

Diagnóstico rápido y efectivo de brucelosis bovina en sangre, mediante una reacción en cadena de la polimerasa doble

Duplex polymerase chain reaction as a rapid, effective diagnostic test for bovine brucellosis using blood samples

Víctor Eustorgio Aguirre Arzola^a, Mónica Alvarado González^b, José Luís Ihave González^a, Marisela Leal Hernández^d, Efrén Díaz Aparicio^c, Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón^a, Francisco Javier Solís Martínez^a, Sigifredo Arévalo Gallegos^a, Blanca Estela Rivera Chavira^a

RESUMEN

La brucelosis es una de las enfermedades infecciosas más importantes del ganado y representa una barrera para la importación y exportación de productos lácteos y cárnicos. En México, el diagnóstico se realiza mediante las pruebas serológicas de tarjeta, rivanol y fijación del complemento. Los métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son herramientas rápidas y específicas para el diagnóstico de la enfermedad. En el presente trabajo se desarrolló el diagnóstico de brucelosis por PCR doble, a partir de muestras de sangre, utilizando los genes *omp2* y *BSCP31*. Para este estudio se utilizaron 53 muestras de sangre con títulos de rivanol de 1:400 y 60 muestras con resultados negativos a las pruebas serológicas. Las concentraciones óptimas de iniciadores y cloruro de magnesio para lograr la amplificación específica de los dos fragmentos, fueron de 100 nM y 0.5 mM respectivamente. La sensibilidad analítica alcanzada para la PCR doble fue de 100 fg/μl de ADN, mientras que la concentración óptima de amplificación fue de 1 ng/μl de ADN. La especificidad analítica obtenida fue del 100 %, mientras que la sensibilidad y la especificidad diagnóstica fueron del 96.3 % y 100 % respectivamente. Los resultados de este estudio aportan evidencia para el uso rutinario de la PCR doble para el diagnóstico de la brucelosis bovina directamente de muestras de sangre, ya que es un método altamente seguro, sensible y específico.

PALABRAS CLAVE: Bovinos, Brucelosis, PCR doble, Sangre.

ABSTRACT

Brucellosis is a major infectious disease of cattle. It is also an international trade barrier for the import and export of dairy and beef products. In Mexico, bovine brucellosis is diagnosed using the card, rivanol, and complement fixation serological tests. Molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) are rapid, specific diagnostic tools for brucellosis. This research developed a duplex PCR assay for the diagnosis of brucellosis in cattle blood samples, using the *omp2* and *BSCP31* genes. Fifty three (53) blood samples with rivanol titers of 1:400, and 60 serologically-negative samples were used. The optimum concentrations of both primers and magnesium chloride for specific fragment amplifications were 100 nM and 0.5 mM, respectively. The analytical sensitivity of duplex PCR was 100 fg/μl DNA, while the optimum amplification concentration was 1 ng/μl DNA. Analytical specificity was 100%. Diagnostic sensitivity and specificity were 96.3% and 100%, respectively. The results of this study provide evidence for the routine use of duplex PCR in the diagnosis of bovine brucellosis directly on blood samples, as a highly safe, sensitive, specific method.

KEY WORDS: Cattle, Brucellosis, Duplex PCR, Blood.

Recibido el 5 de junio de 2007. Aceptado para su publicación el 12 de noviembre de 2007.

^a Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México.

^b Centro de Desarrollo Tecnológico para la Industria Láctea. S.A de C.V. (CDTIL).

^c Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria. INIFAP. Km. 15.5 carretera federal México-Toluca, 05110 Palo alto, Delegación. Cuajimalpa, Distrito Federal. Tél. 55703100 ext 45, efredia@yahoo.com. Correspondencia al quinto autor.

^d FES. Cuautitlán, UNAM.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infecciosa que afecta al ganado y al hombre, es ocasionada por coccobacilos Gram negativos del género *Brucella*⁽¹⁾. La especie que afecta primordialmente al ganado bovino es *Brucella abortus*. La enfermedad tiene un curso prácticamente asintomático, siendo el aborto el principal signo de la enfermedad. Sin embargo, cerca de un 33 % de las vacas afectadas con la enfermedad nunca abortan y el 80 % de las gestantes sólo abortan una vez. Actualmente, el esquema de diagnóstico en México se basa en pruebas serológicas como la de tarjeta y la de rivanol. El estudio bacteriológico es un diagnóstico irrefutable de la enfermedad, sin embargo, estos procedimientos llegan a requerir hasta de siete semanas para obtener el resultado. Además de que representan un riesgo para el personal que los realiza⁽²⁾. Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proveen de un método rápido, sensible y específico para el diagnóstico de la brucelosis bovina y la técnica de PCR doble incrementa la especificidad de la técnica^(3,4,5,6).

Las muestras utilizadas para realizar la PCR han sido principalmente leche, y exudados vaginales u órganos, dejando de lado las muestras de sangre, que son más adecuadas por ser más fáciles de obtener y su disponibilidad es perenne, a diferencia de la leche o los exudados.

En el presente trabajo se desarrolló el diagnóstico de brucelosis por PCR doble, a partir de muestras de sangre, utilizando los genes *omp2* y *BSCP31*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de referencia

La cepa RB51 de *B. abortus*, fue donada por el Dr. Gustavo Vizcarra, Secretaría de Recursos Agrícolas Ganaderos y Pesqueros (SAGARPA). Las cepas de *Proteus mirabilis* (ATCC12453), *Staphylococcus aureus* (ATCC14028), *Streptococcus pyogenes* (ATCC19615), *Streptococcus faecalis* (ATCC29212) y *Salmonella choleraesuis* (ATCC14028), fueron proporcionadas por el Dr. Jorge Portillo Gallo, Laboratorio Internacional de Análisis Clínicos (LIACSA).

INTRODUCTION

Brucellosis is an infectious disease affecting cattle and humans. It is caused by Gram negative coccobacilli of the *Brucella* genus⁽¹⁾. *Cattle are mostly affected by the Brucella abortus* species. The disease runs virtually asymptomatic, and its main clinical sign is abortion. Nevertheless, nearly 33 % cows affected by the disease never abort, and 80 % pregnant cows abort only once. In Mexico, diagnosis is currently based on serological tests such as the card test, and the rivanol test. A positive bacteriological result constitutes an irrefutable diagnosis. The disadvantages of these procedures are that they require up to 7 wk for results to be obtained, and also they represent a health hazard for the diagnostician⁽²⁾. Polymerase chain reaction (PCR) techniques are rapid, sensitive, and specific for the diagnosis of bovine brucellosis. Duplex PCR further increases the specificity of this particular technique^(3,4,5,6).

Samples for PCR have primordially been milk, vaginal exudates, and various organs. Nevertheless, blood samples are more adequate since they are convenient to obtain and they are readily available, as opposite to milk or exudates.

In this research, duplex PCR diagnosis of brucellosis in blood samples using the *omp2* and *BSCP31* genes was developed.

MATERIALS AND METHODS

Reference strains

B. abortus RB51 strain was donated by Dr. Gustavo Vizcarra, *Secretaría de Recursos Agrícolas Ganaderos y Pesqueros* (SAGARPA, Mexico's Secretariat of Agricultural, Livestock, and Fishery Resources). *Proteus mirabilis* (ATCC12453), *Staphylococcus aureus* (ATCC14028), *Streptococcus pyogenes* (ATCC19615), *Streptococcus faecalis* (ATCC29212) and *Salmonella choleraesuis* (ATCC14028) strains were provided by Dr. Jorge Portillo Gallo, *Laboratorio Internacional de Análisis Clínicos* (LIACSA, International Clinical Analysis Laboratory.)

Muestras

Se colectaron 450 muestras de sangre de bovino con y sin anticoagulante (EDTA), procedentes de ganado productor de leche del Centro de Desarrollo Tecnológico para la Industria Láctea. S.A de C.V. (CDTIL), del estado de Chihuahua, México, a las cuales se les habían realizado las pruebas serológicas de rosa de bengala y rivanol. Para este estudio se seleccionaron 53 muestras positivas al rivanol con títulos de 1:400. Además, se obtuvieron 60 muestras de sangre de ganado productor de leche del estado de Chihuahua, procedentes de hatos y de zonas libres de brucelosis, sin antecedentes de la enfermedad por varios años y con resultados negativos a las pruebas de tarjeta y rivanol.

Extracción de ADN a partir de sangre

Se colectaron 0.5 ml de sangre total de bovino con anticoagulante (EDTA) y se les adicionó 1 ml de solución amortiguadora para lisis de eritrocitos [320 mM sacarosa, 5 mM MgCl₂, 1% tritón X-100, 10 mM tris HCl (pH 7.5)]. La mezcla se centrifugó por 2 min a 22,500 xg y 4 °C (Thermal IEC, Multi RF series centrifuge). El sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó con agua desionizada estéril hasta que desapareció la coloración rojiza. Una vez finalizados los lavados se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 0.4 ml de solución amortiguadora para lisis de leucocitos [60 mM NH₄Cl, 24 mM Na₂-EDTA (pH 8.0)] adicionada con 1 mg/ml de proteinasa K y SDS al 1%. La muestra se digirió por 30 min a 64 °C; posteriormente se dejó enfriar y se le adicionaron 100 µl de acetato de amonio 7.5 M. Se centrifugó por 10 min a 22,500 xg y 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregó un volumen igual de isopropanol. Se agitó suavemente hasta observar las hebras de ADN y se centrifugó durante 1 min a 6,000 xg y 25 °C. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70%. Una vez que se secó la pastilla, se reconstituyó con 100 µl de agua tridestilada estéril⁽⁵⁾.

La concentración aproximada de ADN se calculó mediante la comparación del ADN extraído, con las concentraciones de las bandas del marcador de

Samples

Four hundred and fifty (450) cattle blood samples with or without EDTA anticoagulant were collected at *Centro de Desarrollo Tecnológico para la Industria Láctea. S.A de C.V. (CDTIL, Dairy Technological Development Center)*, State of Chihuahua, Mexico. Samples were subjected to both the rose Bengal and the rivanol serological tests. For this study, 53 rivanol-positive (titer 1:400) were selected. In addition, 60 cattle blood samples were collected from brucellosis-free dairies in the State of Chihuahua with several years of brucellosis-negative history and negative card/rivanol test results.

DNA extraction from blood

Half (0.5) µl total blood samples with EDTA anticoagulant were collected. One ml red-blood-cell-lysis buffer [320 mM saccharose, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 10 mM tris HCl (pH 7.5)] was added. The mix was centrifuged for 2 min using 22,500 xg at 4 °C (Thermal IEC, Multi RF series centrifuge.) Supernatant was discarded and pellet was washed with sterile deionized water until reddish color disappeared. After washing, supernatant was discarded and pellet was re-suspended in 0.4 white-blood-cell-lysis buffer [60 mM NH₄Cl, 24 mM Na₂-EDTA (pH 8.0)] with the addition of 1 mg/ml proteinase K and 1% sodium dodecyl sulfate (SDS). Sample was digested for 30 min at 64 °C then allowed to cool down and 100 µl 7.5 M ammonium acetate were added. The mix was centrifuged for 10 min at 22,500 xg, 4 °C. Supernatant was transferred to a separate tube and an equal amount (v/v) isopropanol was added. The mix was gently stirred until observing DNA strands then centrifuged for 1 min at 6,000 xg, 25 °C. The supernatant was carefully discarded and the pellet was washed with 70% ethanol. Once the pellet was dried, it was rehydrated with 100 µl sterile tridistilled water⁽⁵⁾.

The approximate concentration of DNA was calculated by comparing the extracted DNA with the pBR322/MspI molecular weight marker banding pattern, using 2.5% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (1 mg/µl) and

peso molecular pBR322/MspI, en una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio (1 mg/μl) y visualizado en un sistema documentador de geles con luz ultravioleta (EDAS 290 Kodak).

Extracción de ADN a partir de un cultivo de B. abortus

De un cultivo en caldo brucella, se transfirieron 1.5 ml de la solución bacteriana a un tubo eppendorf y se centrifugaron por 2 min a 15,000 xg, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 567 μl de TE1X (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0.1 mM), se adicionaron 30 μl de SDS al 10% y 30 μl de solución de proteinasa K (20 mg/μl), se incubó por 1 h a 37 °C, se le adicionaron 100 μl de NaCl 5M y 80 μl de CTAB/NaCl y se incubó por 10 min a 65 °C. El ADN se extrajo con una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se precipitó con un volumen equivalente de isopropanol y se lavó con etanol al 70%⁽⁶⁾.

Amplificación de ADN mediante PCR doble

Para la amplificación se utilizaron cuatro iniciadores: JPR (5'-ACCAGCCATTGCGGTTCGGTA-3') y JPF (5'GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA-3'), que amplifican un fragmento de 193 pb⁽⁴⁾ del gen que codifica para la porina Omp-2⁽⁷⁾, y B4(5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3') y B5(5'-CGCGCTTGCCCTTTCAGGTCTG-3'), correspondientes a un fragmento de 233 pb⁽³⁾, del gen que codifica para la proteína antigénica de 31 kDa, BCSP31⁽⁸⁾. El volumen final de la reacción de PCR fue de 25 ml, conteniendo 100 nM de cada iniciador, 0.5 mM de MgCl₂, 2 mM de una mezcla de los cuatro dNTP, 10 mM de Tris HCl, 50 mM de KCl, y 5 U/ml de la enzima ADN Taq polimerasa. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp 2400, con un programa que incluyó: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; seguido por 40 ciclos que incluyen: desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 60 °C por 45 seg y extensión a 72 °C de 1 min; terminando con extensión final a 72 °C de 5 min. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de

visualized using an ultraviolet light gel documentor system (EDAS 290 Kodak).

DNA extraction from B. abortus culture

From a brucella broth culture, 1.5 ml bacterial solution was transferred to an Eppendorf tube then centrifuged for 2 min at 15,000 xg. Supernatant was discarded and pellet was re-suspended in 567 μl TE1X [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA]. Thirty (30) μl 10% SDS and 30 μl proteinase K solution (20 mg/μl) were added. Mix was incubated for 1 h at 37 °C. One hundred (100) μl 5M NaCl and 80 μl CTAB/NaCl were added then incubated for 10 min at 65 °C. The DNA was extracted with a phenol-chloroform-isoamyl alcohol solution (25:24:1), precipitated with an equivalent volume of isopropanol and washed with 70% ethanol⁽⁶⁾.

DNA amplification by duplex PCR

Four primers were used for the amplification, i.e.: JPR (5'-ACCAGCCATTGCGGTTCGGTA-3') and JPF (5'GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA-3') which amplify a 193 bp fragment⁽⁴⁾ of the gene encoding for the Omp-2 porine⁽⁷⁾; and B4(5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3') and B5(5'-CGCGCTTGCCCTTTCAGGTCTG-3'), which correspond to a 233 bp fragment⁽³⁾ of the gene encoding for the 31 kDa antigenic protein BCSP31⁽⁸⁾. The PCR reaction and volume was 25 ml containing 100 nM of each primer, 0.5 mM MgCl₂, 2 mM of the mix containing all four dNTPs, 10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, and 5 U/ml DNA Taq polymerase. All reactions occurred in a Perkin-Elmer GeneAmp 2400 thermocycler, using the following program: one initial denaturation step at 94 °C for 5 min; followed by 40 cycles including: denaturation at 94 °C for 1 min, alignment at 60 °C for 45 sec, and extension at 72 °C for 1 min; then finished with an end extension at 72 °C for 5 min. The amplification products were analyzed by 2.5% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (1 mg/ml) then visualized using an ultraviolet gel documentor.

Duplex PCR validation

The test was validated using five different parameters: Analytical sensitivity/reportable range,

agarosa al 2.5%, teñido con bromuro de etidio (1 mg/ml) y visualizado en un documentador de geles con luz ultravioleta.

Validación de la PCR doble

La validación de la prueba, se realizó utilizando cinco parámetros: sensibilidad analítica y rango reportable, especificidad analítica, precisión, sensibilidad y especificidad diagnóstica^(9,10).

a) Sensibilidad analítica y rango reportable: se realizaron amplificaciones utilizando diluciones del ADN de la cepa vacunal RB51 de *B. abortus*, desde una concentración de 44.57 ng/μl hasta cero.

b) Precisión: se determinó amplificando 52 veces, 1 ng/μl del ADN de la cepa RB51 de *B. abortus*.

c) Especificidad analítica: se evaluó amplificando ADN de las cepas de referencia que podrían encontrarse en el sitio de toma de la muestra (caudal): *Proteus mirabilis* (ATCC12453), *Staphylococcus aureus* (ATCC14028), *Streptococcus pyogenes* (ATCC19615), *Streptococcus faecalis* (ATCC29212), *Salmonella cholerasuis* (ATCC 14028) y *Brucella abortus* (RB51).

d) Sensibilidad diagnóstica: se obtuvo utilizando 55 muestras de sangre de bovino positivas a las pruebas serológicas de rosa de bengala y rivanol.

e) Especificidad diagnóstica: se determinó con 60 muestras de sangre de bovino negativas a las pruebas serológicas.

RESULTADOS

Estandarización de la técnica de PCR doble. Para amplificar los fragmentos de 193 pb y 233 pb, se determinó mediante cinéticas por separado, las concentraciones óptimas de los iniciadores JPR y JPF, B4 y B5 y del MgCl₂.

Se utilizó el ADN obtenido directamente de la vacuna RB51 de *B. abortus* y como control negativo el ADN se sustituyó por agua tridestilada estéril. El mejor resultado de amplificación se obtuvo utilizando concentraciones de 100 nM para los

analytical specificity, precision, sensitivity, and diagnostic specificity^(9,10).

a) Analytical sensitivity/reportable range: Amplifications were performed using dilutions of *B. abortus* RB51 vaccine strain DNA, in concentrations from 44.57 ng/μl down to zero.

b) Precision was determined by amplifying 1 ng/μl *B. abortus* RB51 strain DNA, 52 times.

c) Analytical specificity was evaluated by amplifying DNA from the reference strains that could be found at sampling point (tail): *Proteus mirabilis* (ATCC12453), *Staphylococcus aureus* (ATCC14028), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Streptococcus faecalis* (ATCC29212), *Salmonella cholerasuis* (ATCC14028) and *Brucella abortus* (RB51.)

d) Diagnostic sensitivity was determined using 55 cattle blood samples serologically positive to both the rose Bengal test and the rivanol test.

e) Diagnostic specificity was determined using 60 serologically-negative cattle blood samples.

RESULTS

Duplex PCR technique standardization. In order to amplify the 193 bp and the 233 bp fragments, the optimum JPR and JPF; B4 and B5 primers; and MgCl₂ concentrations were determined.

The DNA obtained directly from the *B. abortus* RB51 vaccine strain was used. As a negative control, DNA was replaced by sterile tridistilled water. The best amplification result was obtained using 100 nM concentrations for the primers, 0.5 mM MgCl₂, 5 U/μl Taq DNA polymerase, 0.2 mM of all four dNTPs mix, 10 mM Tris-HCl and 50 mM KCl (results not shown).

Duplex PCR using *B. abortus* RB51 strain cultures: The amplification of both fragments in the same reaction was performed using optimal reagent concentrations from the reaction mix and the DNA obtained from three different sources, i.e.: directly from the *B. abortus* RB51 vaccine, from the Ruiz-

iniciadores, 0.5 mM de MgCl₂, 5 U/μl de Taq ADN polimerasa, 0.2 mM de una mezcla de los cuatro dNTP, 10 mM de Tris-HCl y 50 mM de KCl (resultados no mostrados).

PCR doble a partir de cultivos de la cepa RB51 de *B. abortus*: La amplificación de ambos fragmentos en una misma reacción, se realizó utilizando las concentraciones óptimas de reactivos de la mezcla de reacción y del ADN obtenido de tres fuentes: directamente de la vacuna RB51 de *B. abortus*, de un cultivo en medio difásico de Ruíz-Castañeda y a partir de las colonias de *B. abortus* crecidas en agar brucela. Los resultados muestran en los tres casos, la amplificación específica de los fragmentos de 193 pb y 233 pb (Figura 1).

PCR doble a partir de muestras de sangre: Para demostrar la utilidad de la PCR doble en la identificación de *B. abortus* directamente en sangre, se obtuvo el ADN de sangre de bovino positivo a la prueba de rivanol con título de 1:400. La presencia de inhibidores de la PCR, se descartó inoculando una muestra negativa a las pruebas serológicas de tarjeta y rivanol, con la cepa RB51

Castañeda's biphasic medium culture, and from the first *B. abortus* colonies grown on brucella agar. In all three cases results showed the specific amplification of the 193 bb and the 233 bp fragments (Figure 1).

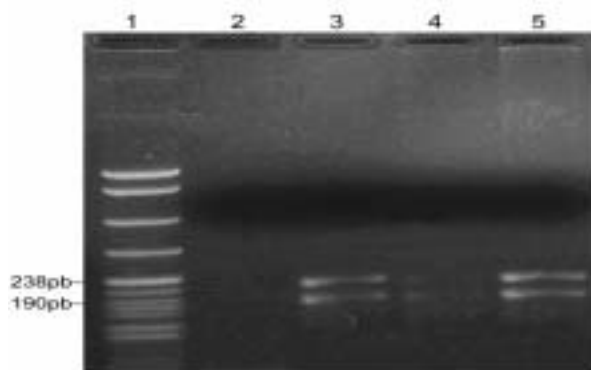
Duplex PCR using blood samples: In order to show the applicability of duplex PCR in the identification of *B. abortus* directly in blood samples, blood DNA from cattle positive to the rivanol test (titer 1:400) was obtained. The presence of PCR inhibitors was discarded by inoculating a card- / rivanol-negative sample with the *B. abortus* RB51 strain. DNA from the same serologically-negative sample not inoculated with the vaccine strain was used as a negative control. Results showed the usefulness of duplex PCR on blood samples (Figure 2).

Duplex PCR test validation

a) Analytical sensitivity and reportable range. The minimum amount of the amplified DNA fragments that can be detected by agarose gel electrophoresis was determined using progressively smaller DNA concentrations (from 44.57 ng/μl down to 0 ng/μl).

Figura 1. PCR doble con los iniciadores JPR/JPF y B4/B5 a partir de cultivos de la cepa RB51 de *Brucella abortus*

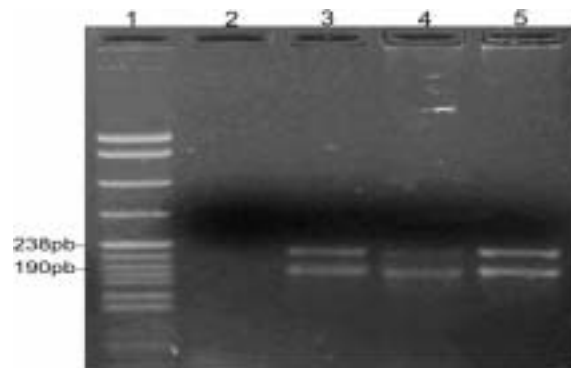
Figure 1. Duplex PCR with the JPR/JPF and B4/B5 primers from *Brucella abortus* RB51 strain cultures



Lanes: 1) molecular weight marker pBR322/Msp I; 2) negative control; 3) DNA from *B. abortus* RB51 strain in brucella agar; 4) DNA from *B. abortus* RB51 strain in RC medium; 5) DNA from the *B. abortus* RB51 vaccine.

Figura 2. PCR doble a partir de muestras de sangre

Figure 2. Duplex PCR from blood samples



Lanes: 1) molecular weight marker pBR322/Msp I; 2) DNA from serologically-negative cow; 3) DNA from *B. abortus* RB51 vaccine; 4) DNA from serologically-positive cow; 5) DNA from serologically-negative cow inoculated with the *B. abortus* RB51 strain.

de *B. abortus*. Como control negativo, se obtuvo ADN de la misma muestra con serología negativa, pero sin inocular con la cepa vacunal. Los resultados que se obtuvieron muestran la utilidad de la PCR doble en muestras de sangre (Figura 2).

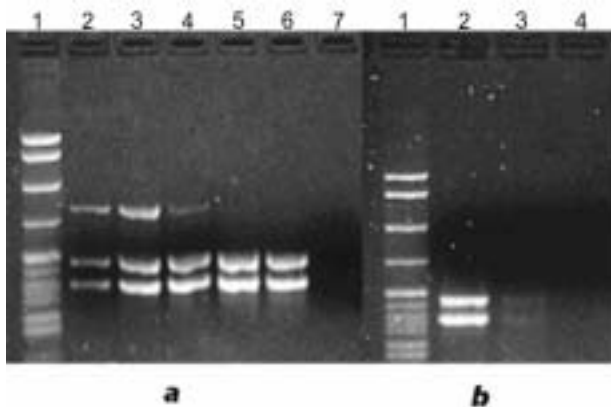
Validación de la PCR doble

a) Sensibilidad analítica y rango reportable. La cantidad mínima de los dos fragmentos de ADN amplificados, que puede detectarse mediante electroforesis en geles de agarosa, se determinó utilizando concentraciones progresivamente menores de ADN. Las concentraciones de ADN analizadas fueron desde 44.57 ng/μl hasta 0 ng/μl. La concentración mínima detectable fue de 100 fg/μl, mientras que la concentración óptima de amplificación fue de 1 ng/μl (Figura 3).

b) Precisión. Para determinar la precisión de la PCR doble, se hicieron 52 repeticiones utilizando

Figura 3. Sensibilidad analítica y rango reportable: PCR doble utilizando concentraciones decrecientes de ADN de la vacuna RB51 de *Brucella abortus*

Figure 3. Analytical sensitivity and reportable range: Duplex PCR with gradually-decreasing concentrations of *Brucella abortus* RB51 vaccine strain DNA



(a) Lanes: 1) molecular weight marker pBR322/Msp I; 2) 5 ng/μl of DNA; lane 3: 4 ng/μl of DNA; lane 4: 3 ng/μl of DNA; lane 5: 2 ng/μl of DNA; lane 6: 1 ng/μl of DNA; lane 7: no DNA.

(b) Lanes: 1) molecular weight marker pBR322/Msp I; 2) 100 pg/μl DNA; 3) 100 fg/μl DNA; 4) reaction with no DNA.

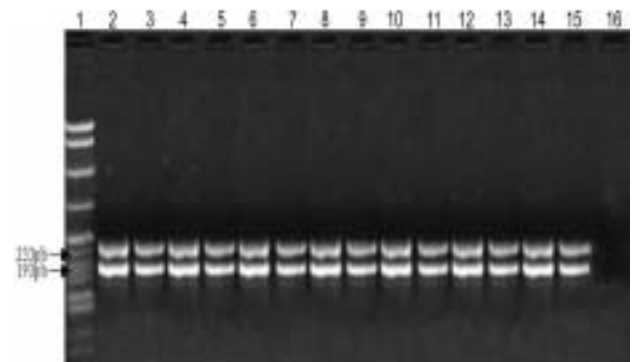
The minimum detectable amount was 100 fg/μl, while the optimum amplification was 1 ng/μl (Figure 3).

b) Precision. In order to determine the precision of the duplex PCR method, 52 repetitions were performed using the optimum DNA concentration obtained (1 ng/ml), of the *B. abortus* RB51 vaccine strain. When the 233 bp band was quantified, reproducible results were obtained with a mean of 86.44 +/-2.48 ng/ml, and a coefficient of variation (CV) of 2.9% (Figure 4). Data performance was visualized using a Levey-Jennings' graph⁽¹¹⁾ (data not shown).

c) Analytical specificity was determined by amplifying the DNA of different bacteria, i.e.: *Proteus mirabilis* (ATCC12453), *Staphylococcus aureus* (ATCC14028), *Streptococcus pyogenes* (ATCC19615), *Streptococcus faecalis* (ATCC29212) and *Salmonella cholerasuis* (ATCC14028), strains isolated from puncture site or those that could cause brucellosis-like symptoms. Figure 5 shows that the test is highly specific since no fragment amplification was observed with any of the strains tested. The presence of a DNA band of a size similar to that of 193 bp fragment and both

Figura 4. Precisión: PCR doble utilizando 1 ng/μl de ADN de la cepa de RB51 de *Brucella abortus*

Figure 4. Precision: Duplex PCR with 1 ng/μl DNA from de *Brucella abortus* RB51 strain



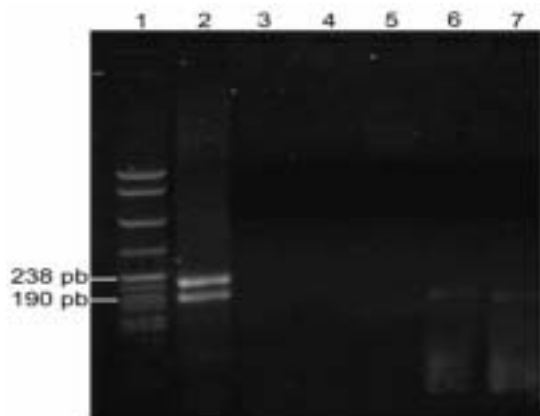
Lane 1: molecular weight marker pBR322/Msp I; lanes 2 to 15 repetitions; lane 16 negative control.

la concentración de ADN óptima obtenida (1 ng/ml), de la cepa vacunal RB51 de *B. abortus*. Al cuantificarse la banda de 233 pb, se obtuvieron resultados reproducibles, con una media de 86.44 +/- 2.48 ng/μl, y un coeficiente de variación del 2.9 % (Figura 4). El comportamiento de los datos fue visualizado en un gráfico de Levey- Jennings⁽¹¹⁾ (dato no mostrado).

c) Especificidad analítica. Se determinó amplificando el ADN de *Proteus mirabilis* (ATCC12453), *Staphylococcus aureus* (ATCC14028), *Streptococcus pyogenes* (ATCC19615), *Streptococcus faecalis* (ATCC29212) y *Salmonella cholerasuis* (ATCC 14028), cepas que podrían aislarse del sitio de la punción, o bien, que podrían causar sintomatología semejante a la de la brucelosis. La Figura 5 muestra que la prueba es altamente específica, pues en ninguna de las cepas probadas se observó la amplificación de los dos fragmentos. La presencia de una banda de ADN de tamaño aproximado al fragmento de 193 pb en las cepas del género *Streptococcus*, sería relevante si se tomara sólo

Figura 5. Especificidad analítica o Exactitud: PCR doble de la cepa vacunal RB51 de *Brucella abortus* RB51 contra el ADN de otras cinco cepas diferentes a *Brucella* spp

Figure 5. Analytical specificity or Accuracy: Duplex PCR of *Brucella abortus* RB51 vaccine strain DNA vs DNA from different bacterial strains



Lanes: 1) molecular weight marker pBR322/Msp I; 2) *B. abortus* RB51; 3) *Salmonella cholerasuis*; 4) *Proteus mirabilis*; 5) *Staphylococcus aureus*; 6) *Streptococcus faecalis*; 7) *Streptococcus pyogenes*.

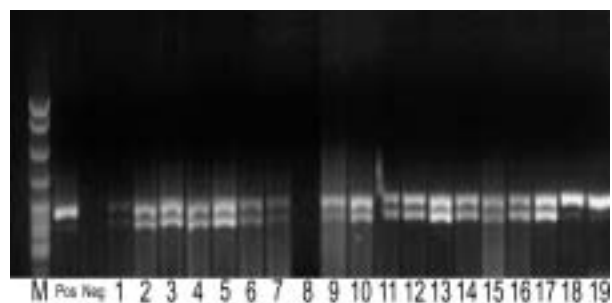
Streptococcus strains could be relevant if only this parameter were considered for the diagnosis. Nevertheless, specificity was 100 % for duplex PCR.

D) Diagnostic sensitivity. In order to evaluate the diagnostic sensitivity of the test, 53 serologically-negative cattle blood samples from herds with 3 or more positive individuals were used. *B. abortus* RB51 strain DNA was used as a positive control for the duplex PCR test, while the reaction mix with no DNA was used as a negative control. Results showed that two serologically-positive samples were negative to the duplex PCR assay, thus yielding 96.3 % test sensitivity (Figure 6).

E) Diagnostic specificity. Sixty (60) serologically-negative cattle blood samples from herds with no positive cases were subjected to the duplex PCR test. Results in Figure 7 show that only the two expected fragments from *B. abortus* RB51 strain DNA were amplified, for 100 % specificity. The presence of a ~193 bp band in lanes 1, 2, 7 and 8 was interpreted as non valid for the duplex PCR test in agreement with results shown in paragraph C above, and also considering the origin of the sample.

Figura 6. Evaluación de la sensibilidad diagnóstica. PCR doble utilizando ADN de muestras de sangre positivas a las pruebas de rosa de bengala y rivanol

Figure 6. Duplex PCR diagnostic sensitivity. Duplex PCR with positive rose bengal and rivanol blood samples



Lane M: molecular weight marker pBR322/Msp I; lane "Pos": *B. abortus* RB51 strain DNA; lane "Neg": negative control; no DNA; lanes 1 - 19: samples from herds with 3 or more serologically-positive samples.

este fragmento como diagnóstico, sin embargo, la especificidad es del 100 % para la PCR doble.

D) Sensibilidad diagnóstica. Para evaluar este parámetro, se utilizaron 53 muestras de sangre de bovino positivas a las pruebas serológicas, provenientes de hatos con tres o más muestras positivas. Como control positivo para la PCR doble, se utilizó el ADN de la cepa RB51 y como control negativo la mezcla de reacción sin ADN. En los resultados se encontró que dos muestras positivas a las pruebas serológicas fueron negativas a la PCR doble, constituyendo, de esta forma, un 96.3 % de sensibilidad de la prueba (Figura 6).

E) Especificidad diagnóstica. Se probaron, por PCR doble, 60 muestras de sangre de bovino negativas a las pruebas serológicas, provenientes de hatos sin casos positivos. En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos, en los cuales se observa que sólo con el ADN de la cepa RB51 de *B. abortus* se lograron amplificar los dos fragmentos esperados, por lo que la especificidad clínica fue considerada del 100 %. La presencia de una banda de aproximadamente 193 pb, en los carriles 1, 2, 7 y 8, se interpretó como no válida para la PCR doble, de acuerdo a lo obtenido en el inciso C y a la procedencia de la muestra.

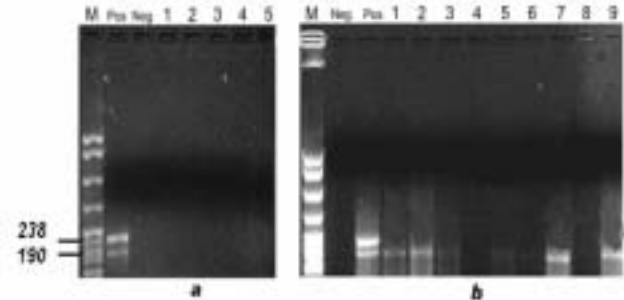
DISCUSIÓN

Actualmente, los métodos moleculares constituyen una buena alternativa para el diagnóstico de la brucelosis bovina, pues ofrecen una mayor sensibilidad y especificidad, comparándolos con los métodos tradicionales, además de ser rápidos y de fácil interpretación. Para la realización de la PCR doble, dentro de la diversidad de muestras las de sangre son las de más fácil obtención, además de que tienen la ventaja de estar disponibles todo el tiempo.

Si bien, la prueba irrefutable de la presencia de un patógeno en una muestra, es su aislamiento en cultivo, en el presente trabajo no fue posible obtener las cepas de *Brucella* spp. a partir de las muestras sanguíneas provenientes de bovinos positivos a la serología, debido a que éstas fueron tomadas de

Figura 7. Evaluación de la especificidad diagnóstica de la PCR doble

Figure 7. Duplex PCR diagnostic specificity



(a) Lane M: molecular weight marker pBR322/Msp I; lane "Pos": *B. abortus* RB51 DNA; Lane "Neg": negative control; lanes 1 - 5: blood samples DNA from serologically-negative cows.

(b) Lane M: molecular weight marker pBR322/Msp I; lane "Neg": negative control; lane "Pos": *B. abortus* RB51 DNA; lanes 1 - 9: blood samples DNA from serologically-negative cows from brucellosis-free herds.

DISCUSSION

Today, molecular methods are a good alternative for the diagnosis of bovine brucellosis, due to their increased sensitivity/specificity as compared to traditional technologies. Molecular methods are also rapid and easy to interpret. For duplex PCR purposes, among the broad diversity of samples, blood samples are particularly convenient to collect and they are readily available at all times.

Even though isolation is the irrefutable proof for the presence of a pathogen in a sample, in this research we were not able to obtain any *Brucella* spp isolates from blood samples of serologically-positive cattle, since samples were collected from the caudal vein, with a heavy fecal contamination load⁽¹²⁾.

The duplex PCR test was standardized and validated in this study. Duplex PCR combines the detection of two molecular DNA fragments for the diagnosis of brucellosis, i.e.: 233 bp⁽³⁾ and 193 pb⁽⁴⁾.

The minimum amount of DNA amplified by duplex PCR was 100 fg/ μ l, similar to those reported by

vena caudal, arrastrando una gran cantidad de contaminación bacteriana fecal⁽¹²⁾.

La prueba de PCR doble, que se estandarizó y validó en este trabajo, combina dos hallazgos moleculares para el diagnóstico de brucelosis: la detección de dos fragmentos de ADN, uno de 233 pb⁽³⁾ y otro de 193 pb⁽⁴⁾.

La cantidad mínima de ADN amplificado por la PCR doble fue de 100 fg/ μ l, comparable con lo reportado por Queipo-Ortuño *et al*, 60 fg/ μ l; Zerva *et al* 150 fg/ μ l y Padilla *et al*, 80 fg/ μ l^(13,14,15).

La especificidad de la prueba, fue considerada del 100 % al observar los dos fragmentos esperados en las muestras positivas a la serología. La presencia de un fragmento similar al de 193 pb en algunas muestras, fue contrastada con los resultados obtenidos en las pruebas de precisión, en las que se observó un fragmento similar con las cepas de referencia del género *Streptococcus*. Debido a que esta bacteria se puede aislar de materia fecal, se recomienda no utilizar muestras tomadas de vena caudal, o en su defecto, realizar una asepsia exhaustiva antes de la toma de la muestra.

Los métodos moleculares permiten realizar indistintamente el diagnóstico de brucelosis tanto en humanos como en animales. Diversos grupos han utilizado variaciones de la PCR para diagnosticar la brucelosis humana, a partir de muestras de sangre. Al-Nakkas *et al*⁽¹⁶⁾ utilizaron una PCR anidada para identificar un fragmento de 52 pb de la secuencia de inserción IS711, específica del género *Brucella*, encontrando una sensibilidad del 96.98 %, comparada con la serología y el cultivo. La combinación de PCR y ELISA, para diagnosticar brucelosis aguda en sangre periférica de 243 pacientes humanos y 50 individuos sanos, mostró una especificidad del 100 %, mientras que la sensibilidad para PCR fue de 81.5, 79 % para ELISA y 99.2 % combinando ambos métodos⁽¹⁷⁾. También existen estudios en humanos, donde los resultados serológicos no siempre coinciden con los de cultivo y PCR, tal es el caso de muestras que aglutinaban en placa y tubo, de las que sólo

Queipo-Ortuño *et al* 60 fg/ μ l, Zerva *et al* 150 fg/ μ l, and Padilla *et al* 80 fg/ μ l^(13,14,15).

One hundred percent (100 %) specificity was found with this test, since both expected fragments were observed in all serologically-positive samples. The presence of a similar 193 bp fragment in some samples was contrasted with the results obtained in the precision tests, where a similar fragment was detected in the *Streptococcus* genus reference strains. Given that these bacteria can be isolated from fecal material, non-caudal vein blood sample collection is recommended, unless exhaustive asepsis is practiced prior to sampling.

Molecular methods can be used for diagnosing brucellosis in both humans and animals. Different research teams have used PCR variations to diagnose human brucellosis using blood samples. Al-Nakkas *et al*⁽¹⁶⁾ used a nested PCR test to identify a 52 bp fragment in the *Brucella* genus-specific IS711 insertion sequence, with a 96.98 % sensitivity as compared to both serology and culture. A PCR/ELISA combination was 100 % specific for the diagnosis of acute brucellosis using peripheral blood samples of 243 sick and 50 healthy humans, while sensitivity values were 81.5 % for PCR alone; 79 % for ELISA alone; 99.2 % for the PCR/ELISA combination⁽¹⁷⁾. Other studies in human patients have shown that serological results not always match those of culture or PCR. As an example, Elfaki *et al* found samples with positive plate/tube agglutination test results, but only 40 and 70 % were positive to culture and PCR, respectively⁽¹⁸⁾.

As far as the use of PCR for bovine brucellosis diagnosis is concerned, up to 100 % sensitivity has been demonstrated in both blood and milk samples⁽¹⁹⁾. Nevertheless, using blood samples for PCR in the diagnosis of *Brucella* spp has not always been considered as adequate. O' Leary *et al* (2006)⁽²⁰⁾, performed assays using both conventional PCR and real time PCR to amplify several different *B. abortus* genome regions, including IS711, 31 kDa PME, and 16S rRNA, but they were not able to detect these fractions in naturally-infected cow blood samples. Nonetheless,

el 40 y el 70 % fueron positivas para el cultivo y la PCR, respectivamente⁽¹⁸⁾.

En relación con la utilización de la PCR para el diagnóstico de la brucelosis bovina, se ha demostrado una sensibilidad de hasta el 100 %, en sangre y leche⁽¹⁹⁾. Sin embargo, el uso de muestras sanguíneas para realizar PCR en la búsqueda de *Brucella* spp no siempre ha sido considerado conveniente. O' Leary *et al* en el 2006⁽²⁰⁾, realizaron ensayos con PCR convencional y PCR en tiempo real, amplificando diversas regiones del genoma de *B. abortus*, como el IS711, la PME de 31 kDa y el rRNA 16S, pero no pudieron observarlas en muestras de sangre de vacas naturalmente infectadas, aunque si lo hicieron con otras muestras, como fueron la leche en un 44 % y el tejido linfático (66 % - retrofaríngeo, 75 % - supramamario)⁽²⁰⁾.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La técnica de PCR doble, es una prueba sensible, específica y reproducible que, aunada a las pruebas serológicas tradicionales, puede ser una herramienta útil para el diagnóstico de la brucelosis bovina en México.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Gustavo Vizcarra y Jorge Portillo por la donación de las cepas utilizadas como referencia y controles. De la misma manera al Dr. Ricardo Gómez por la revisión del presente manuscrito.

LITERATURA CITADA

1. Alton GG, Forsyth JRL. Brucellosis. Medical microbiology. INRA. 2003;28:512-525.
2. Bouza E, Sanchez-Carrillo C, Hernangomez S, Gonzalez MJ. Laboratory-acquired brucellosis: A Spanish national survey. J Hosp Infect 2005;61:80-83.
3. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J Trop Med Hyg 1992;95:271-275.

such fractions were found in other sample types (44 % milk, 66 % retropharyngeal lymph tissue, and 75 % supramammary lymph tissue)⁽²⁰⁾.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Duplex PCR is a sensitive, specific, reproducible test which together with traditional serological techniques can be a useful tool in the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Gustavo Vizcarra and Dr. Jorge Portillo for their donation of the strains used as references and controls. Likewise, we gratitude is expressed to Dr. Ricardo Gómez for reviewing this manuscript.

End of english version

-
-
4. Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. J Clin Microbiol 1995;33:3087-3090.
 5. Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. J Clin Microbiol 1996;34:477-478.
 6. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Gonil. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J Clin Microbiol 1995;33:615-617.
 7. Ficht TA, Hussein HS, Derr J, Bearden SW. Species-specific sequences at the Omp2 locus of *Brucella* type strains. Int J Syst Bacteriol 1996;46:329-331.
 8. Mayfield JE, Bricker BJ, Godfrey H, Crosby RM, Knight DJ, Halling SM, Balinsky D, Tabatabai LB. The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. Gene 1988;63:1-9.
 9. Forbes BA. Introducing a molecular test into the clinical. Microbiology Laboratory: Development, evaluation, and validation. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 2003;127:1106-1111.
 10. Belak S, Thorén P. Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. En: OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [on line]. https://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00014.htm. Accessed July 15, 2007.
 11. Levey S, Jennings ER. The use of control charts in clinical laboratories. Am J Clin Pathol 1950;20:1059-1066.

12. Rich M, Memish ZA. Presumptive diagnosis of brucellosis of contaminated blood cultures in an area of endemicity. *Br J Biomed Sci* 2004;61:93-94.
13. Queipo-Ortuño MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:2927-2930.
14. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:1661-1664.
15. Padilla CR, Montoya YP, Carrillo PC. Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella* spp. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2003;20:102-104.
16. Al-Nakkas A, Mustafa AS, Wright SG. Large-scale evaluation of a single-tube nested PCR for the laboratory diagnosis of human brucellosis in Kuwait. *J Med Microbiol* 2005;54:727-730.
17. Vrioni G, Gartzonika C, Kostoula A, Boboyianni C, Papadopoulou C, Levidiotou S. Application of a polymerase chain reaction enzyme immunoassay in peripheral whole blood and serum specimens for diagnosis of acute human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:194-199.
18. Elfaki MG, Al-Hokail AA, Nakeeb SM, Al-Rabiah FA. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of brucellosis in humans. *Med Sci Monit* 2005;11:MT 69-74.
19. Lavaroni O, Aguirre N, Vanzini V, Lugaresi C, Torioni de Echaide S. Assessment of polymerase chain reaction (PCR) to diagnose brucellosis in a *Brucella* infected herd. *Rev Argent Microbiol* 2004;36:101-106.
20. O' Leary S., Sheahan M. and Sweeney T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res Vet Sci* 2006;81:170-176.