

80



**DESARROLLO DE UN NUEVO METODO
DE DETECCION Y DE DIFERENCIACION DE
LAS ESPECIES DEL GENERO BRUCELLA,
BASADO EN LA REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA.**

TESIS QUE CON OPCION AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

**CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR E
INGENIERIA GENETICA**

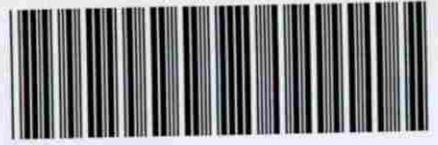
PRESENTA

ANA MARIA SIFUENTES RINCON

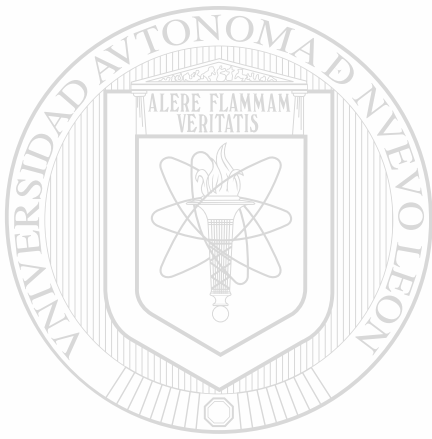
MONTERREY, NUEVO LEON

JULIO DE 1995

1
R 12
. B 7
S 3
C 1



1080073265



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO DE UN NUEVO METODO
DE DETECCION Y DE DIFERENCIACION DE
LAS ESPECIES DEL GENERO BRUCELLA,
BASADO EN LA REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA.**

TESIS QUE CON OPCION AL GRADO DE

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
MAESTRO EN CIENCIAS**

**CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR E
INGENIERIA GENETICA**

PRESENTA

ANA MARIA SIFUENTES RINCON

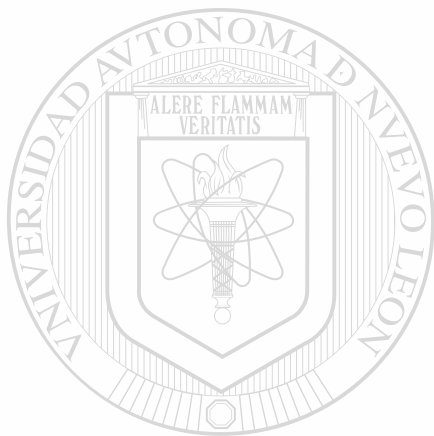
MONTERREY, NUEVO LEON

JULIO DE 1995

TM
RC123
.B7
S5

ANL
FONDO
TESIS
(73265)

BUR
FONDO
TESIS MAESTRIA

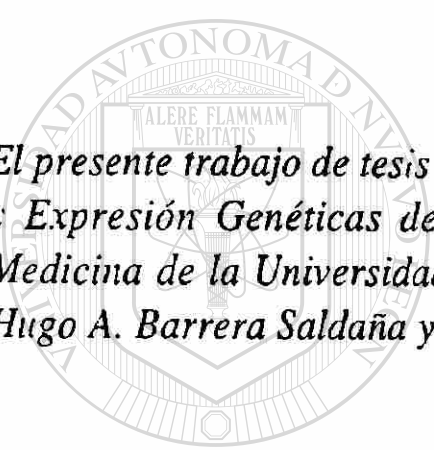


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



El presente trabajo de tesis se realizó en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y la co-asesoría de la Dra. Agnès Revol de Mendoza.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



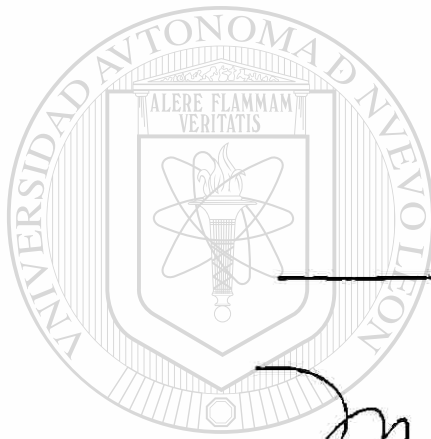
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

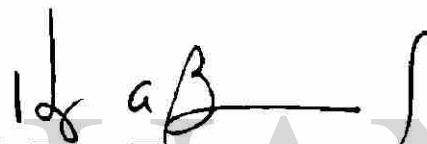
Desarrollo de un nuevo método de detección y diferenciación de las especies del género Brucella, basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Por

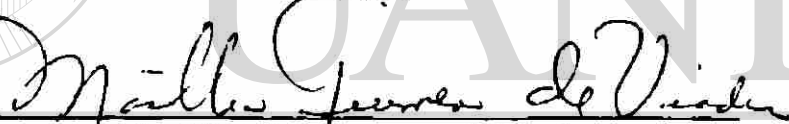
Ana María Sifuentes Rincón

El comité de tesis:





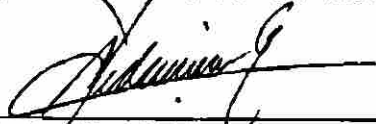
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Asesor



Dra. Martha Guerrero de Viader



Dr. José María Viader Salvadó



Dr. Carlos E. Medina de la Garza

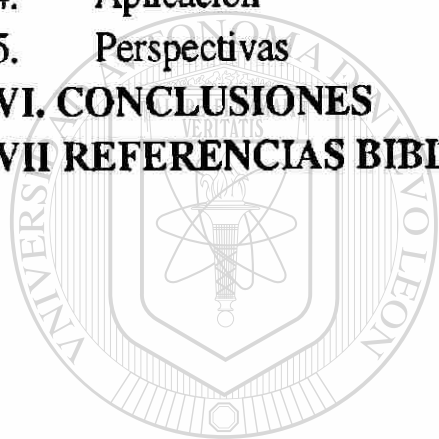


Dr. J. Gerardo Velasco Castañón

INDICE

	pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	ii
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
1. Las bacterias del género <i>Brucella</i>	2
2. Epidemiología	4
3. Diagnóstico	5
4. Contribución de la PCR al diagnóstico de brucelosis	6
5. El locus <i>Omp2</i> en <i>Brucella</i> .	7
III. OBJETIVO	9
IV. MATERIAL Y METODOS	10
1. Material Biológico	10
2. Métodos	10
2.1. Amplificación del ADN por medio de la PCR	11
2.1.1. Preparación del ADN	11
2.1.2. Iniciadores	12
2.1.3. Amplificación	14
2.1.3.1. Amplificación con tres iniciadores	14
2.1.3.2. Optimización de la prueba de PCR	14
2.2. Caracterización de los productos amplificados	15
2.3. Clonación molecular de los productos de PCR	15
2.4. Transformación y selección de las clonas recombinantes	16
2.5. Determinación de la secuencias nucleotídicas	16
2.6. Análisis computacional	18
V. RESULTADOS Y DISCUSION	20
1. Detección de <i>Brucella spp</i> por PCR	20
1.1. Especificidad de los iniciadores	20
1.1.1. Determinación de la secuencia nucleotídica de los iniciadores	20
1.2. Amplificación del ADN de las especies y biovariedades del género	22
1.2.2. Caracterización enzimática de los fragmentos de 900 pb	24

1.2.3. Origen del polimorfismo <i>Kpn I</i> en <i>B. neotomae</i>	26
2. Diferenciación de las especies del género	27
2.1. Contribución del polimorfismo <i>Kpn I</i>	27
2.2. Diferenciación de <i>B. ovis</i> y <i>B. canis</i> : inclusión de un cuarto iniciador en la PCR.	29
2.2.1. Análisis del cuarto iniciador	28
2.2.2. Amplificación de las seis especies de <i>Brucella</i> con cuatro iniciadores	29
3. Evaluación del método	31
3.1. Límite de detección	31
3.2. Especificidad	33
4. Aplicación	34
5. Perspectivas	36
VI. CONCLUSIONES	37
VII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
G	Curie
°C	Grados centígrados
cols	Colaboradores
dNTP's	Trifosfato de desoxinucleótidos
DTT	Ditiotrietol
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
gr	gramos
g	Fuerza centrífuga relativa
h	hora
kDa	Kilodaltones
kb	Kilobases
l	litros
M	Concentración molar
mg	Miligramos
min	minutos
ml	militros
mm	milímetro
mmol	milimoles
mM	Concentración milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Concentración micromolar
ng	Nanogramos
nuc	Nucleótidos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilén glicol
pH	$-\log[H^+]$
pmol	Picomoles
PSA	Persulfato de amonio
s	segundos
SDS	Lauril sulfato de sodio
sevag	Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)
spp	Sin especie
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-endiamino
U	Unidades
v	Voltios
X	Veces la concentración

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	pág.
Tabla 1.	Organismos hospederos de las especies de <i>Brucella</i> . 3
Tabla 2.	Secuencias y sitios de apareamiento de los iniciadores. 13
Tabla 3.	Patrones de amplificación con tres iniciadores. 23
Tabla 4.	Diferenciación de brucelas con el RFLP para <i>Kpn I</i> 28
Figura 1.	Representación esquemática del Locus <i>Omp2</i> en <i>B. abortus</i> 7
Figura 2.	División de las especies y biovariedades de <i>Brucella</i> spp. 8
Figura 3.	Estrategia general 11
Figura 4.	Amplificación teórica del Locus <i>Omp2</i> en <i>B. abortus</i> con los tres iniciadores. 13
Figura 5.	Autorradiografía de un gel de secuenciación. 21
Figura 6.	Mapas de restricción de las cepas de referencia. 22
Figura 7.	Amplificación de las especies y biovariedades del género. 23
Figura 8.	Selección de las endonucleasas de restricción. 24
Figura 9.	Caracterización enzimática de los fragmentos de 900 pb. 25
Figura 10.	Origen del patrón de restricción en <i>B. neotomae</i> . 25
Figura 11.	Caracterización enzimática de las clonas de <i>B. neotomae</i> . 26
Figura 12.	Diferenciación de las cepas de <i>B. melitensis</i> (biovar.1), <i>B. suis</i> y <i>B. neotomae</i> . 27
Figura 13.	Amplificación teórica del Locus <i>Omp2</i> en <i>B. abortus</i> con los cuatro iniciadores. 29
Figura 14.	Inclusión del cuarto iniciador en la reacción de PCR 30
Figura 15.	Optimización de la PCR. 31

Dedicatoria :

A mis **padres**: Agapita Rincón Aviña e Ismael Sifuentes Esparza, **hermanos**: Ismael, Hilda, Claudia, Jesús y nuevos integrantes: Lucy, Fernando y Abril por mantener por sobre todo **firme** el desen de **unión y superación** de nuestra familia.

A mis queridas tías: Guadalupe, Teresa y Antonia, tíos: José y Basilio, y mis primos consentidos: Laura y Hugo, de quienes he recibido siempre apoyo y confianza. **Gracias** por sus desvelos y cariño.

Con todo mi amor para mi abuelita Sotera y mi abuelito Isidro. Y en memoria de mi abuelito Nemesio y mi abuelita Rafaela. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, por enseñarme el significado de la constancia y dedicación y los frutos que de ellas se derivan.

Al Dr. Juan Pablo Martínez Soriano y M.C. Ataúlfo Martínez Torres, quienes fueron muy importantes al inicio de mi preparación en este mundo de la Biología Molecular.

A la Dra. Agnés Revol, quien “vino, vió y venció”. Gracias por sus enseñanzas y amistad.

A mi comisión de tesis y en especial a las Dra Martha Guerrero y Dr. José María Viader por sus críticas y sugerencias al trabajo.

A la Dra. Herminia Martínez por todas las facilidades prestadas para lograr la presentación del trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por haberme otorgado la beca para mis estudios de Maestría.

A Felipa Castro e Irma A. Martínez, por compartir conmigo todas las penas y alegrías de la vida de estudiantes.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A todos mis compañeros de la ULIEG por su paciencia, ayuda y por hacer del laboratorio casi un hogar: Ana Cecilia, Eddy, Jorge A., Hugo, Marío, Javier, Feli, Norma G., Ataúlfo, Martín, Carmen B., Miguel Angel, Ruy, Claudio, Lolita, Marisa, Lisbeth, Gil, Luis Lauro, Ramiro, Carmen V., Jorge A., Celia, Patty, Raquel, Alejandra, Chelita, Alma Rosa, Don Raul, Don Pancho, la maestras Rosy, Blanca, Laura y todos los nuevos.

“Es un lugar casi cerrado, austero sin belleza aparente, como reflejando el alma de los que ahí habitan. Sin embargo, en cada uno de los salones existen ventanales apenas perceptibles pero dispuestos a mostrar a todo aquel que quiera ver, la grandeza de lo que este lugar guarda: la búsqueda del saber “

I. RESUMEN

La brucelosis es una zoonosis ampliamente distribuída en el mundo y es considerada como un problema de salud pública muy importante. Es causada por bacterias del género *Brucella*, para el cual, de acuerdo al tipo de organismo hospedero, se han propuesto seis especies: *Brucella melitensis* (cabras), *Brucella abortus* (vacas), *Brucella suis* (cerdos), *Brucella canis* (perros), *Brucella ovis* (carneros) y *Brucella neotomae* (ratón americano). Adicionalmente, tres de las principales especies pueden separarse en biovariedades: *B. melitensis* (3 biovariedades), *B. abortus* (7 biovariedades) y *B. suis* (4 biovariedades).

El diagnóstico de la brucelosis es primeramente clínico, basándose principalmente en la sintomatología del paciente. Sin embargo este primer paso debe ser confirmado por pruebas serológicas y/o el aislamiento de la bacteria. La serología es la prueba diagnóstica de mayor uso, pero presenta problemas de baja sensibilidad y limitada especificidad. El aislamiento de la bacteria es la prueba confirmatoria de elección, sin embargo su cultivo es muy difícil y toma largos periodos el tener un resultado.

En la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, recientemente se logró implementar una prueba diagnóstica para la detección de *B. abortus* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (27) (PCR por sus siglas en inglés). Esto se consiguió al practicar la PCR al ADN obtenido a partir de muestras de sangre de vacas lecheras sospechosas de infección por dicho agente, empleando un juego de iniciadores que fueron diseñados a partir de la secuencia que codifica para una proteína de membrana (porina) de *B. abortus* (28).

En el presente trabajo se presentan: los problemas encontrados al extender la prueba a otras bacterias del género *Brucella*; la resolución de éstos mediante el perfeccionamiento del método de detección original; la evaluación del límite de detección y especificidad de la nueva prueba, misma que ya permite la diferenciación de las seis especies tipo del género y finalmente la demostración de su utilidad en el área clínica.

II. INTRODUCCION

El diagnóstico actual de muchas enfermedades infecciosas se basa en el aislamiento y tipificación de los agentes patogénicos causales. Esto requiere el empleo no solamente de numerosos medios de cultivo, sino también el complementarlos con pruebas bioquímicas y/o enzimáticas.

El desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de Biología Molecular ha abierto nuevas y amplias perspectivas en el diagnóstico microbiológico. Entre otras técnicas, la hibridación de ácidos nucleicos fue hasta hace algunos años aprovechadas para la detección de patógenos. Sin embargo, este tipo de ensayos resultan en la mayoría de los casos demasiado complejos, tediosos, costosos y relativamente poco sensibles, como para establecerlos como diagnósticos de rutina (1).

Afortunadamente, una de las últimas invenciones metodológicas de la Biología Molecular ha venido a salvar estos obstáculos. Se trata de la PCR, la cual desde su invención en 1984 (2,3) se ha ido perfeccionando y sus aplicaciones se han extendido a muchas áreas de la investigación biomédica, entre las cuales están incluidos el diagnóstico y la diferenciación de agentes infecciosos(1,4,5,6). Aún cuando muchas pruebas para el diagnóstico bacteriológico están tan bien establecidas que no se espera que cambien mucho en un futuro cercano, la PCR puede ayudar a perfeccionar ciertos tipos de pruebas diagnósticas, como es el caso de:

- a) microorganismos cuyo cultivo es difícil y/o costoso (virus, micobacterias, etc.).
- b) bacterias patogénicas que poseen toxinas difíciles de detectar.
- c) microorganismos que no sobreviven al transferirlos a medios de cultivo
- d) diferenciación de especies y serotipos dentro de un género bacteriano.

Precisamente, el diagnóstico de Brucelosis enfrenta algunos de estos problemas, por lo que se ha venido recurriendo al empleo de las nuevas herramientas de la Biología Molecular.

1. Las bacterias del género *Brucella*

Las brucelas, agentes causales de la brucelosis, fiebre de Malta o fiebre ondulante, son cocobacilos Gram negativos, inmóviles, de pequeño tamaño y no formadores de esporas. Estas bacterias son aerobios estrictos, crecen lentamente y requieren medios complejos para el aislamiento primario.

El género *Brucella* contiene seis especies, las cuales en base al tipo de organismo hospedero se han clasificado según se muestra en la tabla 1. Además, en base al metabolismo oxidante de varios aminoácidos y carbohidratos, al crecimiento en presencia de colorantes, a la producción de ácido sulfhídrico y a la susceptibilidad a lisis por bacteriófagos, tres de las principales especies pueden separarse en biovariedades: *B. melitensis* (3 biovariedades), *B. abortus* (7 biovariedades) y *B. suis* (5 biovariedades) (7). La taxonomía del género *Brucella* es todavía controversial, ya que algunos autores proponen en base a estudios a nivel molecular la existencia de una sola especie: *B. melitensis* y consideran la clasificación antes descrita válida sólo para fines prácticos y/o epidemiológicos (8,9). El reporte de cepas atípicas de *Brucella*, apoya el hecho de que no existen aún criterios firmes para la taxonomía de este género (10).

Tabla 1.- Organismos hospederos de las especies de *Brucella*.

ESPECIES	HOSPEDERO
<i>B. melitensis</i>	Cabras, ovejas
<i>B. abortus</i>	Vacas
<i>B. suis</i>	Biovariedad 1, cerdos Biovariedad 2, liebres Biovariedad 3, cerdos Biovariedad 4, venados Biovariedad 5, roedores
<i>B. canis</i>	Perros
<i>B. ovis</i>	Carneros
<i>B. neotomae</i>	Ratón americano

La estrecha homología a nivel de ácidos nucleicos encontrada para las especies del género *Brucella* (8-13), ha hecho difícil encontrar un método de diferenciación basado en el genoma de la bacteria. Sin embargo, existen reportes en los cuales se ha logrado encontrar variaciones genéticas entre las especies (14-16), lo cual no sólo aporta nuevas metodologías de diferenciación para éstas, sino que refuerza también la idea de la especialización de las bacterias al preferir ciertos organismos hospederos.

2. Epidemiología

La brucelosis es fundamentalmente una enfermedad de animales domésticos, siendo los principales animales reservorios las cabras, el ganado vacuno y los cerdos. El hombre puede infectarse de manera secundaria, principalmente por *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*.

La predilección de las brucelas por los órganos reproductivos de los rumiantes está asociada con el aborto, el cual es frecuentemente el único síntoma de enfermedad en el animal. Una gran cantidad de bacterias son liberadas durante el aborto, dando lugar a una contaminación masiva del medio ambiente. Algunas veces las bacterias se establecen en las glándulas mamarias, permanecen allí por largos periodos y pueden dispersarse en cantidades significativas en la leche (17).

Las brucelas también se liberan cuando las hembras preñadas infectadas son ordeñadas, y dado que estos animales son generalmente asintomáticos, estas circunstancias son las que determinan la epidemiología de la brucelosis en humanos.

La infección por brucelas en humanos tiene una distribución prácticamente mundial, sin embargo existen diferencias geográficas importantes según las especies implicadas. *B. melitensis* es la responsable de la mayoría de los casos en España y la especie predominante en los países ribereños del Mediterráneo, África, Centroamérica y Sudamérica. *B. abortus* es el agente principal de la enfermedad en el norte y centro de Europa, y su difusión ha aumentado hacia los Estados Unidos de Norteamérica en los últimos años. *B. suis* es relativamente frecuente en diversos estados de este último país (18).

La infección por *B. canis* ocurre principalmente en personas encargadas del manejo de perros, ya que al parecer es necesario un contacto muy estrecho y frecuente para que se presente la infección (17).

La endemia de brucelosis humana en México varía con el tiempo y la entidad. En general se considera que la brucelosis se encuentra distribuida en todas las entidades federativas con diferentes tasas de morbilidad, en las que por su alta frecuencia ocupan los primeros lugares los estados de Nuevo León, Querétaro, Coahuila, Guanajuato, Zacatecas, Michoacán, San Luis Potosí y Chihuahua (19,20,22).

La determinación de la especie responsable de la enfermedad en el hombre es importante ya que la gravedad de la infección puede depender de ésta. Por ejemplo las infecciones por *Brucella melitensis* y *Brucella suis* (en sus biovariedades 1,3 y 4) suelen ser más graves que las producidas por *B. abortus* (19).

3. Diagnóstico

El diagnóstico de la brucelosis en el humano es primeramente clínico. Este se hace en base al patrón típico de enfermedad febril combinado con la revisión del historial clínico, para buscar una posible exposición. Además, se debe incluir no sólo la ocupación del paciente y el posible consumo de leche, derivados lácteos o productos cárnicos contaminados, sino también el considerar si el paciente vive o no en zonas endémicas (19,20).

La brucelosis puede ser asintomática; las manifestaciones de la brucelosis con síntomas se pueden dividir en brucelosis aguda, formas localizadas y brucelosis crónica. En la brucelosis aguda, muchas veces el comienzo es insidioso, con fiebre ligera y síntomas localizados. Malestar, debilidad, cansancio, cefalea, dolor de espalda, mialgias, sudores y escalofríos son las manifestaciones más destacadas. La mayoría de los enfermos tienen anorexia y pierden peso. Sin embargo, la infección con *B. melitensis* puede ser de comienzo brusco con fiebre alta. Las formas localizadas de brucelosis pueden observarse en casi cualquier región anatómica; las formas más frecuentes de presentación son: osteomielitis, abscesos esplénicos, infecciones del sistema genitourinario, formas pulmonares y endocarditis.

Las manifestaciones de la brucelosis crónica son complejas y abarca a pacientes con recaídas, que tengan o no infecciones localizadas y también a quienes no tengan signo alguno de infección (21).

El cuadro clínico de la brucelosis puede ser confundido con el de otras enfermedades febriles, razón por la cual el diagnóstico clínico se debe confirmar con pruebas serológicas y/o con el aislamiento de la bacteria. La serología es el principal método diagnóstico para la brucelosis en humanos y animales. Las pruebas serológicas recomendadas y ampliamente usadas para este diagnóstico son: prueba de Rosa de Bengala, aglutinación estándar en tubo, aglutinación con β -mercaptoetanol, fijación del complemento y prueba de Coombs. La mayoría de estas pruebas emplean como antígeno a la bacteria. Sin embargo, todas ellas presentan problemas de especificidad y sensibilidad insuficientes (19). Se ha desarrollado una gran variedad de inmunoensayos para el diagnóstico de la brucelosis en humanos, entre los cuales está incluido el ELISA. Aún cuando todos estos métodos parecen muy prometedores en cuanto a especificidad y sensibilidad, se debe tener cuidado en el diagnóstico de brucelosis en áreas endémicas, ya que se pueden obtener falsos positivos que sólo reflejan una enfermedad subclínica pasada (19). En México, aún cuando es bien conocida la baja confiabilidad de los resultados obtenidos por métodos serológicos, se realiza preferencialmente la prueba de aglutinación en placa con rosa de Bengala como prueba de tamizaje y posteriormente la comprobación con las pruebas de aglutinación en tubo y β -mercaptoetanol para identificar un enfermo en etapa aguda, en zonas donde la brucelosis es endémica (22).

El diagnóstico más confiable se basa en el aislamiento del microorganismo. El cultivo de sangre es el método de elección, pero las muestras deben ser obtenidas en la fase temprana de la enfermedad y los cultivos tienen que ser incubados por lo menos tres semanas. Aún bajo estas condiciones, es difícil aislar las bacterias, especialmente en el caso de la infección con *B. abortus*, razón por la cual los porcentajes de aislamiento reportados son del 20 al 50%, aún en los laboratorios con mayor experiencia. El cultivo de muestras de médula ósea ofrece mayor posibilidad de aislar la bacteria en la brucelosis aguda, también es más probable que estos sigan siendo positivos en fases más tardías de la enfermedad y aún después de la administración de antibióticos (21). Sin embargo, es necesario al igual que en los cultivos de sangre, tener en cuenta las condiciones óptimas para lograr el aislamiento (19).

Cabe señalar que en nuestro país la búsqueda cotidiana de *Brucella* mediante su aislamiento a partir de muestras de los pacientes es prácticamente nula, especialmente en las instituciones del sector público, lo cual trae como consecuencia que el porcentaje de diagnósticos erróneos sea muy alto (22).

4. Contribución de la PCR al diagnóstico de Brucelosis

Dadas las ventajas de la especificidad y sensibilidad que ofrece la PCR, muchos grupos de investigación se han avocado a establecer métodos diagnósticos basados en esta nueva tecnología para la detección de *Brucella* (23,24,25). Sin embargo, los resultados han sido parcialmente positivos en cuanto a lograr la diferenciación de las especies del género. La mayoría de estas pruebas son específicas para el género pero no para las especies, o bien se inclinan a lograr la diferenciación de las especies locales de mayor importancia epidemiológica (26).

Estudios realizados en la ULIEG (27) empleando la PCR para detectar secuencias del genoma de *Brucella abortus*, a partir de muestras de sangre de vacas lecheras infectadas con esta bacteria, abrieron una nueva posibilidad para establecer un método diagnóstico basado en esta poderosa técnica. Lo anterior fue logrado al practicar la PCR utilizando un par de iniciadores derivados de la secuencia reportada para el locus *Omp2*, que codifica para una proteína de la membrana externa (porina) de *B. abortus* (28). Experimentos posteriores incluyendo en la PCR un tercer iniciador, permitieron detectar y diferenciar tres especies de *Brucella* (*B. melitensis* Rev-1, *B. suis* 1330 y *B. abortus* S44). Los patrones de amplificación fueron una banda de 200 pb presente en las tres especies probadas y bandas de 720 y 900 pb presentes en *B. abortus* S44 y *B. suis* 1330, respectivamente (datos no publicados).

5. El locus Omp2 en Brucella

Los iniciadores requeridos para esta prueba preeliminar de PCR fueron sintetizados a partir de la secuencia reportada por Fitch y cols. (28) para el locus Omp 2 de *B. abortus*. Este locus está formado por una duplicación génica. Los dos genes denominados Omp2a y Omp2b se encuentran en cadenas opuestas y son separados por una región de 900 pb. Las secuencias de los extremos presentan una alta similitud (100% en el extremo 5' y 90% en el 3'), sin embargo las regiones centrales difieren principalmente por la ausencia de un segmento de 108 pb en la secuencia del gen Omp2a (fig 1). Aunque estos autores reportan la expresión *in vivo* únicamente del gen Omp2b, logran también la expresión del gen Omp2a al introducirlo en *E. coli*. Las proteínas codificadas por los dos genes pertenecen a la familia de las porinas y difieren sólo por su peso molecular (28).

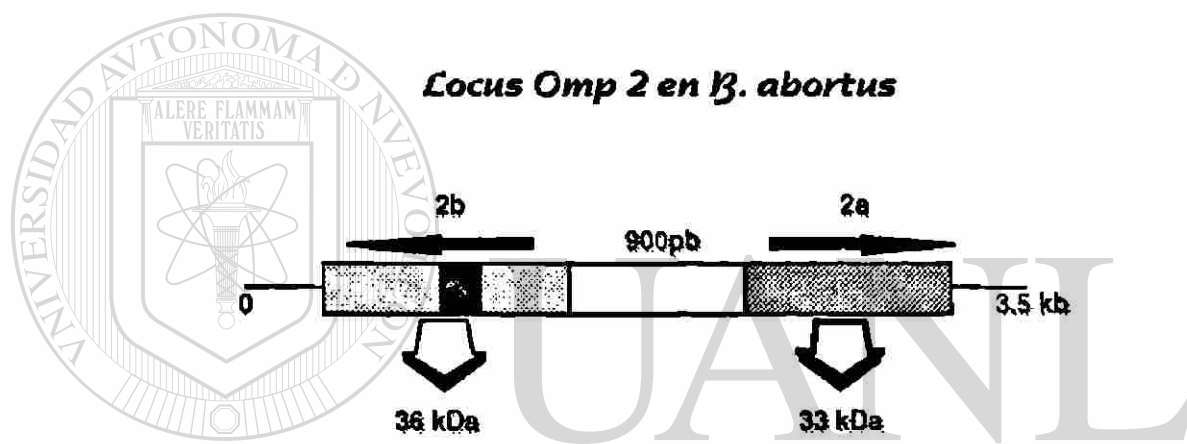


Fig.1.- Representación esquemática del Locus Omp2 en *B. abortus*. El locus tiene una longitud de 3.5 kb, y está formado por dos genes denominados Omp2a y 2b los cuales están orientados del centro del locus hacia afuera. Cada gen codifica para una proteína con características de porina y sólo difieren entre sí por su peso molecular. El cuadro oscuro en Omp2b representa una región de 108 pb ausente en Omp2a.

Se ha reportado la conservación del arreglo del locus Omp2 en todas las especies del género *Brucella* (16). Dada la variación genética encontrada dentro del locus en las diferentes especies, y basándose en los patrones de restricción obtenidos a partir de éstas, se ha propuesto una clasificación de las bacterias en cinco grupos, tal y como se indica en la figura 2; así mismo, no se descarta la posibilidad de utilizar los genes que constituyen el locus como modelo para establecer relaciones evolutivas entre las especies del género. Adicionalmente, este grupo de investigación ha relacionado a las porinas codificadas por los genes del locus con la patogenicidad de las brucelas (29).

Mapas de restricción del Locus Omp2

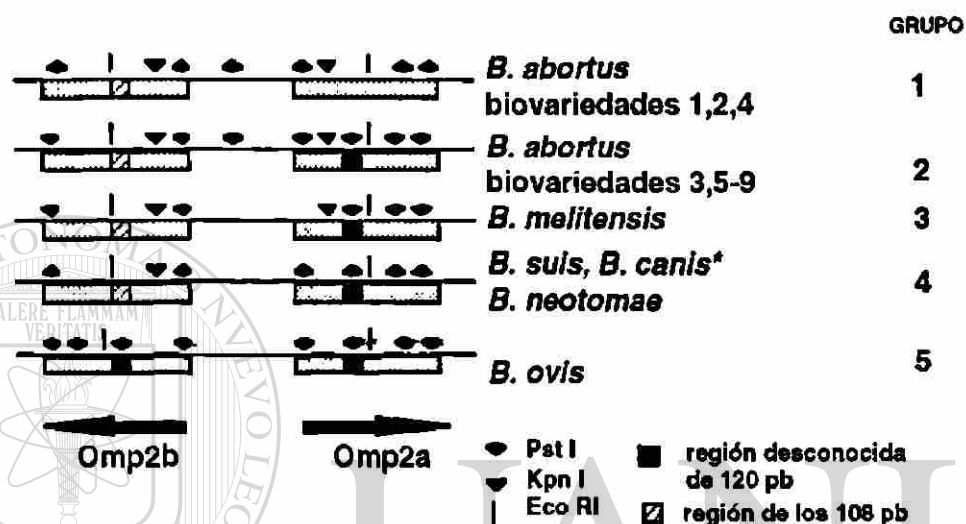


Fig. 2.- División de las especies y biovariedades de *Brucella* spp. Se muestran los mapas de restricción reportados por Fitch y cols. (16); en base a éstos las especies y biovariedades se dividen en cinco grupos. El último grupo sólo incluye a *B. ovis*, la cual al parecer presenta en su arreglo solamente dos genes Omp2a, estando ausente la región de 108 pb característica del gen Omp2b. El asterisco es para indicar que *B. canis* carece de sitio para la enzima *Kpn* I.

III OBJETIVO

En virtud del gran interés para la medicina veterinaria y humana, así como para la industria pecuaria, por contar con un diagnóstico rápido y sencillo que permita detectar y diferenciar a las especies que constituyen el género *Brucella*, en el presente trabajo se planteó el siguiente objetivo:

Desarrollar un método basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar y diferenciar las especies del género Brucella .

Para lograrlo, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar la clonación molecular y caracterización los fragmentos de amplificación de 200 pb, para corroborar la especificidad de los iniciadores hacía la región blanco para la PCR.
2. Mejorar el método de PCR, buscando conferirle la capacidad de diferenciar las seis especies del género.
3. Evaluar el límite de detección y la especificidad del método de detección y diferenciación.
4. Demostrar la utilidad del mismo, aplicándolo tanto al diagnóstico de pacientes como a la identificación de cepas aisladas.

IV. MATERIAL Y METODOS

1. Material Biológico

Los experimentos para verificar la especificidad de los iniciadores hacia la región blanco para la PCR se realizaron con cultivos bacterianos de las cepas de referencia (*B. melitensis* Rev-1, *B. suis* 1330 y *B. abortus* S44) los cuales fueron proporcionadas a la ULIEG por la Dra. Aidé López Merino del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud en la ciudad de México, así como también por la Q.B.P. y M.C. Martha Rodríguez, del Laboratorio de Referencia Estatal de Nuevo León del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Las cepas de los microorganismos probados para especificidad fueron proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. El ADN de la cepa Rev-1 se aisló apartir de bacterias provenientes de vacunas que se encuentran en el mercado. La cepa aislada de Brucella se obtuvo del Laboratorio de Infectología del “Hospital José Eleuterio González” Finalmente, la mayoría de los estudios aquí descritos se realizaron con los ADN's de las seis cepas tipo (*B. melitensis* biovar 1, *B. suis* biovar. 1, *B. abortus* biovar 1, *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae*) que fueron amablemente proporcionados por el Dr. Thomas Ficht de la Universidad de Texas A&M en College Station Texas, E.U.A.

Para la clonación de cada uno de los fragmentos amplificados se utilizaron el plásmido pBS KS y el bacteriófago M13 (series mp 18 y 19), los cuales fueron propagados en las cepas de *Escherichia coli* DH5 α y DH5 α F', respectivamente. Los vectores de clonación, las cepas bacterianas y los marcadores de peso molecular empleados, provienen de la colección de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2. Métodos

La estrategia general que se estableció para la implementación del diagnóstico diferencial de brucelosis se esquematiza en la fig. 3 y se detalla en los siguientes apartados:

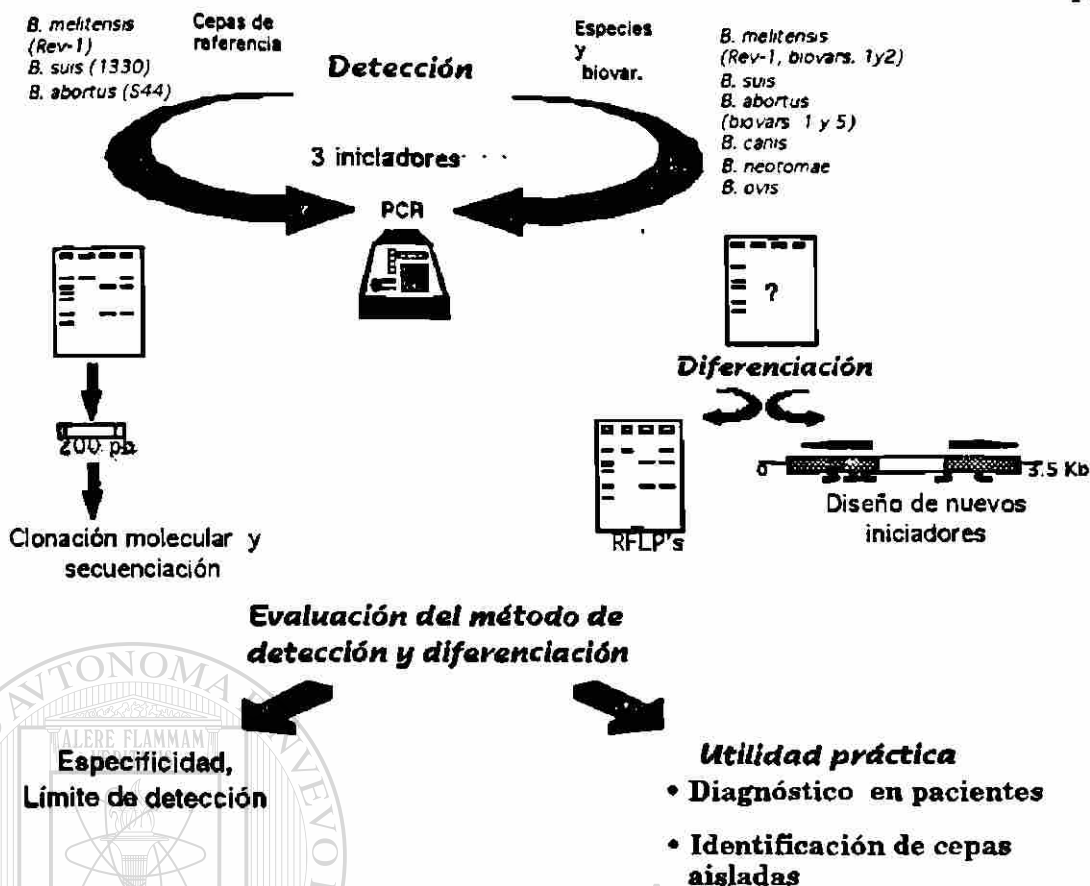


Fig. 3.- Estrategia general. Se representan esquemáticamente los pasos más importantes del presente trabajo. Se probó la especificidad de los iniciadores con la clonación molecular y determinación de la secuencia nucleotídica de los fragmentos de 200 pb de las cepas de referencia, posteriormente se realizó la detección y diferenciación de las seis especies tipo del género *Brucella* utilizando RFLP's y un nuevo iniciador. Finalmente el método fue evaluado y aplicado a casos particulares de tipificación y diagnóstico en pacientes.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

2.1. Amplificación del ADN por medio de la PCR

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La realización de la PCR implica una serie de pasos, desde la preparación de reactivos hasta la caracterización de los productos amplificados, pasando por la determinación de las condiciones ideales para la obtención del producto de amplificación deseado.

2.1.1. Preparación del ADN

El ADN de las cepas de *B. abortus* (S44), *B. suis* (1330) *B. melitensis* (cepas Rev-1 y biovariedades 1 y 2) fue preparado utilizando el método de lisis bacteriana con tritón X-100/SDS y extracción de los ácidos nucleicos con fenol-sevag, descrito por Martínez-Soriano y cols. (27) y consta de los siguientes pasos:

1. Se crecieron 10 ml de cultivo de las bacterias, las cuales se centrifugaron 10 min. a 16,000 g.

2. La pastilla de células se resuspendió en 0.5 ml de agua destilada, agitando suavemente. Posteriormente se transfirieron a un tubo de 1.5 ml y se colectaron por centrifugación a 16,000 g por 5 segundos.

3. A la pastilla de células se agregaron 0.2 ml de solución de lisis (10mM Tris-HCl pH 8, 2% triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA), 0.5 ml de fenol y 0.1 ml de sevag.

4. Se mezcló y después se centrifugó durante 10 min a 16,000 g. La fase acuosa se transfirió a un tubo y se agregó 1 ml de etanol al 100%. Se mezcló por inversión.

5. El ADN se recuperó centrifugando por 2 min a 16,000 g y posteriormente se resuspendió en 0.4 ml de TE (EDTA 100mM y Tris HCl 1M pH 8) + 3 ml de una solución de RNAsa (10 mg/ml). Se incubó por 5 min. a 37°C y después se agregaron 10 ml de acetato de amonio 4M más 1 ml de etanol 100%. Se mezcló por inversión.

6. Se centrifugó por 10 min. a 16,000 g, la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70%. y se secó en el savant. Finalmente el ADN se resuspendió en 50 μ l de TE.

El ADN bacteriano de la cepa aislada en el Hospital Universitario "José Eleuterio González", fue aislado utilizando la técnica antes descrita partiendo de masa bacteriana obtenida directamente de la placa de aislamiento.

— En el caso de la extracción de ADN de muestras de sangre de pacientes se aisló el ADN a partir de 1 ml de sangre periférica con EDTA como anticoagulante, y se siguió el procedimiento antes descrito (27), pero iniciando en el paso 5.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.1.2. Iniciadores

El éxito de la PCR depende en gran parte del diseño de los iniciadores, ya que estos dictan la especificidad de la región amplificada en el ADN molde. Los iniciadores usados fueron diseñados a partir de la secuencia reportada para el locus *Omp2* de *B. abortus* (II 5).

Los iniciadores denominados 2ab200, 2a900 y 2ab5' se diseñaron de tal manera que se aparean a las mismas secuencias del locus que los usados por Martínez-Soriano y cols. (27), pero en las secuencias se incluyeron sitios de restricción con el objeto de facilitar los experimentos de clonación.

Haciendo uso del programa Amplify (33) se verificó el apareamiento teórico de los tres iniciadores utilizando como blanco a la secuencia del locus *Omp2* de *B. abortus* mismo que se muestra en la figura 4, este mismo programa permitió

además el análisis de la capacidad iniciadora y estabilidad de cada uno de los iniciadores.

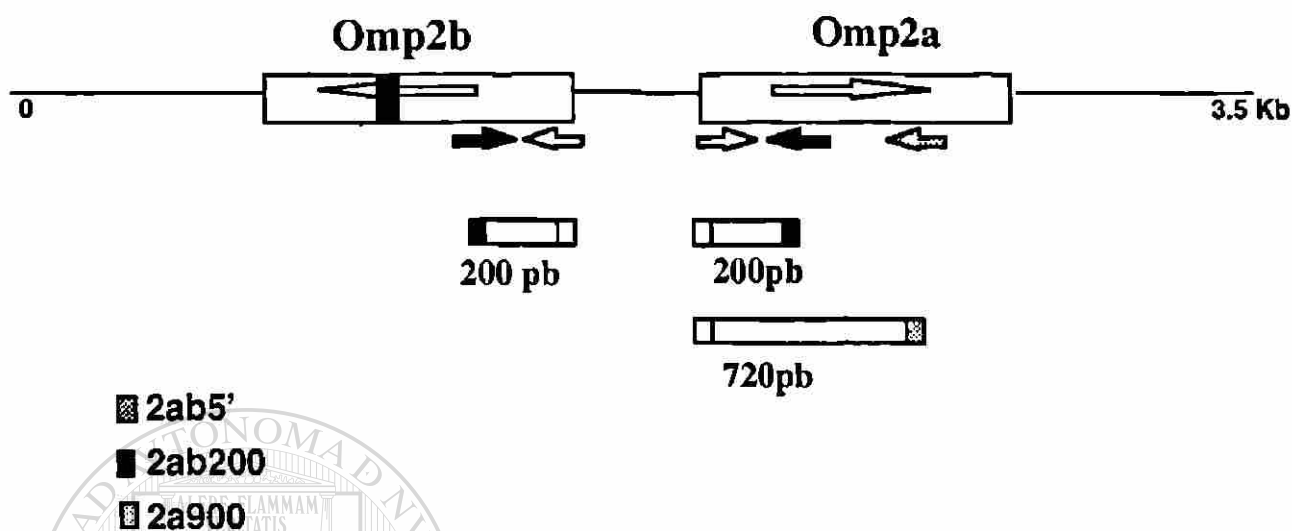


Fig. 4.- Amplificación teórica del locus Omp2 en *B. abortus* con los tres iniciadores. Las flechas indican los sitios de apareamiento de los iniciadores y las barras los tamaños de los principales productos obtenidos después de practicar la PCR. El cuadro obscuro dentro del gen Omp2b corresponde a un segmento de 108 pb ausente en el gen Omp2a.

El cuarto iniciador denominado 2b600 se diseñó durante la ejecución del presente trabajo, a partir de la misma secuencia que los anteriores y tiene la particularidad de aparearse en una región presente únicamente en el gen Omp2b. Las secuencias de los iniciadores se muestran en la tabla 2.

Tabla 2.- Secuencias y sitios de apareamiento de los iniciadores

Iniciador	Secuencia*	Apareamiento	Sitio de restricción
2ab5'	5'- <i>actgacggatccgcgctcaggcggccgacgcaa</i> -3'	Omp 2a y 2b	<i>Bam</i> HI
2a900	5- <i>actgac ttcgaattgcc ttttcgggggcaatga</i> -3'	Omp2a	<i>Hind</i> III
2ab200	5- <i>actgac ttcgaaaccagccattgcggtcggtac</i> -3'	Omp2a y 2b	<i>Hind</i> III
2b600	5- <i>actg aagctfagccgctgatgtgtagt</i> -3'	Omp2b	<i>Hind</i> III

*La secuencia en *itálicas* corresponde al sitio de restricción.

Para el diseño del iniciador 2b600 primeramente se recurrió a la ayuda del programa Oligo, el cual permitió elegir de entre una serie de posibles secuencias de iniciadores, una que reunía teóricamente las condiciones óptimas es decir, no formaba estructuras secundarias, presentaba temperatura de apareamiento que se ajustaba a la de los otros iniciadores, y no formaba dímeros de iniciadores.

Tres de los iniciadores (2ab200, 2a900 y 2ab5') se sintetizaron en BioSyntesis, Inc. (Lewisville, Texas, E.U.A.) y el cuarto iniciador, 2b600, se sintetizó en el Laboratorio de Química Biomolecular en el Departamento de Bioquímica de la Fac. de Medicina (UANL), empleando una estrategia de síntesis en fase sólida y la química de las fosforamiditas.

2.1.3. Amplificación

La PCR es un proceso cíclico, durante el cual se duplica el número de moléculas de ADN molde, al ejecutar los tres pasos que constituyen un ciclo: 1) desnaturalización de las cadenas originales de ADN; 2) apareamiento de los iniciadores, y por último, 3) polimerización a partir de éstos copiando las cadenas originales con ayuda de la polimerasa.

2.1.3.1. Amplificación con 3 iniciadores

Tanto las cepas de referencia como las seis cepas tipo del género y algunas biovariedades, se amplificaron siguiendo el protocolo de amplificación reportado por Martínez-Soriano y cols (27), por lo que 500 ng de cada ADN de las bacterias se amplificaron en un volumen total de 50 μ l, usando 2.5 U de ADN polimerasa *Taq* (Promega Inc., Madison Wisconsin, E.U.A.), 0.1 μ M de cada iniciador, 200 mM de dNTP's y 3 mM de cloruro de magnesio. La PCR se realizó en un termociclador programable (MJ Research, Inc. Watertown, Massachusetts, E.U.A.), bajo un programa que incluye los siguientes pasos:

- | | | |
|---|--|----------------------------------|
| 1 | 94°C, 4 min. | Desnaturalización inicial |
| 2 | 94°C, 1 min. | Desnaturalización |
| 3 | 63°C, 1 min. | Apareamiento |
| 4 | 72°C, 1 min. | Extensión |
| 5 | Repetir durante 30 ciclos los pasos del 2 a 4. | |

Cuando fue necesario, se utilizaron sólo los juegos de iniciadores que producían el fragmento de interés (por ejemplo: los iniciadores 2ab5' y 2ab200 para la obtención de únicamente el fragmento de 200 pb).

2.1.3.2. Optimización de la prueba de PCR

La inclusión de un cuarto iniciador en la PCR hizo necesaria la optimización de las condiciones de amplificación, para lo cual se variaron diferentes parámetros como concentración de ADN, temperatura de apareamiento, tiempo de extensión y número de ciclos; finalmente, éstas quedaron establecidas de la siguiente manera: 50 ng de cada ADN de las bacterias fueron sometidos a PCR en un volumen total de 50 μ l, usando 2.5U de ADN polimerasa *Taq* (Promega Inc., Madison Wisconsin,

E.U.A.), 0.1 μ M de cada iniciador, 200 mM de dNTP's y 3 mM de cloruro de magnesio . El nuevo programa consta de los siguientes pasos:

- | | | |
|---|--|--------------------------|
| 1 | 94°C, 4 min. | |
| 2 | 94°C, 1 min. | Desnaturalización |
| 3 | 66°C, 1 min. | Apareamiento |
| 4 | 72°C, 1 min,30 seg. | Extensión |
| 5 | Repetir durante 35 ciclos los pasos del 2 a 4. | |

En las bacterias diferentes a *Brucella* (*Escherichia coli*, *Hemophilus influenzae*, *Pseudomonas spp*, *M. tuberculosis* y *Salmonella spp*) utilizadas para la evaluación de la especificidad de la prueba, la amplificación se realizó a las condiciones establecidas pero utilizando de 1 a 0.5 ng de ADN bacteriano. De igual forma, en el caso de la evaluación del límite de detección de la prueba se aplicaron las mismas condiciones de amplificación pero utilizando diluciones de ADN como templado.

2.2. Caracterización de los productos amplificados

La elección de las enzimas para la caracterización de los productos de amplificación de 900 pb y las clonas correspondientes a *B. neotomae* se basó en el mapa de restricción correspondiente al fragmento de aproximadamente 720 pb, obtenido a partir de la secuencia reportada para *B. abortus* , con ayuda de los programas Amplify (33) y ADN Strider Versión 1.1 (32).

Las caracterizaciones con endonucleasas de restricción de los fragmentos amplificados se llevaron a cabo en un volumen total de 10 μ l, siguiendo las instrucciones del proveedor [New England Biolabs (NEB), Inc. Beverly, Massachusetts, EUA, para las enzimas *Kpn I*, *Nco I*, *Nci I* , y GIBCO-Bethesda Research Laboratories (BRL), Inc., Gaithersburg, Maryland, EUA, para las enzimas *Eco RI*, *Pst I*, *Pvu II* *Hind III* y *Bam HI*].

2.3 Clonación molecular de los productos de PCR

Con el objeto de establecer la identidad de los fragmentos de amplificación, se procedió a su clonación para determinar en un segundo paso sus secuencias nucleotídicas (este ultimo paso sólo se realizó en los fragmentos de 200 pb correspondientes a las cepas de referencia).

Para ello, los fragmentos de 200 pb de las cepas de referencia obtenidos al amplificar sólo con los iniciadores 2ab5' y 2ab200, se trataron con enzimas de restricción y fueron clonados en el par de vectores M13 mp18 y mp19.

Después de digerir con las enzimas *Bam HI* y *Hin d III*, tanto el vector como el producto de amplificación se purificaron y la reacción de ligación se llevó acabo a 16°C durante toda la noche en un volumen total de 20 μ l, utilizando 2 U de T4

ADN ligasa y 50 ng de vector [New England Biolabs (NEB), Inc. Beverly, Massachusetts, EUA]. La relación inserto-vector utilizada fue de 5:1

Por otro lado, en el caso de los fragmentos de 900 pb correspondientes a la cepa de *B. neotomae*, el vector de clonación utilizado fue el plásmido pBS SK, usando el sitio de restricción *Sma* I, el cual genera extremos romos. Con el fin de asegurar que en efecto los extremos estuviesen totalmente romos, los productos de amplificación fueron tratados de la siguiente manera :

1.- A 25 μ l del volumen total de la reacción de PCR se le agregaron 3 U de T4 ADN polimerasa (Boehringer Mannheim, Indianapolis, EUA) y se incubó a 37°C durante 30 min..

2.-La reacción se precipitó utilizando 2.5 μ l de acetato de sodio 3 M y 62 μ l de etanol absoluto.

3.- Posteriormente, la pastilla se lavó con etanol al 70% y se secó en el Savant por 5 min., finalmente se resuspendió en 20 μ l de agua Milli-Q.

Después de este tratamiento el producto de amplificación y el plásmido (linearizado con la enzima *Sma* I) se ligaron utilizando una relación inserto-vector de 3:1. La reacción de ligación se llevó a cabo a 16°C durante toda la noche en un volumen total de 20 μ l y empleando 100 U de T4 ADN ligasa y 50 ng de vector [New England Biolabs (NEB), Inc. Beverly, MA, EUA].

2.4. Transformación y selección de las clonas recombinantes

Cien ng de los productos ligados fueron utilizados para transformar las células de *Escherichia coli* (cepas DH5 α y DH5 α F'). Posteriormente se hizo una selección entre las colonias obtenidas de cada transformación utilizando la α -complementación como prueba de identificación de las posibles colonias recombinantes (31a). De las colonias seleccionadas se realizaron minipreparaciones de ADN por la técnica de lisis alcalina (31b). El ADN de cada una de las colonias se analizó con las enzimas *Bam* HI y *Hind* III, para observar la liberación del inserto.

2.5. Determinación de las secuencias nucleotídicas

Las clonas obtenidas para cada fragmento de 200 pb de las cepas de referencia, fueron posteriormente utilizadas para la determinación de la secuencia nucleotídica de cada uno de los fragmentos. Para lograrlo se utilizó el método enzimático de Sanger (30), el cual involucra la síntesis *in vitro* de una cadena de ADN por la ADN polimerasa, utilizando como molde un ADN de cadena sencilla y en presencia de un nucleótido radioactivo. La síntesis se inicia con la ayuda de un iniciador que se aparea con el ADN molde y termina con la incorporación de un análogo de nucleótido que inhibe la elongación del ADN. Posteriormente los fragmentos son separados en un gel de poliacrilamida (5%)-urea (8M) y visualizados después de ser expuestos a una película de rayos X.

Tratándose del bacteriofago de la serie M13 grandes cantidades de moléculas de ADN que llevan sólo una de las cadenas del genoma recombinante del virus, se secretan como partículas virales al medio de cultivo. Por ello, el templado de cadena sencilla se preparó siguiendo los pasos que se describen a continuación:

- Se infectaron y crecieron células DH5 α F' en 2 ml de LB (Luria-Bertani), durante 8 horas. De éstas se tomaron 1.5 ml y se centrifugaron a 16,000 g durante 10 min.
- El sobrenadante se repartió cuidadosamente en dos tubos eppendorf de 1.5 ml. Agregando a cada uno de ellos 230 μ l de la solución de precipitación (polietilenglicol al 30%, cloruro de sodio 1.8 M).
- Se incubó a 4°C por 20 min. y posteriormente se centrifugó a 16,000 g durante 8 min.
- La pastilla obtenida se resuspendió en 120 μ l de agua Milli-Q estéril y se agregó 120 μ l de fenol saturado (0.1% de 8-hidroxiquinoleína + TE pH 8). La mezcla se agitó 2 min. en vortex.
- Se centrifugó durante 5 min. a 16,000 g y a la fase acuosa se agregó 1 ml de éter etílico se agitó vigorosamente y después se centrifugó a 16,000 g por 8 min.
- La fase superior se eliminó cuidadosamente y los dos pasos anteriores se repitieron dos veces más.
- Los tubos se dejaron abiertos 10 min. a temperatura ambiente para eliminar el éter remanente y el ADN se precipitó agregando 25 μ l de acetato de sodio 3M y 625 μ l de etanol 100%.
- La muestra se incubó 1h a -20°C. Se centrifugó para obtener la pastilla, la cual se lavó con etanol al 70%. Finalmente el ADN se resuspendió en 20 μ l de agua Milli-Q estéril.
- Una vez preparado el ADN de cadena sencilla se midió su concentración espectrofotométricamente y se ajustó a 150 ng/ μ l.

Las condiciones utilizadas para hacer la determinación de la secuencia nucleotídica fueron las descritas en el manual "The M13 cloning and sequencing laboratory manual" de la compañía USB.(United States Biochemical, P.O. Box 22400; Cleveland, Ohio 44122), de la cual se adquirió el estuche para la reacción de secuenciación. Esta reacción se practicó como sigue:

Apareamiento:

- Se mezclaron:

7 μ l del ADN de cadena sencilla (1 μ g)
 1 μ l del iniciador universal (0.5 pmol/ μ l)
 2 μ l del amortiguador de reacción 5X

- La mezcla se incubó en un vaso de precipitado instalado dentro de un baño a 65°C durante 2 min , después se dejó enfriar hasta 35°C.

Extensión:**- Se mezclaron:**

10 μ l de la mezcla de apareamiento

1 μ l de DTT 0.1M

2 μ l de la mezcla de desoxinucleótidos (diluída 1:5)

0.5 μ l de 32 SdATP (generalmente con una actividad específica de 1000 Ci/mmol)

2 μ l de secuencia (diluída en fresco 1:8 con el buffer de dilución)

- Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.

Terminación:

- Se prepararon 4 tubos con 2.5 μ l de cada uno de los didesoxinucleosidos trifosfatados a cada uno de los cuales se agregaron 3.5 μ l de la mezcla de extensión.

- Se incubó 5 min a 37°C.

- Finalmente, se agregaron 4 μ l de solución "stop" (95% formamida/20 mM EDTA/0.05% azul de bromofenol/0.05% xilencianol)

Todos los reactivos utilizados forman parte del estuche para secuenciación.

Electroforesis:

Una vez concluida la reacción, los fragmentos de ADN se separaron en un gel de poliacrilamida-urea al 8%, precorrido durante 1 h.

Las muestras de reacción se incubaron a 80°C por 5 min., antes de ser depositadas al gel.

Preparación del gel de poliacrilamida:

- 48 ml de acrilamida-bisacrilamida 20%

- 70 ml de urea 7.7 M (grado de secuenciación y disuelta en TBE 1X)[®]

- 680 μ l de PSA 10%

- 80 μ l de TEMED

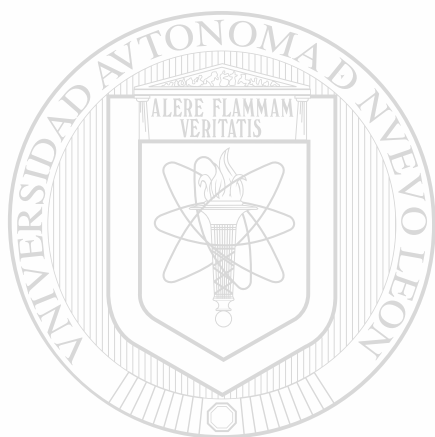
Todos los reactivos se mezclan perfectamente y se vacían en el molde formado por 2 placas de vidrio previamente lavadas y desengrasadas.

La migración se realizó a 1000v. Al final del corrimiento, el exceso de urea se eliminó lavando el gel durante 30 min. en una solución al 15% de metanol y 5% de ácido acético. El gel se transfirió a una hoja de papel Watmman 3 MM y se secó aplicando vacío y calor. Finalmente el gel seco se expuso a una película de rayos X (KODAK Autoradiography Films, Amersham International, Buckingham England).

2.6. Análisis computacional

Las secuencias nucleotídicas leídas a partir de las autorradiografías, se analizaron mediante el programa ADN Strider 1.1 (32) con el cual se construyeron mapas de restricción.

Mediante el empleo del programa Clustal (35) (vía internet) , se obtuvieron los porcentajes de similitud existentes entre los diferentes fragmentos y la secuencia reportada para *B. abortus* (28).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

V RESULTADOS Y DISCUSION

1.- DETECCION DE *Brucella* spp POR PCR

1.1. Especificidad de los iniciadores

1.1.1. Determinación de la secuencia nucleotídica de los fragmentos de 200 pb

Con el fin de comprobar la especificidad de los 3 iniciadores (2ab5', 2ab200 y 2a900) hacia la región blanco para la PCR, los fragmentos de amplificación de 200 pb provenientes de las cepas de referencia *B. melitensis* (Rev-1), *B. suis* (cepa 1330) y *B. abortus* (cepa S44) fueron clonados en los vectores M13 mp18 y 19. Se seleccionó una clona de ambos tipos de vectores para cada tipo de cepa y el ADN de cadena sencilla de cada una de éstas sirvió como plantilla para la determinación de las secuencias nucleotídicas; la autoradiografía de una de ellas se muestra en la fig. 5.

— Cabe señalar aquí que la introducción de los sitios de restricción así como los nucleótidos adicionales a los tres iniciadores originales no afectó los resultados de amplificación.

La comparación de las secuencias obtenidas con la previamente establecida para *B. abortus* (28) empleando el programa Clustal (35), permitió establecer que las regiones amplificadas corresponden efectivamente a la secuencia del gen que codifica para la porina.

La secuencia nucleotídica de cada uno de los fragmentos se analizó utilizando el programa ADN Strider 1.1 (33) y los mapas de restricción completos obtenidos permiten observar más claramente, que aún cuando éstas no son idénticas, existen sitios de restricción conservados en las tres cepas (fig. 6).

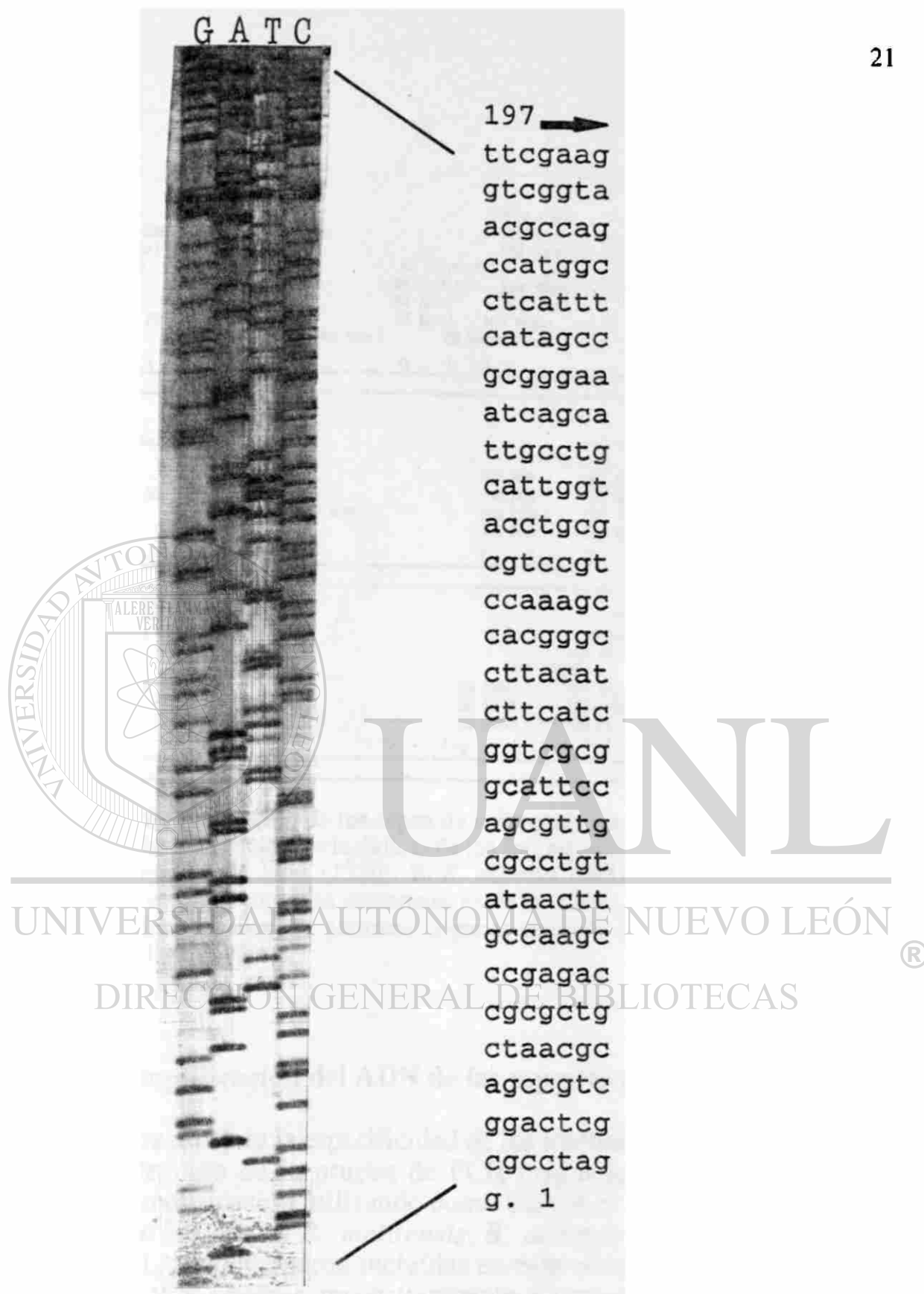


Fig. 5.- Autorradiografía de un gel de secuenciación. Se muestra la secuencia obtenida para la clona correspondiente al fragmento de 200 pb de *B. melitensis* (Rev-1) iniciando y terminando con los sitios de restricción introducidos por los iniciadores. Resultados similares fueron obtenidos para las cepas de referencia estudiadas.

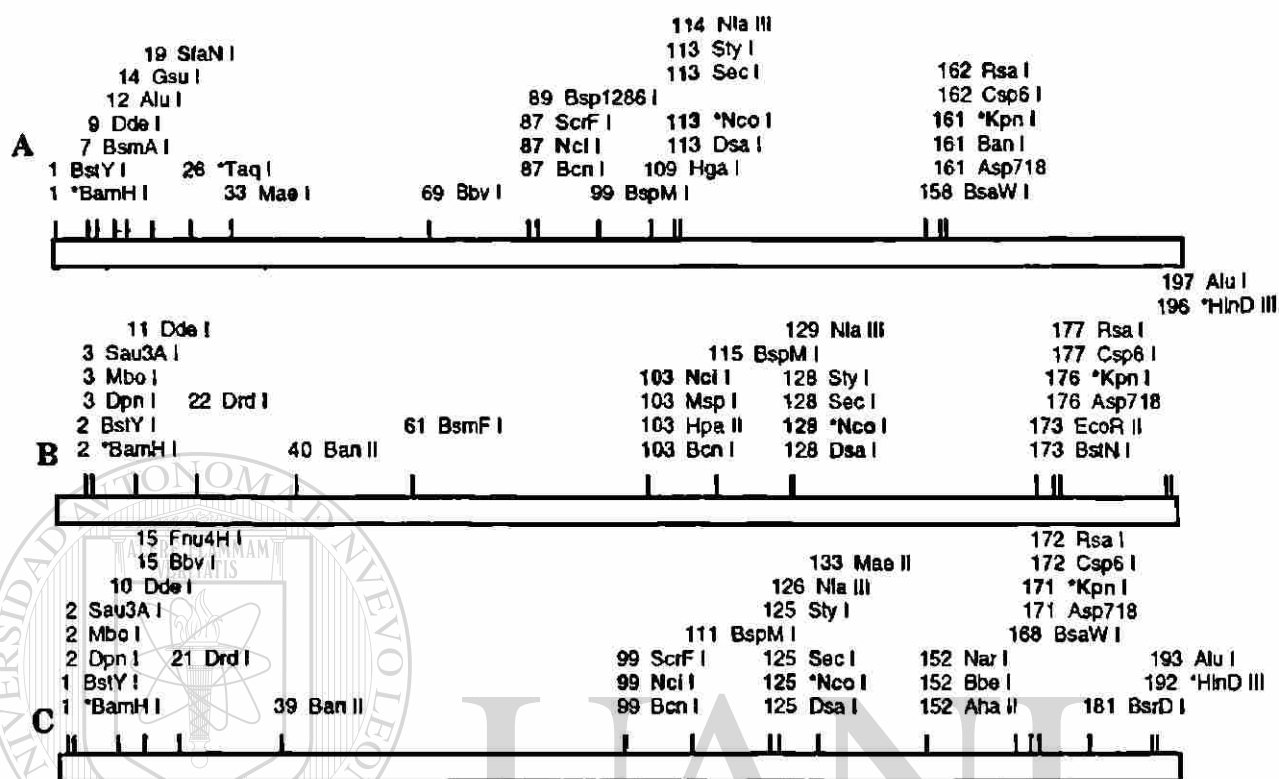


Fig.6.- Mapas de restricción de las cepas de referencia. Se muestran los mapas de restricción generados con las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de 200 pb amplificados a partir del ADN de las cepas **A**, *B. suis*, (1330), **B**, *B. abortus* (544) y **C**, *B. melitensis* (Rev-1). Los porcentajes de similitud entre las secuencias es de un 72 %, pero como puede observarse, aún cuando hay diferencias en los patrones, algunas enzimas como *KpnI*, *Nco I* y *Nci I* siguen conservadas en las tres cepas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2. Amplificación del ADN de las especies y biovariedades del género

Una vez probada la especificidad de los iniciadores, y con el fin de ampliar el poder de detección de la prueba de PCR originalmente implementada (27), se realizó una amplificación utilizando como blanco el ADN de las seis cepas tipo de *Brucella*, de las cuales *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* corresponden a la biovariedad 1, además fueron incluidas en este ensayo las biovariedades 2 y 5 de *B. melitensis* y *B. abortus*, respectivamente. Como se puede observar en la figura 7, todos los ADNs fueron amplificados dando patrones de bandas diferentes para algunas especies e idénticos para otras. Estos patrones se pueden dividir como se muestra en la tabla 3.

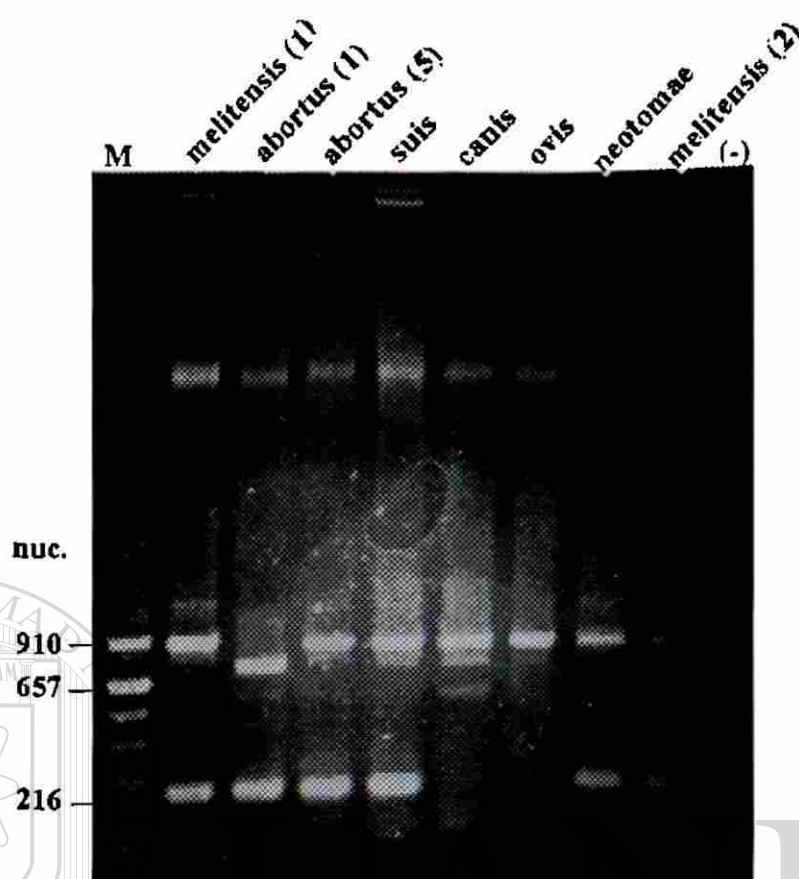


Fig. 7.- Amplificación de las especies y biovariedades del género. Todas las cepas analizadas mostraron amplificación. El experimento se llevó a cabo por 30 ciclos utilizando 500 ng de ADN, 2.5 U de Taq ADN polimerasa y 0.1 μ M de cada iniciador. La temperatura de apareamiento y tiempo de extensión fueron 63°C y 60 segundos, respectivamente. M, marcador de peso molecular (pBR322 digerido con *Alu* I), (-) testigo negativo de PCR sin ADN.

Tabla 3.- Patrones de amplificación con tres iniciadores.

Productos de amplificación	Especies
Bandas de 900 y 200 pb	<i>B. melitensis</i> (biovar. 1 y2) <i>B. suis</i> (biovar 1) <i>B. neotomae</i> <i>B. abortus</i> (biovar 5)
Banda de 900 pb	<i>B. canis</i> <i>B. ovis</i>
Bandas de 720 y 200 pb	<i>B. abortus</i> (biovar 1)

De estos resultados, se dedujo que los tres iniciadores diseñados a partir de la secuencia de *B. abortus*, permiten amplificar específicamente el locus *Omp2*. El uso de este juego de tres iniciadores permitió la detección de todas las especies analizadas, sin embargo, estos no fueron capaces de lograr su diferenciación.

1.2.2. Caracterización enzimática de los fragmentos de 900 pb

Con el fin de corroborar la identidad de los fragmentos de 900 pb presentes en la mayoría de las seis especies tipo del género, con excepción de *B. abortus*, se les realizó una caracterización enzimática utilizando para ello varias endonucleasas de restricción elegidas a partir del mapa de restricción correspondiente a éste fragmento en la secuencia de *B. abortus* (28) (fig. 8). Dada la variación genética que presentan los genes del locus *Omp2* (16), este análisis permitió además encontrar una endonucleasa cuyos sitios de restricción no existen en todos los fragmentos, permitiendo así diferenciar algunas de las especies probadas.

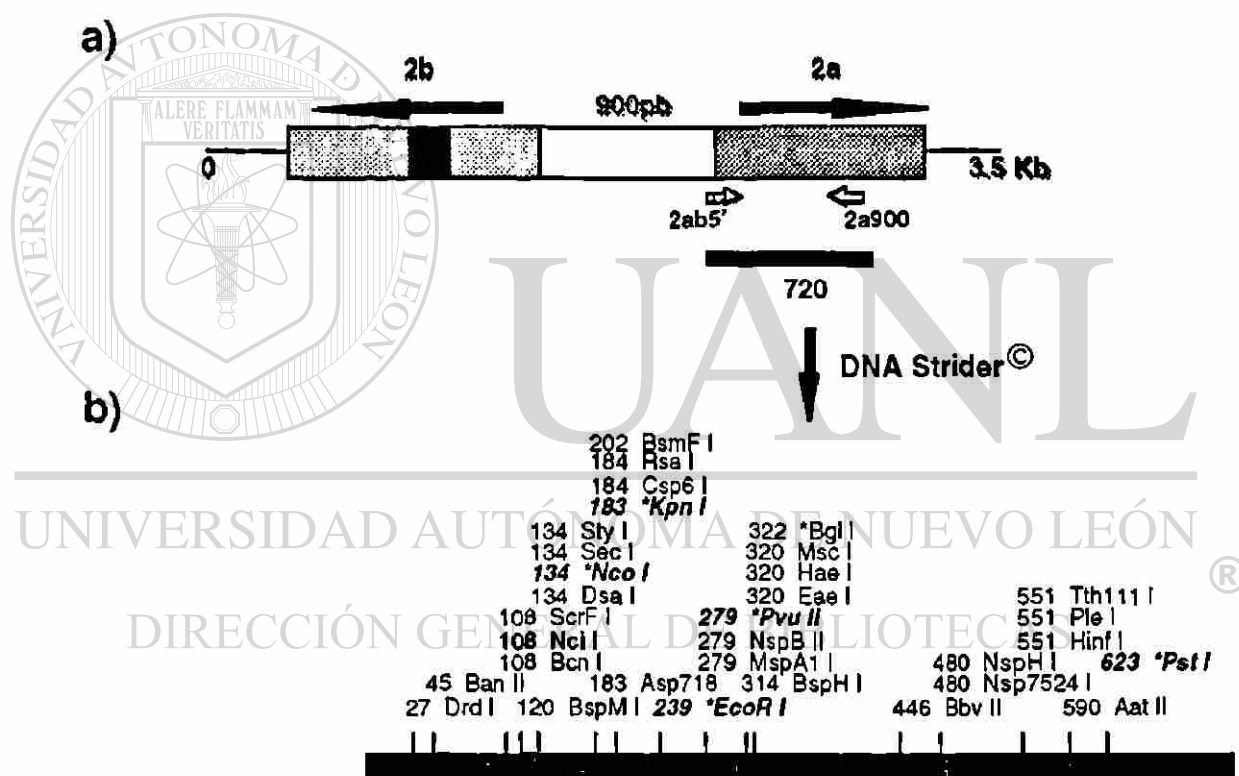


Fig. 8.- Selección de las endonucleasas de restricción. Mapa de restricción del fragmento de amplificación de 720 pb en *B. abortus*. a) Amplificación teórica utilizando el programa Amplify. b) Análisis de los sitios de restricción del fragmento obtenido utilizando el programa ADN Strider Versión 1.1. Las enzimas seleccionadas se muestran en *itálicas*.

Como se muestra en la fig 9, con la caracterización enzimática de cada uno de los fragmentos de 900 pb, se construyeron mapas de restricción y sólo se detectaron patrones de restricción que difieren de una especie a otra, por la presencia (+) o ausencia (-) del sitio de corte para la enzima *Kpn I*.

Mapas de restricción

Cepas

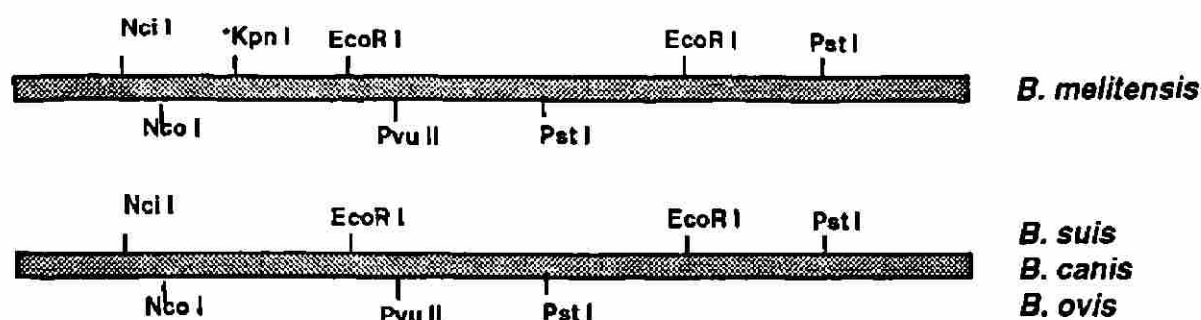


Fig. 9.- Caracterización enzimática de los fragmentos de 900 pb. Se muestran los mapas de restricción de los productos de amplificación de 900 pb. Se encontraron dos patrones de restricción característicos para las especies y con la excepción de *B. neotomae* (ver texto), estos presentan los patrones de restricción esperados según el reporte de Fitch y cols (16).

Este sitio polimórfico resultó estar presente (+) en *B. melitensis* (Rev-1), y ausente (-) en *B. suis*, *B. canis* y *B. ovis*, e inesperadamente "heterocigótico" (+/-) para *B. neotomae*. Cabe señalar que el resultado de la digestión con *Kpn* I de sólo una copia de las dos de la banda de 900 pb proveniente de esta última bacteria fue sorprendente, ya que no se podía lograr obtener una digestión total del fragmento. Además, la presencia de un sitio *Kpn* I no era esperado en este producto de amplificación, ya que de acuerdo a los resultados presentados por Fitch y cols. (16), *B. neotomae* pertenece al mismo grupo de *B. suis* y para ambas se había reportado la existencia de un sitio *Kpn* I únicamente en el gen *Omp2b* y ninguno en el *Omp2a*, lugar donde teóricamente se apárea el iniciador 2a900 (fig.4).

Una posible explicación de este resultado sería que en *B. neotomae* ambos genes son amplificados dando dos productos uno (+) y otro (-) para el sitio *Kpn* I (fig. 10).

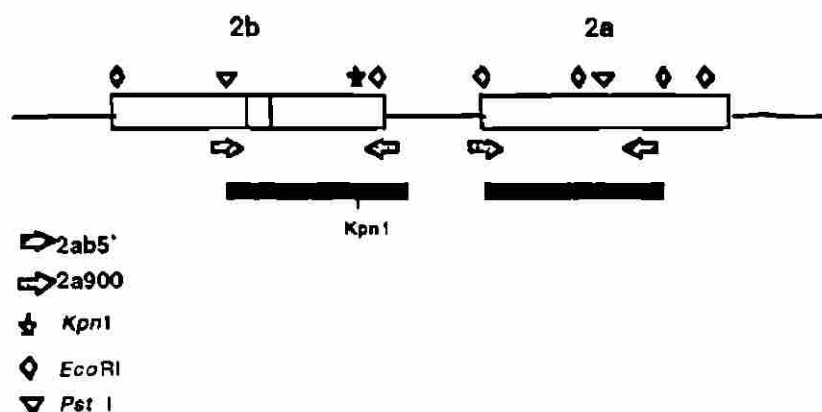
Locus *Omp2 B. neotomae*

Fig. 10.- Origen del patrón de restricción en *B. neotomae*. Se esquematiza la interpretación del patrón de restricción obtenido para *B. neotomae* después de digerir el fragmento de 900 pb con la enzima *Kpn* I. La gran similitud a nivel nucleotídico entre los genes del locus hace posible el apareamiento del iniciador 2a900 en ambos genes del locus.

1.2.3. Origen del polimorfismo *Kpn* I en *B. neotomae*

Para comprobar la existencia de dos bandas de 900 pb en *B. neotomae*, se realizó la clonación molecular (como se indica en materiales y métodos) del producto de amplificación.

Al analizar las clonas seleccionadas se encontraron dos tipos de insertos: positivos y negativos para el sitio *Kpn* I (ver fig 11). Este resultado permitió confirmar que el patrón de restricción proviene de la heterogenicidad del producto de amplificación de 900 pb, el cual incluye a la banda correspondiente al gen *Omp2a* (*Kpn* I negativa) y la otra (*Kpn* I positiva) que podría corresponder a la amplificación del gen *Omp2b*. Aún cuando la digestión de la clona *Kpn* I positiva con esta enzima muestra un patrón que no es posible explicar con los datos hasta ahora conocidos, la caracterización enzimática de esta última clona, con las enzimas *Eco* RI y *Pst* I apoya la posibilidad de que este fragmento realmente provenga del gen *Omp2b*, sin embargo análisis complementarios como son la determinación de la secuencia nucleotídica, permitirán establecer con certeza su identidad.

Con estos resultados, se puede deducir que de los tres iniciadores diseñados a partir de la secuencia de *B. abortus*, el iniciador 2a900 se apareja en el gen *Omp2a* en todas las especies probadas, dando una banda de 720 pb sólo en el caso de *B. abortus* y de 900 pb en las cinco especies restantes. Para *B. neotomae*, se observó que el producto de amplificación es heterogeneo ya que incluye una segunda banda del mismo tamaño que podría provenir del gen *Omp2b*.

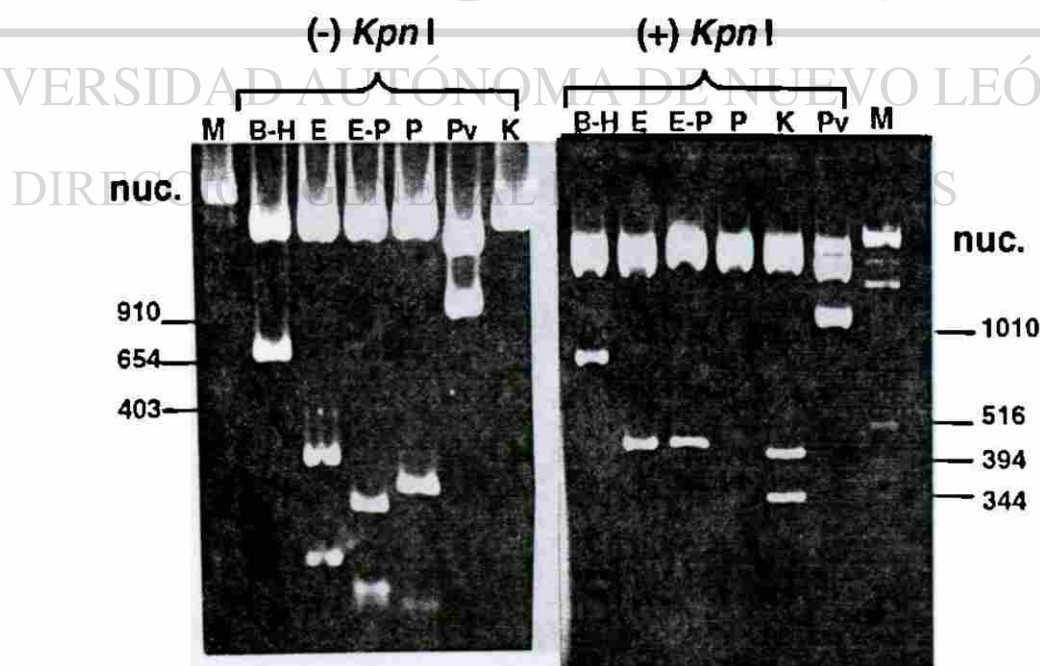


Fig. 11.- Caracterización enzimática de las clonas de *B. neotomae*. Como puede observarse (carriles K): en la clona (-) se obtiene únicamente la linearización del plásmido recombinante, en tanto que en la clona (+) se generan dos fragmentos adicionales lo cual indica la presencia de sitios de corte para esta enzima. M= Marcador de peso molecular Cos/pBR322 -*Alu* I; los siguientes carriles son digestiones con las enzimas B-H, *Bam* HI y *Hind* III; E, con *Eco* RI; E-P, *Eco* RI y *Pst* I; P, *Pst* I; Pv, con *Pvu* II y K, con *Kpn* I.

2. DIFERENCIACION DE LAS SEIS ESPECIES DEL GENERO

2.1. Contribución del polimorfismo *Kpn* I

Aún cuando los tres iniciadores fueron capaces de detectar las seis especies del género y algunas de sus biovariedades, no conferían la especificidad suficiente a la prueba de PCR para lograr diferenciarlas. Como puede observarse en la tabla 3, los patrones de amplificación, pudieron separarse en tres:

- Patrón a: bandas de 900 pb y 200 pb para *B. melitensis* (biovar. 1), *B. suis* y *B. neotomae*.
- Patrón b: una sola banda de 900 pb para *B. canis* y *B. ovis*.
- Patrón c: bandas de 720 pb y 200 pb para *B. abortus*.

Sin embargo con el análisis enzimático de los fragmentos de 900 pb se había ya detectado un RFLP para la enzima *Kpn* I, el cual permitió la diferenciación de tres cepas: *B. melitensis* (biovar. 1) en la cual la enzima digiere el producto en dos bandas (una de 600 pb y otra de 200 pb); *B. suis* que carece éste sitio de restricción y *B. neotomae*, que presenta una combinación de estos dos patrones (fig. 12). En la tabla 4 se hace un resumen de estos resultados.

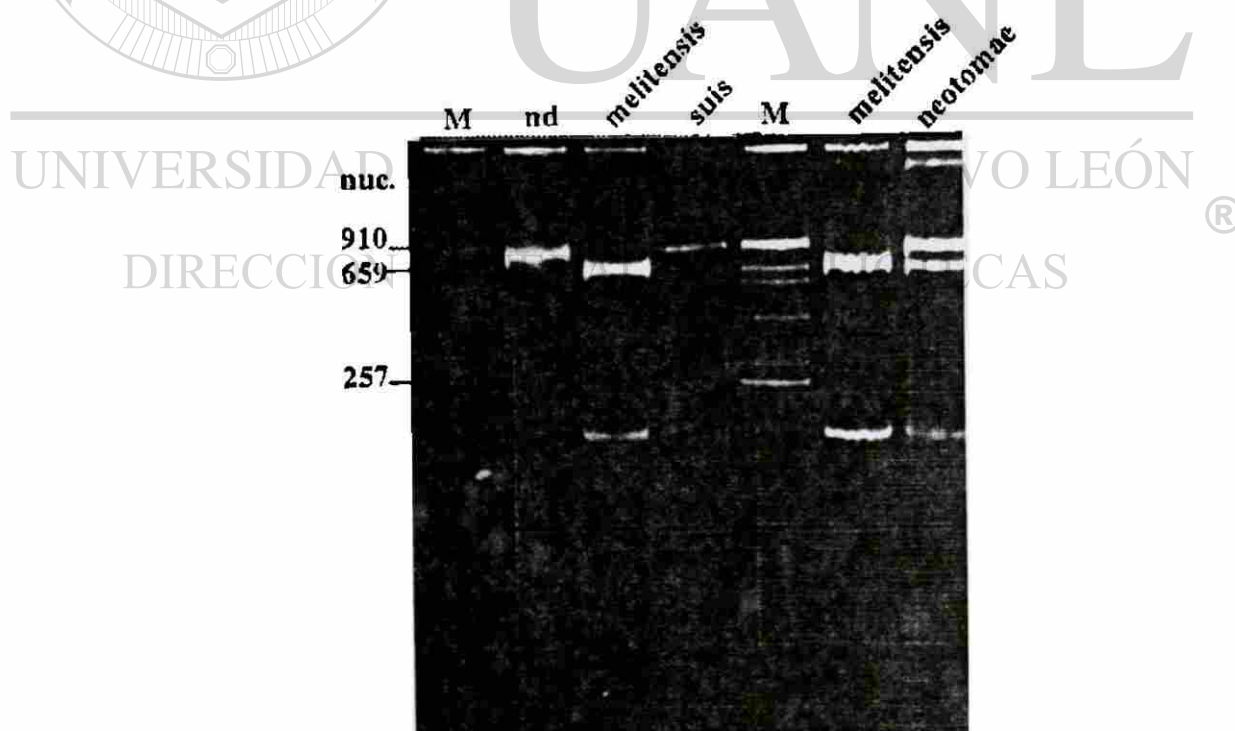


Fig. 12.- Diferenciación de las cepas de *B. melitensis* (Rev-1), *B. suis* y *B. neotomae*. Se muestra la diferenciación de las cepas *B. melitensis* y *B. suis*, utilizando el RFLP detectado para la enzima *Kpn* I. M, marcador de peso molecular (pBR322/ digerido con *Alu* I); nd, fragmento sin digerir; los siguientes carriles son digestiones con la enzima *Kpn* I, de los fragmentos correspondientes a *B. melitensis* (Rev-1), *B. suis* y *B. neotomae*.

Tabla 4.- Diferenciación de brucelas con el RFLP para *Kpn* I.

Patrón previo	Productos de PCR	RFLP de <i>Kpn</i> I	Especies
a	bandas de 200 y 900 pb	+	<i>B. melitensis</i>
a	bandas de 200 y 900 pb	--	<i>B. suis</i>
a	bandas de 200 y 900 pb	+/--	<i>B. neotomae</i>
b	banda de 900 pb	--	<i>B. canis</i> y <i>B. ovis</i>
c	bandas de 200 y 720 pb	*	<i>B. abortus</i>

* No se probó por carecer de la banda de 900 pb, aunque por su patrón de bandas ya era diferenciable.

2.2 Diferenciación de *B. ovis* y *B. canis* : inclusión de un cuarto iniciador en la PCR

Haciendo uso de los tres iniciadores y del polimorfismo para *Kpn* I, se tenían diferenciadas cuatro de las seis especies tipo del género, quedando por encontrar condiciones que permitieran generar patrones diferenciales para *B. canis* y *B. ovis*.

2.2.1. Análisis del cuarto iniciador

Analizando los mapas de restricción del locus *Omp2* en las seis especies, se pudo notar que la diferencia esencial entre *B. canis* y *B. ovis* es la ausencia en esta última del gen *Omp2b*. En base a esto se diseñó un cuarto iniciador que se aparea justo en una región de este gen que está conservada en cinco de las seis especies excepto en *B. ovis*.

Haciendo uso del programa Amplify (33) se verificó el apareamiento teórico del nuevo iniciador (denominado 2b600) junto con los tres iniciadores ya existentes, utilizando como blanco a la secuencia del locus *Omp2* de *B. abortus* mismo que se muestra en la figura 13, este mismo programa permitió además el análisis de la capacidad iniciadora y estabilidad del nuevo iniciador.

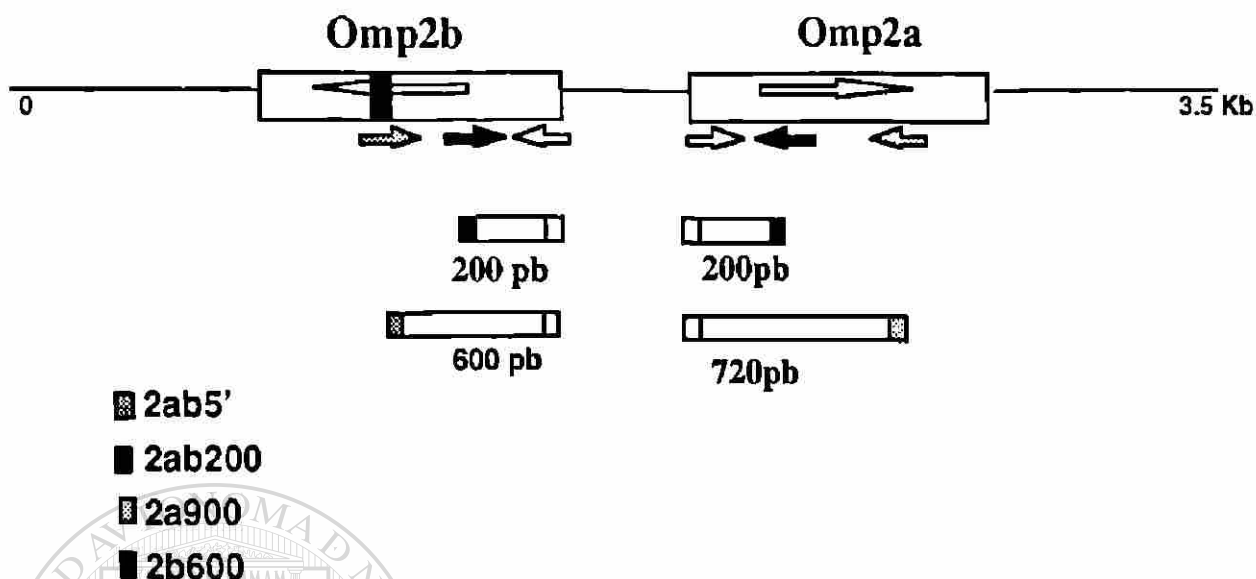
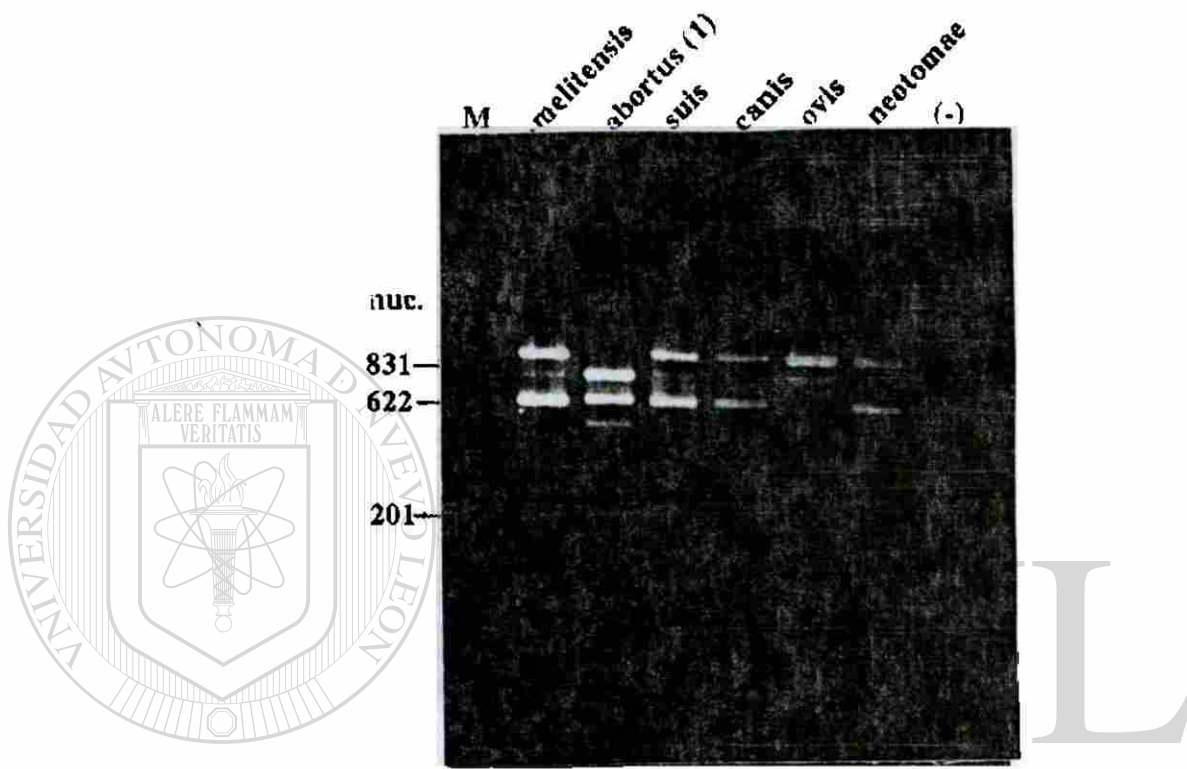


Fig. 13.- Amplificación teórica del locus Omp2 en *B. abortus* con los cuatro iniciadores. Las flechas indican los sitios de apareamiento de los iniciadores y las barras los tamaños de los principales productos obtenidos después de practicar la PCR. El cuadro oscuro dentro del gen Omp2b corresponde a un segmento de 108 pb ausente en el gen Omp2a. El programa computacional utilizado solo marcó la formación de dímeros de iniciadores para el iniciador 2ab200.

La capacidad iniciadora es uno de los parámetros más importantes a tomar en cuenta en el diseño de los iniciadores (36), el valor obtenido para el nuevo iniciador fue del 96%. Este valor menor del 100% se debe a la inclusión del sitio de restricción y seis nucleótidos adicionales para asegurar la actividad de la enzima de restricción. Adicionalmente, se hizo un análisis del iniciador 2b600 utilizando el programa Oligo 4.0, esto con el fin de valorar posibles problemas causados por la formación de estructuras secundarias, dímeros intra e interoligonucleótidos, los resultados obtenidos fueron adecuados.

2.2.2. Amplificación de las seis especies de *Brucella* con cuatro iniciadores

La adición del nuevo iniciador 2b600 a los tres primeros (2ab5', 2ab200 y 2a900), produciría en la PCR una banda de un tamaño teórico de 600 pb. Como se muestra en la figura 14, al practicar la PCR incluyendo el nuevo iniciador en las condiciones de amplificación utilizadas en la PCR con tres iniciadores, efectivamente se obtuvo la banda de 600pb en todas las especies tipo, excepto en *B. ovis*. Sin embargo, se observaron bandas inespecíficas para algunas especies. Por esta razón, se realizó una optimización de las condiciones de amplificación, modificando parámetros como concentración de ADN, temperatura de apareamiento y tiempo de extensión.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Fig. 14.-Inclusión del cuarto iniciador en la PCR. Se muestra el resultado de la amplificación de las seis especies tipo usando 500 ng de ADN, 2.5 U de Taq ADN polimerasa y 5 μ M de cada iniciador. La amplificación se realizó por 30 ciclos a una temperatura de apareamiento de 63°C y un tiempo de extensión de 1 minuto. M), Marcador de peso molecular λ /Eco RI- Hind III.

El aumento en la temperatura de apareamiento (de 63 a 66 °C) de los iniciadores disminuyó la inespecificidad de la amplificación, pero también disminuyó la intensidad de las amplificaciones, lo que fue compensado aumentando el número de ciclos (de 30 a 35). Durante estos experimentos se observó que el parámetro más importante para la disminución de la inespecificidad fue la concentración de ADN, la cual fue reducida diez veces (de 500 a 50 ng). En estas condiciones como se muestra en la fig. 15 se logró una perfecta diferenciación de *B. abortus* (biovariedad 1), *B. canis* y *B. ovis*.

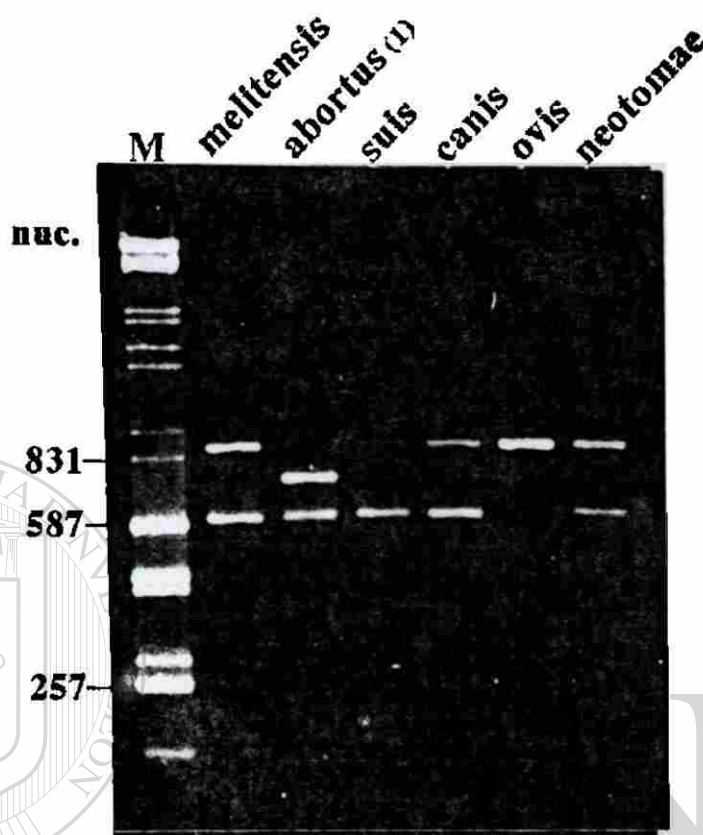


Fig. 15.- Optimización de la PCR. Se muestra el resultado de la amplificación de las seis especies tipo. El ensayo de PCR se realizó por 35 ciclos, la temperatura de apareamiento se cambió de 63 a 66°C y el tiempo de extensión se amplió de 60 a 90 segundos. M, Marcador de peso molecular λ -Eco RI- *H*indIII.

Con los resultados obtenidos hasta aquí, se había logrado la detección y diferenciación de las especies del género *Brucella*, recurriendo al uso de 4 iniciadores en la PCR y del polimorfismo detectado para la enzima *Kpn* I. Sin embargo, antes de poder aplicarlo al diagnóstico para la brucelosis, se evaluaron dos parámetros importantes: el límite de detección y la especificidad del método.

3. EVALUACION DEL METODO

3.1. Límite de detección

Como se mencionó en los apartados correspondientes a la optimización de la PCR, la cantidad de ADN utilizada como molde venía siendo de 50 ng en un volúmen total de 50 μ l. Pero puesto que es de interés el practicar la prueba a partir del ADN recuperado de muestras de sangre de pacientes sospechosos de padecer brucelosis, y donde se esperaría encontrar cantidades ínfimas de ADN bacteriano, se probó el límite de detección del sistema de amplificación.

Para lograrlo se realizaron amplificaciones en las condiciones de PCR ya establecidas, pero reduciendo la cantidad de ADN.

Primeramente y como se muestra en la fig. 16A. se tomaron diferentes cantidades del ADN de dos cepas: *B. suis* y *B. abortus*, pues se consideró con los ensayos hasta aquí realizados que eran las que respondían en la amplificación con menor y mayor especificidad, respectivamente. Con este ensayo, se determinó que la cantidad mínima de ADN necesario para lograr la detección-diferenciación era de 1 ng. La figura 16B muestra los resultados obtenidos al aplicar estas condiciones a la amplificación del ADN de todas las especies del género. Se ha estimado (23) que cada bacteria contiene 5 fg de ADN, tomando en cuenta este valor con el límite de detección de 1 ng alcanzado en la prueba la cantidad aproximada de células detectadas sería de 2×10^5 células, Este valor es todavía alto en comparación con los resultados de sensibilidad alcanzados en otros trabajos de PCR (23-26), sin embargo, es posible que este resultado se deba principalmente a la alta temperatura de apareamiento utilizada en la prueba, razón por la cual la optimización del método con el diseño de iniciadores específicos de cada especie, permitirá disminuir aún más este requerimiento de ADN de bacteriano, ya que las condiciones de la PCR no serían tan drásticas como las establecidas en este trabajo.

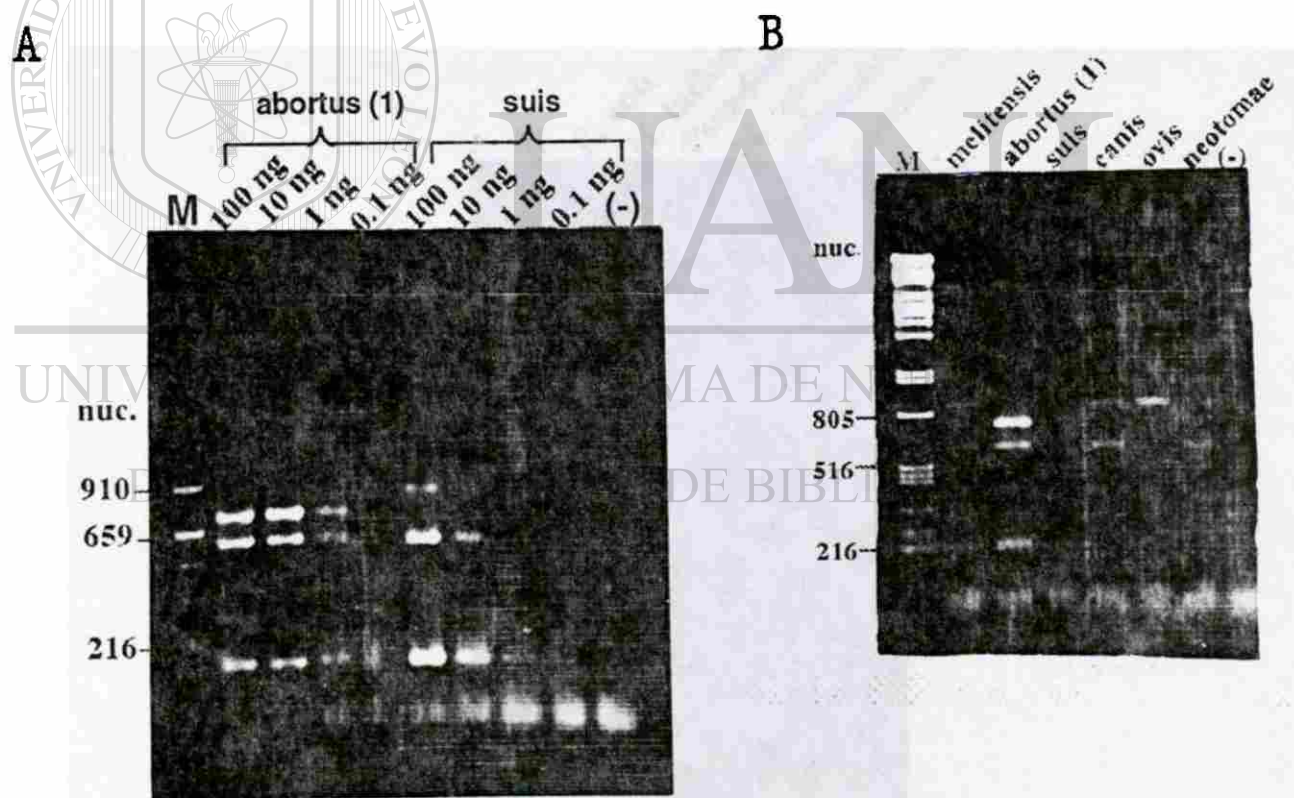


Fig. 16.- Límite de detección de la PCR. En A se muestran los productos de amplificación a diferentes concentraciones de las cepas *B. abortus* (biovar 1) y *B. suis* (biovar 1). En B se muestran los productos de amplificación obtenidos después de utilizar 1 ng de ADN de todas las cepas como molde y 0.1 μ M de los cuatro iniciadores. M, marcador de peso molecular λ -*Pst* I.

3.2. Especificidad

Otro aspecto importante de una prueba diagnóstica es su especificidad, por tal razón se amplificó una serie de ADNs provenientes de microorganismos distintos a *Brucella*, pero que pudieran estar presentes en una muestra a analizar. Como se muestra en la figura 17 y con la clara excepción del testigo positivo, todos los ADNs de las cepas usadas resultaron negativos para la prueba de PCR, aún cuando la cantidad de ADN de las bacterias fue de 500 ng, comparado con 1 ng del testigo. De estos resultados se puede concluir que los iniciadores son altamente específicos para las especies del género *Brucella*.

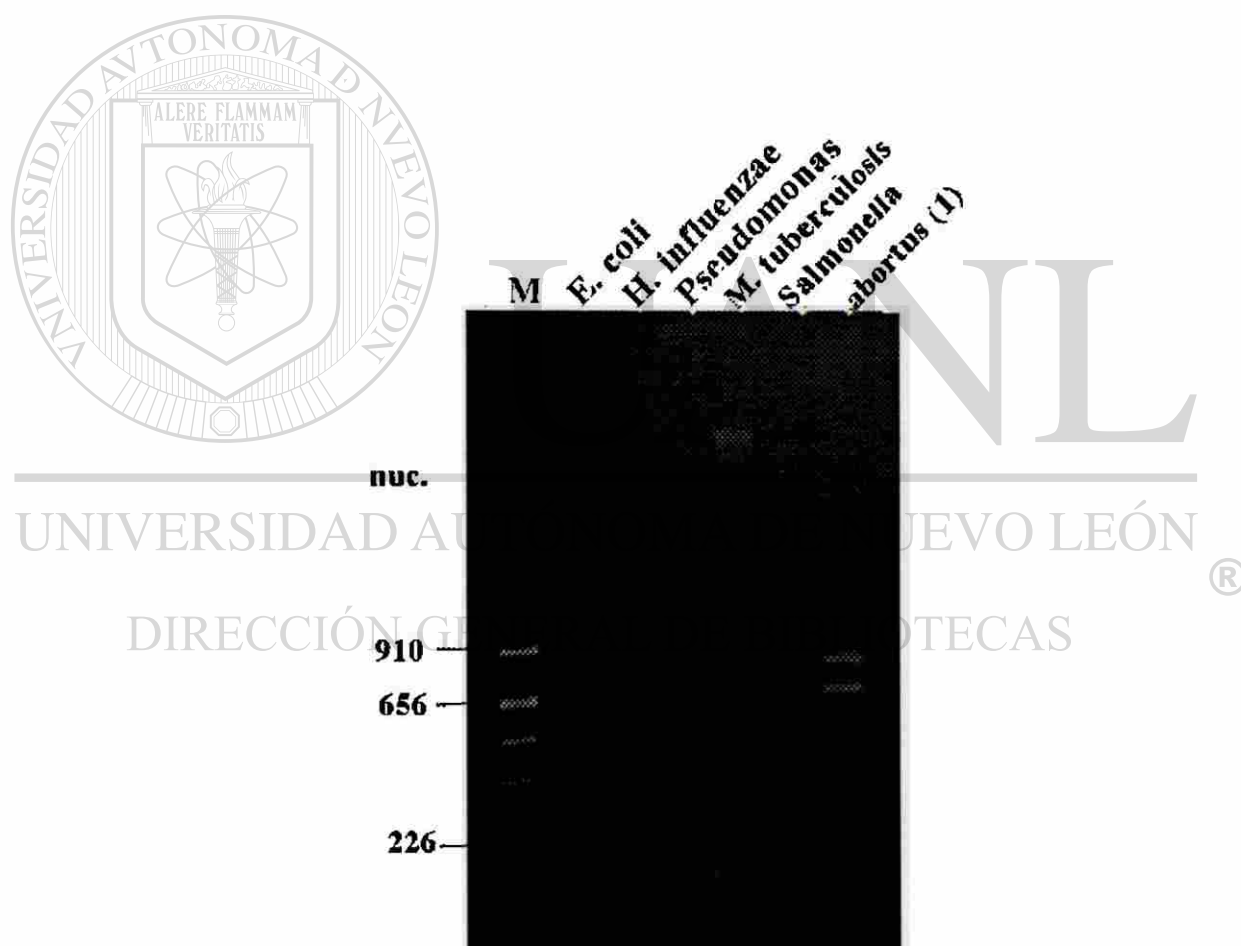


Fig. 17.- Especificidad de la PCR. Se muestra la amplificación del ADN extraído de diferentes microorganismos utilizando las condiciones ya establecidas y hasta 500 ng del ADN, sólo para el carril correspondiente a *Mycobacterium tuberculosis* se puede observar una banda que proviene del exceso de ADN. Como testigo positivo de la amplificación se usó 1 ng de ADN de *B. abortus*, biovariedad 1. M Marcador de peso molecular pBR322/ digerido con *Alu I*.

4. APLICACION

Esta última parte, estuvo dirigida a mostrar la utilidad potencial del método desarrollado aplicándolo a casos particulares de tipificación y confirmación del diagnóstico de brucelosis en pacientes.

Al practicar la PCR con cuatro iniciadores y el ADN de la cepa aislada se obtuvo el siguiente patrón de bandas: 900, 800, 600 y 200 pb (figura 18), este resultado de amplificación de 4 bandas no corresponde a ninguna de las especies consideradas en este estudio. Sin embargo previamente esta cepa había sido identificada en el hospital como *B. abortus* por tal razón en este caso solamente se pudo comprobar su relación con el género *Brucella* y descartar la posibilidad de que se trate de la biovariedad 1 de *B. abortus*.

Este resultado también permite deducir que los patrones de amplificación no son típicos de cada especie y sus biovariedades, por lo cual la utilización del método desarrollado para la tipificación de especies requerirá ampliar significativamente el número de cepas, y establecer de esta manera todos los patrones de amplificación para poder relacionarlos con las biovariedades.

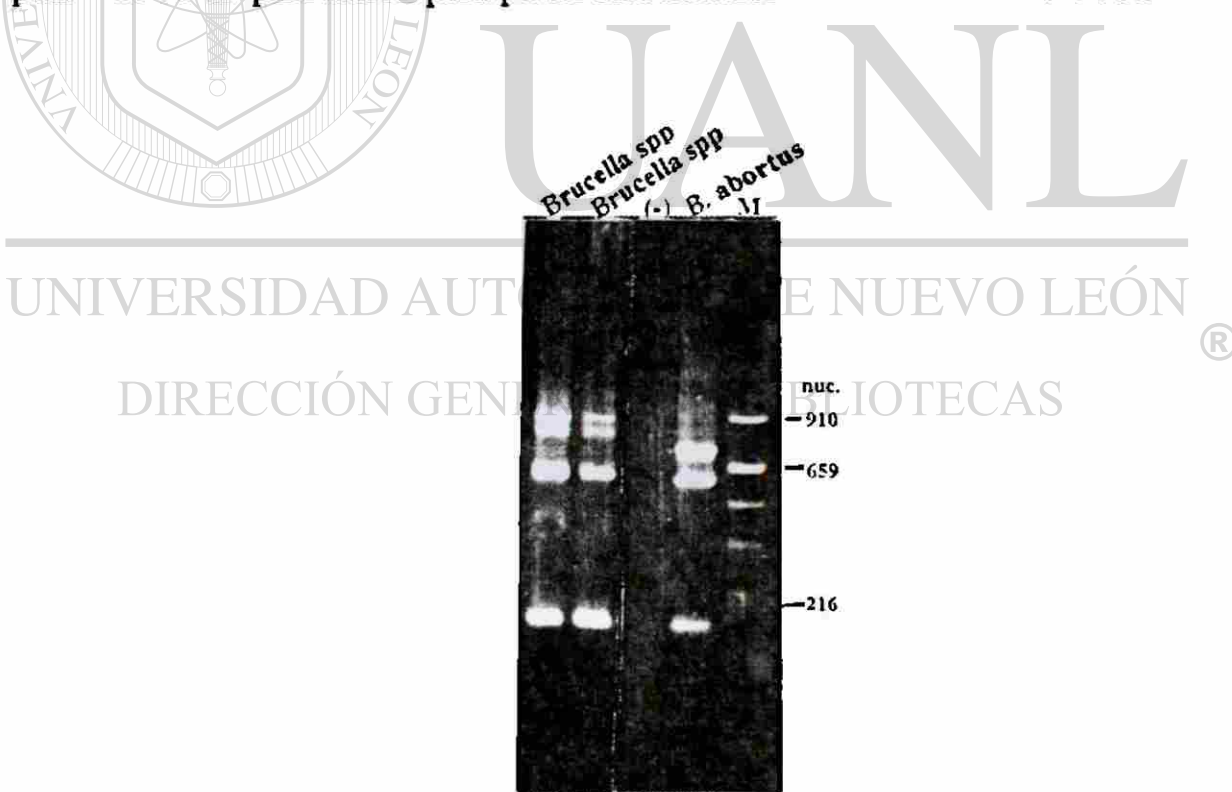


Fig. 18.-Tipificación de Brucella. Se muestran los productos de amplificación de la tipificación, utilizando las condiciones de amplificación establecidas para la detección-diferenciación. Dado el patrón de bandas obtenido no fue posible identificar la biovariedad de la especie, sin embargo la reacción confirmó su relación con el género *Brucella*. M= Marcador de peso molecular pBR322/*Alu* I

Para comprobar la factibilidad de utilizar el método en el diagnóstico de brucelosis en pacientes, se trataron dos tipos de muestras: una muestra de sangre de un paciente pediátrico con antecedentes serológicos de brucelosis, y otra de sangre control que no presentaba ningún antecedente de la enfermedad. El ADN total de cada una de las muestras se aisló como se describe en materiales y métodos. Aproximadamente 2 μ g de ADN fueron amplificados utilizando los cuatro iniciadores y como se muestra en la figura 19, el patrón obtenido después de practicar la PCR con el ADN del paciente, fue el de las especies indiferenciables (*B. melitensis*, *B. suis* ó *B. neotomae*), razón por la cual una alícuota del producto amplificado fue sometida a digestión con la enzima *Kpn* I, siendo *B. melitensis* la especie revelada por el patrón de RFLP para *Kpn* I (fig. 19).

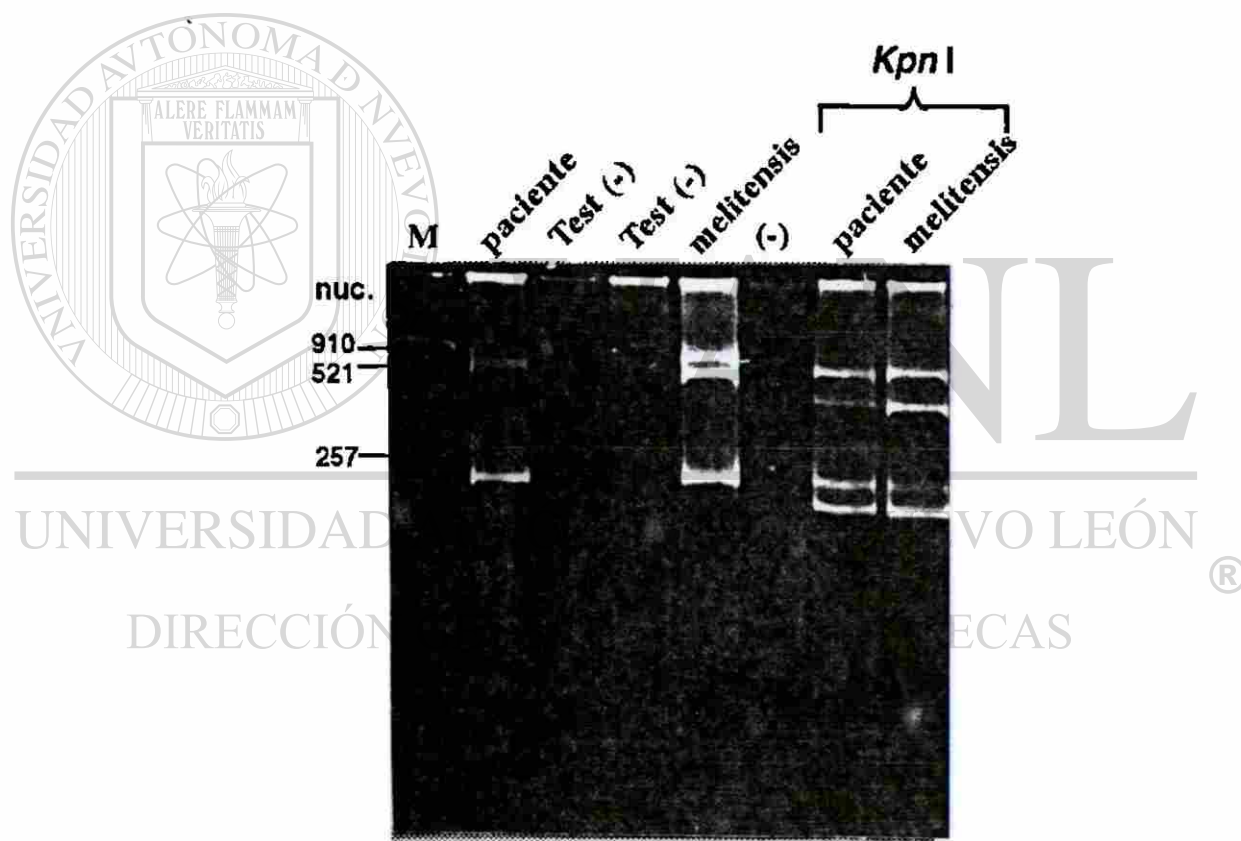


Fig. 19.- Detección y diferenciación de Brucella. Se muestran los resultados obtenidos al practicar la PCR a muestras de ADN genómico humano. La muestra del paciente pediátrico originó el patrón de PCR consistente en bandas 900-600-200 pb; en muestras de los ADN testigos no se observa amplificación; el ADN de *B. melitensis* (Rev-1) presentó el patrón típico de amplificación. En los últimos carriles se muestra el patrón obtenido después de digerir con la enzima *Kpn* I las muestra del paciente y la de *B. melitensis* (Rev-1) respectivamente.

5. PERSPECTIVAS

Estos últimos resultados aún preliminares muestran que el método de detección y diferenciación podría ser una forma más rápida, específica y sensible para la detección y diferenciación de *Brucella*. Sin embargo esto requerirá de una optimización de condiciones tales como:

- Aislamiento del ADN. La técnica utilizada para el aislamiento de ADN a partir de muestras de sangre en este trabajo no considera en ninguno de los pasos la eliminación de componentes derivados del grupo hemo, los cuales es bien sabido inhiben la reacción de PCR a elevadas concentraciones (34), por esta razón se deberán practicar metodologías en donde se considere que la bacteria es intracelular y se realicen pasos previos de separación de los leucocitos, o bien otras en las que se favorezca el aislamiento del ADN bacteriano.
- Optimización de la PCR. En el presente trabajo todos los parámetros establecidos se hicieron con ADN proveniente de cultivos bacterianos; por lo tanto, cuando se trabaje con el ADN total extraído de una muestra de paciente será necesario ajustar las condiciones de amplificación, tales como concentración de ADN, temperatura de apareamiento y número de ciclos.
- Finalmente una vez establecido el método, se deberá validar con un número mayor de muestras provenientes de pacientes y controles, apoyándose en un diseño estadístico adecuado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VI CONCLUSIONES

Los experimentos aquí descritos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- 1.- Se logró establecer un nuevo método de detección y diferenciación de las especies del género *Brucella*, basado en la PCR, utilizando para ello iniciadores que se apárean en el locus *Omp2*.
- 2.- Se capitalizó en la variabilidad genética que presenta el locus *Omp2*, para lograr la diferenciación de las seis especies del género, apoyándose en el polimorfismo *Kpn I* y en la inclusión de un cuarto iniciador.
- 3.- El método es específico para las especies del género *Brucella*, siendo el límite de detección alcanzado de 1 ng de ADN bacteriano.
- 4.- Se demostró la potencial aplicabilidad del método de diagnóstico y diferenciación, al lograr confirmar el diagnóstico de brucelosis en un paciente con cuadro clínico y serología positivos para la enfermedad.
- 5.- La información derivada de la secuencia nucleotídica de los fragmentos de amplificación hará factible la refinación de la metodología implementada al diseñar juegos de iniciadores específicos para cada especie, y contribuirá además a la Biología Molecular y Filogenia de las brucelas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

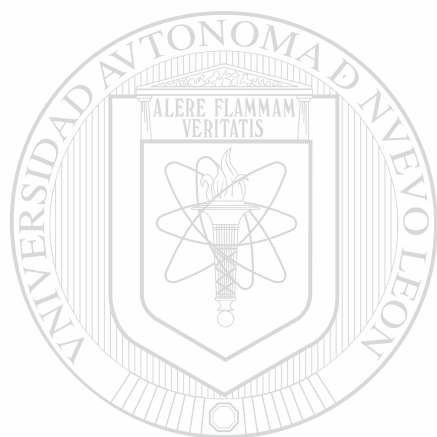
- 1.- Ehlich, D. G. and S. J. Greenberg. (1994) .PCR-based diagnostics in infectious disease. *Blackwell Scientific Publications*. 698pp.
- 2.- Mullis, K.B. and F.A. Faloona.(1987) Specific synthesis of ADN *in vitro* via polymerase chain reaction. *Methods in Enzymol.* **155**:335-350.
- 3.- Barrera, Saldaña H.A.; R.Ortíz López, A. Rojas Martínez y D. Reséndez Pérez. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa: una nueva época dorada en la Biología Molecular. *Ciencia y Desarrollo*. pp 50-60.
- 4.- Kwok S., D. H. Mack, K.B. Mullis, B. Poiesz, G. Ehlich, D. Blair, A. Friedman-Kien, and J.J. Sninsky. (1987). Identification of human immunodeficiency virus sequences by using *in vitro* enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *Journal of Virology*. **61**(.5):1690-1694.
- 5.- Burstain J.M., S.A Grimprel ., M.V. Lukehart , Norgard and J.D. Radolf. (1991). Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *Journal Clinic Microbiol.* **29**:62-69.
- 6.- Erlich H.A; D. Gelfand; J.J. Sninsky. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*. **252**:1643-1650.
- 7.- Freeman B.A.(1988). Tratado de Microbiología de Burrows. *Ed. Interamericana*. Cap. 22.
- 8.- Verger J.M., F. Grimont, P.A.D. Grimont , and M. Grayon.(1985). *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **35**(3): 292-295.
- 9.- Verger J.M., F. Grimont, P.A.D. Grimont and M. Grayon. (1987). Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.***138**:235-238.
- 10.- Banai Menachem, I.; M. and L. Cohen.(1990). Isolation, identification and characterization of *Brucella melitensis* biovar. 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. *Journal of Clinical Microbiology*. **28**(5):1057-1059.
- 11.- Hoyer H. B. and N. McCullough.(1968). Polynucleotide homologies of *Brucella* deoxyribonucleic acids. *Journal of Bacteriology*. **95**(2):444-448.

- 12.- De Ley J., W. Mannheim, P. Segers, A. Lievens, M. Dejin, M. Vanhoucke and M. Gillis. (1987). Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and *cdc* group VD. *37*(1):35-42.
- 13.- Hoyer H. B. and N. B. McCullough.(1968). Homologies of deoxyribonucleic acid from *B. ovis*, Canine Abortion Organisms, and other *Brucella* species. *Journal of Bacteriology*. *96*(5):1783-1790.
- 14.- Grimont F., J.M. Verger, P. Cornelis, J. Limet, M. Lefèvre, M. Grayon, B. Règnault, J. Van Broeck and P.A.D. Grimont. (1992). Molecular typing of *Brucella* with cloned ADN probes. *Res. Microbiol.* *143*:55-65.
- 15.- Allardet-Servent A., G. Bourg, M. Ramuz, M. Pages, M. Bellis and G.Roizes. (1988). ADN Polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *Journal of Bacteriology*. *170*(10):4603-4607.
- 16.- Ficht T.A., S.W. Bearden, B.A. Sowa and H. Marquis.(1990). Genetic variation at the *Omp2* porin locus of the *Brucellae*: species-specific markers. *Molecular Microbiology*. *4*(7):1135-1142.
- 17.- Forsyth, J.R.L. and G.G. Alton.(1990). *Brucella*. *Medical Microbiology*. 3th edition. Churchill Livingstone.
- 18.- Pumarola A.; A. Rodríguez-Torres; J.A. García-Rodríguez y G. Piedrola-Angulo. (1987). Microbiología y Parasitología Médica. *Ediciones Científicas y Técnicas*, S.A. Barcelona, España. p. 492-500, Cap. 45.
- 19.- López-Merino, A. (1991). Brucelosis: avances y perspectivas. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. *Publicacion INDRE #6*. 53pp.
- 20.- Dajer-Abimerhi A.; E.J. Gutierrez-Ruiz ; D Zapata-Villalobos . (1994) .Estudio serológico de la Brucelosis porcina en el estado de Yucatan, México. *Revista Biomédica*. *5*(2):84-87.
- 21.-Wilson, J.D., E. Braúnwald, K. Isselbacher, R.G. Petersdorf, J.B. Martin, A.S. Fauci, R.K. Root.(1991). Principios de Medicina Interna. *Ed. Interamericana McGraw-Hill*. 12.a. edición. pp. 2577.
- 22.- Canales-Muñoz J.L.; S. Aguilar-Benavides; G. Flores-Cásarea; M.A. Boeta-Guerrero y T. Vázquez Castellanos. (1993). Estudio de un brote de brucelosis y valoración diagnóstica de las pruebas de laboratorio. *Revista Médica*. *31*(4):272-277.

- 23.- Fekete A, J. Bantle, S. M. Halling and M.R. Sanborns. (1990) Preliminary development of diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*. **69**:216-227.
- 24.- Fekete A, J.Bantle, S. M. Halling and R. William Stich. (1992). Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *Journal of Bacteriology*. **174**(23): 7778-7783.
- 25 Romero C; C. Gamazo; M. Pardo and I. López-Goñi.(1995). Specific detection of *Brucella* ADN by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**(3):615-617.
- 26.- Bricker J. B. and S. M. Halling.1994. Differentiation of *Brucella abortus* Bv.1,2 and 4, *Brucella melitensis*, *B. ovis* and *Brucella suis* Bv.1 by PCR. (1994). *Journal of Clinical Microbiology*. **32**(11):2660-2666.
- 27.- Martínez-Soriano J P., E.L. Cab Barrera, R. Tamez González y D.S. Leal Klevezas.(1993). Detección de *Brucella abortus* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Bioquímica*. **XVIII**(72):10-16.
- 28.- Ficht A. T., S. W. Bearden, B. A. Sowa and L. G. Adams. (1989). ADN Sequence and expresion of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*. **57**(11):3281-3291.
- 29.- Marquis H. and Thomas A. Ficht. (1993). The Omp2 locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. *Infection and Immunity*. **61**(9):3785-3790.
- 30.- Sanger F. S. and A.R. Nicklen (1977). ADN sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad. U.S.A.* **74**: 5463-5467.
- 31a.- Sambrook J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.(1989). Molecular cloning a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. pag. 1.85.
- 31b.- Sambrook J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.(1989). Molecular cloning a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. pag. 1.25.
- 32.- Marck Ch..(1989). ADN Strider 1.1: a program for ADN and protein sequences analysis. *Departament de Biologie*. Institut de Recherche Fundamentale-C.E.A. France.
- 33.- Engls Bill. Amplify version 1.2 β *University of Wisconsin Genetics* WI. USA.
- 34.- Research Products Life Technologies,INC. GIBCO BRL.(1993).*Boletín Técnico*.

35.- Higgins D.G.; P.M. Sharp. (1988). Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* . **73**:237-244.

36.- Iturbe-Cantú M.A. (1995). Formas alternativas de procesamiento de los ARN mensajeros de los genes lactógeno placentario 1 y hormona del crecimiento variante del genoma humano y su abundancia relativa durante el embarazo. *Tesis*. Facultad de Medicina. UANL.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

