

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACION DE LA REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA EN EL DIAGNOSTICO DE
BRUCELOSIS, ESTIMANDO EL ESPECTRO DE
INFECCION EN HUMANOS EN UNA ZONA
ENDEMICA.

Por

Q.B.P. MARTA GRACIELA ORTEGA MARTINEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado
de Maestría en Ciencias con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

DICIEMBRE, 1997

TM

QR201

.B8

07

c.1



1080080864

12263

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

EVALUACION DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN EL DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS, ESTIMANDO EL ESPECTRO DE INFECCION EN HUMANOS EN UNA ZONA ENDEMICA.

MT
P. S. C. P.
88.
70

Aprobación de Tesis:



[Signature]
Dra. *[Name]*

[Signature]
Dra. Agnes Revol de Mendoza
Coasesor
Secretaría

EVALUACION DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN EL DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS, ESTIMANDO EL ESPECTRO DE INFECCION EN HUMANOS EN UNA ZONA ENDEMICA.

[Signature]
Dr. Javier Ramos Jiménez
Por

Q.B.P. MARTA GRACIELA ORTEGA MARTINEZ

Dra. Lilia Cárdenas Ibarra
3° vocal

Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética




DICIEMBRE, 1997

TM
QR201
BB
07



**EVALUACION DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN
EL DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS, ESTIMANDO EL ESPECTRO DE
INFECCION EN HUMANOS EN UNA ZONA ENDEMICA.**

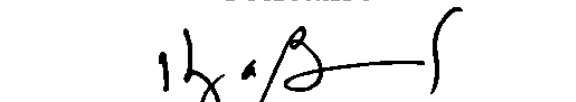
Aprobación de Tesis:



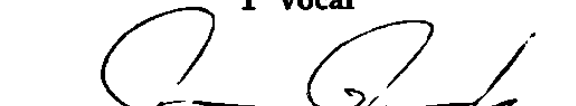
Dra. Martha Guerrero Olazarán
Presidente



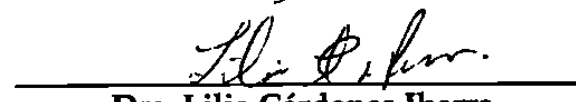
Dra. Agnès Revol de Mendoza
Coasesor
Secretaria



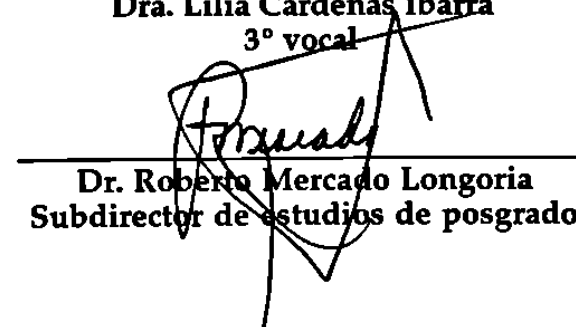
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Asesor
1° vocal



Dr. Javier Ramos Jiménez
2° vocal



Dra. Lilia Cárdenas Ibarra
3° vocal



Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de estudios de posgrado

AREA DE TRABAJO

La parte de genética molecular de esta tesis se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica de esta Facultad, mientras que la realización de las pruebas serológicas y el procesamiento de las muestras se realizaron en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas de esta Facultad bajo los elementos de bioseguridad adecuados.

*El éxito no es cuestión de sabiduría o de astucia
sino de honradez y confianza*

La moral no puede ser substituida por el entendimiento

Albert Einstein

DEDICATORIA

A DIOS, por estar en mi siempre, por ser mi vida, mi verdad y mi camino.

A mis Padres por su incomparable entrega y amor, por ser mi mejor ejemplo de rectitud, por todos sus sacrificios y esfuerzos que han logrado hacer de mi una persona realizada.

A mi hermana Mary, por su protección y su cariño, por ser una gran compañera y amiga en todo momento de mi vida.

A mi sobrino Ginés Ricardo, por que con su llegada le dio sentido a mi vida.

A mis queridas tías Beatriz y Alicia, por ser mis segundas mamás, por su gran cariño y comprensión.

A la memoria de mi hermano Ginés, mis abuelos Ernesto, María y Ginés y de mis tíos Virginia, Amanda y Ernesto. Gracias por haber dejado un legado de amor en nuestras vidas. Dios los bendiga.

A mi casi hermana Ethel, por tantos años de amistad, por compartir mis triunfos y mis fracasos.

De una manera muy especial a Gil, por cultivar en mi la semilla de la paciencia, por hacerme ver que después de la tempestad viene la calma, pero sobre todo por estar siempre a mi lado y compartir conmigo todos sus momentos. Gracias por querer ser parte de mi vida.

A aquellos que usarán su inteligencia en la batalla contra la muerte, que fortalecerán su voluntad contra el deseo de morir y substituirán con amor la ciega compulsión de entregarse al odio como precio para vivir.

AGRADECIMIENTOS

A todos los maestros que con su verdadera vocación contribuyeron en mi formación, en especial a la Madre Ma. Esthela Hernández V. y al Maestro Jesús Nerio Rodríguez, en quienes encontré siempre una verdadera amistad.

A las Familias: Martínez-Garza, Leos-Rivas, Barrera-Oranday, por brindarme un hogar, por hacer más placentera mi estancia en esta Ciudad.

A las Familias Fortozo-García y Mendoza-Villarreal, gracias por los felices momentos compartidos.

A Olga Monsivaís, porque sin unimos lazos de sangre ha sido siempre una verdadera hermana.

A mis mejores amigos y compañeros de generación de la Licenciatura: Blanca, Lucero, Evangelina, Lulú, Silvia, Irasema, Maricela y Carla; porque hasta la fecha siempre encuentro en ellos apoyo y confianza.

A mis amigas de toda la vida: Claudia, Eloína, Mónica e Iliana, por tantos años de cariño y confianza.

A Francisco Dávila mi gran amigo.

Al Padre René Fernando Peña López, en quien siempre he encontrado un gran confidente.

A la Dra Martha Guerrero y al Dr. Viader por depositar su confianza en mi, pero sobre todo por su integridad como personas e investigadores, gracias por su gran ejemplo.

A la Dra. Agnès Revol por compartir conmigo esta tesis desde el principio hasta el final. Gracias por su valiosa asesoría.

A la Dra. Herminia Martínez por todo el apoyo brindado.

A la Dra. Lilia Cárdenas y al Dr. Javier Ramos por su participación en este trabajo.

A Gil y Carmen Villalobos mis grandes maestros de Biología Molecular, gracias por su paciencia.

A mis amigos de la ULIEG en quienes siempre encontré apoyo y palabras de aliento muy especialmente: Celia, Dolores, Normita Carmen V. y Ramirin. Agradezco también a mis demás compañeros porque de cada uno de ellos aprendí algo diferente: Eddy, Flor, Maribel, Mauricio, Carmen B. y Miguel D., Fermin, Claudio, Luis, Martin, Hugo, Marcos, las Anas, Pollito, Raquel, Don Raúl, Ale, Don Panchito, Alma R, la Maestra Rosy R, Vicky.

A la Maestra Lidia Rivera, a la Maestra Rita Rositas y al Dr. Rolando Tijerina por contribuir a que este proyecto se realizara.

A mis compañeros de generación de Maestría por los momentos compartidos, en especial a mi gran amigo Ricardo Salazar. También agradezco a Sachiko su disponibilidad para escucharme siempre que lo he necesitado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cols.	Colaboradores
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP's	Trifosfato de desoxinucleósidos
DO	Densidad óptica
EDTA	Acido etilendiaminotetracetico
Fig.	Figura
g	Veces la fuerza de gravedad
HCl	Acido clorhídrico
min.	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
n	Tamaño de muestra
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometros
p	Significancia estadística
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg.	Segundos
sp	Especie no definida
T_m	Temperatura de fusión
UV	Ultravioleta
V	Voltios
X	Veces la concentración
°C	Grados centígrados
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar

RESUMEN

Marta Graciela Ortega Martínez

Fecha de graduación: Diciembre 1997

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: EVALUACION DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN EL DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS, ESTIMANDO EL ESPECTRO DE INFECCION EN HUMANOS EN UNA ZONA ENDEMICA

Número de páginas:

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias
con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería
Genética.

Area de Estudio: Medicina Molecular

Propósito y Método de estudio: La brucelosis es una zoonosis causada por bacterias del género *Brucella*, las cuales, dependiendo del organismo hospedero han sido clasificadas en *B. melitensis* (cabras), *B. abortus* (vacas), *B. suis* (cerdos), *B. canis* (perros), *B. ovis* (carneros) y *B. neotomae* (ratón americano). Tradicionalmente el diagnóstico de brucelosis se ha venido realizando mediante la valoración del cuadro clínico, pruebas serológicas y cultivo del microorganismo. Sin embargo, los primeros dos procedimientos tienen la desventaja de una limitada sensibilidad y especificidad, mientras que el tiempo de incubación del cultivo tarda al menos tres semanas. Desde su surgimiento, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha ofrecido nuevas alternativas en el diagnóstico de varias enfermedades. Recientemente en nuestro laboratorio se ha establecido un método de detección y diferenciación molecular de las especies del género *Brucella* basado en la PCR. Sin embargo este método fue aplicado solamente al DNA extraído de bacterias por lo que para su validación se requiere del análisis de muestras provenientes de personas con diferente probabilidad de exposición a la bacteria y de controles, además con la publicación de nuevas secuencias de *Brucella*, se ha necesitado actualizar el método original. Así, en este estudio nos propusimos evaluar la utilidad del método de detección y diferenciación de las especies del género *Brucella*, basado en la amplificación del locus Omp 2, para el diagnóstico en humanos. Con la ayuda de programas computacionales de Biología Molecular se rediseñaron los iniciadores originales modificando los sitios de restricción y haciéndolos más complementarios a la secuencia blanco. Con estos nuevos iniciadores se buscaron las condiciones más óptimas de amplificación, variando temperatura de apareamiento, concentración de MgCl₂ y concentración de los oligonucleótidos. Para evaluar la especificidad de especie del método, éste se aplicó a DNAs extraídos de cultivos de bacterias diferentes a *Brucella*. Para determinar el límite de detección se contaminaron muestras de sangre con diluciones seriales de una suspensión de *Brucella* de concentración conocida de las cuales se hizo extracción del DNA el cual se amplificó por PCR. Para probar la utilidad del método en la detección de *Brucella* en humanos se recolectaron muestras de sangre de personas clasificadas en diferentes grupos según su probabilidad de exposición y en controles sanos. El DNA extraído de estas muestras se analizó mediante PCR y se compararon sus resultados con los de las pruebas serológicas, cuadro clínico y, cuando correspondía, respuesta al tratamiento.

Contribuciones y Conclusiones: El rediseño de los iniciadores mejoró la intensidad de la señal y por lo tanto el límite de detección del método. Esto se debe también a que se determinaron las condiciones óptimas de amplificación con éstos. No se obtuvo señal de amplificación con los DNAs de especies probadas diferentes a *Brucella*, tanto de las aisladas de muestras clínicas, como de aquellas que dan reacción cruzada en las pruebas serológicas o que están relacionadas filogenéticamente con *Brucella*. Al evaluar el límite de detección se encontró que nuestro método es capaz de detectar reproduciblemente 90, 000 células/mL de sangre. No se observó señal en la prueba de PCR cuando se aplicó a el análisis de los grupos de personas previamente establecidos, sin embargo es una herramienta valiosa en la identificación de las especies de *Brucella* provenientes de cultivo.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Descripción de la Brucelosis	1
1.2 Epidemiología	2
1.3 Bacterias del Género <i>Brucella</i>	3
1.4 Diagnóstico	4
1.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa en el Diagnóstico de Brucelosis	6
1.6 Justificación del Estudio	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL Y METODOS	15
3.1 Origen de los Reactivos y Materiales Utilizados	15
3.2 Elementos de Bioseguridad	19
3.3 Optimación del Método	20
3.3.1 Rediseño de los Iniciadores	20
3.3.2 Optimación de las Condiciones de Amplificación	23
3.3.3 Extracción del DNA Genómico	24
3.3.4 Análisis y Cuantificación del DNA	26
3.3.5 Evaluación de la Especificidad de Especie	28
3.3.6 Determinación del Límite de Detección	29
3.4 Evaluación del Método	31

3.4.1	Aplicación del Método a las Personas Incluidas en el Estudio.	31
3.4.2	Análisis Estadístico Propuesto de los Resultados	37
4.	RESULTADOS	39
4.1	Optimación del Método	39
4.1.1	Rediseño de los Iniciadores	39
4.1.2	Optimación de las Condiciones de Amplificación	43
4.1.3	Evaluación de la Especificidad de Especie	44
4.1.4	Determinación del Límite de Detección	47
4.2	Evaluación del Método	48
4.2.1	Aplicación del Método a las Personas Incluidas en el Estudio	48
4.2.2	Análisis Estadístico de los Resultados	50
5.	DISCUSION	52
6.	CONCLUSIONES	57
	APENDICE	58
	REFERENCIAS BIBLOGRAFICAS	62

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I Grupo sospecha (prevalencia >50%)	37
II Grupo de alto riesgo (prevalencia >15%)	38
III Grupo de personas sanas (prevalencia de <1%)	38
IV Secuencias y sitios de apareamiento de los iniciadores utilizados por Sifuentes y cols y de los iniciadores rediseñados	39
V Resumen de los resultados de PCR con el DNA de aislados clínicos analizados para determinar la especificidad de especie	45
VI Distribución de los sujetos en los grupos de acuerdo a la edad, el sexo y tipo de exposición	48
VII Resultados observados en las pruebas serológicas	50
VIII Resultados observados en la PCR	51

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación de dos ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	7
2. Método de detección y diferenciación de las especies de <i>Brucella</i>	9
3. Amplificación teórica del <i>locus</i> <i>Omp2</i> en <i>B. abortus</i> con los cuatro iniciadores	10
4. Estrategia para la determinación del límite de detección del método	30
5. Aplicación del método a grupos de personas incluidos en el estudio	34
6. Apareamiento a la secuencia blanco de un iniciador, antes y después del rediseño	40
7. Simulación de la reacción de amplificación para el <i>locus</i> <i>Omp2</i> de <i>B. suis</i> con los iniciadores anteriores	41
8. Simulación de la reacción de amplificación para el <i>locus</i> <i>Omp2</i> de <i>B. suis</i> con los iniciadores rediseñados	42
9. Diferenciación por PCR de las especies de <i>Brucella</i>	44
10. Especificidad de especie del método	45
11. Prueba para descartar resultados falsos negativos en la determinación de la especificidad de especie	46
12. Límite de detección del método	47
13. Resultados representativos del análisis de amplificación del gen de la β -Globina en las muestras incluidas en este estudio	40
14. Curso de la brucelosis.	40

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Descripción de la Brucelosis

Las bacterias del género *Brucella* causan enfermedad primariamente en animales domésticos y en algunos silvestres. La brucelosis se considera una zoonosis debido a que habitualmente todas las infecciones que se presentan en humanos se adquieren al ingerir productos contaminados (derivados lácteos o cárnicos) provenientes de animales infectados, o al estar en contacto con los mismos (1).

En los animales, *Brucella* afecta principalmente los órganos reproductores y el aborto es generalmente el único signo de la infección (2).

La brucelosis en humanos puede presentarse como una enfermedad febril aguda o crónica, con una gran variedad de signos y síntomas. El periodo de incubación varia ampliamente, siendo de una semana hasta de varios meses (3).

La fase aguda puede parecerse a una enfermedad vírica sistémica con escalofríos, fiebre, cefalea, dolores óseos y articulares, aumento discreto de tamaño de los ganglios linfáticos y a veces hepatoesplenomegalia. Las recidivas son comunes y pueden ser seguidas de complicaciones localizadas, prolongando la enfermedad. La brucelosis crónica puede caracterizarse por fiebre transitoria (que en raras ocasiones supera los 40°C), dolores abdominales y musculoesqueléticos poco definidos, debilidad, pérdida de peso y a veces anemia. Por otro lado, la infección por *Brucella* puede en ocasiones ser enteramente subclínica (3).

En una comunidad pueden presentarse diferentes posibilidades entre los individuos con probable exposición a *Brucella*: grupos en riesgo alto, memoria inmunológica, infección asintomática, infección con síntomas muy ligeros, infección sintomática, complicaciones.

1.2 Epidemiología

La infección por bacterias del género *Brucella* en humanos tiene una distribución prácticamente mundial, sin embargo los países en vías de desarrollo son los más afectados. Se presenta principalmente en las poblaciones del área rural y urbana consumidora de productos lácteos crudos, derivados de cabras o de hatos de ganado vacuno infectados, cuando el control sanitario es deficiente. (4,5).

En los Estados Unidos de América, la incidencia anual de brucelosis ha descendido a menos de 200 casos anuales gracias a la pasteurización de la leche, el sacrificio de animales de rebaños enfermos y a la vacunación de éstos (3).

En México, la endemia de brucelosis en humanos tiene forma oscilatoria, variando con el tiempo y la entidad. En el periodo de 1985 a 1990 se registraron cerca de 4,000 casos por año, y durante 1990, sólo Jalisco, Campeche y Yucatán no reportaron casos a la Dirección General de Epidemiología. En la zona del Bajío y en el Norte se registran cada año más del 80% de todos los casos conocidos del país, situándose los estados de Nuevo León y Coahuila entre los primeros lugares (6,7).

1.3 Bacterias del Género *Brucella*

Las bacterias del género *Brucella* son cocobacilos gram negativos, aeróbicos, inmóviles, de tamaño pequeño y no formadores de esporas. Son parásitos intracelulares facultativos que crecen lentamente y que requieren de medios complejos para su aislamiento primario. El género *Brucella* incluye seis especies originalmente clasificadas de acuerdo al tipo de organismo hospedero: *Brucella melitensis* (cabras), *B. abortus* (vacas), *B. suis* (cerdos), *B. canis* (perros), *B. ovis* (carneros) y *B. neotomae* (ratón americano). Además, tres de las principales especies, en base al metabolismo oxidante de varios aminoácidos y carbohidratos, a la producción de ureasa y ácido sulfhídrico, al crecimiento en presencia de colorantes, a los antígenos

de la pared celular y a la susceptibilidad a bacteriófagos, pueden separarse en biovariedades: *B. melitensis* (3 biovariedades), *B. abortus* (7 biovariedades) y *B. suis* (5 biovariedades) (8, 9).

El poder patógeno para el hombre, de las diferentes especies de *Brucella* no es uniforme. *B. melitensis* es la especie más invasiva y la que produce las infecciones más severas; *B. abortus* produce infecciones generalmente más leves y *B. suis* en sus biovariedades 1, 3 y 4 ocasiona infecciones bastante invasivas con marcada tendencia a localizarse sobre todo en hígado y bazo. Las infecciones por *B. canis* son excepcionales y sólo se han descrito en cuidadores de perro. *B. suis* biotipo 2, *B. neotomae* y *B. ovis* no son patógenas para el hombre (8).

Para disminuir la incidencia de brucelosis en el ganado bovino se ha utilizado una vacuna constituida por gérmenes vivos atenuados (cepa 19 de *B. abortus*), la cual provoca una infección limitada, que va seguida de un período de inmunidad (8).

1.4 Diagnóstico de la Brucelosis

En el humano, el diagnóstico de brucelosis es primeramente dado por la revisión del historial clínico y el patrón típico de enfermedad febril; además se deben tomar en cuenta datos epidemilógicos, tales como ocupación del paciente, una probable exposición del mismo a productos lácteos o cárnicos contaminados y si vive o no en zonas endémicas. El

cuadro clínico de la brucelosis es fácilmente confundido con el de otras enfermedades febriles víricas o bacteriológicas, razón por la cual este primer paso se debe confirmar con pruebas serológicas y/o con el aislamiento de la bacteria (4,7).

En México, el diagnóstico se confirma generalmente por métodos serológicos, siendo los más usuales las reacciones febriles, que son rápidas y relativamente fáciles de realizar, pero presentan la desventaja de una sensibilidad y especificidad insuficientes (50 y 84.6%, respectivamente). Sin embargo, de manera adicional éstas pueden complementar con las pruebas de aglutinación en placa con Rosa de Bengala y en tubo con β -mercaptoetanol; esta última permite diferenciar una enfermedad activa de una crónica (4, 6).

El diagnóstico más confiable se basa en el aislamiento del microorganismo, siendo el cultivo de sangre el método de elección. Sin embargo, la proporción de cultivos positivos de *Brucella* varía entre el 15 y el 85%. Varios factores explican este poco éxito, entre los cuales se pueden mencionar: el número y la frecuencia con que se obtienen los hemocultivos, el día y la hora seleccionados para la toma de la muestra, ya que se ha observado una correlación entre la positividad y el estado febril del paciente, y el antecedente de haber recibido antibioticoterapia. En individuos con brucelosis crónica es aún más difícil el aislamiento, ya que el paso de brucelas a la circulación es muy poco frecuente. Otra desventaja notable del método es que se requiere por lo menos de tres semanas de incubación de los cultivos (4).

Cabe señalar que en el país, la búsqueda cotidiana de *Brucella* mediante su aislamiento de muestras de pacientes es prácticamente nula, especialmente en las instituciones del sector público, lo cual tiene como consecuencia un alto porcentaje de diagnósticos falsos (4,6)

Las bacterias de este género tienen ciertas características metabólicas que permiten su tipificación una vez que se han aislado. *B. abortus* se diferencia de otras especies, ya que, al ser aisladas, requiere de una atmósfera que contenga del 5 al 10% de CO₂. Todos estos microorganismos producen catalasa y descomponen la urea; raramente se produce la fermentación de azúcares. Aunque existen diferencias en el metabolismo de las especies del género *Brucella*, éstas son difíciles de distinguir (8).

1.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa en el Diagnóstico de Brucelosis

Gracias a la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés, Polymerase Chain Reaction) es posible obtener millones de copias de un gen o segmento de ácido desoxirribonucleico (DNA, del inglés Desoxirribonucleic acid) (Fig. 1), del cual existe una o algunas copias dentro de los cientos de miles que pueden llegar a constituir el genoma de un organismo. La PCR ha planteado nuevas alternativas en el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades tanto infecciosas como genéticas (10).

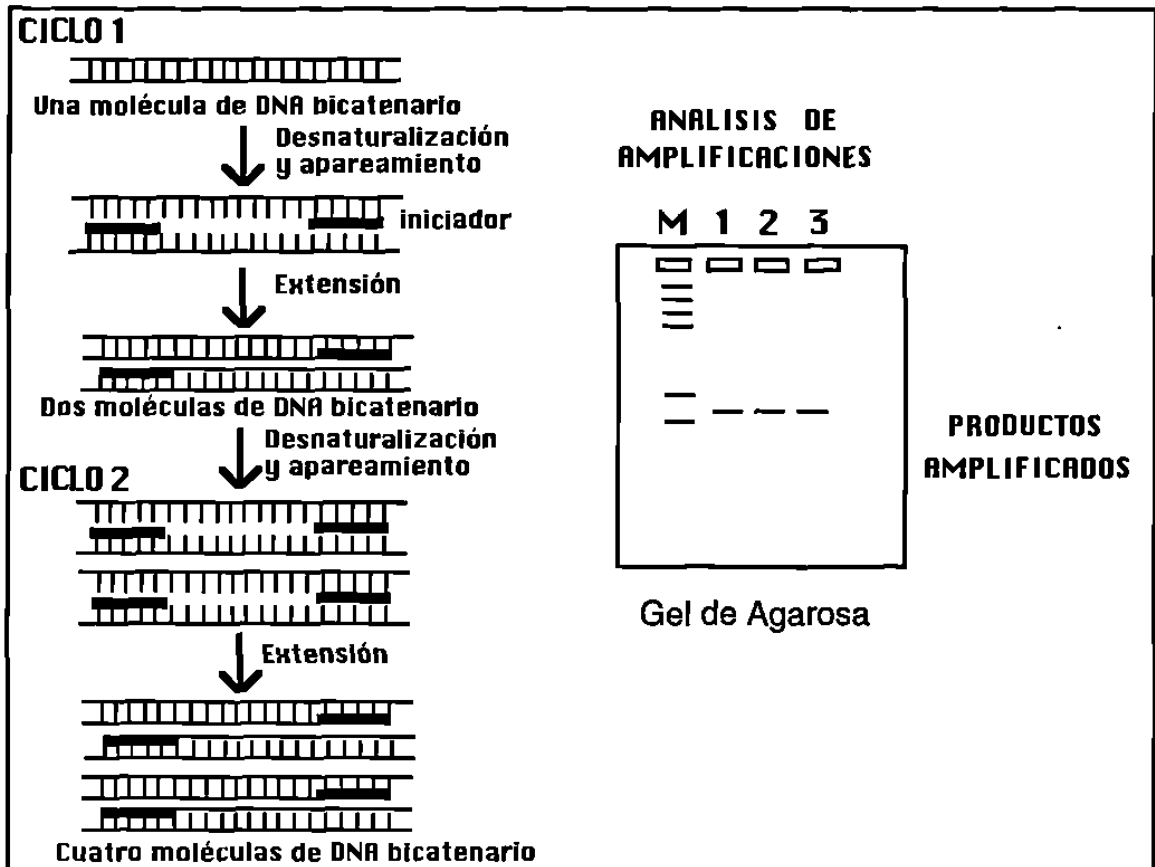


Figura 1. Representación de dos ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se ilustran dos ciclos de la PCR. En cada ciclo, que consta de los pasos de desnaturalización, apareamiento y extensión, se duplican las cadenas de DNA blanco existentes al inicio (panel izquierdo). Al resolver los productos de las amplificaciones, por electroforesis en gel de agarosa, se observan bandas únicas correspondientes a los fragmentos de los DNAs amplificados millones de veces (panel derecho). M= marcador de peso molecular.

Todas los microorganismos del género *Brucella* están estrechamente relacionadas compartiendo un alto grado de similitud a nivel de las secuencias de sus DNAs genómicos(11), lo cual facilita la identificación del género pero dificulta la de las especies que lo constituyen. Sin embargo, se

han encontrado variaciones genéticas entre las especies que permiten la implementación de técnicas para su diferenciación (11).

Recientemente, en nuestra Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas se ha establecido un método de detección y diferenciación molecular de las especies del género *Brucella* (Fig. 2), basado en la PCR, el cual ofrece ventajas en rapidez, especificidad y sensibilidad. Esto se logró utilizando cuatro iniciadores, obteniéndose bandas de 900, 600y 200 pb para *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae*; de 900 y 600 pb para *B. canis* ; de 900 para *B. ovis* y de 720, 600 y 200 pb para *B. abortus* . Se utilizó un polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción (RFLP) para la enzima *Kpn* I de uno de los productos de amplificación (900pb) para distinguir entre las tres especies que presentan el mismo patrón de amplificación. En *B. melitensis* la enzima digiere el producto en dos bandas, *B. suis* carece de este sitio de restricción y *B. neotomae* presenta una combinación de estos dos patrones (12).

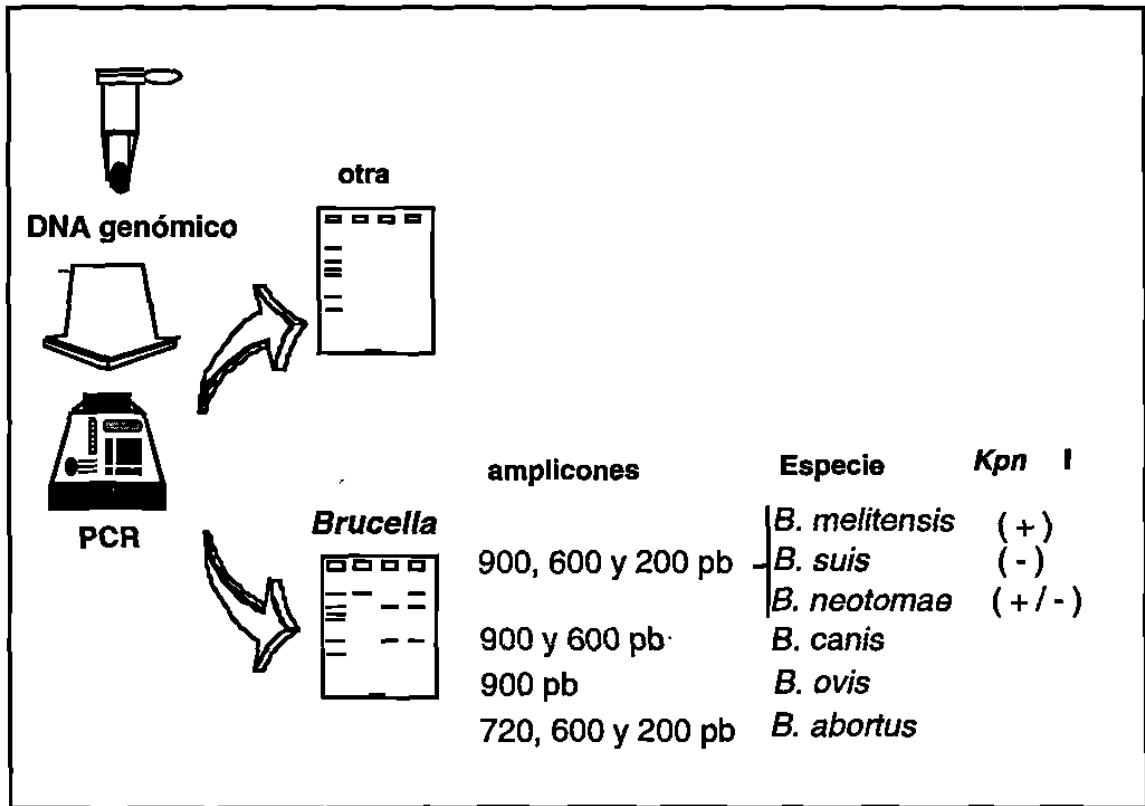


Figura 2. Método de detección y diferenciación de las especies del género *Brucella*. Utilizando una PCR con cuatro iniciadores y un polimorfismo para la enzima *Kpn I*, se logra la detección y diferenciación de las seis especies del género *Brucella*.

Los iniciadores requeridos para esta prueba de PCR fueron diseñados a partir de la secuencia reportada por Fitch y cols. para el *locus* *Omp 2* de *B. abortus* (Fig. 3).

Este *locus* consta de dos genes muy similares entre sí, con sentido transcripcional opuesto y apuntando hacia el exterior del *locus*, los cuales codifican para proteínas de membrana externa con características de porina. La conservación de este *locus* en las especies del género *Brucella* permite la detección específica de este género, mientras que las diferencias que existen

en las secuencias de ambos genes, son suficientes para lograr la diferenciación de las especies (11).

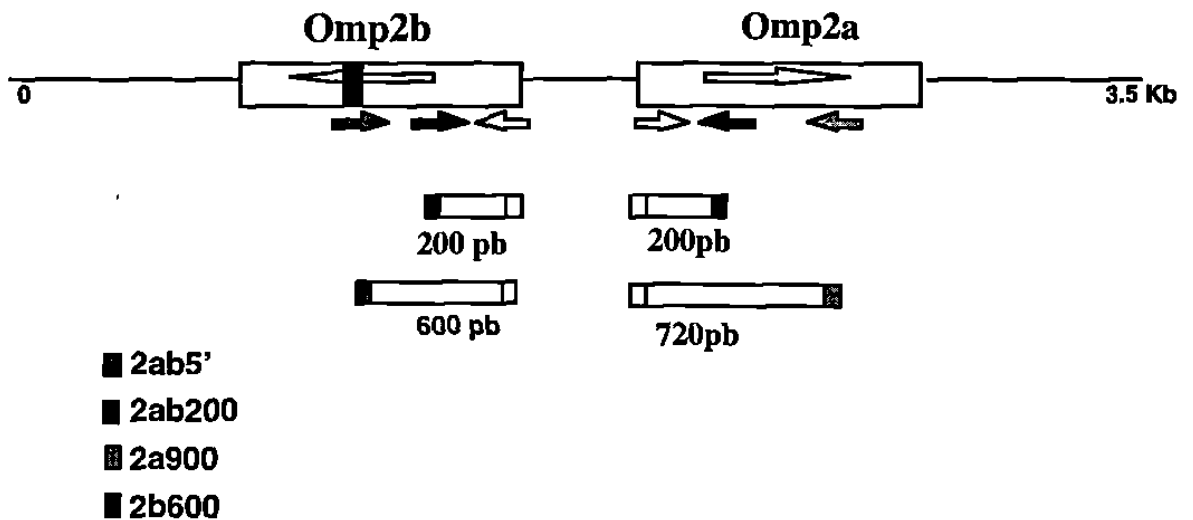


Figura 3.- Amplificación teórica del locus Omp 2 en *B. abortus* con los cuatro Iniciadores. Las flechas indican los sitios de apareamiento de los iniciadores y las barras los tamaños de los principales productos obtenidos después de practicar la PCR. El cuadro oscuro dentro del gen Omp 2b corresponde a un segmento de 108 pb ausente en el gen Omp 2a.

Para el diagnóstico de brucelosis en animales, ya se han empleado métodos basados en la PCR para la detección de *Brucella* en fluídos tales como leche y sangre (13), mientras que en humanos, aunque se ha llegado a aplicar esta metodología (13), todavía no es posible hacer un diagnóstico rutinario.

1.6 Justificación del Estudio

Aunque se han identificado todos los elementos para el control de la brucelosis tanto en los humanos como en los animales, una de las principales limitantes para su total abatimiento es la dificultad para lograr un diagnóstico temprano y confiable, ya que es una enfermedad que clínicamente puede ser confundida con muchas otras. Actualmente los métodos de diagnóstico más empleados, no cumplen con los requisitos anteriores ya que el cultivo requiere de un mínimo de tres semanas y que las pruebas serológicas presentan reacciones cruzadas con otros microorganismos. Por lo anteriormente mencionado es necesario el establecimiento de un método diagnóstico de brucelosis rápido y específico.

Recientemente una nueva metodología basada en la PCR fue descrita por Sifuentes y cols. (14), sin embargo, ésta fue desarrollada a partir de DNAs extraídos de bacterias. Para su validación en el diagnóstico de brucelosis en humanos, se requiere del análisis de muestras provenientes de grupos de sospecha clínica, alto riesgo y controles, apoyándose en un diseño estadístico adecuado, comparando los resultados obtenidos de la PCR con otros métodos. Al integrarse estos resultados permiten estimar la validez de la prueba analizada. La validez de una prueba corresponde al grado en el que el resultado positivo de un procedimiento diagnóstico refleje la verdadera situación del enfermo. Para determinarla, es necesario analizar sus dos componentes: la sensibilidad (se refiere a la capacidad de la prueba de dar un resultado positivo cuando la persona analizada tiene la

enfermedad) y la especificidad (se refiere a la capacidad de la prueba de dar un resultado negativo si la persona no tiene la enfermedad) (15).

Además, recientemente se reportaron en el GenBank nuevas secuencias del *locus* Omp 2 de *Brucella* , por lo cual pudimos aprovechar estos datos para mejorar el diseño de los iniciadores del método de Sifuentes y cols.

El presente estudio se realizó con el objetivo principal de probar la eficiencia de esta prueba de PCR que pudiera cumplir con las necesidades de rapidez y especificidad.

CAPITULO 2

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad del método de detección y diferenciación de las especies del género *Brucella*, basado en la amplificación del *locus* Omp 2, para el diagnóstico en humanos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.1.- Optimizar el método de detección y diferenciación para bacterias del género *Brucella*, previamente desarrollado en nuestro laboratorio por Sifuentes y cols.

2.1.1 Diseñar nuevos iniciadores aprovechando el reporte de las secuencias de todas las especies de *Brucella*.

2.1.2 Optimizar la PCR con estos iniciadores rediseñados.

2.1.3 Demostrar la especificidad de especie del método con los nuevos iniciadores.

2.1.4 Valorar el límite de detección del método, analizando muestras reconstruidas con sangre y diluciones de la bacteria.

2.2 Evaluar la utilidad del método en la detección de *Brucella* en humanos.

2.2.1 Poner a prueba el método en muestras de sangre de grupos de individuos con diferente probabilidad de positividad.

2.2.2 Comparar los resultados obtenidos con el diagnóstico establecido por métodos tradicionales.

2.2.3 Calcular la especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del método, como prueba para el diagnóstico de la enfermedad en cualquiera de sus etapas, en humanos.

CAPITULO 3

MATERIAL Y METODOS

3.1. Origen de los Reactivos y Materiales Utilizados

Insumos biológicos

Se utilizaron muestras de sangre de las personas incluídas en este estudio. Para la recolección de las muestras se contó con la colaboración del Servicio de Infectología del Hospital Universitario "Dr. José E. González". Los cultivos de las bacterias probadas fueron proporcionados por el Departamento de Microbiología de esta Facultad.

Reactivos químicos

Para el aislamiento del DNA se utilizó EDTA, SDS, NaCl, Tris-HCl, tritón, fenol saturado (de acuerdo a Sambrook y cols.), cloroformo, alcohol isoamílico y etanol adquiridos todos en Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, EUA) y en JT Backer (San Antonio, TX, EUA).

La PCR se realizó con iniciadores sintetizados en el Instituto de Genética y de Biología Molecular y Celular (IGBMC) de Estrasburgo, Francia. El aceite mineral estéril fue comprado a Sigma Chemical Company.

Para establecer el límite de detección se utilizó la vacuna comercial "Brucel N-19" elaborada por Productora Nacional de Biológicos Veterinarios en México D.F.

Para la realización de las pruebas serológicas se utilizó el antígeno de *B. abortus* (Febriclin, Huddleson) elaborado por Sanofi Diagnostics Pasteur en México D.F.

Enzimas

La DNA polimerasa Taq fue adquirida de Promega (Madison, WI, EUA).

Material

Los tubos de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL y las puntillas de 0.2 y 1.0 mL fueron comprados a Cel Associates (Houston, TX, EUA), los tubos de 15 y 50 mL fueron comprados a Falcon, Becton Dickinson and Co (New Jersey, E.U.A.), también se utilizaron guantes de latex Première (Ormond Beach, FL, E.U.A.) y las pipetas de precisión de 2, 20, 200 y 1000 μ L a Rainin Instruments (Woburn, MA, E.U.A).

Equipo

Para analizar los productos de la PCR se utilizó una cámara horizontal Fotodyne y una fuente de poder BRL modelo 250; ácido

bórico, agarosa y colorantes xilencianol y azul de bromofenol, comprados a Sigma Chemical Company.

Fue utilizada la centrífuga Centra MP4R de IEC (Needham Heights, MA, E.U.A). La cuantificación y el análisis de la calidad de los DNAs fue realizada utilizando un espectrofotómetro Beckman modelo DU-50 (Fullerton E.U.A.), cámaras de electroforesis horizontales Fotodyne (Hartland, WI, E.U.A.) y una fuente de poder BRL modelo 250 (Gaithersburg, MD, E.U.A.). También se utilizó un termociclador automatizado minicycler™ de la compañía MJ Research (Watertown, MA, E.U.A.), una campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (Kansas City, MI, E.U.A). Para tomar las fotografías fue utilizada una cámara fotográfica Fotodyne modelo FCR-10 (New Berlin, WI, E.U.A.) y película Polaroid 667 ISO 3000/36° blanco y negro de Polaroid de México (México D.F.). Otros equipos utilizados fueron microcentrífuga Eppendorf modelo 5402 (Hamburg, Germany), placa agitadora con control de temperatura Thermolyne cimarec 2 (Dubuque, Iowa, USA), ultracongelador So-Low de Enviromental Equipment (Cincinnati, OH, E.U.A.), báscula digital Sartorius 1206 MP (Camibh, Göttingen, Germany), baño de temperatura Precision® modelo 181 de Precision Scientific inc. (Chicago, Illinois, USA), potenciómetro Orion modelo 520A de Orion Research inc. (Boston, USA), un agitador Maxi Mix II Thermolyne tipo 37600 (Dubuque, Iowa, USA), evaporador concentrador Labconco Corporation modelo 78100-00 (Kansas, MI, E.U.A.), un transiluminador de luz ultravioleta marca Fotodyne modelo Photo//Phoresis I (New Berlin, WI, E.U.A.), un horno de microondas marca GoldStar Co. Ltd. (Seoul, Corea del Sur) y una

campana de seguridad biológica clase II LABCONCO (Kansas, MI, E.U.A.) equipada con filtros HEPA.

El procesamiento de datos fue realizado en las computadoras modelos Macintosh Classic II, Macintosh LC III y Macintosh Power PC (Apple Computer, Inc.; Cupertino, California. EUA). Los periféricos compatibles utilizados fueron el Modem Global Village Communication Inc. modelo Teleport/Silver A801 (East Middlefield Road Mountain View Ca. EUA) y un digitalizador de imágenes de cama plana UMAX data System Inc. modelo UC630 MaxColor (Industrial Park Hsinchu Taiwan, R.O.I.).

El procesador de textos utilizado fue de *Microsoft Word* versión 5.1a (© 1987-1992 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos *Microsoft PowerPoint* Versión 3.0 (© 1987-1992 Microsoft Corporation), *Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1* (© 1989-1993 Adobe Systems Incorporated) y *UMAX Scan* (© 1990-1991 UMAX Scanner Driver, Impact Research Inc.).

Los programas de análisis en biología molecular fueron el *Amplify* Versión 1.2b (Bill Engels ©1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, Wi. EUA) y el *DNA Strider*™ 1.1 (© Ch. Marck and C.E.A 1989 Service de Biochimie-Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), *OLIGO*. Ver 4.0 (© 1992, Plymouth, Mn, EUA).

3.2. Elementos de Bioseguridad

Para el manejo del material infeccioso se siguieron las recomendaciones del nivel de bioseguridad 2 (16).

1.- El material potencialmente infeccioso (sangre y la vacuna de *B. abortus*) se manipuló bajo una campana de bioseguridad de clase II equipada con filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air). Se trabajó en una sección construida con un sistema de ventilación de una única entrada de aire para mantener la circulación en una sola dirección de un área limpia a otra menos limpia. El flujo a través de la campana se ajustó para que proporcionara una presión de 0.35 pulgadas de agua.

2.- Se utilizó ropa de protección especial : guantes, cubrebocas y bata.

3.- Se utilizaron para desinfectar las superficies externas del material empleado, soluciones de formaldehído al 5% (v/v) en agua y de etanol al 70% (v/v) en agua.

4.- Una vez trabajadas las muestras, el material que las contenía se guardó en bolsas y se esterilizó.

5.- El estado de salud de la persona que manejó el material infeccioso se verificó mediante la realización de pruebas serológicas antes y después de iniciar la parte experimental del proyecto.

Para cumplir con los objetivos anteriormente descritos, se llevó a cabo la siguiente estrategia experimental:

3.3 Optimación del Método de Detección y Diferenciación para Bacterias del Género *Brucella*, Desarrollado por Sifuentes y cols.

3.3.1 Rediseño de los Iniciadores

Las secuencias del *locus* Omp 2 de todas las especies de *Brucella* se obtuvieron del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information; Bethesda, MD., EUA) a través de la red internacional de cómputo Internet, utilizando el programa NETSCAPE en una computadora Macintosh Power PC. Para la búsqueda se utilizaron palabras claves tales como "*locus* Omp 2" y "*Brucella*".

Una vez que se obtuvieron las secuencias, basándose en las mismas y en los iniciadores antes utilizados, se procedió al rediseño de estos últimos.

Los iniciadores previamente diseñados por Sifuentes y cols. incluyen en la parte 5' de su secuencia un sitio de restricción que facilita la clonación del fragmento de PCR. Sin embargo, estos sitios de restricción introdujeron despareamiento entre la secuencia blanco y el iniciador. Para mejorar los iniciadores, se cambiaron los sitios de restricción de los iniciadores por bases que los hicieran más complementarios a la secuencia blanco, desplazándose ligeramente del sitio de apareamiento original, para obtener

el número máximo de apareamientos legítimos posible entre las bases del DNA blanco y del iniciador.

Posteriormente se simuló la amplificación con los nuevos iniciadores mediante el programa Amplify 1.2, alimentando a la computadora con cada una de las secuencias de las especies de *Brucella* por separado. Mediante este programa se investigó la calidad de apareamiento de los oligonucleótidos con cada una de las secuencias blanco, analizando características tales como capacidad de iniciación y estabilidad entre los mismos.

Mediante el programa Oligo 1.4 (National Bioscience, Inc.) se realizó un análisis de complementariedad inter e intraoligonucleótidos y se determinaron las temperaturas de fusión (T_m) de cada uno de los iniciadores. Estas T_m s se utilizaron para calcular la temperatura de apareamiento de cada uno de los fragmentos amplificados mediante las siguientes ecuaciones:

Temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos (17).

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = \left[\frac{\Delta H}{\Delta S + S^{\circ}} - R \cdot \ln (C/4) \right] - 273.15 + 16.6 \log [K^+]$$

donde T_m = temperatura de fusión del oligonucleótido

ΔH = cambio de entalpía

ΔS = cambio de entropía

C = concentración del oligonucleótido

$[K^+]$ = concentración molar de iones potasio

S° = valor de la entropía en las condiciones estándares

Temperatura de fusión (T_m) del fragmento amplificado (18).

$$T_m = 16.6 \log [K^+] + 0.41\%GC - 675/L + 81.5$$

donde T_m = temperatura de fusión del fragmento teórico amplificado

$[K^+]$ = concentración molar de iones potasio

$\%GC$ = porcentaje de nucleótidos G+C en el fragmento amplificado

L = longitud del fragmento amplificado

Temperatura de óptima de apareamiento ($T_{a^{opt}}$) (19).

$$T_{a^{opt}} = 0.3 T_m \text{ iniciador} + 0.7 T_m \text{ producto} - 14.9$$

donde $T_{a^{opt}}$ = temperatura óptima de apareamiento

T_{mp} = temperatura de fusión

Finalmente, cuando se obtuvieron los mejores iniciadores en cuanto a las características anteriormente señaladas, se realizó un análisis de su similitud con respecto a todas las secuencias nucleotídicas reportadas en el Gen Bank, mediante el servicio Blast (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI, con el fin de verificar su especificidad hacia las secuencias del género *Brucella*.

3.3.2 Optimaci3n de las Condiciones de Amplificaci3n

Se buscaron para estos nuevos iniciadores las condiciones 3ptimas de amplificaci3n variando, de las ya conocidas para los originales, los par3metros de concentraci3n tanto de $MgCl_2$, como de oligonucle3tidos.

Las condiciones 3ptimas de amplificaci3n utilizando los iniciadores originales eran: 25 ng de DNA de las bacterias en un volumen total de 25 μL , usando 1.25 U de DNA polimerasa *Taq*, 0.1 μM de cada iniciador, 200 mM de dNTP's y 3 mM de $MgCl_2$. La amplificaci3n se practic3 utilizando un termociclador programado de la siguiente manera:

- | | | |
|---|---|---|
| 1 | 94°C, 4 min | Paso de desnaturalizaci3n inicial |
| 2 | 94°C, 1 min | Paso de desnaturalizaci3n de cada ciclo |
| 3 | 66°C, 1 min | Paso de apareamiento de cada ciclo |
| 4 | 72°C, 1 min, 30 seg | Paso de extensi3n de cada ciclo |
| 5 | Repetir 35 ciclos (de los pasos 2 al 4) | |

Utilizando el mismo programa, se procedi3 a probar las concentraciones de oligonucle3tidos, variando la misma desde 0.2 a 0.5 μM para cada uno de los cuatro. Cuando se encontraron las condiciones 3ptimas para este par3metro, se hizo una titulaci3n de $MgCl_2$ amplificando muestras de todas las especies de *Brucella* con 3, 4, 5 y 6 mM de dicha sal.

3.3.3 Extracción del DNA Genómico

a) Extracción del DNA genómico de cultivos bacterianos

El DNA de las especies bacterianas se preparó a partir de cultivos utilizando el siguiente método de extracción (20): 10 mL de cultivo de cada una de las especies bacterianas preparados en el Departamento de Microbiología se centrifugaron por 2 minutos a 10,000 g a 4°C, se eliminó el medio de cultivo sobrenadante, y la pastilla bacteriana se resuspendió en 500 µL de agua ultrapura. Se transfirieron las células a un tubo de microcentrifuga de 2 mL, se centrifugó por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se añadieron 200 µL de buffer buffer de lisis (Tritón 100X al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl a 10 mM y EDTA a 1 mM, pH 8) y 500 µL de fenol saturado con Tris-HCl 10 mM pH 8.0 (21). Se mezcló completamente por inversión durante un min.

Posteriormente, se agregaron 100 µL de Sevag (cloroformo-alcohol isoamílico, 24:1) y se agitó en Vortex durante 5 min. Una vez concluida la agitación, se añadió a la mezcla 200 µL de TE 1X (EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM pH 8) y se procedió inmediatamente a centrifugar por 20 min a 14,000 g y 4°C. Concluida la centrifugación, se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrifuga de 2 mL y se precipitó el DNA agregando 1 mL de etanol al 100%.

Por último, se centrifugó el tubo por 2 min a 14,000 g y 4°C para decantar el sobrenadante, se hizo un lavado con etanol al 70% se centrifugo

nuevamente por 2 min a 14,000 g y 4°C para decantar el sobrenadante. La pastilla se secó al aire y el DNA se resuspendió en 30 µL de TE mediante agitación durante 12 ó 14 horas en una plataforma vertical, para posteriormente determinar su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa por un lado, y su pureza y concentración por espectrofotometría de luz ultravioleta (UV) por el otro.

b) Extracción de DNA genómico a partir de muestras de sangre

El DNA proveniente de la muestras de sangre contaminadas con la vacuna, se preparó utilizando el método de extracción descrito anteriormente, pero con algunos cambios: se colocó la muestra de sangre contaminada en un tubo de polipropileno de 15 mL y se añadieron 400 µL de buffer de lisis y 1 mL de fenol saturado. Se mezcló completamente por inversión durante un min. Posteriormente, se agregaron 200 µL de Sevag y se agitó en Vortex durante 5 min. Una vez concluida la agitación, se añadió a la mezcla 400 µL de TE y se procedió inmediatamente a centrifugar por 20 min a 14,000 g y 4°C. Una vez concluida la centrifugación, se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se precipitó el DNA agregando 1 mL de etanol al 100%.

Por último, se centrifugo por 2 min a 14,000 g y 4°C para decantar el sobrenadante y se resuspendió el DNA en 100 µL de TE mediante agitación durante 12 ó 14 horas en una plataforma vertical, para posteriormente determinar su concentración y calidad.

Para la obtención del DNA de las personas incluidas en este estudio se siguió el procedimiento previamente descrito, solamente variando los volúmenes de los reactivos utilizados de acuerdo al volumen de cada una de las muestras recibidas. Una vez obtenido el DNA, se determinó su concentración y calidad por la metodología que se describe a continuación.

3.3.4 Análisis y Cuantificación del DNA

La concentración de DNA se determinó por la medición espectrofotométrica de la cantidad de radiación UV absorbida a 260 nm. Para ello, se colocó 1 ml de TE en una celda de cuarzo, se calibró el espectrofotómetro a cero de absorbancia y se añadió 1 μ L de la muestra, se mezcló bien por inversión y se tomaron lecturas a 260 nm y 280 nm. La concentración del DNA se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Conc.de DNA ng}/\mu\text{L} = (50) (\text{factor de dilución}) (\text{Absorbancia a 260 nm})$$

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{volumen total después de la dilución}}{\text{volumen tomado de la muestra}}$$

Una unidad de densidad óptica corresponde a 50 μ g/mL de DNA de doble cadena. La calidad del DNA se estimó con el cociente de las lecturas a 260 nm y 280 nm (DO_{260}/DO_{280}), el cual nos da una estimación de la pureza del ácido nucleico. Una preparación de alta pureza de DNA tiene una relación DO_{260}/DO_{280} entre 1.8 y 2.0. Al haber contaminación con proteínas

o fenol, esta relación puede disminuir e incluso afectar la precisión de la cuantificación.

La estimación de la cantidad de DNA en la muestra de interés, se corroboró sometiendo el mismo a una electroforesis y utilizando la fluorescencia emitida por las moléculas de bromuro de etidio intercaladas entre sus bases e inducida por la radiación UV, comparándola con la fluorescencia de una serie de estándares. Asimismo, se evaluó la integridad del DNA en base a su perfil electroforético, evidenciando la degradación por la presencia de un barrido, el cual inicia abajo de la banda del DNA y se proyecta hacia la parte inferior del gel.

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (Tris-Borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 2.5 mM pH 8.0), el cual una vez gelificado se depositó en una cámara de electroforesis y se cubrió con buffer. Se mezcló 1 μ L de la muestra a cuantificar con 1 μ L de jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25%, Xilencianol al 0.25% y glicerol al 30%) y 4 μ L de TE. De la misma manera, se preparó una serie de estándares substituyendo el DNA a cuantificar por cantidades conocidas y variables de las muestras estándares. La serie de preparaciones se colocó en los carriles del gel y se realizó la electroforesis inicialmente a 60 V mientras penetraban las muestras dentro del gel y posteriormente a 100 V por 1 hora.

Concluida la electroforesis, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio a 2 μ g/mL por 5 ó 10 min y luego se lavó varias veces con agua de la llave para quitar el exceso del colorante fluorescente y así proceder a visualizar el DNA en un transiluminador de luz UV. Se

determinó la concentración del DNA por comparación visual con los estándares. La integridad se evaluó tomando en cuenta la intensidad del barrido, la cual determina el grado de degradación; la ausencia de tal barrido indica que el DNA extraído está mayoritariamente íntegro.

3.3.5 Evaluación de la Especificidad de Especie

Para evaluar la especificidad de especie, se extrajo el DNA de bacterias diferentes a *Brucella* que se pueden encontrar en una muestra clínica y se sometió a la reacción de amplificación que ya había sido optimizada. Las especies bacterianas analizadas fueron las siguientes:

Acinetobacter calcoaceticus

Escherichia coli

Klebsiella pneumoniae

Vibrio cholerae

Salmonella enteritidis

Salmonella typhimurium

Pseudomonas sp

Serratia marcescens

Shigella sp

Streptococcus faecalis

Staphylococcus epidermidis

Yersinia enterocolitica

Staphylococcus aureus

Proteus mirabilis

Listeria monocytogenes.

En la reacción de amplificación se colocaron 500 ng de DNA bacteriano y se incluyeron un testigo positivo (25 ng de DNA de *Brucella melitensis*) y uno negativo (agua).

Para descartar la presencia de inhibidores en el DNA de cada una de las bacterias, los cuales pudieran conducir a resultados falsos negativos, se contaminó el DNA de *Brucella* con el de cada una de ellas y se sometieron a amplificación junto con un testigo positivo (25 ng de DNA de *Brucella melitensis*) y uno negativo (agua).

3.3.6 Determinación del Límite de Detección

Para establecer el límite de detección del método, se realizaron diluciones seriadas de la vacuna comercial Brucel N-19 (*Brucella abortus* cepa 19) y con 500 μ L de cada una de éstas se contaminaron muestras de 500 μ L de sangre (anticoagulada con EDTA 5 mM), provenientes de una persona sin ningún antecedente previo de brucelosis, además se incluyeron un control positivo (vacuna) y un control negativo (sangre sin contaminar). Posteriormente se realizó la extracción de DNA, el cual se amplificó por PCR con los cuatro iniciadores (Fig. 4). Este experimento se llevo a cabo de manera completa en tres ocasiones, amplificando por duplicado en cada una

de ellas todas las muestras contaminadas con las diferentes diluciones, es decir, cada una de las diluciones se amplificó en total seis veces.

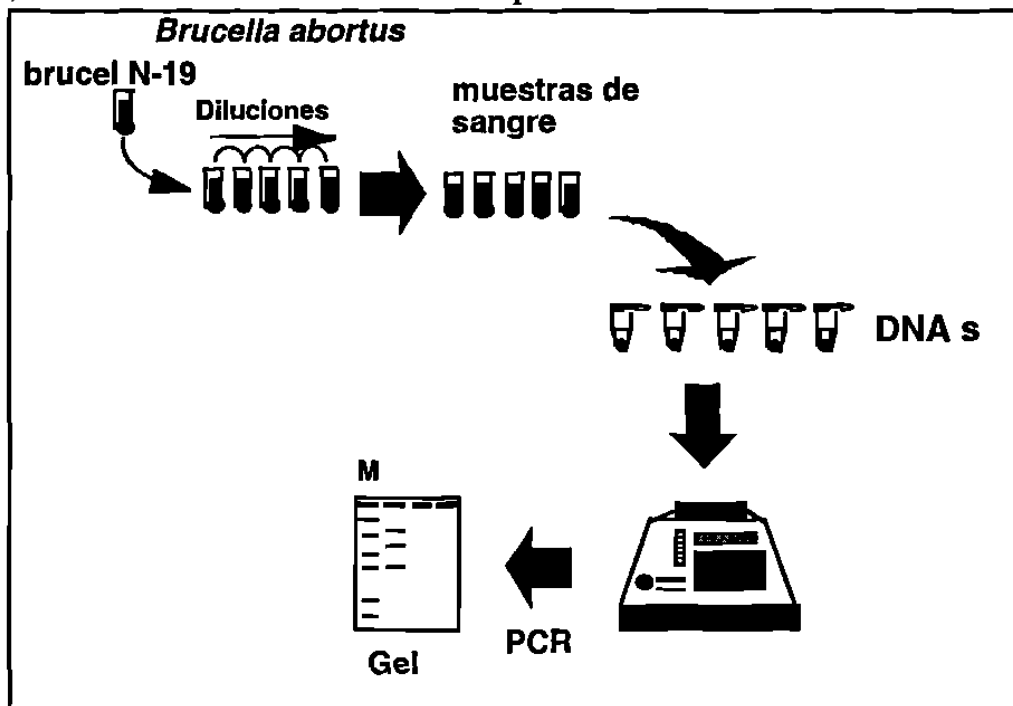


Figura 4. Estrategia para la determinación del límite de detección del método. Se contaminaron muestras de sangre completa con concentraciones conocidas de *Brucella* y el DNA extraído de las mezclas se sometió a la PCR con los cuatro iniciadores, específicos para *Brucella*.

En la reacción de amplificación se colocaron 2 μg de DNA y se incluyeron un testigo positivo (25 ng de DNA de *Brucella melitensis*) y uno negativo (agua). El producto de la amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 2%.

3.4 Evaluación de la Utilidad del Método en la Detección de *Brucella* en Humanos

3.4.1 Aplicación del Método en Muestras de Sangre de Grupos de Individuos con Diferente Probabilidad de Positividad

Este estudio tiene un diseño prospectivo, porque se reclutaron los casos incidentes de Marzo del 95 a Abril del 96; comparativo porque se contrastaron los resultados del PCR contra los de serología y clínica; y ciego porque el grupo que llevo a cabo los ensayos de PCR desconocia los resultados del grupo que realizó las pruebas serológicas y que recopiló los datos del cuadro clínico y, cuando correspondía, los datos de la respuesta al tratamiento, y viceversa; esto con individuos con diferente probabilidad de positividad.

Se definieron 3 grupos: grupo sospecha, grupo de alto riesgo y controles sanos. Los individuos considerados en el estudio se ubicaron en uno de los tres grupos según los criterios de inclusión que se presentan a continuación:

1. Grupo con sospecha clínica: pacientes con cuadro febril congruente con exposición.

2. Grupo de alto riesgo: sin cuadro sintomático y trabajo directo con animales o sus productos por al menos 6 meses como sería el caso de veterinarios, trabajadores de rastro y rancheros.

3. Controles sanos: individuos con historial negativo de exposición, sin síntomas y sin antecedente de infección por *Brucella*.

Se estableció un tamaño de muestra tomando en cuenta la probabilidad de prevalencia de los grupos y la capacidad de contraste entre los mismos.

$$n = (1.96)^2 \frac{p(1-p)}{(\text{error tolerado})^2}$$

$$n = 2(a + b)^2 \left[\frac{p - (1-p)}{(p_1 - p_2)^2} \right]$$

Grupo sospecha (prevalencia probable 50%), n=40

Grupo riesgo alto (prevalencia probable 15%), n=100

Grupo sano (prevalencia probable 1%), n=20

El incluir 40 individuos en el grupo sospecha permite encontrar el 50% de positividad y contrastarlo con el 15% de positividad correspondiente al grupo de alto riesgo, en el cual se incluyeron 100 individuos. En el grupo de controles sanos consideramos más que un 1% de positividad, un 99% de no probabilidad de infección, por lo que se incluyeron 20 individuos.

Los individuos se reclutaron secuencialmente en el término de un año. Fueron elegibles los que cumplieron con los criterios y aceptaron participar. A cada participante se le aplicó un cuestionario del que se derivó

información necesaria para su reclutamiento y su asignación en el grupo correspondiente (apéndice 2).

Grupo sospecha: se incluyeron los casos incidentes secuencialmente de Marzo del 95 a Abril del 96.

Grupo de alto riesgo: personas pertenecientes a comunidades de alto riesgo, específicamente de las rancherías de Acatita, Las Encinas y otras comunidades de Saltillo, Coahuila.

Grupo de controles sanos: personas voluntarias que cumplieron con los correspondientes criterios de inclusión antes mencionados.

De cada una de las personas incluidas en el estudio, se recolectaron de 2 a 5 mL de sangre total anticoagulada con EDTA 0.5 mM para hacer la extracción de DNA y 2 a 5 mL de sangre total sin anticoagulante para la obtención del suero utilizado en la realización de las pruebas serológicas. Además se tomaron los datos del cuadro clínico de los pacientes, y a los que resultaron positivos para las pruebas serológicas, se les dió tratamiento con el fin de evaluar su respuesta al mismo (Fig. 5).

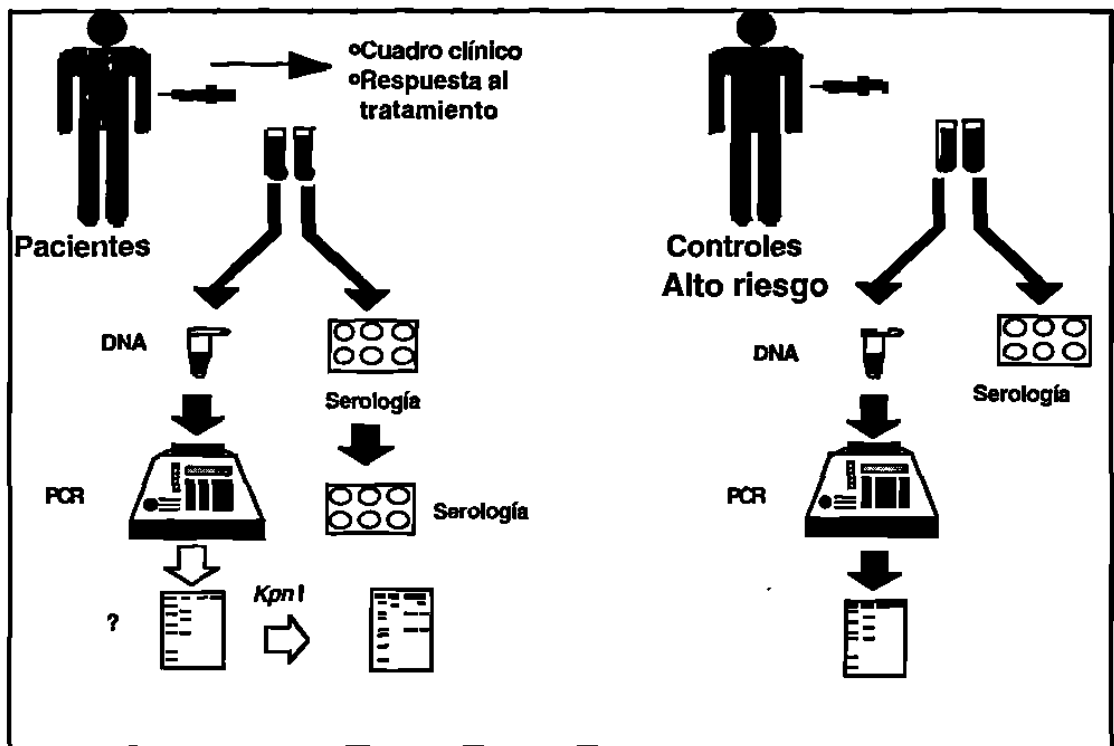


Figura 5. Aplicación del método a los grupos de personas incluidos en el estudio. De cada una de las personas incluidas en el estudio se extrajo sangre para obtener el DNA que posteriormente se sometió a la PCR y el suero para las pruebas serológicas. En los pacientes se evaluó además la respuesta al tratamiento.

En la reacción de amplificación se colocaron $2\mu\text{g}$ de DNA y se incluyeron un testigo positivo (25 ng de DNA de *Brucella melitensis*) y uno negativo (agua). El producto de la amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 2%.

Para descartar la presencia de inhibidores en el DNA de cada una de las muestras, los cuales pudieran conducir a resultados falsos negativos, se amplificó el DNA proveniente de cada una de ellas con iniciadores específicos para el gen de la β - globina, junto con un testigo positivo (100 ng de DNA genómico humano) y uno negativo (agua).

Las condiciones de amplificación para esta prueba fueron: 100 ng de DNA genómico humano en un volumen total de 25µL, usando 1.25 U de DNA polimerasa *Taq*, 0.5µM de los iniciadores BG1 y BG2, 200 mM de dNTP's y 1.5 mM de MgCl₂. La amplificación se practicó utilizando un termociclador programado de la siguiente manera:

1	94°C, 5 min	Paso de desnaturalización inicial
2	94°C, 30 seg	Paso de desnaturalización de cada ciclo
3	57°C, 30 min	Paso de apareamiento de cada ciclo
4	72°C, 2 min	Paso de extensión de cada ciclo
5	Repetir 35 ciclos (de los pasos 2 al 4)	
6	72°C, 10 min	Paso de extensión final

Para la realización de las pruebas serológicas se llevó a cabo el procedimiento siguiente (22):

- 1.- Se tomó una muestra de 2 a 5 mL de sangre con jeringa estéril y se depositó en un tubo vacutainer sin anticoagulante.
- 2.- Se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente y con ayuda de un aplicador de madera estéril se separó el coágulo de las paredes del tubo. Se dejó retraer el coágulo y se centrifugó el tubo a 3,000 rpm durante 5 min. En condiciones de esterilidad se aspiró el suero sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril y se transfirió a un tubo de microcentrifuga estéril.
- 3.- Tanto los sueros como el antígeno se dejaron alcanzar la temperatura del laboratorio.

4.- En una placa de vidrio limpia y desengrasada, dividida en cuadros, se colocó la cantidad de suero y antígeno descrita a continuación:

Cuadro No.	Volumen de suero (mL)	Antígeno (mL)	Dilución final
1	0.08	0.03	1:20
2	0.04	0.03	1:40
3	0.02	0.03	1:80
4	0.01	0.03	1:160
5	0.005	0.03	1:320

5.- Se mezcló con ayuda de un aplicador, se agitó la placa con movimientos rotatorios durante 2 minutos.

6.- Se observó al microscopio de luz en busca de la presencia de grumos.

7.- Se determinó el título, considerando éste como la última dilución en la que se observó una aglutinación definida.

Para la evaluación de estos resultados se tomaron como positivas las pruebas con valores a partir de la dilución 1:80.

El tratamiento que se administró a algunos pacientes se evaluó considerando su mejoría clínica.

Los médicos llevaron a cabo el registro y organización de los datos provenientes de los resultados de las pruebas serológicas y respuesta al

tratamiento, mientras que desconocían el resultado de la PCR. Nuestro laboratorio desconocía de que grupo provenía cada una de las muestras al realizar el PCR.

3.4.2 Análisis Estadístico Propuesto de los Resultados

Se compararon los resultados obtenidos mediante la metodología de PCR con los datos del cuadro clínico y las pruebas serológicas practicadas en paralelo a dichos individuos, así como con la respuesta al tratamiento, con el fin de evaluar la sensibilidad y especificidad de esta prueba para la detección de *Brucella* en humanos.

Para el análisis estadístico de los resultados, se contó con 3 tipos de tablas, una para cada grupo:

Tabla I. Grupo sospecha (prevalencia >50%)

Cuadro clínico	Serología	Respuesta al tratamiento	Diagnóstico	Valor	PCR
+	+	+	Brucelosis	V	+
+	+	-	?	V	-
+	+	+	Brucelosis	F	-
+	+	-	?	F	+
+	-	na	?	V	-
+	-	+	Brucelosis	V	+
+	-	-	?	F	+
+	-	+	Brucelosis	F	-

(-) Negativo

(+) Positivo

(V) Verdadero

(F) Falso

(na) no aplicable

(?) diagnóstico en duda

Tabla II. Grupo de alto riesgo (prevalencia de >15%)

Cuadro clínico	Serología	Diagnóstico	Valor	PCR
-	+	Infección asintomática	V	+
-	+	Memoria inmunológica	v	-
-	-	Sano ?	?	+
-	-	Sano	V	-

(-) Negativo (V) Verdadero (?) Se desconoce (+) Positivo (F) Falso

Tabla III. Grupo de personas sanas (prevalencia del 1%)

Cuadro clínico	Serología	Diagnóstico	Valor	PCR
-	-	Sano	V	-
-	-	Sano	F	+

(-) Negativo (V) Verdadero (+) Positivo (F) Falso

Para cada grupo se asignaron valores para la prueba de PCR considerando todas las combinaciones resultantes de la evaluación del cuadro clínico, serología diagnóstico y, en el caso del grupo sospecha, respuesta al tratamiento.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Optimación del Método de Detección y Diferenciación para Bacterias del Género *Brucella*, Desarrollado por Sifuentes y cols.

4.1.1 Rediseño de los Iniciadores

En la tabla IV se muestran las secuencias de los iniciadores utilizados por Sifuentes y cols. y de los iniciadores rediseñados

Tabla IV. Secuencias y sitios de apareamiento de los iniciadores utilizados por Sifuentes y cols. y de los iniciadores rediseñados

Iniciador		Secuencia*	Apareamiento	Sitio de restricción
2ab5'	a	5'-actgacggatccgcgctcaggcggccgacgcaa-3'	Omp2a y 2b	<i>Bam</i> HI
	n	5'-cggcgctcagggccccgacgcaa-3'	Omp2a y 2b	<i>Apa</i> I
2a900	a	5'-actgacttcgaattgccttttcgggggcaatga-3'	Omp2a	<i>Hind</i> III
	n	5'-ggttgcccttttcgggcaatga-3'	Omp2a	<i>Nae</i> I
2ab200	a	5'-actgacttcgaaccagccattgcggtcggtac-3'	Omp2a y 2b	<i>Hind</i> III
	n	5'-gctcttgccagccattgcggtcggt-3'	Omp2a y 2b	Sin sitio
2b600	a	5'-actgaagcttagccgctgatgtggtagt-3'	Omp2b	<i>Hind</i> III
	n	5'-cgtcaggeatgtcgacgacgatgtgg-3'	Omp2b	<i>Sal</i> I

* La secuencia en *itálicas* corresponde al sitio de restricción
 a= iniciadores anteriores
 n= iniciadores rediseñados

Los iniciadores rediseñados son más cortos (Tabla IV), pero a pesar de ello se aparean a un mayor número de bases de la secuencia blanco en comparación con los iniciadores anteriores como se muestra en el siguiente esquema tomando como ejemplo al iniciador 2ab200 (Fig. 6).

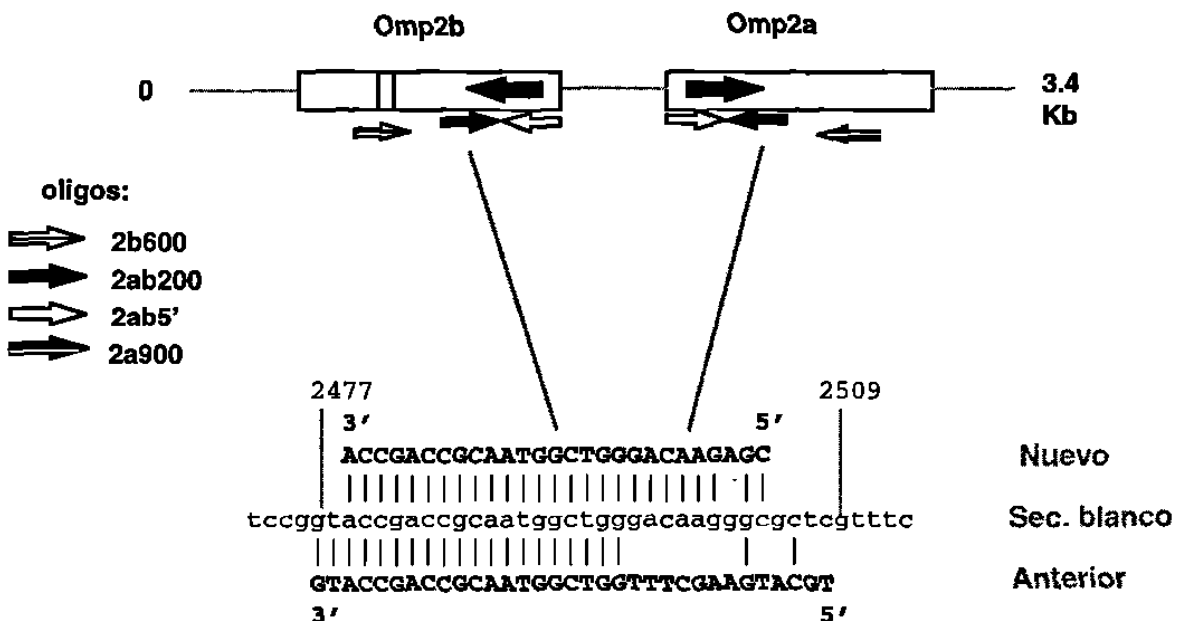


Figura 6. Comparación del apareamiento a la secuencia blanco del iniciador 2ab200, antes y después del rediseño. El iniciador 2ab200 rediseñado queda con solo una base no apareada con la secuencia blanco, debido al cambio del sitio de restricción.

En la simulación de la amplificación mediante el programa computacional Amplify, se observaron bandas más intensas con los nuevos iniciadores, como se muestra en el caso de *B. suis*, ya que con los iniciadores anteriores se obtenía muy tenue la banda de 900 pb (Figs.7 y 8).

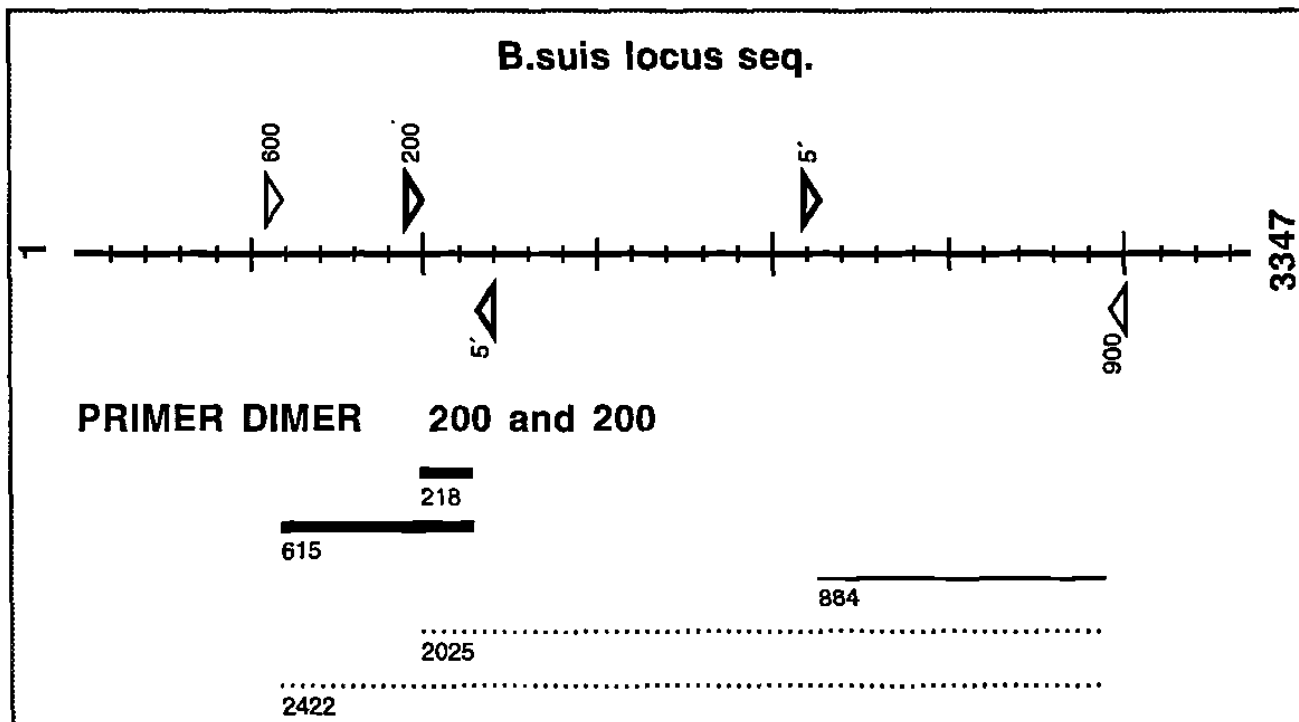


Figura. 7 Simulación de la reacción de amplificación para el locus Omp 2 de *B. suis* con los iniciadores anteriores. Se observa muy tenue la banda de 884 pb en comparación con las bandas de 615 y 218 pb.

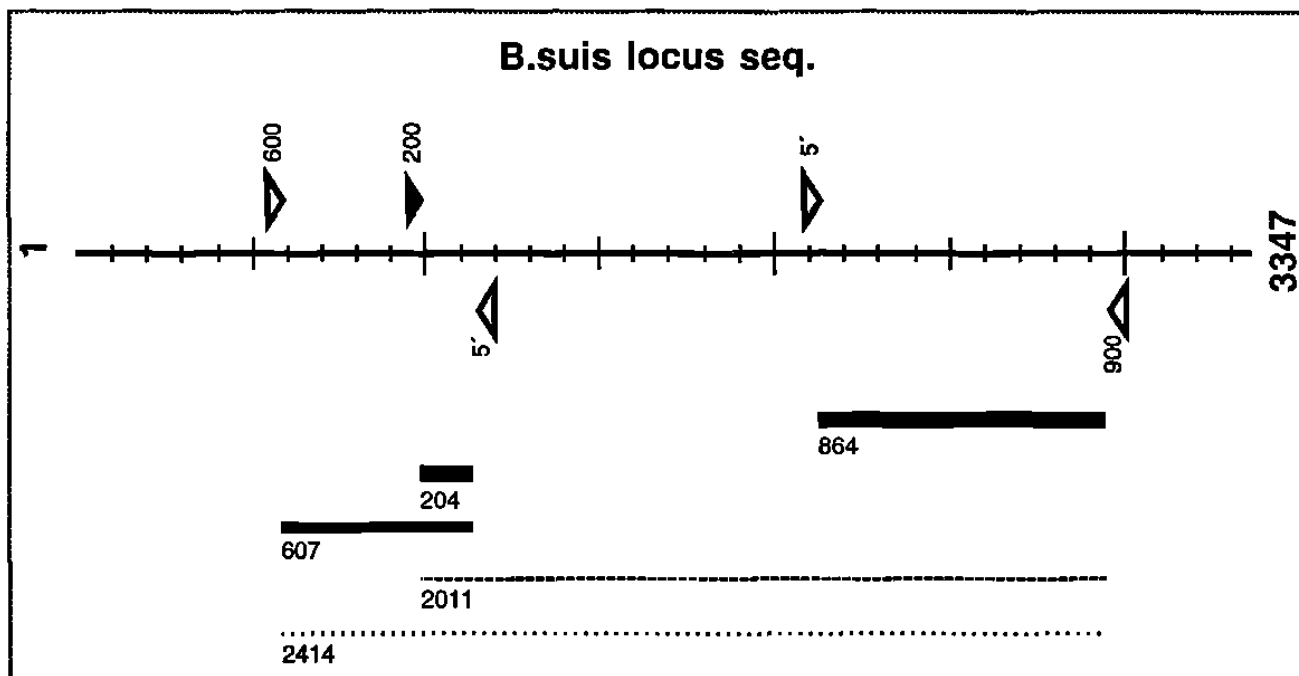


Figura.8 Simulación de la reacción de amplificación para el *locus* Omp 2 de *B. suis* con los iniciadores rediseñados. Se observa la banda de 864 pb muy intensa al igual que las bandas de 607 y 204 pb.

Mediante el programa computacional Oligo se observó que los iniciadores rediseñados no forman estructuras secundarias importantes que puedan afectar la reacción de amplificación. Asimismo, las T_m de estos iniciadores determinadas mediante este programa fueron las siguientes: iniciador 2ab5', 86.8°C; iniciador 2ab200, 81.6°C; iniciador 2b600, 80.3°C; iniciador 2a900, 77.5°C. Las temperaturas de apareamiento teóricas de los fragmentos amplificados oscilan entre 65 y 66°C.

En el análisis de similitud de los iniciadores, el cual se hizo utilizando el servicio Blast, se observó que entre todas las secuencias reportadas en el GenBank, los iniciadores 2ab5', 2ab200 y 2a900 comparten homología solamente con las secuencias del *locus* Omp 2 de las especies de *Brucella* ; el iniciador 2b600 presentó además similitud con la secuencia del DNA complementario de la clona yk91f5 de *C. elegans* , y con un cósmido de *Mycobacterium leprae* .

4.1.2 Optimación de las Condiciones de Amplificación

Se encontraron las condiciones óptimas de amplificación para los iniciadores rediseñados como se mencionó en la sección de Material y Métodos: 0.5µM de los iniciadores 2ab5' y 2a900, 0.2µM de los iniciadores 2ab200 y 2b600 y 5mM de MgCl₂. Con estas condiciones se obtuvieron 4 patrones de amplificación (existen algunas bandas inespecíficas menos abundantes) : I, bandas de 900, 600 y 200 pb para *B. neotomae*, *B. melitensis* y *B. suis*; II, 720, 600 y 200 pb para *B. abortus*; III, 900 y 600 pb

para *B. canis* y IV, 900 pb para *Brucella ovis*. (Fig. 9). Los otros parámetros, tales como el número de ciclos, la temperatura de apareamiento, etc., permanecieron igual a las del método anterior, mismas que ya se describieron en la sección de Materiales y Métodos.

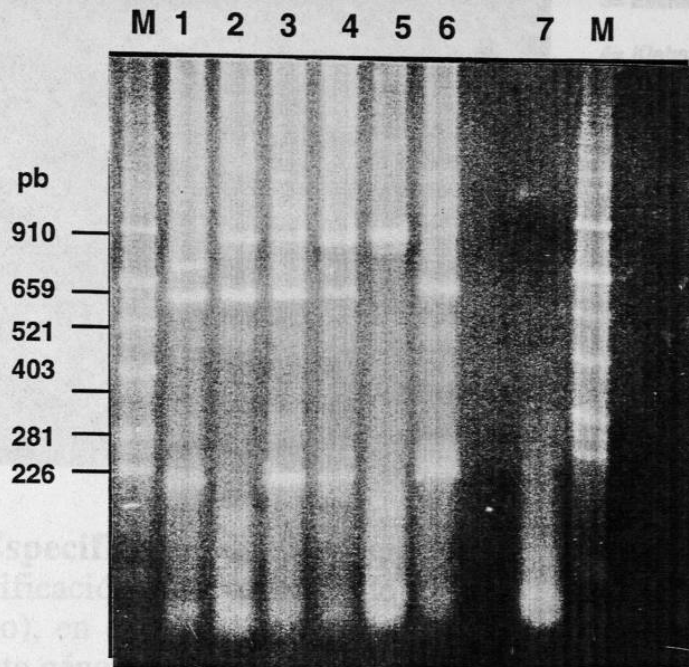


Figura 9. Diferenciación por PCR de las especies de *Brucella*. Se muestra el patrón de amplificación de bacterias del género *Brucella* a las condiciones óptimas para los iniciadores rediseñados. M= pBR322 + Alu I, 1= *B. abortus*, 2= *B. canis*, 3= *B. melitensis*, 4= *B. neotomae*, 5= *B. ovis*, 6= *B. suis*, 7= testigo negativo.

4.1.3 Evaluación de la Especificidad de Especie

Con ninguno de los DNAs de especies diferentes a *Brucella* se obtuvo una señal de amplificación correspondiente al patrón característico de dicho género (Fig. 10, Tabla V).

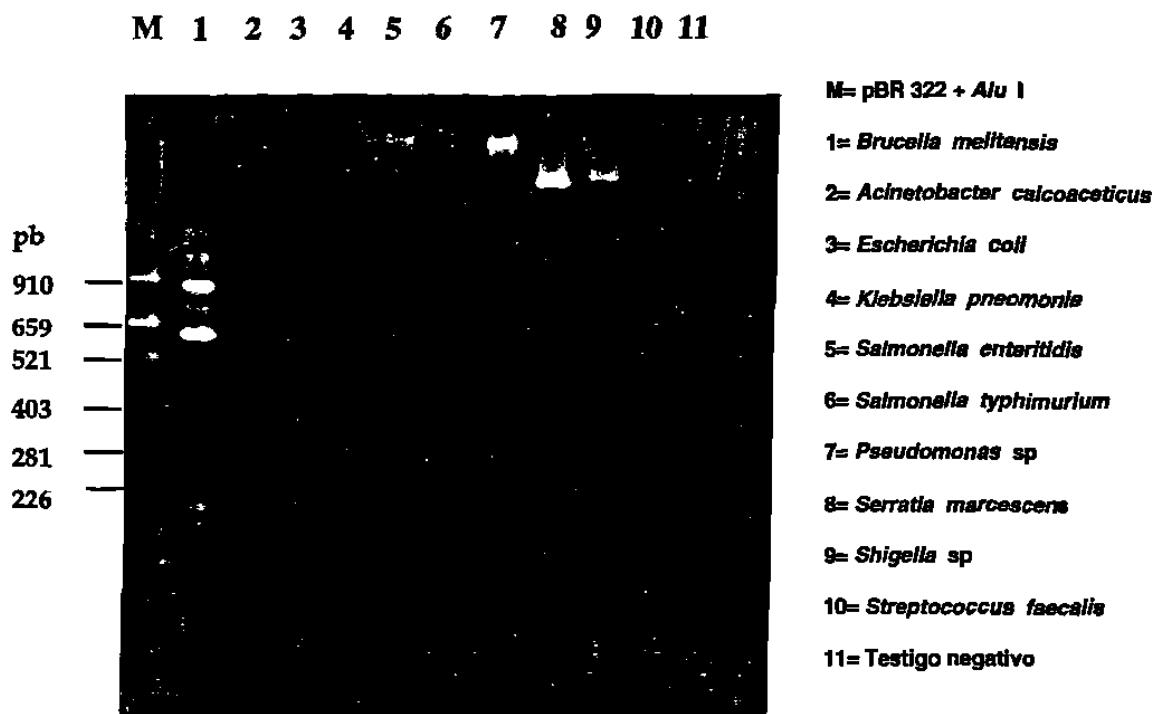


Figura 10. Especificidad de especie del método. Se observa un patrón de amplificación característico de *Brucella* solamente en el carril 1 (testigo positivo), en el 5, 7, 8 y 9 se observa señal de amplificación no específica de este género y en el 2, 3, 4, 6, y 10 no hay señal alguna.

Tabla V. Resumen de los resultados de PCR con el DNA de aislados clínicos analizados para determinar la especificidad de especie del método.

Microorganismo	Resultado en la PCR
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
<i>Vibrio cholerae</i>	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	*
<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Pseudomonas sp</i>	*
<i>Serratia marcescens</i>	*
<i>Shigella sp</i>	*
<i>Streptococcus faecalis</i>	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-
Especies de <i>Brucella</i>	+
Testigo negativo	-

4.1.4 Determinación del Límite de Detección

(+) Positivo

(-) Negativo

* Sólo presentaron bandas que no corresponden al patrón específico para *Brucella*

Por otra parte, el DNA de *Brucella* contaminado con el de cada una de las especies analizadas siguió siendo un buen templado en la PCR (Fig. 11).

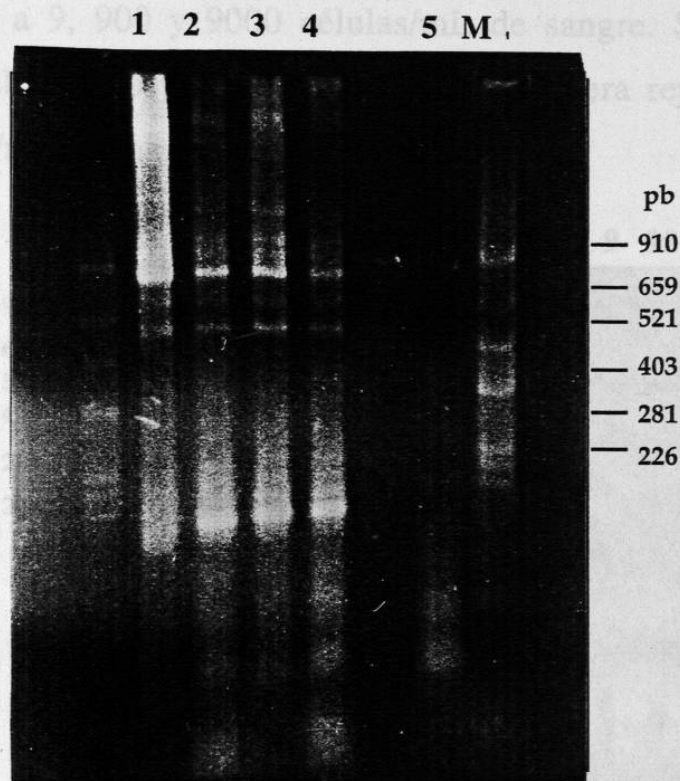


Figura 11. Prueba para descartar resultados falsos negativos en la determinación de la especificidad de especie. El DNA de *Brucella* contaminado con el de cada una de las especies de bacterias analizadas fue un buen templado en la reacción de amplificación. M= pBR322 + *Alu* I, 1= *B. melitensis*, 2= *B. melitensis* + *A. calcoaceticus*, 3= *B. melitensis* + *Y. enterocolitica*, 4= *B. melitensis* + *E. coli*.

4.1.4 Determinación del Límite de Detección

Al manipular en el laboratorio sangre contaminada con diferentes concentraciones de bacteria, en algunas reacciones de amplificación se observó señal, incluso en la dilución que correspondía a una célula/mL de sangre. También en ocasiones se observó señal en las diluciones que correspondían a 9, 900 y 9000 células/mL de sangre. Sin embargo, se observó que el método pudo detectar de una manera reproducible hasta 90,000 células/mL de sangre (Fig. 12).

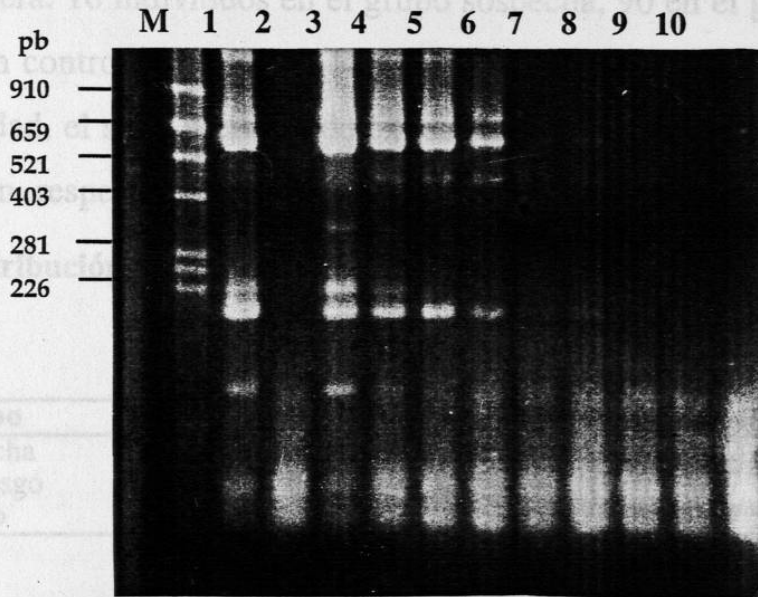


Figura 12. Límite de detección del método. Se observa el resultado de la PCR para cada una de las diluciones analizadas. M= pBR322 + *Alu I*, 1= control positivo, 2= control negativo, 3= 9×10^9 bacterias/mL de sangre, 4= 9×10^8 , 5= 9×10^7 , 6= 9×10^6 , 7= 9×10^5 , 8= 9×10^4 , 9= 9×10^3 , 10= 9×10^2 . Se presentó amplificación de una manera reproducible en la dilución correspondiente a 90,000 células/mL de sangre (450 pg DNA) en el carril 8.

Grupo	Exposición	%
Suspecha	lácteos	100
Alto riesgo	lácteos	66
	lácteos y carne	34
Sano	lácteos	0

4.2 Evaluación de la Utilidad del Método en la Detección de *Brucella* en Humanos

4.2.1 Aplicación del Método en Muestras de Sangre de Grupos de Individuos con Diferente Probabilidad de Positividad

De los 144 individuos reclutados se contó con los datos completos (PCR, serología y en los pacientes cuadro clínico y respuesta al tratamiento) de 119 de ellos, los cuales se ubican en los grupos establecidos de la siguiente manera: 10 individuos en el grupo sospecha, 90 en el grupo de alto riesgo y 19 en controles sanos. En la tabla VI se muestran los promedios y el rango de edad, el sexo y el tipo de exposición de los sujetos por grupo al que pertenecen, respectivamente.

Tabla VI. Distribución de los sujetos en los grupos de acuerdo a:

a) Edad

Grupo	Media +/- DE (años)	Min-Max (años)
Sospecha	35+/-15	14-62
Alto riesgo	47+/-17	18-87
Sano	40+/-15	20-67

b) Sexo

Sexo	%
Masculino	40.2
Femenino	59.8

c) Tipo de Exposición

Grupo	Exposición	%
Sospecha	lácteos	100
Alto riesgo	lácteos	66
	lácteos y carne	34
Sano	lácteos	0

4.2.2 Análisis Estadístico de los Resultados Obtenidos

No se obtuvo señal de amplificación con los 119 DNAs aislados, aunque el testigo positivo si la dio.

Por otra parte, los DNAs de las muestras a pesar de que resultaron negativas en la PCR para *Brucella*, fueron buenos templados en la PCR control (Fig. 13), donde se amplificó el gen de la β -globina; esto descarta cualquier problema que interfiriera con la calidad de los DNAs como sustrato para la PCR.

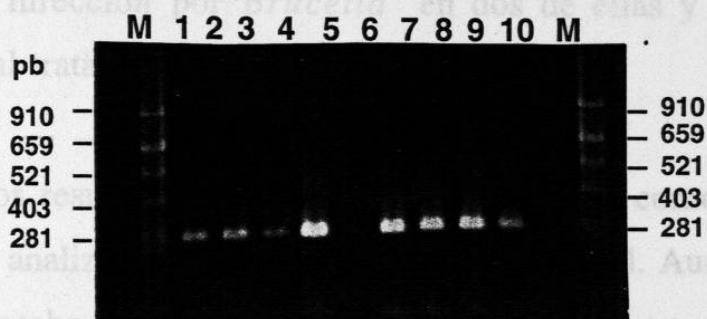


Figura 13. Resultados representativos del análisis de amplificación del gen de la β -Globina en las muestras incluidas en este estudio. Una banda específica de 268 pb representa una reacción positiva para β -globina. M= pBR322 + *Alu* I, 1 a 9= DNA genómico humano, 10= testigo negativo.

Tabla VII. Resultados observados en las pruebas serológicas

Grupo	Prevalencia		P
	Esperada (%)	Observada (%)	
Sospecha	50	40	0.75
Alto riesgo	15	14	0.48
Sano	1	0	0.86

4.2.2 Análisis Estadístico de los Resultados Obtenidos

Para validar la prueba de PCR se compararon los resultados obtenidos con los resultados de las pruebas serológicas, datos del cuadro clínico y respuesta al tratamiento.

Del total de las muestras analizadas, en 17 se observó un título serológico arriba de 1:80, siendo el más alto 1:1,600. En cuanto al cuadro clínico y respuesta al tratamiento, de las 10 personas del grupo sospecha se descartó una infección por *Brucella* en dos de ellas y las 8 restantes respondieron al tratamiento.

Tanto los resultados obtenidos por la serología como los obtenidos por la PCR se analizaron mediante una prueba binomial. Aunque en el caso del grupo sospecha sólo obtuvimos la cuarta parte del tamaño de muestra establecido, éste número nos permitió realizar el análisis correspondiente.

En la tabla VII se muestra la evaluación de los resultados de las pruebas serológicas aplicadas a los sujetos incluidos en los diferentes grupos. Se puede observar que no existe una diferencia significativa entre los valores de las prevalencias observadas y esperadas en ninguno de los tres grupos.

Tabla VII. Resultados observados en las pruebas serológicas

Grupo	Prevalencia		P
	Esperada (%)	Observada (%)	
Sospecha	50	40	0.75
Alto riesgo	15	14	0.48
Sano	1	0	0.86

En la tabla VIII se muestran los resultados observados para la PCR en comparación con los esperados. Aunque el testigo positivo siempre dio señal, ninguna muestra de las personas incluidas en el estudio generó una banda de amplificación. Para el caso del grupo sospecha y de alto riesgo la p indica que hay diferencia significativa entre los resultados observados con respecto a los esperados, para el caso del grupo de controles sanos la p indica que no hay diferencia significativa entre los mismos.

Tabla VIII. Resultados observados en la PCR

Grupo	Prevalencia		p
	Esperada (%)	Observada (%)	
Sospecha	50	0	0.002
Alto riesgo	15	0	0.001
Sano	1	0	0.82

Terminado el estudio, no fue posible determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del método debido a que los resultados de PCR fueron invariables.

CAPITULO 5

DISCUSION

Existen en la literatura muchos métodos basados en la PCR aplicables en el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades infecciosas (23, 24, 25, 26, 27, 28). En cuanto a la brucelosis, únicamente se ha logrado detectar el agente causal empleando esta técnica en animales tales como cabras y vacas (13), no habiéndose logrado hasta la fecha el empleo de la PCR en el diagnóstico rutinario de esta enfermedad en humanos.

Aunque la metodología que hemos desarrollado tampoco resultó lo suficientemente sensible para el diagnóstico de la enfermedad en humanos, ofrece la ventaja de que se puede utilizar en la diferenciación de las 6 especies de *Brucella* en muestras provenientes de cultivo. Así pues, nuestro método es una alternativa buena, rápida y con menos riesgo que los métodos utilizados actualmente para este fin (pruebas bioquímicas).

La detección y diferenciación clara de las especies que constituyen el género, se logra gracias a la gran especificidad proporcionada por los iniciadores utilizados. El rediseño de los iniciadores que se utilizaban anteriormente, permitió que se unieran con una alta afinidad a su secuencia

blanco correspondiente de cada una de las especies del género. Para lograr una señal óptima con estos iniciadores rediseñados, fue necesario encontrar las mejores condiciones de amplificación variando la cantidad de iniciadores y $MgCl_2$. Además comprobamos la especificidad de los iniciadores sometiendo a la prueba el DNA proveniente de varias especies bacterianas que se pueden encontrar en un aislado clínico o que pueden dar reacciones cruzadas con ella en las pruebas serológicas, con los que se obtuvieron resultados negativos o señales inespecíficas.

Por otra parte, el límite de detección de 90,000 células/mL reportado para este método, confirma su limitada sensibilidad. Sin embargo, hay que resaltar que este valor indica el resultado para esta prueba que se obtuvo de una manera reproducible y que en ocasiones se llegó a detectar hasta una célula/mL de sangre. La metodología que empleamos para establecer el límite de detección de nuestro ensayo de PCR, implica las condiciones más cercanas a trabajar con personas infectadas. En otros estudios se ha llegado a detectar hasta 16 células/mL de *Brucella* trabajando con diluciones del DNA purificado directamente de la misma, sin embargo en estos trabajos no se reporta el número de veces que se hicieron los ensayos y su reproducibilidad(29, 30, 31). En otro estudio, en el que se determinó la sensibilidad de una prueba de PCR para la detección de *M. tuberculosis*, si se tomó en cuenta la reproducibilidad del experimento del límite de detección, observándose que de las 8 repeticiones que se hicieron de este ensayo, sólo en dos ocasiones se detectó 1 fg de DNA bacteriano, siendo el valor detectable de manera reproducible 10 fg del mismo (27).

También se podría considerar que en las diluciones que no siempre fueron detectadas podría haber influido una homogenización incompleta del DNA bacteriano y el proveniente del sujeto analizado, sin embargo no encontramos reportado un método de homogenización especial en otros estudios en los que se detectan genomas de microorganismos en muestras clínicas.

Por otra parte, los resultados de las pruebas serológicas realizadas a los grupos de estudio están dentro de lo esperado. Los resultados negativos del PCR en todos los individuos incluidos en este estudio pueden explicarse de la siguiente manera (Fig.14): una vez que la bacteria entra al organismo se establece en los ganglios linfáticos regionales y una vez rebasada la barrera linfática llegan a la circulación sistémica, donde se puede decir que hay una gran cantidad de la bacteria, después se establecen en el sistema reticuloendotelial y empieza entonces la formación de anticuerpos. *Posteriormente, puede haber bacteremias intermitentes donde hay poca cantidad de bacterias en circulación; es aquí donde se dice que la enfermedad ha adquirido carácter de cronicidad (32, 33).* El método de extracción de DNA que utilizamos para evaluar esta metodología fue a partir de sangre completa, por lo que para detectar a la bacteria, las personas infectadas deben de estar en una fase bacterémica lo cual corresponde a la etapa aguda de la enfermedad.

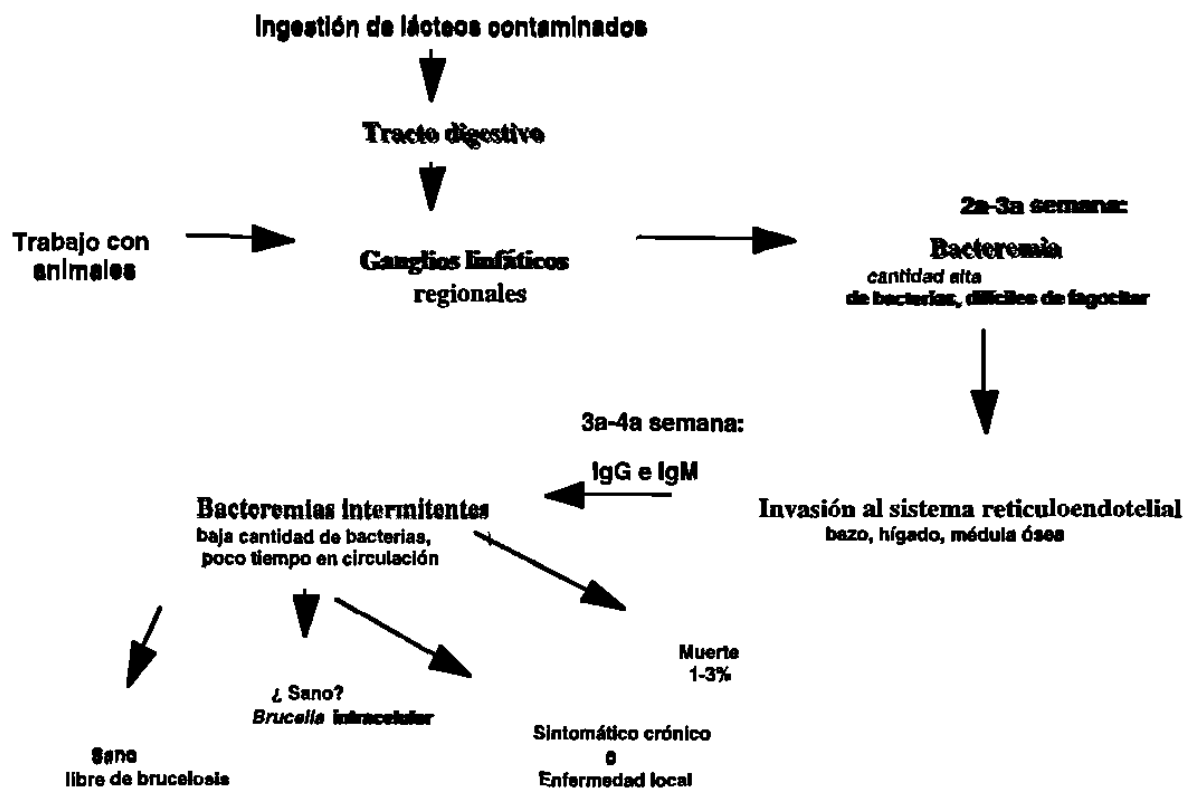


Figura 14. Curso de la brucelosis. Una vez que la bacteria ingresa al organismo se establece en los ganglios linfáticos regionales, llega a la circulación sistémica y después se establece en el sistema reticulo endotelial produciendo bacteremias intermitentes. El resultado final puede variar desde una resolución completa de la infección, hasta muerte por complicación de la misma.

Además, en el inicio de la etapa aguda de la enfermedad, es cuando el cultivo de sangre tiene las mayores probabilidades de dar un resultado positivo, ya que es cuando la bacteria se encuentra en sangre en grandes cantidades. Es casi al final de esta etapa donde empieza a aumentarse el título de anticuerpos y a disminuir la probabilidad de detectar la bacteria en la sangre (33), (Fig. 15).

En 1996 Folguiera y cols. establecieron un diagnóstico rápido de detección de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR en pacientes en fase bacterémica (28). Matar y cols. en 1996 desarrollaron un método de detección por PCR de *Brucella* en humanos pero aplicable solo en la fase bacterémica de la enfermedad, estos autores mencionan que se requieren estudios posteriores para encontrar una prueba efectiva en el diagnóstico de pacientes con brucelosis crónica o que se encuentren bajo tratamiento(34). En la actualidad hay un grupo de investigación que ha logrado establecer a la PCR como método de diagnóstico de brucelosis en animales (13). El porqué de la diferencia del éxito del PCR en animales en comparación con humanos, creemos que se debe a que en animales la bacteremia inicial dura dos meses y hay abundantes bacterias debido a que los anticuerpos son menos eficientes, mientras que en humanos la bacteremia inicial dura aproximadamente dos semanas, hay pocas bacterias en circulación y los anticuerpos son más eficientes (32, 35, 36).

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

- 1) El rediseño de los iniciadores y la optimación de las condiciones de amplificación aumentó la intensidad de señal, lo que permite detectar bandas que con el método anterior eran muy débiles, facilitándose así la diferenciación de las 6 especies de *Brucella*.
- 2) Este nuevo método de PCR no detectó las bacterias diferentes a *Brucella* analizadas.
- 3) El límite de detección garantizando reproducibilidad resultó ser de 90,000 células/mL de sangre
- 4) Este método de PCR permite la identificación rápida de las 6 especies de *Brucella* en muestras provenientes de cultivo, disminuyendo la manipulación y riesgo de contaminación con la bacteria.
- 5) Esta metodología basada en la PCR no es aplicable por el momento en el diagnóstico de brucelosis en humanos. Creemos que esto es debido a la intermitencia y a la baja escala de la bacteremia, así como al carácter intracelular de *Brucella*, lo cual interfiere con el éxito de su detección. De esta manera, las pruebas serológicas siguen siendo, a pesar de sus limitaciones, la alternativa diagnóstica.

APENDICE 1

PREPARACION DE REACTIVOS

Acido etilen diamino tetracético (EDTA) 0.5 M pH=8.0

Disolver 186.1 g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 800 mL de H_2O -DEPC. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH y aforar a 1 L.

Bromuro de etidio 2 mg/mL

Disolver 200 mg de bromuro de etidio en 80 ml de agua ultrapura. Aforar a 100 mL y almacenar a 4°C protegido de la luz en recipiente de vidrio ámbar. De esta solución se hará una dilución 1:1000 para teñir los geles.

No autoclavar.

Buffer de lisis TSNT

Disolver 1 mL de tritón y 5 mL de SDS 10% en agua milli Q estéril (aforar a 20 mL y mezclar), hasta que la solución quede incolora. Por separado disolver 0.2922 g de NaCl, 0.01861 g de EDTA y 250 μL de Tris-HCl ph 8 2M en 20 mL de agua milli Q estéril y aforar a 30 mL. Mezclar la solución de detergentes con la solución de sales. No autoclavar.

Fenol saturado

El fenol debe ser redistilado para remover productos de oxidación, como quinonas que pueden causar el rompimiento de los enlaces fosfodiéster o entrecruzamiento de RNA y DNA.

A) Destilación:

1. Fundir el fenol a 68°C.
2. Se procede a destilarlo si su aspecto al estar fundido, no es cristalino. El fenol destila a una temperatura de 180°C. Es recomendable no conectar agua circulante porque el fenol puede cristalizarse en el mismo refrigerante.
3. El fenol que va destilando se puede recibir en un pequeño volumen de Tris- HCl 0.5 M para evitar su cristalización.

B) Saturación:

Antes de usar el fenol debe ser equilibrado a un pH mayor de 7.8 debido a que el DNA puede quedar dentro de la fase orgánica si el pH del fenol es ácido.

1. Agregar 8-hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1%.
2. Añadir un volumen de solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M pH 8 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8. agitar durante 24 horas en el cuarto frío.
3. Dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o un embudo de separación.

4. Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1M pH 8.
5. Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH 8 conteniendo β -mercaptoetanol a una concentración final de 0.2%.
6. La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un frasco oscuro a -20°C .

Gel de agarosa al 1%

Pesar 1g de agarosa y agregar 100 mL de TBE 1X. Fundir.

Gel de agarosa al 2%

Pesar 2g de agarosa y agregar 100 mL de TBE 1X. Fundir.

IA:C (Alcohol isoamílico: cloroformo 1:49)

Mezclar 98 mL de cloroformo con 2 mL de alcohol isoamílico. No autoclavar.

Jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%)

Mezclar 25 mg de xilencianol, 25 mg de azul de bromofenol y 3.0 mL de glicerol. Aforar a 10 mL. No autoclavar.

SDS 10% (Dodecil sulfato de sodio)

Disolver 10 g de SDS en 60 mL de H₂O-DEPC y aforar a 100 mL.

TBE 10X (Tris-borato 0.89M, ácido bórico 0.89M, EDTA)

Mezclar 108 g de trizma base y 55.0 g de ácido bórico disolver en 800 mL de H₂O-DEPC y agregar 40 mL de EDTA 0.5M pH=8.0. Aforar a 1 L.

APENDICE 2

INFORMACION BASICA

INFORMANTE _____ FECHA DE INGRESO _____

DATOS DEL PACIENTE

NOMBRE _____ EDAD _____

REGISTRO _____ DEPARTAMENTO _____ SALA _____ CAMA _____

FECHA Y LUGAR DE NACIMIENTO _____

E. CIVIL _____ FECHA DE MATRIMONIO _____ RELIGION _____

DOMICILIO _____ ESCOLARIDAD _____

OCUPACION _____ SALARIO _____

MOTIVO DE CONSULTA:

ANTECEDENTES PERSONALES:

1. PAROTIDITIS __ FIEBRE REUMATICA __ ARTRITIS __ ESCARLATINA __

TUBERCULOSIS __ OTRAS ENF. RESP. __ DIABETES __ EFERMEDADES

CARDIOVASCULARES __ ALERGIAS __ NEFROPATIAS __ HIPERTENSION __

ICTERICIA __ ENF. VENEREAS __ OTRAS __

2. INMUNIZACIONES

3. HOSPITALIZACIONES PREVIAS

4. TRAUMATISMOS

5. HABITOS: ALCOHOL

TABACO

DROGAS

6. MEDICAMENTOS ACTUALES

7. TRANSFUSIONES

8. EXPOSICION: LACTEOS CABRA __
VACA __
AMBOS __
NINGUNO __

9. OCUPACION: TABLAJERO __

ORDEÑADOR __

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Joklik, W., Willett, H.P., Amos D.B. 1983. Zinsser Microbiología. 17 Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp: 746-750.
- 2.- Forsyth, J.R.L. and Alton, G.G. (1990). *Brucella*. Medical Microbiology. 3th edition. Churchill Livingstone.
- 3.- Robbins, S.L.y Cotran, R.S. Patología estructural y funcional. 3a edición. Ed. Interamericana. pp:329.
- 4.- López Merino, A. (1991). Brucelosis: avances y perspectivas. Instituto Nacional de Referencia Epidemiológicos. Publicación INDRE # 6 pp:53.
- 5.- Vigilancia Epidemiológica. Semana 37, 1995. pp:14.
- 6.- Canales Muñoz, J.L., Aguilar, S., Flores, G., Boeta, M.A. y Vázquez,T. (1993). Estudio de un brote de brucelosis y valoración de las pruebas de laboratorio. Rev. Med. IMSS (Méx). 31:273-277.
- 7.- Dajer-Abimerhi, A., D.S., Gutierrez-Ruiz, E.J. y Zapata-Villalobos, D. (1994). Estudio Serológico de la Brucelosis Porcina en el Estado de Yucatán, México. Revista Biomédica. 5(2):84-87.
- 8.- Baron S. Medical Microbiology. 3th Edition. Churchill Livingtone. pp:397-404.
- 9.- Freeman B.A. (1988). Tratado de Microbiología de Burrows. Ed. Interamericana. Cap 22.
- 10.- Barrera, Saldaña H.A., Ortíz López, R., Rojas Martínez, A. y Reséndez Pérez, D. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa: una nueva época dorada en la Biología Molecular. Ciencia y Desarrollo. pp 50-60.
- 11.- Fitch, A.T., Bearden, S.W., Sowa, B.A. and Marquis, H. (1990). Genetic variation of the Omp-2 porin locus of the Brucellae: species-specific markers. Molecular Microbiology. 4(7):1135-1142.

- 12.- Sifuentes Rincón A.M. (1995). Desarrollo de un nuevo método de detección y diferenciación de las especies del género *Brucella* basado en la reacción en cadena de la polimerasa. Tesis de Maestría. U.A.N.L. Facultad de Medicina. 40 pp.
- 13- Leal-Klevezas, D.S., Martínez, I.O., López-Merino, A. and Martínez Soriano, J.P. (1995). Single-Step PCR detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(11):3087-3090.
- 14.- Sifuentes-Rincón, A.M., Revol, A. and Barrera, H. (1997). Detection and Differentiation of the six *Brucella* species by Polymerase Chain Reaction. *Molecular Medicine*. 3(11): 734-739.
- 15.- Cañedo Dorantes L. 1987. Investigación Clínica. Ed. Interamericana. México, D.F. pp:115-116.
- 16.- Hernández Monroy, I., Peña Flores, G.P. y Betancourt Morillo, X. (1996). Manual de Procedimientos de Laboratorio INDRE/SAGAR. Brucelosis # 19. 1a ed. Editor Alejandro Escobar Gutiérrez. pp:19, 20.
- 17.- Mueller, H. and Duclos, J. Facile oligomer concentration and Tm determination for estimation of PCR annealing temperature. Perkin Elmer Corporation.
- 18.- Baldino, F., Chesselet, M. and Lewis, M. (1984). *Methods in enzymology* 168:761-777.
- 19.- Wetman, J. (1991). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:227-259.
- 20.- Martínez-Soriano J.P., Cab Barrera, E.L., Tamez González, R. y Leal Klevezas, D.S. (1993). Detección de *Brucella abortus* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Bioquímica*. XVIII(72):10-16.
- 21.- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 22.- Rivera Morales, L.G., Almaguer Gaona, G. y Ramirez Rodriguez L.M. (1990). Manual de Prácticas de Inmunología. 3a ed. Facultad de Medicina. U.A.N.L.

- 23.- Mouritsen C.L., Wittwer, C.T., Litwin, C.M., Yang, L., Weis, J.J., Martins, T.B., Jaskowski, T.D. and Hill, H.R. (1996). Polymerase chain reaction detection of Lyme disease: correlation with clinical manifestations and serological responses. *Am. J Clin Pathol.* **105**(5):647-654.
- 24.- Fakh, M., Chapalamadugu, S., Ricart, A., Corriere, N. and Amsterdam, D. (1996). *Mycobacterium malmoeense* bacteremia in two AIDS patients. *Journal of Clinical Microbiology.* **34**(3): 731-733.
- 25.- Weig, M., Klinker, H., Bogner, B.H., Meier, A. and Gross, U. (1997). Usefulness of PCR for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in different patients groups. *Journal of Clinical Microbiology.* **35**(6): 1445-1449.
- 26.- Tang, Y.W., Procop, G.W. and Persing, D.H. (1997). Molecular diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* **43**(11):2021-2038.
- 27.- Kox, L.F., Rhienthong, D., Medo Miranda, A., Udomsantisuk, N., Ellis, K., Leeuwen, J., Heusden, S., Kuijper, S. and Kolk, A.H.J. (1994). A More Reliable PCR Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology* *Journal of Clinical Microbiology.* **32**(3):672-678.
- 28- Folguiera, L., Delgado, R. Palenque, E., Aguado, J.M. and Noriega, A.R. (1996). Rapid Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Bacteremia by PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* **34**(3):512-515.
- 29.- Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M. and Sanborns, M.R. (1990). Preliminary Development of a Diagnostic Test for *Brucella* Using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Applied Bacteriology.* **69**:216-227.
- 30- Bricker, J. B. and Halling, S.M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1,2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv.1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* **32**(11):2660-2665.
- 31.- Romero, C., Camazo, C., Pardo, M. and I. López-Goñi. (1995). Specific Detection of *Brucella* DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* **33**(3):615-617.
- 32.- Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O. y Santos, J.I. (1990). Manual de Infectología. 12a edición. Ed. Francisco Méndez Cervantes. pp:122-129.

- 33.- Mandell G., Gordon-Douglas, R. and Bennett, J.E. (1979). Principles and Practice of Infectious Diseases. Ed. John Wiley & Sons. 1772-1775.
- 34.- Matar, G.M., Khneisser, I.A. and Abdelnoor, A.M. (1996). Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31 kilodalton *Brucella* antigen DNA. Journal of Clinical Microbiology. 34(2):477-478
- 35.-Briner, D.W. and Gillespie, J.H. (1978). Hagan's Infectious Diseases of Domestic Animals. 7a ed. Ithaca, Cornell University Press.
- 36.- Center for Disease Control. (1976). Brucellosis Surveillance. Annual Survey,

De todo se le puede despojar a un hombre, menos de una cosa, la última de las libertades humanas:

La elección de la propia actitud en un conjunto dado de circunstancias, la elección de la propia forma de reaccionar.

