POSITIVO NEGATIVO	0.070 0.070	Insignificante Insignificante
<i>FP / CM-L</i>	16	60	47.29, 71.82	POSITIVO NEGATIVO	0.021 0.027	Insignificante Insignificante
<i>qPCR-S / CM-L</i>	17	29.09	18.60, 41.44	POSITIVO NEGATIVO	-0.010 -0.010	Sin acuerdo Sin acuerdo
<i>qPCR-L / CM-L</i>	18	62.45	52.84, 76.69	POSITIVO NEGATIVO	0.327 0.317	Bajo Bajo
<i>qPCR-S / qPCR-L</i>	19	58.18	45.47, 70.16	POSITIVO NEGATIVO	0.058 0.025	Insignificante Insignificante

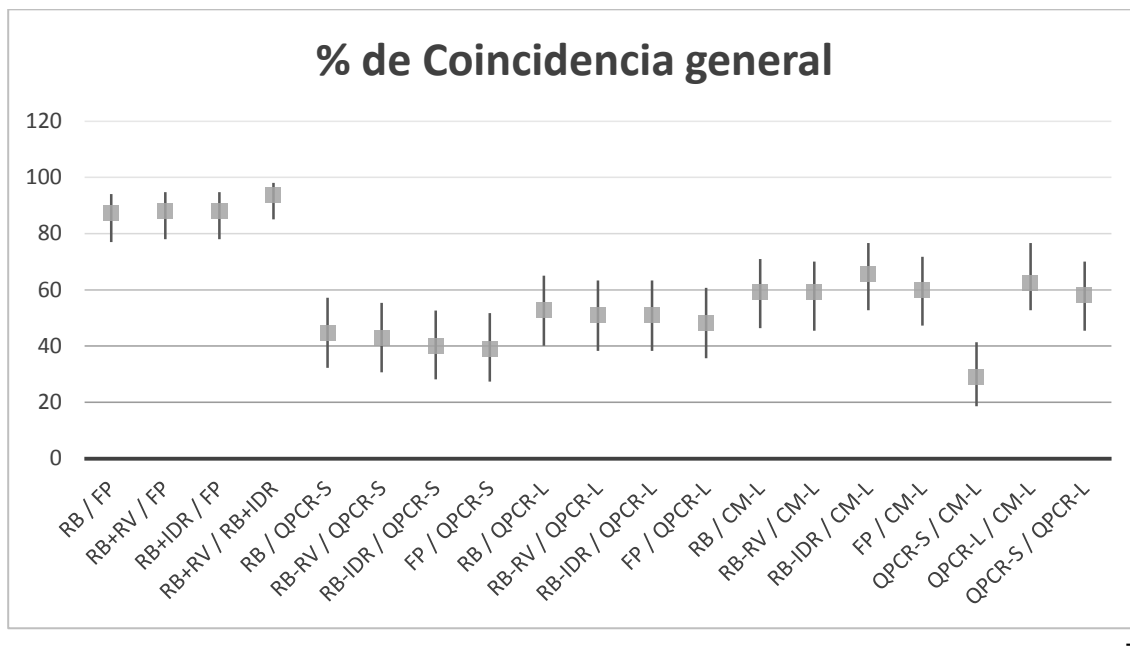


Figura 34 Porcentaje de coincidencia entre los resultados emitidos por las distintas pruebas diagnósticas.

El porcentaje de coincidencia más alto se presentó entre los diagnósticos emitidos por las pruebas serológicas, siendo estas igualmente las que presentaron el mayor grado de acuerdo entre ellas así: “Muy bueno” con índices kappa superior a 0.8, entre RB+RV Vs RB+IDR, tanto en el atributo diagnóstico Positivo como en el Negativo; RB+RV Vs FP y RB+IDR Vs FP en el atributo diagnóstico Positivo; “Bueno” con índices kappa entre 0.73 y 0.77, en la pruebas RB Vs FP, tanto en el atributo diagnóstico Positivo como en el Negativo; RB+RV Vs FP y RB+IDR Vs FP en el atributo diagnóstico Negativo.

El análisis de concordancia entre las pruebas serológicas y las pruebas de PCR tiempo real en sangre y leche, arrojaron índices kappa menores de 0.2, obteniendo un grado de acuerdo “Insignificante”; y el análisis entre las

pruebas serológicas y las pruebas de PCR tiempo real versus el cultivo microbiológico resulto en la mayoría de los casos “Insignificante”; “Sin acuerdo” entre RB-RV Vs CM-L y qPCR-S Vs CM-L y “Bajo” entre qPCR-L Vs CM-L.

Entre las pruebas de PCR tiempo real en Sangre y PCR tiempo real en leche el grado de acuerdo fue “Insignificante” con un kappa de 0.058 para el atributo diagnóstico Positivo y 0.025 para el Negativo.

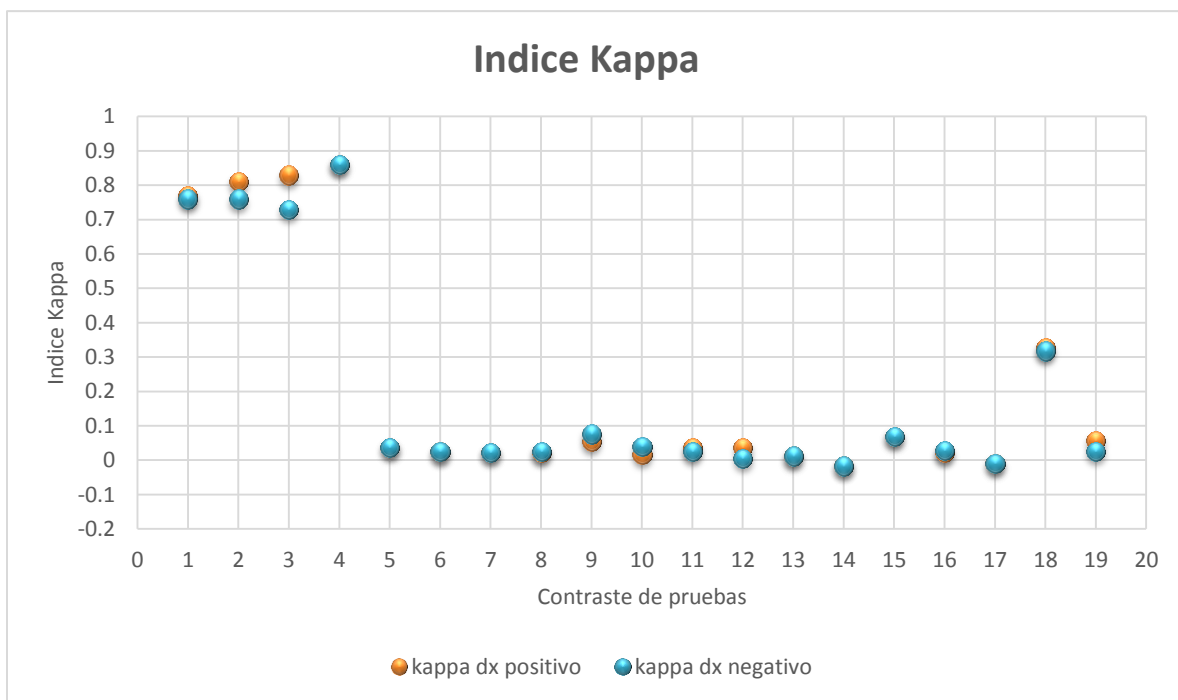


Figura 35 Índice kappa para los diagnósticos emitidos por cada una de las pruebas en acuerdo con cada otra.

8.1.7 Evaluación de las pruebas analíticas

Se calcularon los parámetros de evaluación para las pruebas analíticas empleadas, en contraste con cada prueba designada como “referencia”; inicialmente se utilizó RB+RV, posteriormente el Cultivo, y finalmente se

comparó el desempeño de las pruebas tomando como referencia a la PCR tiempo real en Sangre qPCR-S.

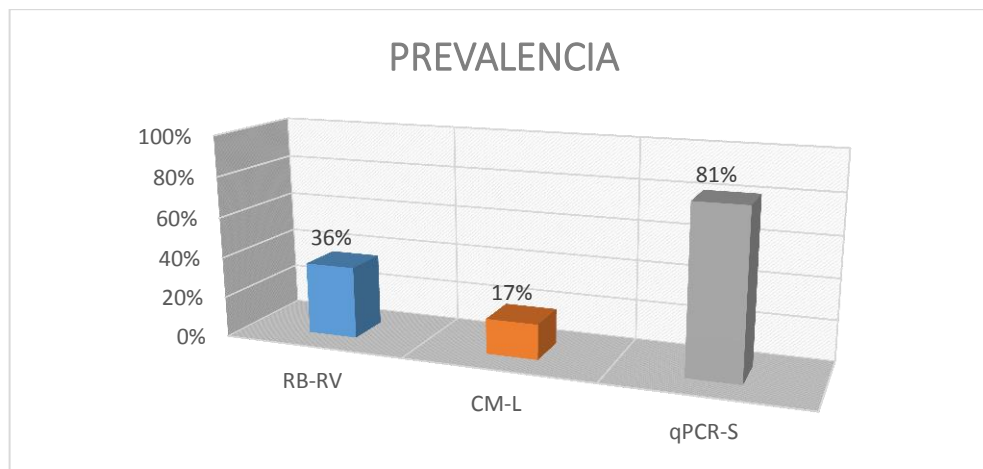
Los datos obtenidos se consolidaron en la siguiente tabla:

Cuadro 17 Consolidado de los parámetros calculados para la evaluación de las pruebas analíticas en contraste con las pruebas asignadas como referencia

PARAMETRO		RB-RV				CM-L				qPCR-S			
		FP	qPCR-L	qPCR-S	CM-L	FP	RB-RV	qPCR-L	qPCR-S	FP	RB-RV	qPCR-L	CM-L
$\chi^2 MV - G^2$		84.16	0.22	0.34	0.05	0.004	0.05	27.91	0.95	0.08	0.34	0.35	0.95
P		<0.0001	0.639	0.558	0.826	0.949	0.826	<0.0001	0.33	0.774	0.558	0.553	0.33
Coincidencia		93%	52%	43%	59%	62%	59%	66%	27%	40%	43%	53%	27%
Intervalo de Confianza	Limite superior	84%	65%	56%	71%	74%	71%	78%	40%	53%	56%	66%	40%
	Limite inferior	98%	39%	31%	46%	48%	46%	53%	17%	28%	31%	40%	17%
Análisis de concordancia	Kappa NEGATIVO	0.85	0.04	0.03	-0.019	0.005	-0.019	0.33	-0.04	0.017	0.03	0.04	-0.04
	Grado de acuerdo	Muy bueno	Insignificante	Insignificante	sin acuerdo	Insignificante	sin acuerdo	Bajo	sin acuerdo	Insignificante	Insignificante	Insignificante	sin acuerdo
	Kappa POSITIVO	0.85	0.04	0.03	-0.019	0.005	-0.019	0.33	-0.04	0.017	0.03	0.04	-0.04
	Grado de acuerdo	Muy bueno	Insignificante	Insignificante	sin acuerdo	Insignificante	sin acuerdo	Bajo	sin acuerdo	Insignificante	Insignificante	Insignificante	sin acuerdo
Prevalencia		36%				17%				81%			
Intervalo de Confianza	Limite superior	48%				27%				91%			
	Limite inferior	23%				8%				71%			
Sensibilidad		86%	54%	84%	16%	33%	33%	100%	72%	33%	37%	52%	15%
Intervalo de Confianza	Limite superior	101%	75%	99%	32%	62%	62%	100%	99%	47%	50%	66%	26%
	Limite inferior	72%	33%	68%	1%	5%	5%	100%	45%	20%	23%	38%	5%
Especificidad		97%	51%	21%	82%	67%	64%	59%	17%	70%	70%	55%	75%
Intervalo de Confianza	Limite superior	102%	67%	34%	94%	80%	77%	73%	28%	96%	96%	84%	100%
	Limite inferior	92%	35%	8%	70%	54%	51%	46%	7%	44%	44%	26%	50%
Valor Predictivo Positivo		94%	38%	37%	33%	18%	16%	34%	15%	82%	84%	83%	72%
Intervalo de Confianza	Limite superior	105%	55%	50%	62%	35%	32%	51%	26%	99%	99%	96%	99%
	Limite inferior	84%	21%	23%	5%	1%	1%	17%	5%	65%	68%	70%	45%
Valor Predictivo Negativo		93%	64%	70%	64%	83%	83%	100%	75%	20%	19%	22%	17%
Intervalo de Confianza	Limite superior	101%	82%	96%	77%	94%	95%	100%	100%	32%	32%	36%	28%

PARAMETRO	RB-RV				CM-L				qPCR-S				
	FP	qPCR-L	qPCR-S	CM-L	FP	RB-RV	qPCR-L	qPCR-S	FP	RB-RV	qPCR-L	CM-L	
Limite inferior	85%	47%	44%	51%	71%	71%	100%	50%	8%	7%	7%	7%	
Exactitud	93%	52%	43%	59%	62%	59%	66%	27%	40%	43%	53%	27%	
Intervalo de Confianza	Limite superior	100%	65%	56%	71%	74%	71%	78%	38%	53%	56%	66%	38%
	Limite inferior	87%	39%	31%	46%	49%	46%	54%	16%	28%	31%	40%	16%
Odss Ratio Diagnóstica	208.0	1.2	1.4	0.9	1.0	0.9	SD	0.5	1.2	1.4	1.3	0.5	
Intervalo de Confianza	Limite superior	1933.1	3.5	5.5	3.6	4.3	3.6	SD	2.6	4.7	5.5	4.9	2.6
	Limite inferior	22.4	0.4	0.3	0.2	0.3	0.2	SD	0.1	0.3	0.3	0.4	0.1
Razon de Probabilidad Positiva	29.0	1.1	1.1	0.9	1.0	0.9	2.5	0.9	1.1	1.2	1.2	0.6	
Intervalo de Confianza	Limite superior	176.1	1.8	1.4	2.9	2.6	2.4	3.4	1.3	2.9	3.2	2.3	2.0
	Limite inferior	4.8	0.7	0.8	0.3	0.4	0.4	1.8	0.6	0.4	0.5	0.6	0.2
Razon de Probabilidad Negativa	0.1	0.9	0.8	1.0	1.0	1.0	0.0	1.6	1.0	0.9	0.9	1.1	
Intervalo de Confianza	Limite superior	0.4	1.6	2.4	1.3	1.6	1.7	SD	5.0	1.5	1.4	1.6	1.6
	Limite inferior	0.0	0.5	0.2	0.8	0.6	0.6	SD	0.5	0.6	0.6	0.5	0.8

El valor de prevalencia de Brucelosis en el hato, determinado por las pruebas normativas Rosa de Bengala mas Rivanol fue de 36% (37/104), al calcular este parámetro mediante el cultivo microbiológico en leche su valor disminuyó en un 47% (17) y empleando la qPCR en sangre incrementó en más del doble (81%).



En la evaluación de las pruebas en contraste a Rosa de bengala con Rivanol (RB-RV), FP y qPCR-S mostraron los porcentajes de sensibilidad más altos, con 86% y 84% respectivamente; en el contraste frente al cultivo, las pruebas serológicas obtuvieron las sensibilidades más bajas (33%) y la qPCR-L alcanzó un 100% de sensibilidad. La evaluación empleando en contraste a qPCR-S, mostró un comportamiento más homogéneo de las pruebas en relación al parámetro sensibilidad, con valores por debajo del 50%

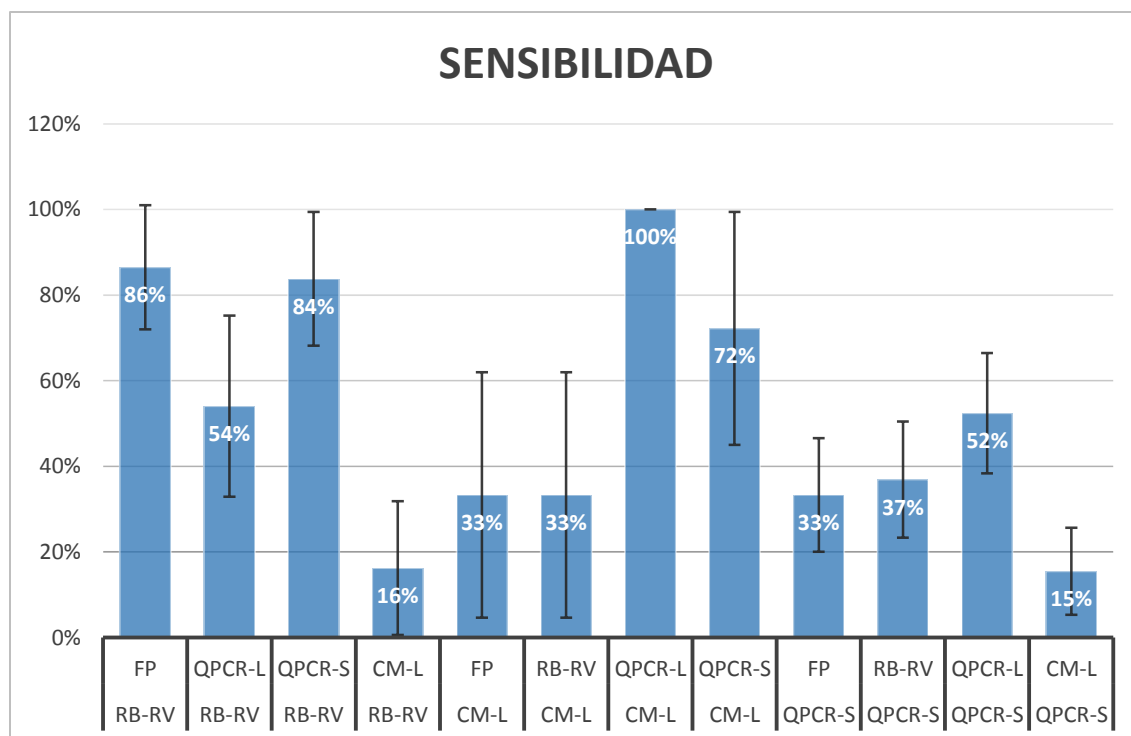


Figura 36 Porcentajes de sensibilidad de las pruebas frente a la prueba designada como referencia

En cuanto al parámetro Especificidad, en el contraste con RB-RV, FP obtuvo el mayor valor con un 97% y qPCR-S el menor valor con un 21% al igual que en el contraste con el cultivo en leche (CM-L) en donde obtuvo un 17%. En el contraste frente a qPCR-S, las pruebas FP, RB-RV y CM-L mostraron valores semejantes, 70%, 70% y 75% respectivamente.

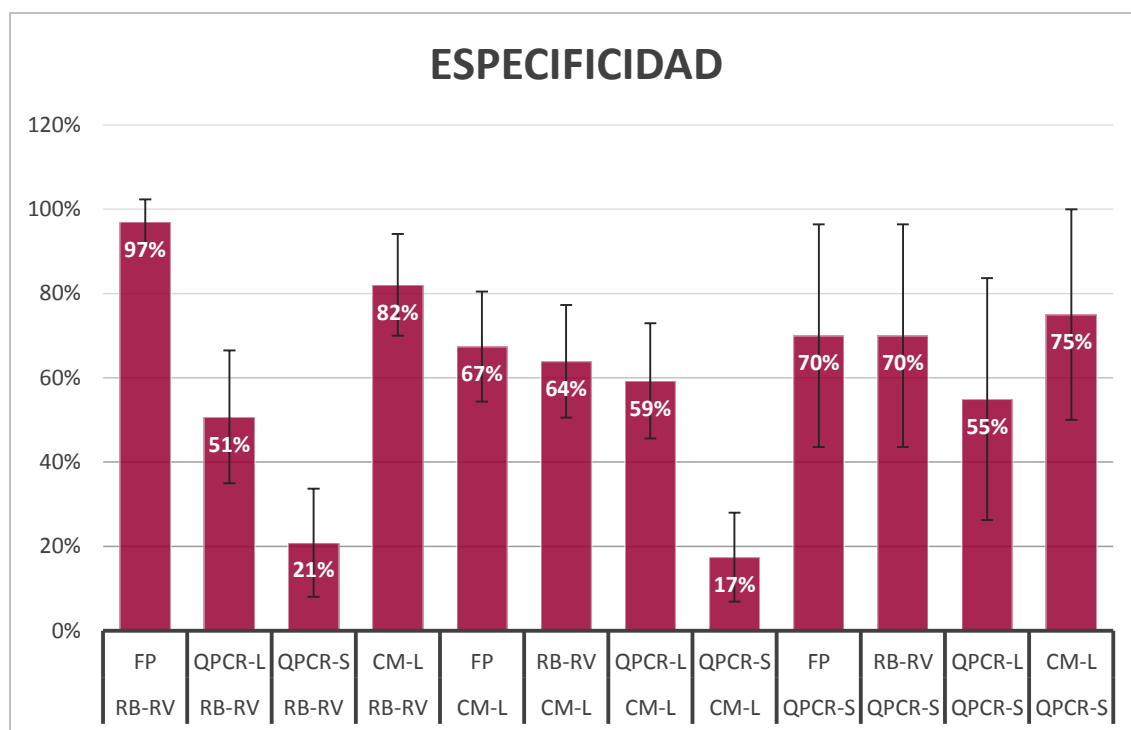


Figura 37 Porcentajes de especificidad de las pruebas frente a la prueba designada como referencia

En el parámetro Valor Predictivo Positivo (VPP), las pruebas mostraron valores más altos –por encima del 70%– y más homogéneos cuando se empleó qPCR-S como referencia; en el contraste frente a RB-RV, tan solo la FP mostró un VPP superior al 50% (94%) y en el contraste frente a CM-L todas pruebas mostraron valores por debajo del 40%.

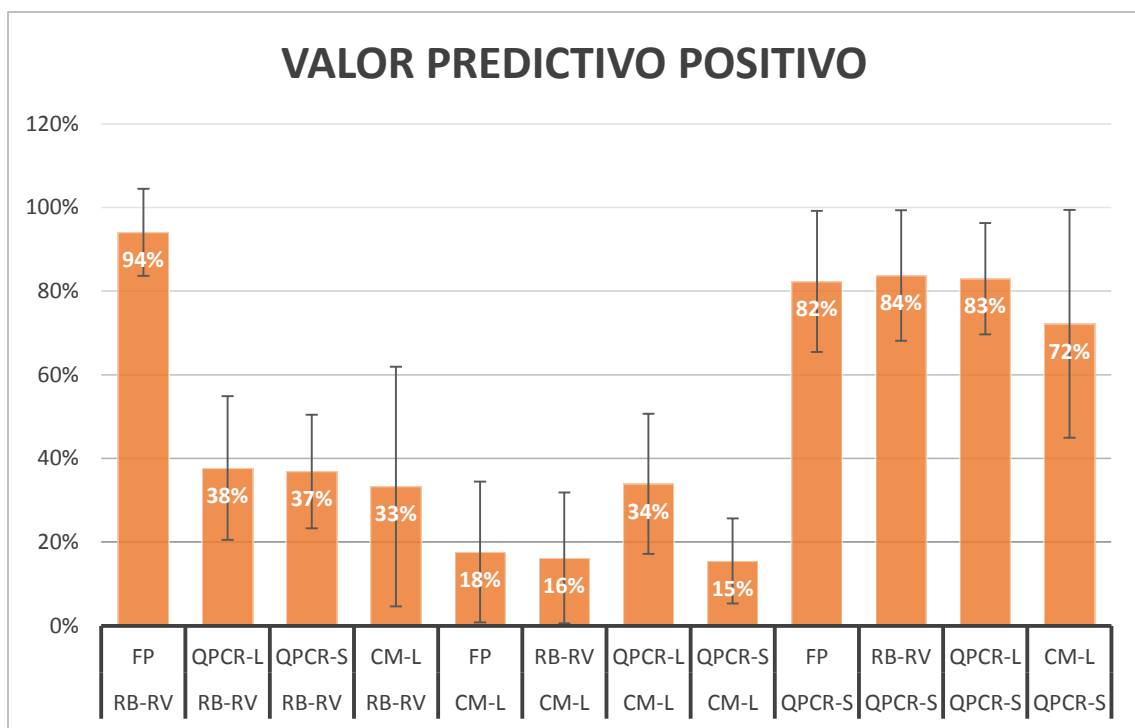


Figura 38 Porcentajes de VPP de las pruebas frente a la prueba designada como referencia

En cuanto al parámetro Valor Predictivo Negativo (VPN), las pruebas mostraron en los contrastes frente a RB-RV y CM-L, valores superiores al 60%, no así frente al contraste con qPCR-S, en donde los valores no superaron el 22%.

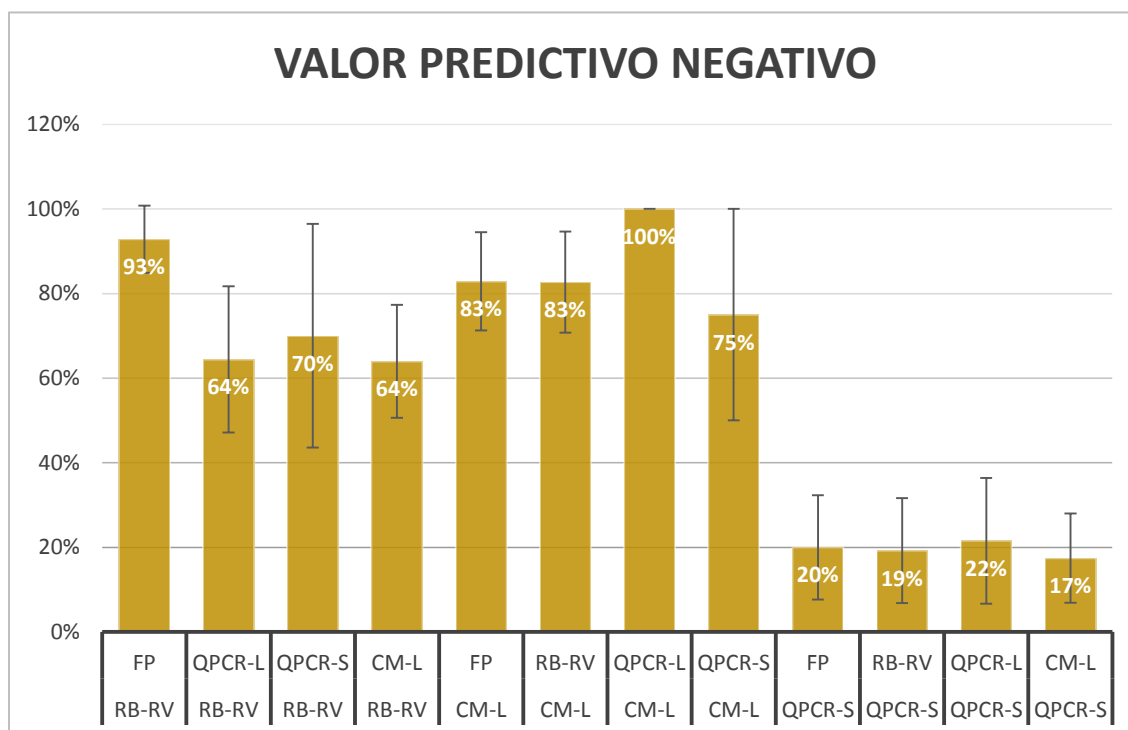
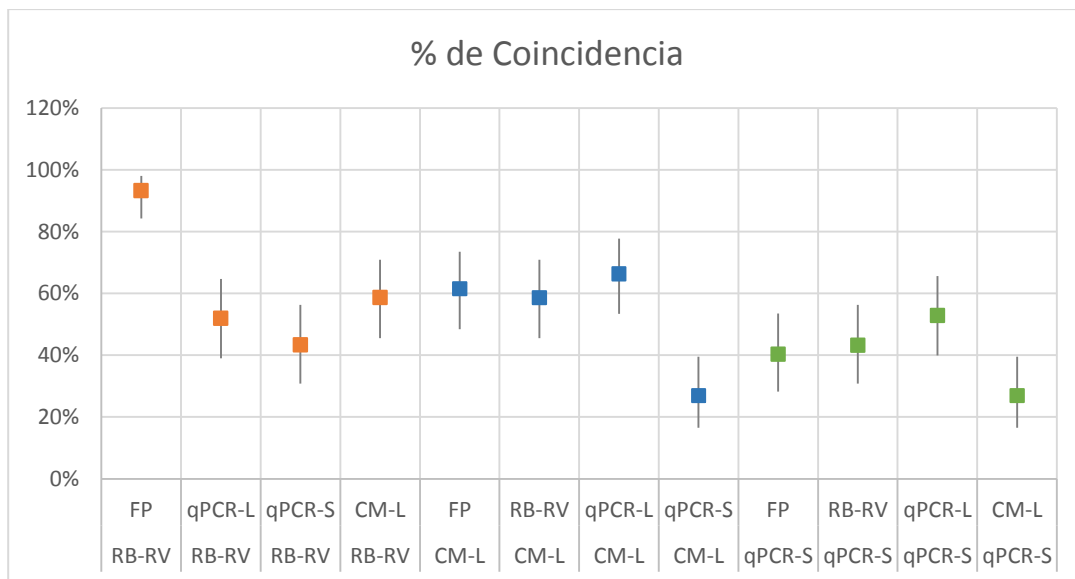
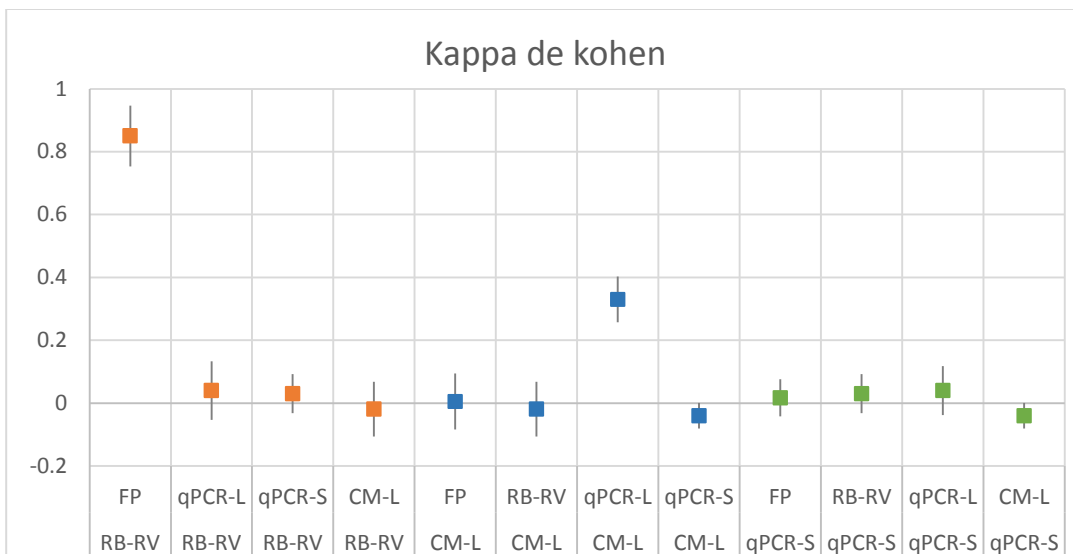


Figura 39 Porcentajes de VPN de las pruebas frente a la prueba designada como referencia

Al analizar la concordancia entre las pruebas, en contraste con RB-RV considerada como referencia, FP presenta el mayor porcentaje de coincidencia (93%) con el mayor índice Kappa (0.85); al contrastar la pruebas con el CM-L, como referencia, los porcentajes de coincidencia de las pruebas no superan el 66%, obteniendo el porcentaje de coincidencia más bajo la qPCR-S con un 27% (Kappa: -0.04).





8.2 Discusión

En este estudio se evaluó la utilidad como herramienta diagnóstica de *Brucella spp.*, de un método de PCR en tiempo real (qPCR) empleando como ADN objetivo el gen *Omp2*, frente a las pruebas diagnósticas normativas y/o tradicionales: Rosa de Bengala en serie con Rivanol (RB-RV), Fluorescencia Polarizada (FP), y Cultivo Microbiológico (CM-L), bajo condiciones de campo en un hato lechero con historial de Brucelosis bovina.

De las muestras negativas a RB-RV, FP y qPCR-S, 4 resultaron positivas a qPCR-L y cultivo (CM-L); este resultado pudo deberse al estado fisiológico de los animales; en un estudio realizado en vacas infectadas naturalmente, en La Florida, Estados Unidos, se encontró que hasta 11 días después del parto la prueba de Rosa de Bengala (tarjeta) arrojó resultados negativos (Ewalt et al., 1997), así mismo en estudios realizados en el marco de

programas de control y erradicación, se evidenció el aislamiento de *Brucella* en 167 vacas seronegativas, en hatos con “problemas crónicos de Brucelosis”, diagnosticándose a estos animales como “bovinos portadores latentes” (Nielsen and Duncan, 1990).

La totalidad de las muestras positivas a cultivo (CM-L), fueron positivas a qPCR-L, no obstante de 53 muestras positivas a qPCR-L, 35 fueron negativas a cultivo, este resultado se puede atribuir a dos aspectos fundamentales de las pruebas empleadas, el primero de ellos es la viabilidad de la bacteria, ya que para el caso de qPCR, esta no afecta la detección del microorganismo, mientras que para CM-L, esta se convierte en un factor crítico; así mismo la cantidad de bacterias (UFC/ml) presentes en la muestra, dado que la sensibilidad analítica de las pruebas moleculares es más alta, que la del cultivo; en una investigación sobre detección de *Brucella melitensis* por PCR en muestras de leche de ovejas postaborto, el PCR detectó 24 (23.5%) de 102 muestras de leche, mientras que el cultivo solamente detectó 8 (7.8%) (Ilhan et al., 2008).

El qPCR diagnosticó un mayor número de animales como positivos en condiciones de campo (80% en Sangre y 50% en leche) que el resto de las pruebas (RB-RV: 41%, FP: 34%, CM-L: 19%).

De las 67 muestras negativas a RB-RV, qPCR en sangre arrojó resultado positivo en 53 muestras; estudios semejantes han publicado datos consistentes con los resultados obtenidos en el presente trabajo, Saraswathy en Chennai, India, obtuvo un 62.5% de positividad a *Brucella* spp, mediante PCR en muestras de sangre, frente a un 4.16% de aglutinación rápida en placa y un 8.33% de aglutinación en tubo (Saraswathy et al., 2015); este resultado se debe probablemente a la mayor sensibilidad de las pruebas moleculares, frente a las pruebas serológicas y microbiológicas (Schuller et al., 2010), lo que aunado a la duplicación del marco abierto de lectura del gen (Omp2) empleado para la qPCR (Leal-Klevezas et al., 1995), permitiría detectar animales infectados con una baja carga bacteriana, antes de que estos desarrollen una respuesta inmunológica.

Al analizar la concordancia entre todas las pruebas, las serológicas (RB, RB-RV, RV-IDR y FP), presentaron entre ellas grado de acuerdo **bueno** y **muy bueno**, con índices Kappa de Cohen entre 0.76 y 0.86, en oposición a los grados de acuerdo **Insignificante** o **Sin acuerdo**, que se obtuvieron entre todas las otras pruebas, con índices kappa entre -0.010 a 0.058.

Cuando la prueba de FP en suero, fue contrastada con RB-RV que es la prueba tamiz oficial mexicana para el control y erradicación de la brucelosis bovina, la sensibilidad y especificidad obtenidas para FP fueron altas, 86% y 97% respectivamente (kappa: 0.85), mostrando un grado de acuerdo **muy**

bueno; Adil M. A. Salman y Hind A. El Nasri, al evaluar cuatro pruebas serológicas para detectar prevalencia de Brucelosis bovina encontraron resultados semejantes, reportando índices Kappa de 0.92 y 0.94 (A Salman and El Nasri, 2012); al calcular la chi cuadrada (G^2) para evaluar los criterios diagnósticos asignados por FP y los asignados por la prueba RB-RV se obtuvo un valor de $G^2 = 84.16$ ($P \leq 0.01$), encontrándose que no hay diferencia estadísticamente significativa.

Mientras que cuando qPCR-S, fue contrastada con RB-RV, se obtuvo una sensibilidad de 84% y una especificidad de 21% (kappa: 0.03), con un grado de acuerdo **insignificante**, la chi cuadrada calculada fue $G^2 = 0.37$ ($P: 0.058$) encontrándose que los criterios diagnósticos emitidos por qPCR-S y RB-RV, difieren estadísticamente, esta situación probablemente se debe a la mayor sensibilidad de qPCR-S respecto a RB-RV.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis de concordancia, en la evaluación de parámetros y en el cálculo de la chi cuadrada, se evidencia que el comportamiento de las pruebas serológicas (indirectas) en la asignación de un criterio diagnóstico de *Brucella spp*, en condiciones de infección natural en campo, es semejante entre ellas, no así frente a la pruebas moleculares y al cultivo microbiológico (directas) con las cuales difieren significativamente; estos resultados plantean una incógnita sobre la capacidad de unas y otras para la definición del verdadero estatus sanitario del hato seleccionado, así como de

las estrategias de manejo para el control y la erradicación de la brucelosis bovina que debieran ser implementadas.

No obstante, dadas las características del presente estudio, en el cual las pruebas a considerarse como referencia (RB-RV y CM-L), poseen sensibilidades menores que las pruebas moleculares en evaluación (qPCR-S y qPCR-L) se hace necesario realizar un nuevo muestreo a estos animales, para contrastar los nuevos resultados con los inicialmente obtenidos para cada una de las pruebas, así como para evaluar la condición clínica de los bovinos; y verificar la posible seroconversión de estos, bajo el supuesto de que al momento de la toma de muestra inicial, el nivel de anticuerpos fuese no detectable, por encontrarse en periodo de ventana inmunológica, o por baja carga bacteriana debido al estado fisiológico del animal; igualmente, evaluar la probabilidad de “portadores latentes” en algunos de ellos dado el historial de Brucelosis del hato seleccionado.

9 CONCLUSION

La ruptura de los paradigmas diagnósticos tradicionales, la aceptación de las limitaciones del diagnóstico serológico, y el reconocimiento de que los métodos moleculares aplicados al diagnóstico ofrecen mejoras significativas sobre los métodos tradicionales, tales como la velocidad, seguridad, alta sensibilidad y especificidad en la detección, es fundamental para lograr la incorporación de estos métodos en los programas de control y erradicación de enfermedades de alto impacto zoonótico y epidemiológico, como es el caso de la Brucelosis bovina.

En el presente estudio, la PCR en tiempo real para el gen Omp2, demostró una mayor detección de positividad para *Brucella spp*, cuando se empleó a partir de muestras de ADN extraídas de sangre, permitiendo el diagnóstico oportuno de la enfermedad, su utilización como herramienta diagnóstica dentro de los procesos de control y erradicación de la Brucelosis bovina, permitiría el diseño de estrategias de manejo, control y erradicación de la enfermedad más eficientes, acordes a la situación sanitaria del hato y por tanto de mayor impacto epidemiológico.

10 LITERATURA CITADA

- A Salman, A. M. & El Nasri, H. A. 2012. Evaluation of four serological tests to detect prevalence of bovine brucellosis in Khartoum State. *Journal of Cell and Animal Biology*.
- Aguirre Arzola, V. E., Alvarado González, M., Ibañez González, J. L., Leal Hernández, M., Díaz Aparicio, E., Nevárez Moorillón, G. V., Solís Martínez, F. J., Arévalo Gallegos, S. & Rivera Chavira, B. E. 2008. Diagnóstico rápido y efectivo de brucelosis bovina en sangre, mediante una reacción en cadena de la polimerasa doble. *Técnica Pecuaria México*, 46, 147-158.
- Aguirre Arzola, V. E., Alvarado González, M., González, J. L. I., Marisela Leal Hernández, E. D. A., Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón & Francisco Javier Solís Martínez, S. A. G., Blanca Estela Rivera Chavira. 2008. Duplex polymerase chain reaction as a rapid, effective diagnostic test for bovine brucellosis using blood samples. *Téc Pecu Méx*, 46, 147-158.
- Al Dahouk, S., Nöckler, K., Scholz, H. C., Pfeffer, M., Neubauer, H. & Tomaso, H. 2007. Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella* spp. *Clin Chem Lab Med*, 45, 1464-70.
- Al-Ajlan, H. H., Ibrahim, A. S. & Al-Salamah, A. A. 2011. Comparison of different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *Pol J Microbiol*, 60, 27-33.

- Alberts, J. N. & Erasmus, J. A. 1995. Detection of *Brucella abortus* antigens by immunoperoxidase histochemical staining of lochia smears. *Onderstepoort J Vet Res*, 62, 147-50.
- Alikhani, M. Y., Hashemi, S. H., Naseri, Z., Farajnia, S. & Peeri-Dogaheh, H. 2013. Diagnosis of Human Brucellosis by Blood Culture (BACTEC) and PCR Method via Whole Blood and Serum. *Jundishapur J Microbiol*, 6, 248-51.
- Aranguren-Méndez, J., Portillo, M., Ruiz, J., Villasmil-Ontiveros, Y., Yáñez, L., Borjas, L. & Zabala, W. 2009. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES EN PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL MEDIANTE PCR. *Revista Científica, FCV-LUZ*, Vol. XIX, 159 - 164.
- Baily, G., Krahn, J., Drasar, B. & Stoker, N. 1992a. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg*, 95, 271-5.
- Baily, G. G., Krahn, J. B., Drasar, B. S. & Stoker, N. G. 1992b. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg*, 95, 271-5.
- Bregu, J., Conklin, D., Coronado, E., Terrill, M., Cotton, R. W. & Grgicak, C. M. 2013. Analytical thresholds and sensitivity: establishing RFU thresholds for forensic DNA analysis. *J Forensic Sci*, 58, 120-9.
- Bricker, B. J. & Halling, S. M. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol*, 32, 2660-6.

- Bricker, B. J. & Halling, S. M. 1995. Enhancement of the Brucella AMOS PCR assay for differentiation of Brucella abortus vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol*, 33, 1640-2.
- Castro, H. A., Gonzalez, S. R. & Prat, M. I. 2005. Brucellosis: Una Revision Practica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J. P. 2003. Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med*, 198, 545-56.
- Colmenero, J. D., Clavijo, E., Morata, P., Bravo, M. J. & Queipo-Ortuño, M. I. 2011. Quantitative real-time polymerase chain reaction improves conventional microbiological diagnosis in an outbreak of brucellosis due to ingestion of unpasteurized goat cheese. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 71, 294-6.
- Corbel, M. 1973. The direct fluorescent antibody test for detection of Brucella abortus in bovine abortion material. *J Hyg (Lond)*, 71, 123-9.
- Cypress, D. 2009. Qualitative determination of antibodies anti-Brucella.
- De Miguel, M. J., Marin, C. M., Munoz, P. M., Dieste, L., Grillo, M. J. & Blasco, J. M. 2011. Development of a Selective Culture Medium for Primary Isolation of the Main Brucella Species. *J. Clin. Microbiol.*, 49, 1458-1463.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. & C.W., R. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, .

- Dougherty, A. M. F., Cornish, T. E., O'Toole, D., Boerger-Fields, A. M., Henderson, O. L. & Mills, K. W. 2013. Abortion and premature birth in cattle following vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25, 630-635.
- Ewalt, D. R., Payeur, J. B., Rhyan, J. C. & Geer, P. L. 1997. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. *J Vet Diagn Invest*, 9, 417-20.
- FBI, F. B. o. I. S. W. G. o. D. A. M. S. 2010. SWGDAM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories In: services, L. (ed.). <https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/swgdam-interpretation-guidelines>.
- Fekete, A., Bantle, J. A., Halling, S. M. & Sanborn, M. R. 1990. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol*, 69, 216-27.
- Foster, J. T., Beckstrom-Sternberg, S. M., Pearson, T., Beckstrom-Sternberg, J. S., Chain, P. S., Roberto, F. F., Hnath, J., Brettin, T. & Keim, P. 2009. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. *J Bacteriol*, 191, 2864-70.
- Foster, J. T., Okinaka, R. T., Svensson, R., Shaw, K., De, B. K., Robison, R. A., Probert, W. S., Kenefic, L. J., Brown, W. D. & Keim, P. 2008. Real-time PCR assays of single-nucleotide polymorphisms defining the major *Brucella* clades. *J Clin Microbiol*, 46, 296-301.
- García-Yoldi, D., Marín, C. M., de Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Vizmanos, J. L. & López-Goñi, I. 2006. Multiplex PCR assay for the identification and

differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin Chem*, 52, 779-81.

Golding B, S. D., Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H. 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.*, 3, 43-8.

Gopaul, K. K., Koylass, M. S., Smith, C. J. & Whatmore, A. M. 2008. Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiol*, 8, 86.

Gopaul, K. K., Sells, J., Bricker, B. J., Crasta, O. R. & Whatmore, A. M. 2010. Rapid and reliable single nucleotide polymorphism-based differentiation of *Brucella* live vaccine strains from field strains. *J Clin Microbiol*, 48, 1461-4.

Guler, L., Gunduz, K. & Ok, U. 2003. Comparison of polimerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep Brucellosis using aboted fetus samples. *Veterinary Microbiology*, 93, 53-61.

Gándara, B., Merino, A. L., Rogel, M. A. & Martínez-Romero, E. 2001. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*, 39, 235-40.

Hall, N. 2007. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J Exp Biol*, 210, 1518-25.

Hekmatimoghaddam, S., Sadeh, M., Khalili, M. B., Mollaabedin, M. & Sazmand, A. 2013. Comparison of PCR, Wright agglutination test and blood culture

for diagnosis of brucellosis in suspected patients. *Pak J Biol Sci*, 16, 1589-92.

Herman, L. & De Ridder, H. 1992. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 58, 2099-101.

Ilhan, Z., Solmaz, H., Aksakal, A., Gulhan, T., Ekin, I. & Boynukara, B. 2008. Detection of *Brucella melitensis* DNA in the milk of sheep after abortion by PCR assay. *Arch Med Vet*.

Junior, D. G. J., Rosinha, G. M. S., Carvalho, C. E. G., Oliveira, C. E., Sanches, C. C. & Lima-Ribeiro, A. M. C. 2013. Detection of *Brucella* spp. DNA in the semen of seronegative bulls by polymerase chain reaction
Transboundary and Emerging Diseases Volume 60, Issue 4. *Transboundary and Emerging Diseases*.

Kang, S. I., Her, M., Kim, J. W., Kim, J. Y., Ko, K. Y., Ha, Y. M. & Jung, S. C. 2011. Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Appl Environ Microbiol*, 77, 6726-8.

Khatun, M. M., Islam, M. A., Baek, B. K. & Lee, S. I. 2009. Characteristics of the immune response during acute brucellosis in Sprague-Dawley rats. *J Infect Dev Ctries*, 3, 392-7.

Kittelberger, R., Hilbink, F., Hansen, M. F., Ross, G. P., Joyce, M. A., Fenwick, S., Heesemann, J., Wolf-Watz, H. & Nielsen, K. 1995. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 II the use of *Yersinia* outer proteins for the specific detection of *Yersinia enterocolitica* infections in ruminants. *Vet Microbiol*, 47, 271-80.

- Koneman, E. 2006. *Koneman's Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology*.
- Le Flèche, P., Jacques, I., Grayon, M., Al Dahouk, S., Bouchon, P., Denoed, F., Nöckler, K., Neubauer, H., Guilloteau, L. A. & Vergnaud, G. 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a Brucella MLVA typing assay. *BMC Microbiol*, 6, 9.
- Leal-Klevezas, D. S., Martínez-Vázquez, I. O., López-Merino, A. & Martínez-Soriano, J. P. 1995. Single-step PCR for detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol*, 33, 3087-90.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *METHODS*. <http://www.gene-quantification.net/livak-2001.pdf>.
- López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C. M., de Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Blasco, J. M., Jacques, I., Grayon, M., Cloeckert, A., Ferreira, A. C., Cardoso, R., Corrêa de Sá, M. I., Walravens, K., Albert, D. & Garin-Bastuji, B. 2008. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all Brucella species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol*, 46, 3484-7.
- López-Goñi, I., Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Moriyón, I. & Moreno, E. 2002. Regulation of Brucella virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol*, 90, 329-39.
- López-Goñi, I. O. C., David. 2012. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*.

- Mindy L. Rawlins¹, Cecilia Gerstner¹, Harry R. Hill^{1,2}, and Christine M. Litwin^{1,2}. 2005. Evaluation of a Western Blot Method for the Detection of *Yersinia* Antibodies: Evidence of Serological Cross-Reactivity between *Yersinia* Outer Membrane Proteins and *Borrelia burgdorferi*.
- Mirnejad, R., Mohamadi, M., Piranfar, V., Mortazavi, S. M. & Kachuei, R. 2013. A duplex PCR for rapid and simultaneous detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *Asian Pac J Trop Med*, 6, 453-6.
- Mitka, S., Anetakis, C., Souliou, E., Diza, E. & Kansouzidou, A. 2007. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. *J Clin Microbiol*, 45, 1211-8.
- Mosquera C, X., Bernal V, C., Muskus L, C. & Berdugo G, J. 2008. DETECCIÓN DE *Brucella abortus* POR PCR EN MUESTRAS DE SANGRE Y LECHE DE VACUNOS. *Revista MVZ Córdoba*, 13, 1504-1513.
- Mukherjee, F., Jain, J., Patel, V. & Nair, M. 2007. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. *J Med Microbiol*, 56, 1309-16.
- Muma, J. B., Toft, N., Oloya, J., Lund, A., Nielsen, K., Samui, K. & Skjerve, E. 2007. Evaluation of three serological tests for brucellosis in naturally infected cattle using latent class analysis. *Vet Microbiol*, 125, 187-92.
- Murphy, M. A., Shariflou, M. R. & Moran, C. 2002. High quality genomic DNA extraction from large milk samples. *J Dairy Res*, 69, 645-9.

- Navarro, E., Segura, J. C., Castaño, M. J. & Solera, J. 2006. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor the evolution of *Brucella melitensis* DNA load during therapy and post-therapy follow-up in patients with brucellosis. *Clin Infect Dis*, 42, 1266-73.
- Naves, J. H., Rezende, L. M., Ramos, G. C., Soares, P. M., Tavares, T. C., França, A. M., Neves, S. M., Silva, N. A. & Lima-Ribeiro, A. M. 2012. Interference in diagnostic tests for brucellosis in cattle recently vaccinated against leptospirosis. *J Vet Diagn Invest*, 24, 283-7.
- Nielsen, K. & Duncan, J. R. 1990. *Animal Brucellosis*.
- O'Leary, S., Sheahan, M. & Sweeney, T. 2006. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res Vet Sci*, 81, 170-6.
- Odumeru, J., Gao, A., Chen, S., Raymond, M. & Mutharia, L. 2001. Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk. *Can J Vet Res*, 65, 201-5.
- OIE. 2006. CAPITULO 1.1.3 VALIDACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS MÉTODOS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA UTILIZADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.
- OIE, O. M. d. s. A. 2012. Capítulo 2.4.3 Brucelosis Bovina. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres*.

- Ortega, J. R. V. 1993. Pérdidas por desecho prematuro de vacas en un hato lechero en México. *World Animal Review, FAO.*, <http://www.fao.org/docrep/U9550T/u9550T00.htm#Contents>.
- Oñate, A., Andrews, E., Beltran, A., Eller, G., Schurig, G. & Folch, H. 2000. Frequent Exposure of Mice to Crude *Brucella abortus* Proteins Down-regulates Immune Response
Journal of Veterinary Medicine, Series B Volume 47, Issue 9. Journal of Veterinary Medicine, Series B.
- Probert, W. S., Schrader, K. N., Khuong, N. Y., Bystrom, S. L. & Graves, M. H. 2004. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol*, 42, 1290-3.
- Pérez, J., Quezada, M., López, J., Casquet, O., Sierra, M. A. & Martín de las Mulas, J. 1998. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. *J Vet Diagn Invest*, 10, 17-21.
- Qasem, J. A., AlMomin, S., Al-Mouqati, S. A. & Kumar, V. 2015. Characterization and evaluation of an arbitrary primed Polymerase Chain Reaction (PCR) product for the specific detection of *Brucella* species. *Saudi J Biol Sci*, 22, 220-6.
- Queipo-Ortuño, M. I., Colmenero, J. D., Reguera, J. M., García-Ordoñez, M. A., Pachón, M. E., Gonzalez, M. & Morata, P. 2005. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples
Clinical Microbiology and Infection Volume 11, Issue 9. Clinical Microbiology and Infection.

- R. Poutou, M. B., S. Sierra, K. Torres, A. K. Carrascal, M. Mercado. 2005. ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ADN Y VALIDACIÓN DE LA PCR MÚLTIPLE PARA DETECTAR *Listeria monocytogenes* EN QUESO, LECHE, CARNE DE RES Y POLLO *UNIVERSITAS SCIENTIARUM* *Revista de la Facultad de Ciencias*, 10, 61-78.
- RAMESH VEMULAPALLI, J. R. M., GERHARDT G. SCHURIG, NAMMALWAR RIRANGANATHAN, SHIRLEY M. HALLING, AND STEPHEN M. BOYLE. 1999. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY*, 6, 760-764.
- Rebrikov, D. V. & Trofimov, D. I. u. 2006. [Real-time PCR: approaches to data analysis (a review)]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 42, 520-8.
- Renteria Evangelista, T. B., Organeses de los Santos, H., Licea Navarro, A. F., Medina Basulto, G. E., Nielsen, K., Montaña Gomez, M. F., Moreno Rosales, J. F. & Pujol Manriquez, L. C. 2005. Evaluación de la prueba Reaccion en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Revista Mexicana de ciencias pecuarias*, 43, 117-126.
- Rivera, J. L. S. 2010. INCIDENCIA DE SEROCONVERSIÓN A *Brucella abortus* EN HATOS LECHEROS DE MICHOACÁN, MÉXICO *Revista Científica, FCV-LUZ*, XX, 584-589.
- SAGARPA. 1995. 08-20-96 NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. .

- Saraswathy, Felsia, M. H., R, S., N.R. & Allwin, B. 2015. Evaluation of clinical samples by various serological, biochemical and Polymerase Chain Reaction techniques for brucellosis.
- Schuller, M., Sloots, T. P., James, G., Halliday, C. & Carter, L. W. 2010. PCR for Clinical Mycrobiology, an Australian and International Perspective. In: Schuller, D. M. (ed.).
- Scott, J. C., Koylass, M. S., Stubberfield, M. R. & Whatmore, A. M. 2007. Multiplex assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *Brucella* isolates at the species level. *Appl Environ Microbiol*, 73, 7331-7.
- Sidor, I. F., Dunn, J. L., Tsongalis, G. J., Carlson, J. & Frasca, S. 2013. A multiplex real-time polymerase chain reaction assay with two internal controls for the detection of *Brucella* species in tissues, blood, and feces from marine mammals. *J Vet Diagn Invest*, 25, 72-81.
- SOLMAZ, H., CANTEKI, N., ALTUG, N., ILHAN, Z., ASLAN, S. & ERGUN, Y. 2014. A PCR method with internal control for detection of *Brucella* spp. from bovine abortion samples.
- Svetić, A., Jian, Y. C., Lu, P., Finkelman, F. D. & Gause, W. C. 1993. *Brucella abortus* induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by elevated IL-10 and IFN-gamma in CD4+ T cells. *Int Immunol*, 5, 877-83.
- Tina S, L., Errol, S. & Julie A, K. c. 2013. Comparison of six commercial DNA extraction kits for detection of *Brucella neotomae* in Mexican and Central

American-style cheese and other milk products *Food Microbiology*, 34, 100-105.

Vemulapalli, R., McQuiston, J. R., Schurig, G. G., Sriranganathan, N., Halling, S. M. & Boyle, S. M. 1999. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6, 760-4.

Wellinghausen, N., Nöckler, K., Sigge, A., Bartel, M., Essig, A. & Poppert, S. 2006. Rapid detection of *Brucella* spp. in blood cultures by fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol*, 44, 1828-30.

Wen-ping, C. & Tsong-teh, K. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gramnegative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 21.

Whatmore, A. M., Perrett, L. L. & MacMillan, A. P. 2007. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol*, 7, 34.

WHO, W. H. O. 2006. *Brucellosis in Humans and Animals*.

William S. Probert, K. N. S., Nhi Y. Khuong, Susan L. Bystrom, & Graves, a. M. H. 2003. Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*

- Winchell, J. M., Wolff, B. J., Tiller, R., Bowen, M. D. & Hoffmaster, A. R. 2010. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol*, 48, 697-702.
- Wright, A. E. 1897. On the application of the serum test to differential diagnosis of typhoid and malta fever. And on the further application of the method of srum diagnosis to the elucidation of certain problems in connexion with the duration of inmunity and the geographical distribution of disease. *The Lancet*, 149, 656-659.
- Xolalpa Campos, V. M., Perez Ruano, M. & Cordova Izquierdo, A. 2010. Evaluación de las pérdidas económicas por eventos de falla reproductiva asociadas a brucelosis bovina en hembras y explotaciones de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, México. . *Rev. cient. (Maracaibo)* 20.