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

TM
RC12
.B7
S5
c.1

1080073265

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

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
FO DO
TESIS
(73265)

BUR
FONDO
TESIS MAESTRIA

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.

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 Brucella	2
2. Epidemiología	4
3. Diagnóstico	5
4. Contribución de la PCR al diagnóstico de brucelosis	6
5. El locus Omp2 en Brucella.	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 *Brucella spp* 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 *Kpn* I en *B. neotomae* 26
2. Diferenciación de las especies del género 27
2.1. Contribución del polimorfismo *Kpn* I 27
2.2. Diferenciación de *B. ovis* y *B. canis*: 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 *Brucella* 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

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
Ci	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	mililitros
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	Polietilénglicol
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 Brucella.	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 *Kpn* I	28
Figura 1.	Representación esquemática del Locus Omp2 en *B. abortus*	7
Figura 2.	División de las especies y biovariedades de Brucella spp.	8
Figura 3.	Estrategia general	11
Figura 4.	Amplificación teórica del Locus Omp2 en *B. abortus* 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 *B. neotomae*.	25
Figura 11.	Caracterización enzimática de las clonas de *B. neotomae*.	26
Figura 12.	Diferenciación de las cepas de *B. melitensis* (biovar.1), *B. suis* y *B. neotomae*.	27
Figura 13.	Amplificación teórica del Locus Omp2 en *B. abortus* 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 deseo 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.

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.

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 "