

Estandarización de un protocolo de caracterización molecular para la identificación de especie de cepas terrestres de bacterias del género *Brucella*

LOHENDY MUÑOZ VARGAS¹

ELÍAS BARQUERO CALVO²

EDGARDO MORENO ROBLES³

CATERINA GUZMÁN-VERRI³

Fecha de recepción: 18 de julio del 2011

Fecha de aprobación: 3 de octubre del 2011

Resumen

La brucelosis es la enfermedad zoonótica más extendida en el mundo que afecta diversos animales, incluyendo especies domésticas y de vida silvestre. Es causada por una bacteria perteneciente al género *Brucella*, el cual incluye nueve especies distintas e infectantes de mamíferos terrestres y marinos. Cada especie de *Brucella* presenta variaciones en la secuencia de ADN que afectan a los nucleótidos en una posición específica del genoma. A estas variaciones se les llama polimorfismo. El polimorfismo de las especies de *Brucella* localizado en los genes que codifican para las proteínas *glk*, *omp25* y *trpE*, se utilizó para desarrollar un ensayo múltiple basado en la extensión de cebadores, el cual permite identificar un aislamiento como miembro de una de las nueve especies reconocidas. Los métodos tradicionales para la identificación de *Brucella* a nivel de especie consumen mucho tiempo y ponen en riesgo al personal laboratorial. Es por ello que la finalidad de este trabajo es evitar la ambigüedad, agilizar el procedimiento, disminuir el tiempo de respuesta y generar una herramienta laboratorial más efectiva para mejorar la vigilancia epidemiológica, el diagnóstico y el abordaje de la brucelosis en Costa Rica. El siguiente trabajo presenta la estandarización del protocolo para la extracción de ADN de *Brucella*, así como de una serie de amplificaciones de fragmentos de genes de interés por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la estandarización de la reacción de extensión de cebadores.

1 Escuela de Medicina Veterinaria (EMV), Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: lohendymv@gmail.com.

2 Laboratorio de Bacteriología, EMV, UNA, Heredia, Costa Rica Correo electrónico: eliasbarquero@gmail.com.

3 Programa de Investigación de Enfermedades Tropicales (PIET), EMV, UNA, Heredia, Costa Rica. Correos electrónicos: emoreno@racsa.co.cr-catguz@medvet.una.ac.cr.

Palabras clave

Brucella, diagnóstico, estandarización.

STANDARDIZATION OF A MOLECULAR CHARACTERIZATION PROTOCOL TO IDENTIFY LAND BACTERIA STRAINS OF THE *BRUCELLA* KIND

Abstract

Brucellosis is the most widespread zoonotic disease worldwide that affects various animals, including domestic species and wildlife. It is caused by bacteria belonging to the genus *Brucella*, which includes nine different species and infective terrestrial and marine mammals. Each species of *Brucella* has variations in DNA sequence involving nucleotides in a specific position in the genome. These variations are called polymorphisms. The polymorphism of *Brucella* species located in the genes coding for proteins *glk*, *omp25*, and *trpE* was used to develop a multiplex assay based on primer extension, with which it can identify an isolate as a member of nine recognized species. Traditional methods for identification of *Brucella* at the species level, time consuming and endanger laboratory staff. That is why the aim of this work is to avoid ambiguity, to streamline the procedure, reduce the response time and generate a more effective laboratory tool for improving epidemiological surveillance, diagnosis and approach of brucellosis in Costa Rica. This paper presents the standardization of the protocol for DNA extraction of *Brucella*, the standardization of a series of amplifications of fragments of genes of interest through the chain reaction (PCR) and standardization of the extension reaction primers.

Keywords

Brucella, standardization, diagnosis.

ESTANDARDIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE CARATERIZAÇÃO MOLECULAR PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE DE CEPAS TERRESTRES DO GÊNERO *BRUCELLA*

Resumo

Brucelose é a doença zoonótica mais distribuída por todo o mundo e que afeta várias espécies animais incluindo espécies domésticas e selvagens. É causada por uma bactéria pertencente ao género *Brucella* que inclui nove espécies diferentes e é infectante para mamíferos terrestres e marinhos. Cada espécie de *Brucella* tem variações na sequência de DNA envolvendo os nucleótidos de uma posição específica do genoma. Estas variações são chamadas polimorfismos. O polimorfismo das espécies de *Brucella* localizado no

código genético para proteínas *glk*, *omp25* e *trpE* foi utilizado para desenvolver um ensaio múltiplo baseado na primeira extensão, com a qual se pode identificar e isolar como membro de uma das 9 espécies. Os métodos tradicionais para identificação de *Brucella* ao nível da espécie, consomem muito tempo e põe em risco o pessoal de laboratório. É por isso que o objectivo deste trabalho é evitar a ambiguidade, agilizar o procedimento, reduzir o tempo de resposta e gerar uma ferramenta laboratorial mais efectiva para melhorar a vigilância epidemiológica, diagnóstico e aproximação à brucelose na Costa Rica. Este artigo, apresenta a estandarização do protocolo para extracção de DNA de *Brucella*, estandarização de uma série de amplificações de fragmentos genéticos de interesse através da reacção de polimerase em cadeia (PCR) e estandarização da reacção dos primers de extensão.

Palavras chave

Brucella, estandarização, diagnostic.

Introducción

La brucelosis es causada por *Brucella*, una bacteria Gram negativa, facultativa e intracelular, filogenéticamente clasificada dentro de la subdivisión $\alpha 2$ de la clase *Proteobacteria* (Ko y Splitter, 2003; Ratushna et ál., 2006). Nueve especies son reconocidas dentro del género *Brucella*, siete de estas, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* y *B. microti* son terrestres (Cloeckáert et ál., 2003; Scholz et ál., 2008; Foster et ál., 2007) y su clasificación está basada principalmente en diferencias fenotípicas y de patogenicidad, además de la preferencia de hospederos (Groussaud et ál., 2007). Cada especie terrestre tiene un hospedero natural: así, *B. abortus* infecta a los bovinos; *B. melitensis* a los caprinos; *B. suis*, de acuerdo al biotipo a los suinos, alces o bien liebres silvestres europeas; *B. ovis* a los ovinos; *B. canis* a los caninos; *B. microti* y *B. neotomae* a los roedores (Cloeckáert et ál., 2003). Sin embargo, su especificidad no es absoluta y por ello pueden causar infecciones secundarias (como *B. abortus* en porcinos y caprinos) o accidentales como en el ser humano, caballos, camellos y animales silvestres como venados, visones y coyotes (Cloeckáert et ál., 2003). Las otras dos especies de *Brucella* se han aislado de mamíferos marinos como delfines, focas, marsopas y ballenas, y se han designado como *B. ceti* sp. nov., para referirse a cepas aisladas en cetáceos y *B. pinnipedialis* sp. nov. para las cepas aisladas en focas (Cloeckáert et ál., 2003; Foster et ál., 2007; Scott et ál., 2007).

En Centroamérica la brucelosis ha estado presente desde décadas atrás, causando sustanciales pérdidas económicas en el sector productivo (cárnico, lechero), ya que los animales diagnosticados positivamente deben ser aislados del hato y sacrificados: *B. suis* ha sido aislada de suinos y humanos en todos los países de Centroamérica, así como *B. abortus* lo ha sido principalmente en bovinos y humanos y esporádicamente en perros y caballos; *B. melitensis* ha sido aislada de ovinos y humanos en Guatemala y es sospechosa en Panamá; y *B. canis* ha sido aislada de perros en Costa Rica (Moreno, 2002; Hidalgo, 2004).

La infección entre animales ocurre por transmisión venérea o por contacto directo de la piel y las membranas mucosas (orales, respiratorias, digestivas, conjuntivales, vaginales y prepuciales) con las placentas, fetos, fluidos fetales, sangre, orina, leche, semen y descargas vaginales de animales infectados (Smith y Ficht, 1990). El ser humano se infecta usualmente por la ingestión de productos lácteos no pasteurizados (queso, leche) o por medio de actividades ocupacionales que implican la manipulación directa de animales como labores veterinarias, trabajos en lecherías o mataderos (Groussaud et ál., 2007).

La complejidad en la identificación se debe a que las distintas especies de *Brucella* muestran más del 90% de similitud en su genoma (Vizcaíno et ál., 1997). Estudios moleculares recientes han descrito polimorfismos en las diferentes especies de *Brucella*, lo que permite identificarlas hasta el grado de especie (Whatmore et ál., 2007; Scott et ál., 2007). El polimorfismo es una variación en la secuencia de ADN que afecta a un solo nucleótido en una posición específica del genoma, denominado por sus siglas en inglés SNP (*single-nucleotide polymorphism*). Los SNP que identifican para cada una de las especies de *Brucella* se localizan en los genes que codifican para las proteínas *glk*, *omp25* y *trpE* (Scott et ál., 2007). El protocolo utiliza una serie de amplificaciones de los fragmentos de genes de interés por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguido por reacciones de extensión de cebador (primer), optimización y validación.

Materiales y métodos

Muestras utilizadas

Para la estandarización de las PCR se utilizaron dos tipos de muestras de ADN genómico. La primera se obtuvo por extracción del ADN de un aislamiento de la

bacteria *Brucella abortus* cepa silvestre 2308 (Sangari y Agüero, 1991) siguiendo el protocolo alcohol-fenol-cloroformo isoamílico CTAB (López, 2008). El otro tipo de muestra consistió en ADN genómico de las seis especies terrestres de *Brucella*: *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis* y *B. neotomae*, los cuales fueron donados por el laboratorio Ignacio López de la Universidad de Navarra, Pamplona, España.

Tratamiento con la enzima ARNasa A

El producto de la extracción del ADN de *Brucella abortus* cepa 2308 requirió de un tratamiento adicional con la enzima ARNasa A. Cada reacción se incubó a 37 °C durante diez minutos.

Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa

Los diferentes componentes utilizados en la reacción multiplex fueron estandarizados individualmente, siguiendo seis protocolos distintos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para validar el ADN genómico de *B. abortus* 2308 como control positivo, se realizó una PCR con la enzima Taq polimerasa y los cebadores *L12/L7*, los cuales codifican para la proteína ribosomal *L12/L7*. Una vez que la concentración y el volumen de ADN fueron estandarizados, se continuó con el desarrollo de los siguientes protocolos.

Tres distintas reacciones de PCR con la enzima termoestable y de alta fidelidad Pfu fueron estandarizadas: la primera con los cebadores *L12/L7*, la segunda con cada uno de los pares de cebadores *glk*, *omp25* y *trpE*, y la tercera con los pares de cebadores *glk*, *omp25* y *trpE* en una reacción múltiple o PCR multiplex, descrita por Whatmore et ál. (2007). Posteriormente, se estandarizaron dos protocolos de PCR con la enzima Taq polimerasa: el primero con cada uno de los pares de cebadores *glk*, *omp25* y *trpE* y el segundo con los pares de cebadores *glk*, *omp25* y *trpE* en una reacción multiplex, descrita por Whatmore et ál. (2007). Las secuencias de los cebadores *L12/L7*, *glk*, *omp25* y *trpE* se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados en la estandarización de las reacciones en cadena de la polimerasa y pesos moleculares esperados para los amplicones

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Pesos moleculares aproximados de los amplicones
<i>glk up</i>	5'-TATGGA AMA GATCGGCGG-3'	475 pb
<i>glk down</i>	5'-GGGCC TTGT CCTCGAAGG-3'	
<i>L7/L12f</i>	5'-GCTGTCCA AG CTCTCGAAGA-3'	100 pb
<i>L7/12r</i>	5'-CTGTTGC TGCTGCCGG-3'	
<i>omp25up</i>	5'-ATGCGCAC TCTTAAGTCTC-3'	490 pb
<i>omp25down</i>	5'-GCCSAGGAT GTTGCCGT-3'	
<i>trpE up</i>	5'-GCGCGCMT GGTATGGCG-3'	486 pb
<i>trpE down</i>	5'-CKSCCGC CATAGGCTTC-3'	

Fuente: Scott et ál. (2007); Guzmán (2008)

Finalmente, el protocolo de PCR multiplex estandarizado con la enzima Taq polimerasa y los cebadores *glk*, *omp25* y *trpE* fue validado con cada uno de los ADN genómicos de las distintas especies terrestres de *Brucella*: *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis* y *B. neotomae*.

Los parámetros de ciclaje en el termociclador Applied Biosystems 2720 se variaron según los cebadores de cada protocolo. Para las reacciones con *L12/L7*: 94 °C durante cuatro minutos, seguido por 35 ciclos de 94 °C por treinta segundos, 48 °C por un minuto y 68 °C por treinta segundos, y una elongación final de 68 °C por diez minutos. Para los cebadores *glk*, *omp* y *trpE* fueron las descritas por Whatmore et ál. (2007): 94 °C durante cinco minutos, seguido por treinta ciclos de 94 °C por un minuto, 53 °C por un minuto y 72 °C por un minuto; y una elongación final de 72 °C por diez minutos.

Ensayo de extensión de cebadores

Para el ensayo de extensión de cebadores se utilizó el kit ABI Prism SNaPshot Multiplex (Applied Biosystems®) con el producto de las PCR purificados y los cebadores publicados por Whatmore et ál. (2007) (tabla 2), con una concentración final de 2 µM.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados en la estandarización del ensayo de extensión de cebadores y pesos moleculares esperados

Nombre del cebador	Secuencias de los cebadores	Peso molecular esperado
<i>glk196R</i>	5'-CGCTAAGAA TTTGYTCGCCGG-3'	21 pb
<i>glk427R</i>	5'-TTTTTTTTTGAAGG ATGCGCACCGGGATGC-3'	32 pb
<i>glk255R</i>	5'-TTTTTTTTTTTTTT TTTTTAGGGTGGGC	43 pb
<i>omp151F</i>	GTGATCTT GTCGGC-3'	27 pb
<i>omp239F</i>	5'-TGGCTATACCGGTC TTTACCTGGCTA-3'	39 pb
<i>trp290R</i>	5'-TTTTTTTTTTTTTTTT CTTGCTGGCTGGAAGTCC AG-3' 5'-TTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTGAA ACCTTG GCGCCCGTCTGG-3'	49 pb

Fuente: Scott et ál. (2007)

Extensión de cebador con distintas temperaturas de extensión

El protocolo de la reacción de extensión se probó con dos protocolos de temperatura distintos, utilizando los productos purificados de la PCR multiplex con la enzima Pfu y ADN de *B. abortus* cepa 2308. El primer protocolo fue el indicado por Whatmore et ál. (2007): 94 °C durante cinco minutos, seguido por treinta ciclos de 94 °C por un minuto, 53 °C por un minuto y 72 °C por un minuto, con una elongación final de 72 °C por diez minutos. El segundo fue el indicado por el fabricante del SNaPshot Multiplex (Applied Biosystems®): 94 °C durante cinco minutos, seguido por veinticinco ciclos de 96 °C por diez segundos, 50 °C por cinco segundos y 60 °C por treinta segundos, finalizando con 72 °C por diez minutos. Ambas reacciones se ejecutaron en el termociclador Applied Biosystems 2720.

Extensión de cebadores con productos de reacción en cadena de la polimerasa purificados a través de columna y por extracción de gel

Para comparar los resultados de los dos métodos de purificación, la extensión de cebadores se realizó con los productos de la PCR multiplex con la enzima Pfu polimerasa y ADN de *B. abortus* cepa 2308, purificados por medio de columna y por extracción de gel, siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN®).

Reacción de extensión para cada cebador

Para realizar la extensión por separado de cada uno de los cebadores, *glk196R*, *omp151F*, *glk427R*, *omp239F*, *glk255R* y *trp290R* (Scott et ál., 2007), se utilizaron los productos de la PCR tanto con la enzima Pfu como con Taq polimerasa, con los pares de cebadores *glk*, *omp25* y *trpE* por separado y el ADN de *B. abortus* cepa 2308. Cada cebador tuvo una concentración final de 2 µM.

Validación de la técnica de extensión de cebador estandarizada

Una vez estandarizadas las reacciones descritas en el apartado “Ensayo de extensión de cebadores”, se ejecutaron las extensiones de cebadores con las PCR multiplex y la enzima Taq polimerasa con los ADN correspondientes a *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis* y *B. neotomae*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tratamiento con la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternero

Para remover los dNTPs no incorporados, todos los productos de las reacciones de extensión fueron tratados con la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternero CIAP (Fermentas®). Así, una unidad de la enzima se añadió a los productos de cada extensión de cebador, se incubó a 37 °C durante 30 minutos, seguido por una incubación a 85 °C por 15 minutos para lograr su inactivación.

Purificación de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa

Para eliminar los dNTPs y los cebadores, se purificaron los productos de la PCR a través de columnas de purificación QIAquick (QIAGEN®).

Electroforesis en gel de agarosa

El 10% del volumen de cada producto fue corrido por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001). El análisis se realizó por medio de luz ultravioleta a través del capturador y analizador de imágenes Chemidoc 170-8070 (Bio-Rad®).

Análisis de los resultados de las extensiones de cebadores

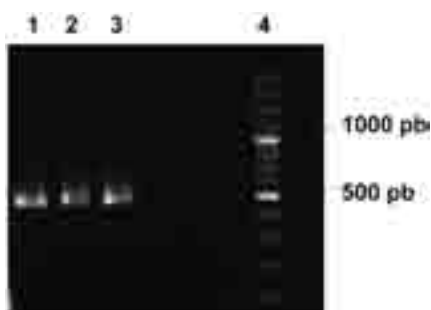
Todas las reacciones se evaluaron en el Analizador Genético 3130 (Applied Biosystems®) interpretado bajo el programa informático Gene Mapper. El marcador de peso molecular utilizado fue el LIZ-120 y la matriz de corrida electroforética fue la POP7 (Applied Biosystems®).

Resultados y discusión

Estandarización de las reacciones en cadena de la polimerasa

Los resultados obtenidos tanto con la enzima Taq como con la Pfu fueron muy similares, dándose bandas intensas de aproximadamente 500 pb (*glk* 475 pb, *omp25* 490 pb y *trpE* 486 pb), como se muestra en la figura 1. Las concentraciones finales de los tres cebadores difieren: para *omp 25* y *glk* es de 0,42 uM, y para *trpE* es de 1 uM, en una reacción de 50 uL. Asimismo, la temperatura de anillamiento fue de 55 °C para los tres pares de cebadores.

Figura 1. Electroforesis de la reacción en cadena de la polimerasa con la enzima Pfu

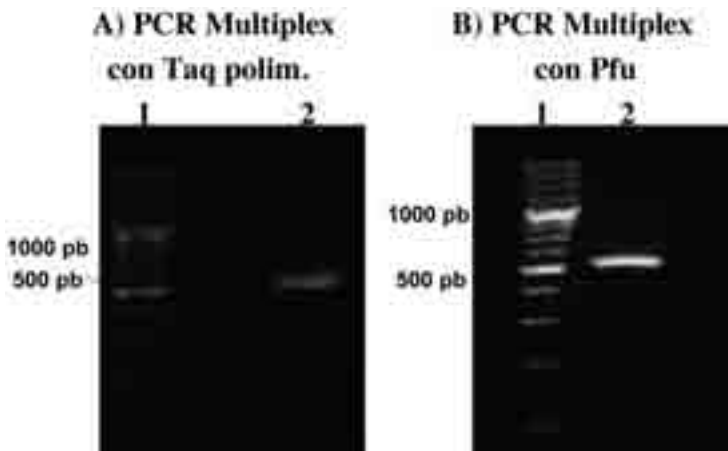


Nota: los pares de cebadores *glk*, *omp* y *trpE* en reacciones por separado y ADN de *B. abortus* 2308. Carril 1: PCR con *omp25*, 2: PCR con *glk*, 3: PCR con *trpE*, 4: MPM 0403 (Fermentas®). Resultados similares con la enzima Taq polimerasa.

Fuente: los autores

El protocolo de la PCR multiplex estandarizado fue: 16,8 uL agua ultrapura estéril, 25 uL Master Mix 2X (Fermentas), 1,7 uL cebador *trpE up* (1 uM), 1,7 uL cebador *trpE down* (1 uM), 0,7 uL cebador *omp 25 up* (0,4 uM), 0,7 uL cebador *omp 25 down* (0,4 uM), 0,7 uL cebador *glk up* (0,4 uM), 0,7 uL cebador *glk down* (0,4 uM) y finalmente 2 uL ADN. En la figura 2 se muestra el resultado de las PCR realizadas con ambas enzimas, en las que se observa una señal intensa con un peso aproximado de 500 pb, correspondiente a las tres bandas de los amplicones de *glk*, *trpE* y *omp25*.

Figura 2. Electroforesis de las reacciones en cadena de la polimerasa multiplex con las enzimas Taq polimerasa (A) y Pfu (B), con ADN de *B. abortus* 2308



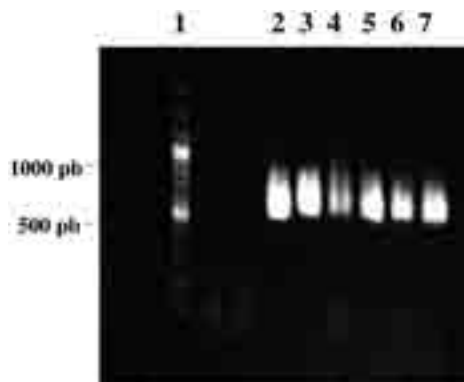
Nota: En cada reacción se usaron los tres pares de cebadores *glk*, *omp25* y *trpE*. Con ellas se muestra el MPM 0323 (Fermentas®).

Fuente: los autores

Con el fin de aplicar y evaluar la estandarización realizada, se reprodujo el protocolo de la PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa, utilizando el ADN de las especies terrestres de *Brucella*: *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis* y *B. neotomae* (figura 3). La elección de reproducir estas reacciones solamente con la enzima Taq, se debió a la facilidad que implica el que se encuentre en una mezcla preparada con los dNTPS y el amortiguador, a su menor costo económico y a los buenos resultados generados, semejantes a los de la enzima Pfu. En la figura 3 se muestran las bandas obtenidas para cada una de las especies terrestres de *Brucella*, las cuales presentan una intensidad muy similar entre ellas y un peso

de aproximadamente 500 pb, como se esperaba. Por ello, se continuó con la estandarización de la extensión de cebador.

Figura 3. Electroforesis de las reacciones en cadena de la polimerasa multiplex con la enzima Taq polimerasa y los ADN genómicos de seis especies de *Brucella*.



Nota: Carril 1: MPM 0323 (Fermentas®); 2: *B. abortus*; 3: *B. melitensis*; 4: *B. suis*; 5: *B. ovis*; 6: *B. canis*; 7: *B. neotomae*.

Fuente: los autores

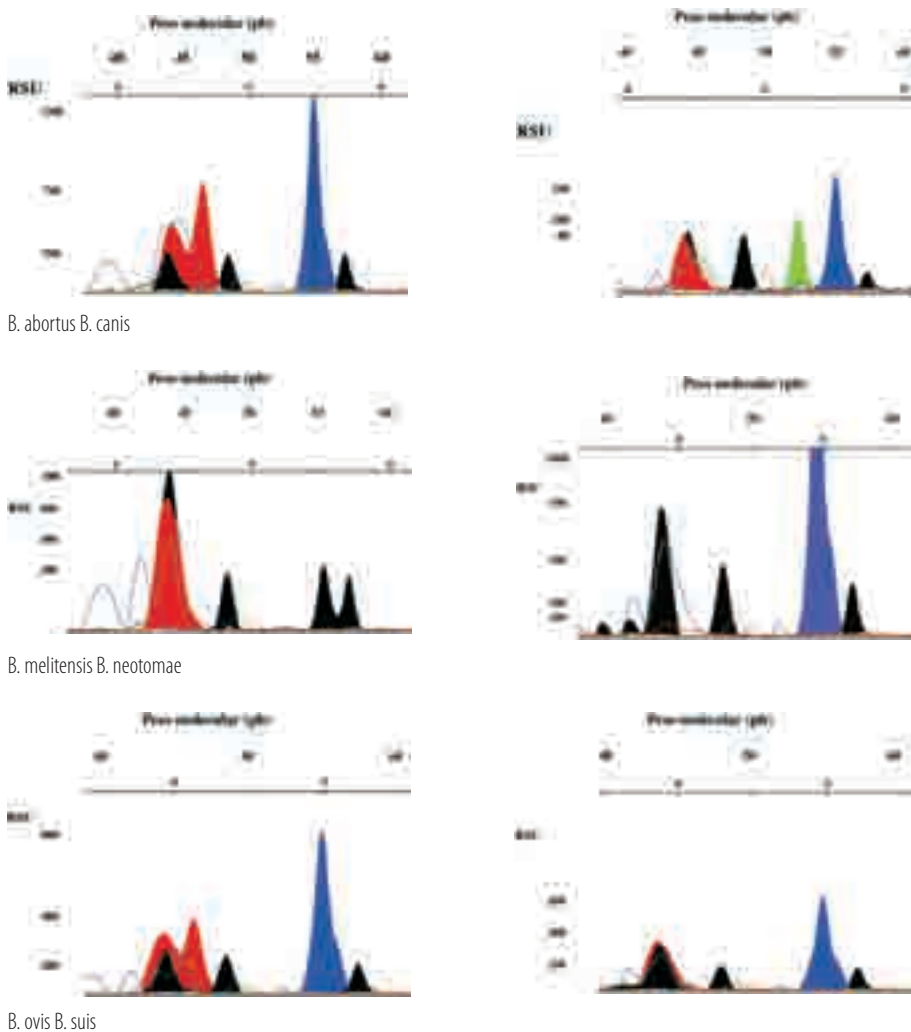
Ensayo de extensión de cebadores

Cada uno de los nucleótidos se representa con la forma de un “pico” coloreado por uno de cuatro colores designados en los electroferogramas. Así, el color negro corresponde al nucleótido citosina (C), el verde para adenina (A), el azul para guanina (G) y el rojo para timina (T) o uracilo (U) (ABI Prism SNaPshot Multiplex, Applied Biosystems®). Los pesos moleculares esperados para los amplicones de las extensiones de cebador según Whatmore et ál. (2007) oscilaban entre 21 y 49 pb. Los pesos moleculares obtenidos difieren con los esperados, ya que su rango oscila entre 41 a 56 pb. Esto puede ser por la diferencia de tecnologías utilizadas o por el uso de diferentes marcadores de peso molecular y matrices para la corrida electroforética. Los picos obtenidos tanto con el ciclaje de extensión recomendado por Whatmore et ál. (2007), así como el sugerido por Applied Biosystems, fueron semejantes. Por esa razón se decidió implementar el ciclo del fabricante, ya que su protocolo es más corto.

Con el objetivo de validar el protocolo de extensión de cebador se realizaron las extensiones de cebadores utilizando los productos de la PCR multiplex con la

enzima Taq polimerasa y los ADN correspondientes a las especies terrestres de *Brucella*: *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis* y *B. neotomae*, purificados por pasaje en columna. Los resultados se observan en la figura 4.

Figura 4. Electroferogramas de la extensión de cebador para las seis especies terrestres de *Brucella*, utilizando las reacciones en cadena de la polimerasa multiplex con la enzima Taq polimerasa, purificados a través de columna sílica



Fuente: los autores

Para la extensión de cebadores de *B. abortus*, el orden de los amplicones presenta una variación a la hora de interpretar los resultados debido a que el producto de extensión del gen *glk427R* tiende a pesar menos que el *omp151F*, difiriendo así con el orden publicado por Whatmore et ál. (2007), debido posiblemente al uso de diferentes matrices para la corrida electroforética en ambos ensayos. Así, la lectura debe ser: T T C C G C. A su vez, los pesos moleculares mostrados presentan un ligero aumento de 1 pb o 2 pb con respecto a las reacciones de extensión de cebador realizadas con el AND genómico de *B. abortus* 2308, el cual no es significativo, ya que las señales de los nucleótidos conservaron el orden esperado. Por otra parte, los picos correspondientes a citosina (negro) se muestran con unidades de fluorescencia menores que las de timina (rojo) y guanina (azul), posiblemente porque se comparten en la señal entre los tres picos.

La extensión de cebador correspondiente a *B. canis* se interpretó como T C C A G C. Esta especie de *Brucella* es la única en presentar un pico de adenina (verde) de aproximadamente 52 pb, por lo que se destaca del resto de electroferogramas. La mayoría de las señales obtenidas presentaron unidades de fluorescencia muy similares, alrededor de los 90 RSU.

La interpretación para *B. melitensis* corresponde a T C C C C. La extensión de cebador para esta especie se diferencia del resto de las especies, ya que el pico correspondiente al gen *glk255R*, de aproximadamente 55 pb, es una citosina (color negro). Las repeticiones de la extensión de cebador realizadas a partir de los productos de la PCR con ADN de *B. melitensis* presentaron igual patrón de las señales en los electroferogramas, las cuales evidencian la ausencia de uno de los picos correspondiente a la citosina del gen *omp239F*, con un peso molecular de 50 pb aproximadamente. Este efecto pudo suceder porque la señal negra fue repartida en los otros picos de citosinas. Aun así, la causa se desconoce con certeza.

El electroferograma de *B. neotomae* se diferencia debido a que es el único en el que ningún gen se representa como timina (pico rojo). Por su parte la señal de color negro se mostró repartida entre cinco picos, los cuales presentaron un peso molecular menor que en los electroferogramas correspondientes a las demás especies de *Brucella*, cuyo rango inició con 39 pb. Aun así, las señales obtenidas conservaron el patrón esperado: C C C C G C.

Para *B. ovis* se observa el mismo patrón de las extensiones de cebador descritas anteriormente. Así, los picos correspondientes a citosinas presentan unidades de fluorescencia menores que la timina (picos de color rojo) y esta a su vez es menor que la RSU de la señal de guanina (azul). La lectura de los genes representados en la figura corresponde a T C T C G C, cuyos pesos moleculares oscilan entre 43 pb y 57 pb.

La extensión de cebador para *B. suis* se representó con las señales de fluorescencia más bajas al ser comparada con los demás electroforogramas, en los que el pico mayor dio una señal de 450 RSU, correspondiente a guanina, con un peso molecular de aproximadamente 54 pb. Además, el nucleótido *omp239F* no presentó el pico esperado alrededor de las 50 pb. Esta presentación fue constante en las repeticiones de extensión de cebador realizadas. La causa se desconoce con certeza, pero la señal de color negro se distribuyó en los otros tres picos de los genes de citosina. Se puede aludir que las unidades de fluorescencia (RSU) son menores a mayor cantidad de señales del mismo color.

Conclusiones

El protocolo molecular estandarizado en este proyecto tiene sustanciales ventajas en términos de tiempo, al compararse con los métodos bioquímicos utilizados para la diferenciación de especies de *Brucella*. La PCR multiplex, la purificación de los productos de la PCR y la extensión de cebador es posible completarlas en dos días, contrariamente a los varios días de tipificación y cultivos que las otras técnicas implican. Aun así, las pruebas moleculares y bioquímicas no se deben excluir entre ellas, sino considerar a cada una como una herramienta para la diferenciación de especies, integrando todos los resultados obtenidos.

El proceso de estandarización no se logra con la simple reproducción de los pasos que conforman un protocolo; esta utiliza el fundamento del protocolo como cimiento para poder iniciar. Durante el desarrollo, las condiciones necesarias para concluir en el mismo punto suelen ser muy diferentes a las utilizadas por el patrón. Esto se ejemplifica con las 157 reacciones de la PCR, las 48 electroforesis, las 55 purificaciones de productos de la PCR y las aproximadamente 50 reacciones de extensión de cebador, necesarias para estandarizar en el laboratorio de Bioquímica de Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, un protocolo optimizado y validado en otra latitud.

La evaluación por separado de cada uno de los componentes de una reacción múltiple, sea PCR o extensión de cebador, es muy importante para determinar su eficiencia. Una vez que todos los componentes han sido optimizados por separado, la reacción múltiple generará consecuentemente óptimos resultados.

Los protocolos de la PCR con las enzimas termoestables Pfu y Taq polimerasa presentaron resultados similares al ser desarrollados con las mismas concentraciones de los componentes y temperaturas de ciclaje. Aun así, aunque la enzima Pfu ofrece mayor fidelidad, el protocolo con Taq polimerasa es más práctico en términos de tiempo, costo económico y manipulación, debido a la formulación en mezcla del *master mix*, el cual es un preparado que contiene la enzima polimerasa, los dNTPs y el amortiguador.

La concentración de los pares de cebadores y la temperatura de anillamiento fueron las variantes más significativas realizadas en la estandarización de las PCR. Las concentraciones de los pares de cebadores *omp25*, *glk* y *trpE* utilizadas que obtuvieron amplicones con señales intensas y específicas en la electroforesis fueron: 0,42 μM , 0,42 μM y 1 μM , respectivamente. La temperatura de anillamiento para las reacciones de PCR con los pares de cebadores *omp25*, *glk* y *trpE* por separado y PCR multiplex, tanto con la enzima Pfu como con la Taq polimerasa, se debió aumentar en 2 °C con respecto a la sugerida por Whatmore et ál. (2007), pasando de 53 °C a 55 °C.

Recomendaciones

Con el fin de lograr una completa optimización y validación, la técnica de extensión de cebador a partir de productos de PCR purificados debe continuar su estandarización en el laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Para ello se deben realizar más extensiones de cebador con ADN de una cepa estándar de *Brucella*, comparándolo con corridas electroforéticas de los cebadores utilizados para hacer la extensión de cebador.

También se recomienda tratar de mejorar la señal de fluorescencia de los picos en los electroferogramas utilizando distintas concentraciones de los cebadores en la extensión de cebador.

Con el objetivo de obtener picos de fluorescencia más distantes uno de otro, no sobrepuestos, se recomienda diseñar los cebadores utilizados en la extensión de cebador con mayor diferencia de tamaños, al menos con una distancia de diez nucleótidos.

Referencias

Batut, J; Andersson, S.; O'Callaghan, D. "The evolution of chronic infection strategies in the α proteobacteria". *Nature Reviews Microbiology* 2 (2004): 933-945. Impreso.

Boschiroli, M. L.; Foulongne, V.; O'Callaghan, D. "Brucellosis: a worldwide zoonosis". *Current Opinion Microbiology* 4.1 (2004): 58-64. Impreso.

Campos, R. Comunicación personal con Dra. Rebeca Campos Sánchez, MQC, MSc. San José: Universidad de Costa Rica (Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular). 12 de diciembre del 2008.

Center for Food Security and Public Health (CFSPH). "Brucellosis". *Iowa State University College of Veterinary Medicine*. CFSPH. 2003. Web. 20 May. 2008. <<http://www.cfsph@iastate.edu>>.

Cloeckáert, Axel; Jean Michel Verger; Maggy Grayon & Nieves Vizcaíno. "Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*". *FEMS Microbiology Letters* 145.1 (noviembre 1996): 1-8. Impreso.

Cloeckáert, Axel; Maggy Grayon; Olivier Grépinet & Karim Sidi Boumedine. "Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests". *Microbes and Infection* 5.7 (junio 2003): 593-602. Impreso.

Corbel, Michael. "Brucellosis: an overview". *Emerging Infectious Diseases* 3.2 (abril-junio 1997): 213-221. Impreso.

Cutler, S. J.; Whatmore, A.; Commander, N. J. "Brucellosis- new aspects of an old disease". *Journal of Applied Microbiology* 98.6 (2005): 1270-1281. Impreso.

Del Vecchio, Vito; Vinayak Kapatral; Philip Elzer; Guy Patra & Cesar Mujer. "The genome of *Brucella melitensis*". *Veterinary Microbiology* 90.1-4 (diciembre 2002): 587-592. Impreso.

Foster, Geoffrey; Bjorn Osterman; Jacques Godfroid; Isabelle Jacques & Axel Cloeckáert. "*Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57.11 (noviembre 2007): 2688-2693. Impreso.

Godfroid, Jacques; Axel Cloeckáert; Jean Pierre Liautard; Stephan Kohler; David Fretin; Karl Walravens; Bruno Garin Bastuji & Jean Jacques Letesson. "From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis". *Veterinary Research* 36.3 (mayo-junio 2005): 313-326. Impreso.

Gorvel, Jean Pierre & Edgardo Moreno. "*Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication". *Veterinary Microbiology* 90.1-4 (diciembre 2002): 281-297. Impreso.

Groussaud, Pauline; Stephen Shankster; Mark Koylass & Adrian Whatmore. "Molecular typing divides marine mammal strains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences". *Journal of Medical Microbiology* 56.11 (noviembre 2007): 1512-1518. Impreso.

Guzmán, C. Comunicación personal con Caterina Guzman Verri. Coordinadora del Programa de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Heredia, Costa Rica: Universidad Nacional, Escuela de Medicina Veterinaria. 22 de julio del 2008.

Hidalgo, W. "Determinación de la seroprevalencia de anticuerpos contra *Brucella canis* y *Brucella abortus* en tres poblaciones caninas del Valle Central". Tesis a optar por el grado de Licenciatura en Medicina Veterinaria, Heredia, Costa Rica: Universidad Nacional, 2004.

Hoover, D. L. & Friedlander, A. M. "Brucellosis". En Zajtchuk, R. *Medical aspects of chemical and biological warfare* (pp. 513-521). USA: Department of Army, 1997. Impreso.

Ko, Jinkyung & Splitter Gary. "Molecular host-pathogen interaction in brucellosis". *Clinical Microbiology Reviews* 16.1 (enero 2003): 65-78. Impreso.

Laboratorio de Inmunología. *Registros de muestras recibidas para diagnóstico de Brucella*. Heredia, Costa Rica: Universidad Nacional, Escuela de Medicina Veterinaria, 1998-2007. Impreso.

López, I. Comunicación personal con el señor Ignacio López Goni. Pamplona, España: Universidad de Navarra, 2008. Impreso.

McDonald, W. L.; Jamaludin, R.; Mackereth, G.; Hansen, M.; Humphrey, S.; Short, P.; Taylor, T.; Swingler, J.; Dawson, C. E.; Whatmore, A. M.; Stubberfield, E.; Perrett, L. L.; Simmons, G. "Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand". *Journal of Clinical Microbiology* 44.12 (2006): 4363-4370. Impreso.

Michaux, Sylvie; Jocelyne Paillisson; Marie Josee Carles Nurit; Gisele Bourg; Annick Allardet Servent & Michel Ramuz. "Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome". *Journal of Bacteriology* 175.3 (febrero 1993): 701-705. Impreso.

Ministerio de Agricultura y Ganadería. “Boletines epidemiológicos”. Costa Rica: *Servicio Nacional de Salud Animal*. 2008. Web. 2 Jun. 2008. <<http://www.senasa.go.cr/boletinepidemiologico.htm>>.

Moreno, Edgardo. “Brucellosis in Central America”. *Veterinary Microbiology* 90.1-4 (2002): 31-38. Impreso.

Moreno, Edgardo & Ignacio Moriyón. “*Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence”. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences* 99.1 (enero 2002): 1-3. Impreso.

Organización Panamericana de la Salud. “Boletín epidemiológico”. 2000. Web. 16 Sept. 2008. <http://www.paho.org/Spanish/SHA/be_v21n3-casos.htm>.

Pizarro, Javier; Edgardo Moreno & Jean Pierre Gorvel. “*Brucella abortus* invasion and survival within professional and nonprofessional phagocytes”. *Advanced Cellular and Molecular Biology Membranes and Organs* 6 (1999): 201-232. Impreso.

Ratushna, Vladyslava; David Sturgill; Sheela Ramamoorthy; Sherry Reichow; Yongqun He; Raju Lathigra; Nammalwar Sriranganathan; Shirley Halling; Stephen Boyle & Cynthia Gibas. “Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp.”. *BMC Microbiology* 6 (2006): 1-20. Impreso.

Sambrook, J. & Russell, D. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3ª Ed.). USA: Cold Spring Harbor, 2001. Impreso.

Sangari, F. & Agüero, J. “Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems”. *Microbiology and Pathology* 11 (1991): 443-446. Impreso.

Scholz, Holger; Zdenek Hubalek; Jirina Nesvadbova; Herbert Tomaso; Gilles Vergnaud; Philippe Le Flêche; Adrian Whatmore; Sascha Al Dahouk; Monika Krüger; Csilla Lodri & Martin Pfeffer. “Isolation of *Brucella microti* from soil”. *Emerging Infectious Diseases* 14.8 (agosto 2008): 1316-1317. Impreso.

Scott, Julie; Mark Koylass; Michael Stubberfield & Adrian Whatmore. “Multiplex assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *Brucella* isolates at the species level”. *Applied and Environmental Microbiology* 73.22 (noviembre 2007): 7331-7337. Impreso.

Smith, Laurie & Ficht, T. A. “Pathogenesis of *Brucella*”. *Critical Reviews in Microbiology* 17.3 (1990): 209-230. Impreso.

Ugalde, Rodolfo. “Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts”. *Microbes and Infection* 1.14 (diciembre 1999): 1211-1219.

Vizcaíno, N; Verger, J. M.; Grayon, M.; Zygmunt, M. S.; Cloeckært, A. “DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion

in *Brucella abortus*, an other species-specific markers”. *Microbiology* 143.9 (septiembre 1997): 2913-2921. Impreso.

Whatmore, Adrian; Lorraine Perret & Alastair MacMillan. “Characterization of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing”. *BMC Microbiology* 7 (abril 2007): 1-15. Impreso.