

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Estandarización de un protocolo para la caracterización molecular
de aislamientos de bacterias del género *Brucella***

Modalidad: Práctica Dirigida

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Lohendy Mayela Muñoz Vargas

Campus Pbro. Benjamín Núñez

2009

APROBACION DEL TRIBUNAL EXAMINADOR**Estandarización de un protocolo para la caracterización molecular de aislamientos de bacterias del género *Brucella***

Dr. Jorge Quirós Arce, DMV.

Decano de la Facultad de Ciencias de la Salud

Dra. Laura Castro Ramírez, DMV.

Directora Escuela de Medicina Veterinaria

Dra. Caterina Guzmán Verri, MQC, PhD.

Tutor

Dr. Edgardo Moreno Robles, MQC, PhD.

Lector

Dr. Elías Barquero Calvo, MQC, MSc.

Lector

Fecha: _____

AGRADECIMIENTO

Agradezco a las personas que contribuyeron con su experiencia, asesoramiento, paciencia y amistad durante la elaboración de este trabajo; Dra. Caterina Guzmán Verri, el señor Reynaldo Pereira (Rey), Dr. Elías Barquero y Dr. Edgardo Moreno; los cuales me ofrecieron su confianza en los Laboratorios de Bioquímica, Inmunología y Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

Agradezco a la Dra. Rebeca Campos Sánchez del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica por su constante guía y profesionalismo.

DEDICATORIA

A mi Creador por haberme dado la oportunidad de vivir y luchar.

A mis padres por ser mis mejores amigos y mi fuerte bastón durante el sendero de la vida.

A mis hermanos: Loyree, Randall, Arlette, Erlend y los “chiquillos” por su constante cariño y apoyo.

A Lee por demostrarme que el amor sobrepasa límites y barreras.

A los pacientes que despertaron en mí sentimientos de caridad, ternura y compasión.

A los amigos con los cuales compartí muchos momentos de felicidad, estrés y hasta lágrimas, especialmente Mari, Vane, Mabe y Luis.

A estos seres especiales les dedico el proyecto de graduación ya que mi meta no estaría completa sin su presencia.

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-------------|
| APROBACION DEL TRIBUNAL EXAMINADOR..... | i |
| AGRADECIMIENTO..... | ii |
| DEDICATORIA..... | iii |
| INDICE DE CONTENIDOS..... | iv |
| INDICE DE CUADROS..... | vii |
| INDICE DE FIGURAS..... | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS..... | xii |
| RESUMEN..... | xiii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| 1. INTRODUCCION..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes..... | 1 |
| 1.2 Justificación..... | 4 |
| 1.3 Objetivos..... | 6 |
| 1.3.1 Objetivo general..... | 6 |
| 1.3.2 Objetivos específicos..... | 6 |
| 2. METODOLOGIA: MATERIALES Y METODO..... | 7 |
| 2.1 Muestras utilizadas..... | 7 |
| 2.2 Tratamiento con la enzima ARNasa A..... | 8 |
| 2.3 Estandarización de los PCR | 9 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 2.4 | Ensayo de extensión de cebadores..... | 12 |
| 2.4.1 | Reacción de cebadores con distintas temperaturas de extensión..... | 13 |
| 2.4.2 | Extensión de cebadores con productos de PCR purificados a través de columna y por extracción de gel..... | 14 |
| 2.4.3 | Reacción de extensión para cada cebador..... | 14 |
| 2.5 | Validación de la técnica de extensión de cebador estandarizada..... | 15 |
| 2.6 | Tratamiento con la enzima Fostasa alcalina de intestino de ternero (CIAP)..... | 15 |
| 2.7 | Purificación de los productos de PCR..... | 15 |
| 2.8 | Electroforesis en gel de agarosa..... | 16 |
| 2.9 | Análisis de los resultados de las extensiones de cebadores..... | 16 |
| 3. | RESULTADOS Y DISCUSION..... | 17 |
| 3.1 | Extracción de ADN..... | 17 |
| 3.2 | Estandarización de las PCR..... | 18 |
| 3.3 | Purificación de los productos de PCR..... | 30 |
| 3.4 | Ensayo de extensión de cebadores..... | 32 |
| 3.4.1 | Reacción de cebadores con distintas temperaturas de extensión..... | 33 |
| 3.4.2 | Extensión de cebadores con productos de PCR purificados a través de columna y por extracción de gel..... | 34 |
| 3.4.3 | Reacción de extensión para cada cebador..... | 36 |
| 3.4.4 | Reacciones de extensión de cebador a multiplex..... | 40 |
| 4. | CONCLUSIONES..... | 48 |
| 5. | RECOMENDACIONES..... | 50 |
| 6. | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 7. ANEXOS..... | 57 |
| Anexo 1: Protocolo de obtención y extracción de ADN a partir de la cepa pura de <i>Brucella abortus</i> 2308 (López, 2008)..... | 57 |
| Anexo 2: Protocolo de extensión de cebadores..... | 58 |
| Anexo 3: Matrices de condiciones analizadas para la estandarización del PCR con el par de cebadores <i>trpE</i> y el ADN de <i>B. abortus</i> 2308, tanto con la enzima Pfu como con la Taq polimerasa..... | 61 |
| Anexo 4: SNPs específicos que diferencian las especies de <i>Brucella</i> (Whatmore et al., 2007)..... | 62 |
| Anexo 5. Electroferogramas de la extensión de cebador para las seis especies terrestres de <i>Brucella</i> , utilizando los PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa, purificados en columna..... | 63 |
| Anexo 6. Resumen de la metodología a seguir para la realización de la extensión de cebador, con los parámetros de los protocolos estandarizados en el desarrollo de este documento..... | 64 |

INDICE DE CUADROS

| | | |
|------------------|--|-----------|
| Cuadro 1: | ADN genómicos de distintas especies de <i>Brucella</i> utilizados en la estandarización de la caracterización molecular..... | 7 |
| Cuadro 2. | Estandarización de la concentración requerida de ARNasa para eliminar el ARN presente en las extracciones de ADN genómico de la cepa <i>B. abortus 2308</i> | 9 |
| Cuadro 3: | Secuencias de los cebadores utilizados en la estandarización de los PCR y pesos moleculares esperados para los amplicones (Scott et al., 2007; Guzmán, 2008)..... | 11 |
| Cuadro 4: | Secuencias de los cebadores utilizados en la estandarización del ensayo de extensión de cebadores y pesos moleculares esperados de los amplicones (Scott et al., 2007)..... | 12 |
| Cuadro 5. | Protocolos estandarizados para cada PCR..... | 26 |
| Cuadro 6: | Pesos moleculares de la extensión de cada cebador por separado utilizando los amplicones del PCR con los pares de cebadores por separado, la enzima Taq polimerasa y el ADN de <i>B. abortus</i> <i>2308</i> , posterior a la purificación por columna..... | 39 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|-----------|
| Figura 1. | Electroforesis de la extracción de ADN a partir de la cepa <i>B. abortus</i> 2308..... | 17 |
| Figura 2. | Electroforesis de la extracción de ADN de la cepa <i>B. abortus</i> 2308 luego del tratamiento con la enzima ARNasa A a una concentración de 0,5 mg/ml..... | 18 |
| Figura 3. | Electroforesis del PCR con Taq polimerasa y cebadores <i>L12/L7</i> | 19 |
| Figura 4. | Electroforesis del PCR con la enzima Pfu, los cebadores <i>L12/L7</i> y el ADN de <i>B. abortus</i> 2308..... | 20 |
| Figura 5. | Electroforesis del PCR con la enzima PFu, los pares de cebadores <i>glk</i> , <i>omp</i> y <i>trpE</i> en reacciones por separado y ADN de <i>B. abortus</i> 2308..... | 21 |
| Figura 6. | PCR con los pares de cebadores por separado, la enzima PFu y ADN de <i>B. abortus</i> 2308, con 55°C de temperatura de anillamiento..... | 23 |
| Figura 7. | Electroforesis de las reacciones de PCR multiplex con las enzimas Taq polimerasa (A) y Pfu (B), con ADN de <i>B. abortus</i> 2308..... | 24 |
| Figura 8. | PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa y los ADN genómicos de seis especies de <i>Brucella</i> | 25 |

- Figura 9.** Electroforesis de los productos de PCR purificados por los métodos de extracción en gel (A) y por pasaje de columnas (B), ambos reacciones con la enzima Taq polimerasa y ADN de *B. abortus* 2308.....**30**
- Figura 10.** Electroforesis de los productos del PCR multiplex y del PCR con cada par de cebadores antes y después de su purificación por columna, utilizando la enzima Taq polimerasa.....**31**
- Figura 11.** Electroferograma del control positivo de la extensión de cebadores.....**32**
- Figura 12.** Electroferograma de la extensión de cebadores a partir de PCR multiplex con la enzima Pfu polimerasa y ADN de *B. abortus*, purificado por pasaje en columna; utilizando dos diferentes protocolos de temperaturas de extensión.....**33**
- Figura 13.** Electroferograma de la extensión de cebadores a partir del PCR multiplex con la enzima Pfu polimerasa y ADN de *B. abortus*; con dos diferentes protocolos de purificación.....**35**
- Figura 14.** Electroferograma de la extensión de cebador para *glk196R* y *omp151R* a partir de los productos del PCR con la enzima Pfu, con ADN de *B. abortus* 2308 y los pares de cebadores *glk* y *omp25* por separado, purificados en columna.....**36**

- Figura 15.** Electroferograma de la extensión de cebador para *omp239F*, *trpE290R* y *glk427R* a partir de los productos del PCR con la enzima Pfu, con ADN de *B. abortus 2308* y los pares de cebadores *glk*, *trpE* y *omp25* por separado, purificados en columna.....37
- Figura 16.** Electroferograma de la extensión de cebador para *glk255R* a partir de los productos del PCR con la enzima Pfu, con ADN de *B. abortus 2308* y los pares de cebadores *glk*, purificados en columna.....38
- Figura 17.** Electroferograma de la extensión de cebadores a partir de los productos purificados por columna del PCR multiplex con ADN de *B. abortus 2308*.....40
- Figura 18.** Electroferograma de la extensión de cebador para *B. abortus* (genotipo A) a partir de los productos purificados por columna del PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa.....42
- Figura 19.** Electroferograma de la extensión de cebador para *B. canis* a partir de los productos purificados por columna del PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa.....43
- Figura 20.** Electroferograma de la extensión de cebador para *B. melitensis* a partir de los productos purificados por columna del PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa.....44

- Figura 21.** Electroferograma de la extensión de cebador para *B. neotomae* a partir de los productos purificados por columna del PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa.....45
- Figura 22.** Electroferograma de la extensión de cebador para *B. ovis* a partir de los productos purificados por columna del PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa.....46
- Figura 23.** Electroferograma de la extensión de cebador para *B. suis* a partir de los productos purificados por columna del PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa.....47

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| A: | nucleótido Adenina |
| ADN: | ácido desoxirribonucleico |
| C: | nucleótido Citosina |
| dNTPs: | deoxinucleótidos trifosfatos |
| EMV: | Escuela de Medicina Veterinaria |
| G: | nucleótido Guanina |
| MPM: | marcador de peso molecular |
| pb: | pares de bases |
| PCR: | reacción en cadena de la polimerasa |
| RSU: | unidades de fluorescencia |
| s: | segundos |
| SNPs: | polimorfismo en un solo nucleótido |
| T: | nucleótido Timina |
| U: | nucleótido Uracilo |
| UCR : | Universidad de Costa Rica |
| uL: | microlitros |
| UNA: | Universidad Nacional de Costa Rica |

RESUMEN

La brucelosis es la enfermedad zoonótica más extendida a nivel mundial. Es causada por una bacteria Gram negativa perteneciente al género *Brucella*, el cual incluye nueve especies distintas e infectantes de mamíferos terrestres y marinos (Cloeckáert et al., 2003; Corbel, 1997; Foster et al., 2007). 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 (Scott et al., 2007). 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, con el cual se permite identificar a un aislamiento como miembro de una de las nueve especies reconocidas (Scott et al., 2007, Whatmore et al., 2007). Los métodos tradicionales para la identificación de *Brucella* a nivel de especie, consumen mucho tiempo y ponen en riesgo al personal laboratorial (Scott et al., 2007). 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 abordaje de la brucelosis en Costa Rica. El siguiente trabajo presenta la estandarización del protocolo para la extracción de ADN de *Brucella*, la estandarización 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.

ABSTRACT

Brucellosis is the most extensive zoonotic disease worldwide. It is caused by a Gram negative bacteria of the genus *Brucella* comprising nine distinct species pathogenic for terrestrial and marine mammals (Cloeckáert et al., 2003; Corbel, 1997; Foster et al., 2007; Scott et al., 2007). Each *Brucella* species presents nucleotide variations in the DNA that causes changes in specific positions of the genome. These changes are named polymorphisms. The polymorphism in the genes that codify for the *glk*, *omp25* y *trpE* proteins of *Brucella* species (Scott et al., 2007) was used to develop a multiple assay based in the primer extension method, to identify a bacterial isolate and include them within one of the nine recognized *Brucella* species (Scott et al., 2007, Whatmore et al., 2007). The traditional methods to identify the *Brucella* species can be time-consuming, and require extensive manipulation of the isolates the assays may pose a hazard to laboratory personnel (Scott et al., 2007). The objective of this paperwork was to simplify the identification procedures, reduce the time of identification and generation of an efficient and unambiguous diagnostic tool for epidemiological vigilance and diagnosis of brucellosis. This thesis presents the standardization procedures required to extract *Brucella* DNA, the standardization of Polymerase Chain Reactions (PCR) and primer extension assays.

1. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

La brucelosis es la enfermedad zoonótica más extendida a nivel mundial que afecta diversos animales, incluyendo especies domésticas y de vida silvestre (Cloeckáert et al., 2003; Corbel, 1997). Es la mayor causa de enfermedad en el área productiva, con serias implicaciones para el bienestar animal y el rendimiento económico. Por su potencial zoonótico, es una constante preocupación en materia de salud pública (Organización Panamericana de la Salud, 2000).

La brucelosis es causada por *Brucella*, una bacteria Gram negativa, facultativa e intracelular, con dos cromosomas circulares en la mayoría de los genomas de sus biovars y filogenéticamente clasificada dentro de la subdivisión $\alpha 2$ de la clase *Proteobacteria* (Ko et al., 2003; Ratushna et al., 2006).

Nueve especies son reconocidas dentro del género *Brucella*, siete de éstas *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* y *B. microti* son terrestres (Cloeckáert et al., 2003; Scholz et al., 2008, Foster et al, 2007) y su clasificación está basada principalmente en diferencias fenotípicas y de patogenicidad, además de la preferencia de hospederos (Groussaud et al., 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 liberes silvestres europeas; *B. ovis* a los ovinos, *B. canis* a los caninos, *B. microti* y *B. neotomae* a roedores (Cloeckáert et al., 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 al., 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 al., 2003; Foster et al., 2007; Scott et al., 2007).

La infección entre animales ocurre por transmisión venérea o por contacto directo de la piel y 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 et al., 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 al., 2007).

Una vez dentro del hospedero, *Brucella* invade fagocitos profesionales y no profesionales y se replica dentro del retículo endoplásmico, sin poseer factores de virulencia como cápsulas, fimbrias o exotoxinas (Michaux et al., 1993; Ugalde, 1999; DelVecchio et al., 2002; Gorvel et al., 2002; Moreno et al., 2002). El control de la infección depende mayormente de la confrontación de las defensas del huésped por un lado, y de la habilidad de *Brucella* para reproducirse y ganar acceso a los diferentes tejidos sin ser destruida, por el otro (Moreno et al., 2002). De esta forma la bacteria se distribuye de forma sistémica y pasa a localizarse en órganos relacionados con el sistema retículo endotelial como bazo y nódulos linfáticos, además en órganos reproductores y glándulas mamarias (Batut et al., 2004). El período de incubación es difícil de determinar pero ha sido estimado desde 5 días hasta varios meses. La mayoría de infecciones en humanos llegan a ser aparentes después de las 2 a 4 semanas (Center for Food Security and Public Health, 2003; Godfroid et al., 2005, Hoover et al., 1997).

En la mayoría de los animales el síntoma más común es el aborto, usualmente durante la segunda mitad de la gestación (Cutler et al., 2005). También puede presentarse reabsorciones,

placentitis, metritis, orquitis, epididimitis, linfadenitis, meningitis y artritis (Center for Food Security and Public Health, 2003). En el ser humano, los síntomas incluyen desde fiebre recurrente, dolor lumbar, mialgia, conjuntivitis, anorexia, sudor nocturno y náuseas, hasta meningitis, osteomielitis, fatiga crónica y depresión si la infección no se detecta tempranamente (Mc Donald et al., 2006; Groussaud et al., 2007). Secuelas crónicas y recaídas pueden ocurrir después de la infección inicial (Godfroid et al., 2005, Hoover et al., 1997).

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. *B. canis* ha sido aislada de perros en Costa Rica (Moreno, 2002; Hidalgo, 2004).

Desde el año 1998 al 2007, solamente el laboratorio de Inmunología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica, recibió alrededor de 6700 muestras para el diagnóstico serológico de *Brucella*. Las muestras fueron enviadas de diferentes áreas de las siete provincias de Costa Rica, de la Isla del Coco, de Panamá y Nicaragua. Dentro de las especies animales evaluadas se encontraban bovinos, suinos, caninos, caprinos, equinos, delfines y humanos (Laboratorio de Inmunología, 1998-2007). Además, en los boletines epidemiológicos presentados a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), emitidos por el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica, se evidencia que la brucelosis está presente en el país y se reporta en forma constante (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2008). Por otro lado, desde el punto de vista epidemiológico, los animales de vida silvestre

pueden jugar un papel como reservorios de la enfermedad para animales de uso doméstico (Cutler et al., 2005). El impacto que pueda tener la enfermedad en la preservación de la vida silvestre como tal se desconoce. Además, el impacto de la infección de *Brucella* en mamíferos marinos no es claro, pero el interés va en aumento, tanto por su potencial como patógeno animal así como por ser un agente capaz de infectar al ser humano (zoonótico) (Foster et al., 2007; Groussaud et al., 2007; Mc Donald et al., 2006).

1.2 Justificación

En Costa Rica, el diagnóstico de brucelosis en la práctica veterinaria se hace de una manera integral, basado en primera instancia en la historia y sintomatología de los animales afectados. Una vez realizada la correcta anamnesis, se procede a tomar las muestras respectivas para el diagnóstico a nivel de laboratorio; el cual se realiza usualmente por medio de pruebas serológicas, tales como la prueba rápida de aglutinación en placa (Rosa Bengala) y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Estas pruebas solamente determinan si el paciente en cuestión ha estado en contacto con la bacteria, sin embargo, no son capaces de brindar información sobre la especie de *Brucella* involucrada.

Por su parte las pruebas bioquímicas realizadas en nuestro país, agrupan las especies de *Brucella* según la similitud de sus características, las cuales son determinadas por los resultados de cinco pruebas de identificación: la producción de H₂S, la resistencia a colorantes (tionina, fucsina), la prueba de detección de ureasa, la sensibilidad a bacteriófagos y la aglutinación con acriflavina (Cloeckáert et al., 1996). Desafortunadamente, ninguna de estas pruebas define claramente a una sola especie.

La complejidad en la identificación se debe a que las distintas especies de *Brucella* muestran más de 90% de similitud en su genoma (Vizcaíno et al., 1997). Estudios moleculares recientes han descrito polimorfismos en las diferentes especies de *Brucella*, lo que permite identificarlas hasta el grado de especie (Whatmore et al., 2007, Scott et al., 2007). El polimorfismo es una variación en la secuencia de ADN que afecta a un solo nucleótido en una posición específica del genoma; llamado por sus siglas en inglés SNPs (single-nucleotide polymorphism). Los SNPs que identifican a cada una de las especies de *Brucella* se localizan en los genes que codifican para las proteínas *glk*, *omp25* y *trpE* (Scott et al., 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 (Whatmore et al., 2007). Por otra parte, la brucelosis en humanos es bastante común en áreas endémicas, pero raramente diagnosticada. La especie de *Brucella* más agresiva para el ser humano, *B. melitensis* (Boschioli et al., 2004), no ha sido aislada en Costa Rica, pero sí se ha reportado en países vecinos (Moreno, 2007).

Debido al incremento del intercambio comercial y el tráfico de personas, la entrada de alguna de las especies más patógenas a territorio nacional es probable. Ante este escenario existe la necesidad de estandarizar un protocolo que pueda identificar rápida y categóricamente los distintos aislamientos de *Brucella* reportados, hasta el grado de especie sin ambigüedad.

13. Objetivos

13.1. Objetivo General

Estandarizar un protocolo de caracterización molecular para aislamientos de bacterias del género *Brucella*.

1.3.2. Objetivos Específicos

- i.** Extraer ácido desoxirribonucleico de una cepa de referencia de *B. abortus*.
- ii.** Estandarizar diferentes PCRs que amplifiquen los genes *glk*, *trpE* y *omp25*, según Whatmore et al., 2007.
- iii.** Estandarizar un PCR multiplex a partir de los PCR que amplifican los genes *glk*, *trpE* y *omp25*.
- iv.** Optimizar el protocolo de extensión de cebador descrito por Whatmore et al., 2007; para su uso en Costa Rica.

2. METODOLOGIA: MATERIALES Y METODOS

2.1 Muestras utilizadas

Para la estandarización de los protocolos de PCR se utilizaron dos tipos de muestras de ADN genómico. La primer muestra se obtuvo por extracción del ADN de un aislamiento de la bacteria *Brucella abortus* cepa 2308 (Sangari et al., 1991) perteneciente a la bacterioteca del Laboratorio de Inmunología de la Escuela de Medicina Veterinaria-UNA; siguiendo el protocolo de CTAB fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (López, 2008) (Anexo 1). El otro tipo de muestra consistió en ADN genómicos pertenecientes a 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 (cuadro 1).

Cuadro 1: ADN genómicos de distintas especies de *Brucella* utilizados en la estandarización de la caracterización molecular

| Especie | Biovar | Referencia |
|-------------------|---------------|-------------------|
| <i>B. abortus</i> | 1 | ATCC 23448 |
| <i>B. abortus</i> | 2 | ATCC 23449 |
| <i>B. abortus</i> | 3 | ATCC 23450 |
| <i>B. abortus</i> | 4 | ATCC 23451 |
| <i>B. abortus</i> | 5 | ATCC 23452 |
| <i>B. abortus</i> | 6 | ATCC 23453 |
| <i>B. abortus</i> | 9 | ATCC 23455 |

| | | |
|----------------------|---|------------|
| <i>B. melitensis</i> | 1 | ATCC 23456 |
| <i>B. melitensis</i> | 2 | ATCC 23457 |
| <i>B. melitensis</i> | 3 | ATCC 23458 |
| <i>B. suis</i> | 1 | ATCC 23444 |
| <i>B. suis</i> | 2 | ATCC 23445 |
| <i>B. suis</i> | 3 | ATCC 23446 |
| <i>B. suis</i> | 4 | ATCC 23447 |
| <i>B. suis</i> | 5 | ATCC |
| <i>B. ovis</i> | 1 | ATCC 25840 |
| <i>B. canis</i> | 1 | ATCC 23365 |
| <i>B. neotomae</i> | 1 | ATCC 23459 |

2.2 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, la cual tenía una concentración inicial de 100 mg/ml. Para estandarizar la concentración de enzima requerida, se elaboró una matriz con los diferentes componentes, mezclando distintas diluciones del producto de la extracción de ADN, agua ultrapura estéril y diferentes concentraciones finales de la enzima, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml; como se muestra en el cuadro 2. Cada reacción se incubó a 37°C durante 10 minutos. Los tratamientos se realizaron hasta obtener los resultados esperados, mostrados más adelante en la sección 3.1.

Cuadro 2. Estandarización de la concentración requerida de ARNasa para eliminar el ARN presente en las extracciones de ADN genómico de la cepa *B. abortus* 2308.

| Componentes de la reacción \ Diluciones del ADN | Diluciones del ADN | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/25 | 1/25 | 1/25 | 1/25 | 1/50 | 1/50 | 1/50 | |
| Agua ultrapura estéril (uL) | 54 | 14 | 16 | 17 | 72 | 38 | 43 | 45.5 | 98 | 88 | 93 | |
| Producto de la extracción de ADN (uL) | 6 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| ARNasa (uL) | - | 4 | 2 | 1 | - | 10 | 5 | 2.5 | - | 10 | 5 | |
| Volumen final (uL) | 60 | 20 | 20 | 20 | 75 | 50 | 50 | 50 | 100 | 100 | 100 | |
| Concentración final de la ARNasa (mg/ml) | - | 2 | 1 | 0.5 | - | 2 | 1 | 0.5 | - | 1 | 0.5 | |

2.3 Estandarización de los PCR

Los diferentes componentes utilizados en la reacción multiplex fueron estandarizados individualmente, siguiendo seis protocolos distintos de PCR. En cada protocolo realizado se varió un componente a la vez hasta lograr la estandarización de cada reacción, cada una con un volumen final de 50 uL. En cada ensayo se incluyó un control positivo de ADN genómico de *B. abortus* cepa 2308 y un control negativo el cual contenía agua ultrapura estéril en vez de ADN. La enzima Taq polimerasa se encontraba formulada en mezcla junto

con los dNTPs y el amortiguador en el producto llamado Master mix 2X (Fermentas®). La enzima Pfu fue utilizada según las instrucciones del fabricante (Fermentas®).

Para validar el ADN genómico de *B. abortus* 2308 como control positivo, se realizó un PCR con la enzima Taq polimerasa y los cebadores *L12/L7*, los cuales codifican para la proteína ribosomal *L12/L7*; cuyo protocolo fue optimizado en el laboratorio de Bioquímica de la EMV- UNA (Guzmán, 2008). Una vez que la concentración y volumen de ADN fueron estandarizados para su uso en las reacciones, 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*, descritos por Whatmore et al., 2007; y la tercera con los pares de cebadores *glk*, *omp25* y *trpE* en una reacción múltiple o PCR multiplex, descrita por Whatmore et al., 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 al., 2007.

Las secuencias de los cebadores *L12/L7*, *glk*, *omp25* y *trpE* se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3: Secuencias de los cebadores utilizados en la estandarización de los PCR y pesos moleculares esperados para los amplicones (Scott et al., 2007; Guzmán, 2008).

| Nombre del cebador | Secuencia del cebador | Pesos moleculares aproximados de los amplicones |
|--------------------|-----------------------------|---|
| <i>glk up</i> | 5'-TATGGAAMAGATCGGCGG-3' | 475 pb |
| <i>glk down</i> | 5'-GGGCCTTGTCTCGAAGG-3' | |
| <i>L7/L12f</i> | 5'-GCTGTCCAAGCTTCTCGAAGA-3' | 100 pb |
| <i>L7/L2r</i> | 5'-CTGTTGCTGCTGCCGG-3' | |
| <i>omp25 up</i> | 5'-ATGCGCACTCTTAAGTCTC-3' | 490 pb |
| <i>omp25 down</i> | 5'-GCCSAGGATGTTGTCCGT-3' | |
| <i>trpE up</i> | 5'-GCGCGCMTGGTATGGCG-3' | 486 pb |
| <i>trpE down</i> | 5'-CKCSCCGCCATAGGCTTC-3' | |

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* (ver más detalles en la sección de resultados).

Los parámetros de ciclaje se realizaron en un termociclador Applied Biosystems 2720, y se variaron según los cebadores de cada protocolo. Los ciclos para las reacciones con los cebadores *L12/L7* fueron: 94°C durante 4 minutos seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 s., 48°C por 1 min y 68°C por 30 s.; y una elongación final de 68°C por 10 minutos. Las

condiciones de amplificación con los cebadores *glk*, *omp* y *trpE* fueron las descritas por Whatmore et al., 2007; es decir, 94°C durante 5 min seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minutos, 53°C por 1 min y 72°C por 1 min ; y una elongación final de 72°C por 10 min

Los detalles de cada protocolo estandarizado, sus concentraciones, volúmenes y temperaturas de ciclaje, se muestran en la sección de resultados (cuadro 5).

2.4 Ensayo de extensión de cebadores

Para el ensayo de extensión de cebadores, se utilizó el Kit ABI Prism SNaPshot Multiplex (Applied Biosystems®); el cual consta de un grupo de controles, una mezcla de reacción y agua ultrapura estéril (anexo 2), el producto de PCR purificado y los cebadores publicados por Whatmore et al., 2007; (cuadro 4).

Cuadro 4: Secuencias de los cebadores utilizados en la estandarización del ensayo de extensión de cebadores y pesos moleculares esperados de los amplicones (Scott et al., 2007).

| Nombres de los cebadores | Secuencias de los cebadores | Peso molecular esperado para los amplicones |
|--------------------------|--|---|
| <i>glk196R</i> | 5'-CGCTAAGAATTTGYTCGCCGG-3' | 21 pb |
| <i>glk427R</i> | 5'-TTTTTTTTTTTGAAGGATGCGCACCGGGATGC-3' | 32 pb |
| <i>glk255R</i> | 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGGTGGGC | 43 pb |

| | | |
|----------------|--|-------|
| | GTGATCTT GTCGGC-3' | |
| <i>omp151F</i> | 5'-TGGCTATACCGGTCTTTACCTTGGCTA-3' | 27 pb |
| <i>omp239F</i> | 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTGCTGGCTGG AACTTCC AG-3' | 39 pb |
| <i>trp290R</i> | 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAA ACCTTG GCGCCCGTCTGG-3' | 49 pb |

Cada uno de los cebadores descritos anteriormente debió ser preparado para alcanzar la concentración final de 2 μ M. Una vez preparados, se hizo una mezcla de los seis cebadores, la cual se requería para la reacción de extensión (anexo 2, B).

Para corroborar la efectividad del protocolo múltiple descrito por Whatmore et al., 2007; el ensayo de extensión se realizó con el PCR multiplex con ADN de *B. abortus* cepa 2308, tanto con la enzima Pfu así como con la Taq polimerasa.

Las variantes realizadas en los componentes y/o condiciones del ensayo introducidas para su estandarización; se describen a continuación y se resumen en el anexo 2.

2.4.1 Extensión de cebador con distintas temperaturas de extensión

El protocolo de la reacción de extensión descrita en el anexo 2B se probó con dos protocolos de temperatura distintos, utilizando los productos purificados del PCR multiplex con la enzima Pfu y ADN de *B. abortus* cepa 2308. El primer protocolo fue el indicado por Whatmore et al., 2007: 94°C durante 5 minutos seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, con una elongación final de 72°C por 10

minutos. El segundo fue el indicado por el fabricante del SNaPshot Multiplex, (Applied Biosystems®); 94°C durante 5 minutos seguido por 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 60°C por 30 segundos, finalizando con 72° por 10 minutos. Ambas reacciones se ejecutaron en el termociclador Applied Biosystems 2720 (anexo 2, A y B).

2.4.2 Extensión de cebadores con productos de PCR 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 del 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®). Los componentes de la reacción así como los parámetros de temperatura fueron los descritos en el protocolo del SNaPshot Multiplex (Applied Biosystems®) (anexo 2, A y B).

2.4.3 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 al., 2007), se utilizaron los productos del 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. Para lograr estas reacciones, se agregaron los cebadores individualmente, cada uno a una concentración final de 2 µM (anexo 2, C).

2.5 Validación de la técnica de extensión de cebador estandarizada

Una vez estandarizadas las reacciones descritas en el punto 2.4, se ejecutaron las extensiones de cebadores con los 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 (anexo 2, B).

2.6 Tratamiento con la enzima Fostasa alcalina de intestino de ternero (CIAP)

Para remover los dNTPs no incorporados, todos los productos de las reacciones de extensión fueron tratados con la CIAP (Fermentas®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, 1 Unidad de la enzima se añadió a los 10 µL de producto de cada extensión de cebador y se incubó de 37°C durante 30 minutos, seguido por una incubación a 85°C por 15 minutos para lograr su inactivación.

2.7 Purificación de los productos de PCR

Para eliminar los dNTPs y los cebadores, se realizaron dos métodos de purificación de los amplicones obtenidos de los PCR, a través de columnas de purificación QIAquick y por extracción de gel. Ambos protocolos siguieron las instrucciones del fabricante QIAquick (QIAGEN®).

A través de columna se purificaron los productos del PCR con los pares de cebadores *glk*, *omp* y *trpE* por separado y el PCR multiplex; ambos con las enzimas Taq y Pfu.

El método de extracción de gel se utilizó para purificar los productos del PCR multiplex con la enzima Pfu polimerasa.

2.8 Electroforesis en gel de agarosa

Para evaluar el resultado de cada reacción, tanto de la extracción de ADN como de cada protocolo de PCR; el 10% del volumen de cada producto fue corrido por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Sambrook et al., 2001). La concentración del gel a utilizarse se escogió según el tamaño del ácido nucleico a analizar; variando entre 1,5% y 2%. El marcador de peso molecular MassRuler DNA Ladder (Fermentas®) se corrió junto con las muestras. El análisis se realizó por medio de luz ultravioleta a través del Capturador y Analizador de Imágenes Chemidoc 170-8070 (Bio-Rad®).

2.9 Análisis de los resultados de las extensiones de cebadores

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

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Extracción de ADN

Con el objetivo de tener una muestra de ADN de una cepa de referencia, se procedió a aislar el ADN genómico de *B. abortus* 2308. El producto de la extracción se corrió en un gel de agarosa y se observó a través de la luz ultravioleta (figura 1).

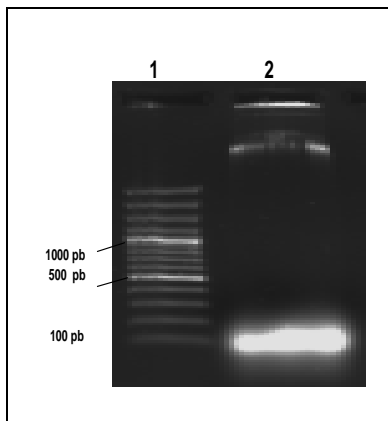


Figura 1. Electroforesis de la extracción de ADN a partir de la cepa *B. abortus* 2308. Carril 1: MPM 0323 (Fermentas®), carril 2: producto de la extracción.

En la figura anterior se observa la banda de ADN en la parte superior del carril 2, reconocida por su alto peso molecular al ser comparada con el MPM (Sambrook et al., 2001). También se evidencia una segunda banda intensa por debajo de la banda de ADN, aproximadamente con un peso molecular de 100 pb, la cual se asemeja a una banda de ARN (Sambrook et al., 2001). Esto refleja que el tratamiento realizado con la enzima ARNasa en el protocolo de extracción, no logró eliminar por completo el ARN presente, el cual podría interferir en la estandarización de las reacciones de PCR. Es por ello que con el fin de eliminar los restos de ARN aún presentes, se realizaron 12 tratamientos post-extracción con la enzima ARNasa A, según se indica en el apartado de materiales y métodos. Cada

tratamiento consistió de distintas concentraciones de la enzima, la cual tenía una concentración inicial de 100 mg/ml; para distintas diluciones del ADN extraído. Finalmente la muestra de ADN diluida 1/10 tratada con 0,5 mg/ml de ARNasa A fue la que no presentó ARN, según análisis de electroforesis en gel de agarosa, como se muestra en la figura 2.

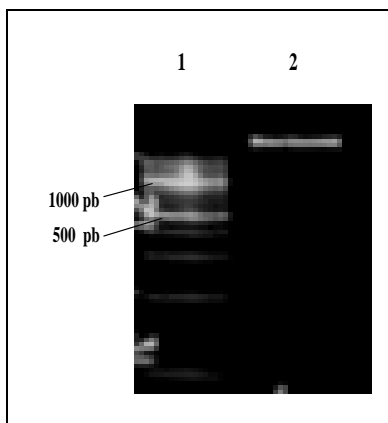


Figura 2. Electroforesis de la extracción de ADN de la cepa *B. abortus* 2308 luego del tratamiento con la enzima ARNasa A a una concentración de 0,5 mg/ml. Carril 1: MPM 0323 (Fermentas®), carril 2: ADN extraído sin banda de ARN.

Este ADN de referencia fue utilizado para las estandarizaciones de los diferentes PCR.

3.2 Estandarización de los PCR.

Con el fin de estandarizar individualmente los diferentes componentes utilizados en la reacción multiplex descrita por Whatmore et al., 2007; se desarrollaron seis distintos protocolos de PCR. En cada protocolo se varió un componente a la vez hasta lograr la estandarización de cada reacción. Cada ensayo incluyó dos controles con la finalidad de detectar una posible contaminación en las muestras o bien para evaluar la calidad de las

mismas. El control positivo consistió de una reacción idéntica a la reacción por estandarizar, excepto que la muestra era un ADN genómico de *B. abortus* 2308 validado previamente en el laboratorio de Bioquímica de la EMV-UNA. El control negativo contenía los mismos componentes de reacción y agua ultrapura estéril en lugar de ADN.

Con el objetivo de estandarizar la concentración del ADN extraído a utilizar en posteriores reacciones; se realizó una reacción de PCR cuyo protocolo había sido optimizado en el laboratorio de Bioquímica de la EMV-UNA (Guzmán, 2008). El PCR contenía la enzima Taq polimerasa y los cebadores *L12/L7*, los cuales codifican para la proteína ribosomal *L12/L7*. Se determinó utilizar 2 uL del ADN extraído, con el cual se obtuvo una banda intensa y específica de aproximadamente 100 pb al ser analizado mediante electroforesis en gel de agarosa (figura 3).

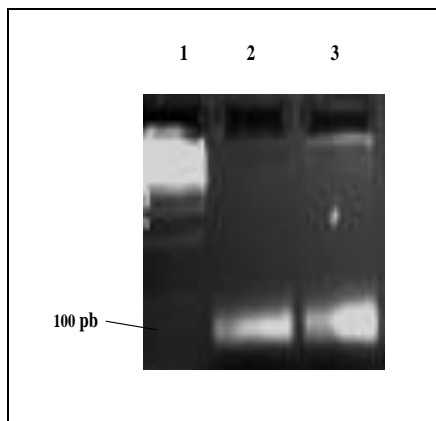


Figura 3. Electroforesis del PCR con Taq polimerasa y cebadores *L12/L7*. Carril 1: MPM 0403 (Fermentas®), carril 2: control positivo del PCR, carril 3: muestra del PCR con el ADN producto de la extracción.

Las bandas evidenciadas en los carriles 2 y 3 de la figura 3, son similares, tanto en su peso molecular como en su intensidad. Por ello se continuó utilizando el ADN genómico extraído para las siguientes reacciones.

Con el objetivo de estandarizar un protocolo de PCR con una enzima termoestable con superior fidelidad que la Taq polimerasa, se procedió a realizar el PCR con la enzima Pfu ADN polimerasa, manteniendo la concentración de los cebadores *L12/L7* y del ADN extraído de *B. abortus* 2308. Para este ensayo, se respetó el protocolo elaborado por el laboratorio de Bioquímica de la EMV-UNA, en 50 uL de volumen final (cuadro 5). El resultado de la reacción dio una señal intensa muy similar a la del control positivo (figura 4).

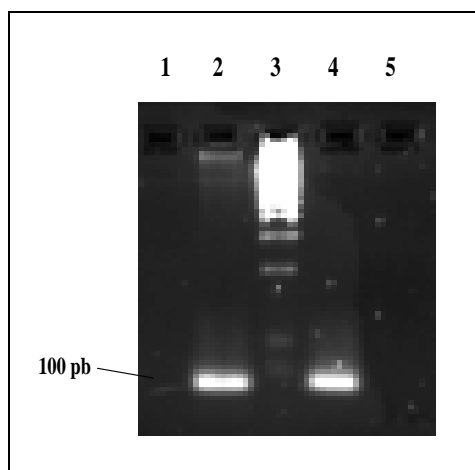


Figura 4. Electroforesis del PCR con la enzima Pfu, los cebadores *L12/L7* y el ADN de *B. abortus* 2308, carril 2: PCR control positivo, carril 3: MPM 0403 (Fermentas®), carril 4: PCR estandarizado.

Tanto en el control positivo como en la reacción estandarizada, se muestran bandas similares intensas de aproximadamente 100 pb, correspondientes con los resultados esperados.

Con el objetivo de evaluar las reacciones de PCR con los pares de cebadores *glk*, *omp* y *trpE* del ensayo descrito por Whatmore et al., 2007; se procedió a reproducirlos tanto con la enzima Pfu como con la Taq polimerasa; utilizando cada par de los cebadores en reacciones separadas, el ADN de *B. abortus* 2308 extraído y las condiciones de ciclaje descritas por los autores.

Los resultados obtenidos con ambas enzimas fueron semejantes; se mostró el inconveniente que el cebador *trpE* no presentaba la misma eficiencia al utilizar igual concentración y temperaturas que los cebadores *omp* 25 y *glk*, como se muestra en la figura 5.

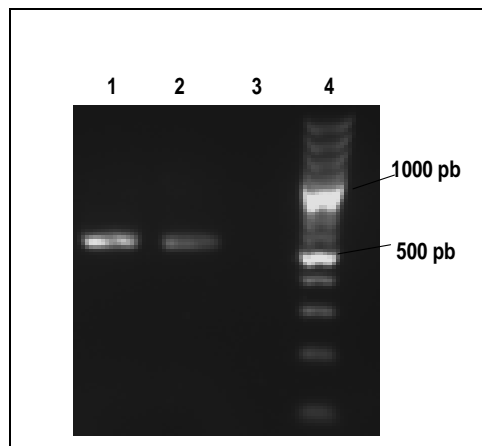


Figura 5. Electroforesis del PCR con la enzima Pfu, los pares de cebadores *glk*, *omp* y *trpE* en reacciones por separado y ADN de *B. abortus* 2308. Carril 1: PCR con *omp*25, carril 2: PCR con *glk*, carril 3: PCR con *trpE*, carril 4: MPM 0403 (Fermentas®). Resultados similares con la enzima Taq polimerasa.

Las bandas intensas mostradas en la figura anterior coinciden con los pesos esperados de aproximadamente 500 pb; 475 pb para el amplicón de *glk* y 490 pb para el amplicón de

omp25. En el carril 3 se evidencia la ausencia de banda, en la cual debió estar presente el amplicón para *trpE* con un peso de 486 pb aproximadamente.

Por esa razón, se procedió a estandarizar la concentración. Para ello, se realizó una matriz con distintas concentraciones de los cebadores *trpE*, iniciando con 0,25 uM hasta alcanzar 1 uM. Cada una de esas reacciones se evaluó con diferentes temperaturas de anillamiento, iniciando con 48°C hasta 60°C (anexo 3, A y B). Los valores de la matriz tomaron como punto medio de referencia las concentraciones de los cebadores (0,42 uM) y las condiciones de temperatura (53°C para el anillamiento) descritas por Whatmore et al., 2007.

El par de cebadores *trpE* logró dar una banda intensa y única de aproximadamente 486 pb, con una concentración final de 1 uM y utilizando 55°C para el anillamiento.

Con el objetivo de unificar las condiciones de ciclaje para los tres pares de cebadores, los PCR por separado para *omp25* y *glk* fueron evaluados con la temperatura que dio efectividad para *trpE*, aumentando entonces 2°C con respecto al protocolo de Whatmore et al., 2007. 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, *trpE* 486 pb), como se muestra en la figura 6. Los protocolos estandarizados para cada reacción se describen en el cuadro 5.

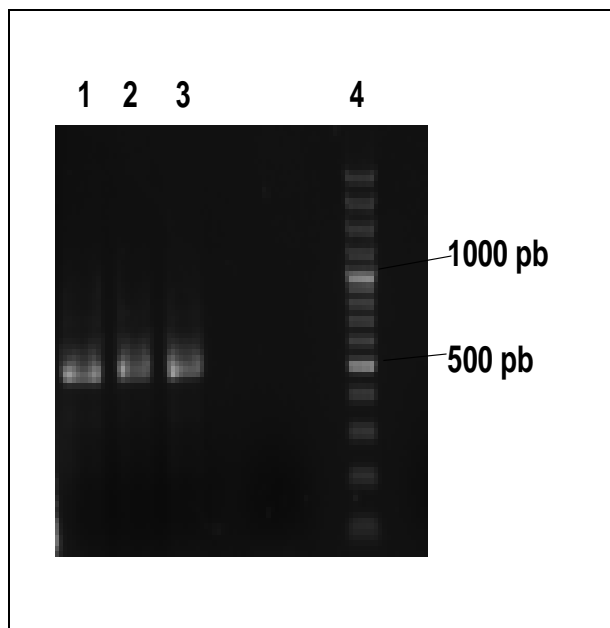


Figura 6. Electroforesis del PCR con los pares de cebadores por separado, la enzima Pfu y ADN de *B. abortus* 2308, con 55°C de temperatura de anillamiento. Carril 1: PCR con *glk*, carril 2: PCR con *omp25*, carril 3: PCR con *trpE*. Resultados similares con la enzima Taq.

Así, 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 se varió de 53°C a 55°C para los tres pares de cebadores.

Con el objetivo de realizar el PCR multiplex, se conservó la temperatura de 55°C y las concentraciones para cada cebador, cada enzima y para el ADN de los PCRs estandarizados individualmente. El protocolo del PCR multiplex estandarizado se describe en el cuadro 5. En la figura 7 se muestra el resultado de los PCR realizados con ambas enzimas, en donde 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*.

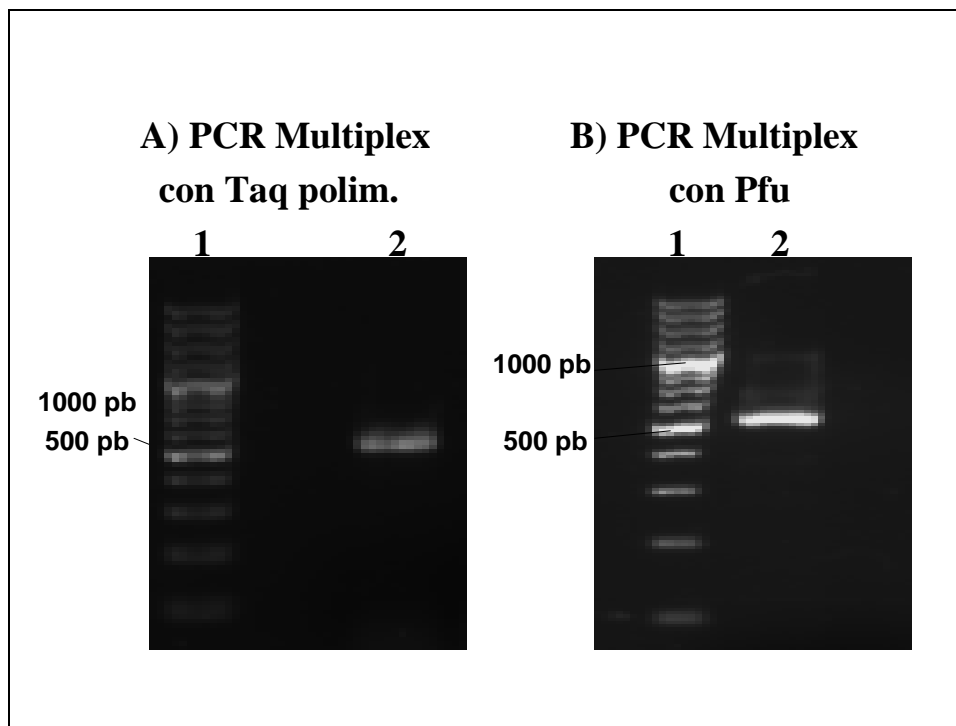


Figura 7. Electroforesis de las reacciones de PCR multiplex con las enzimas Taq polimerasa (A) y Pfu (B), con ADN de *B. abortus* 2308. En cada reacción se usaron los tres pares de cebadores *glk*, *omp25* y *trpE*. Con ellas se muestra el MPM 0323 (Fermentas®).

Con el fin de aplicar y evaluar la estandarización realizada, se reprodujo el protocolo del 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*. 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 8 se muestran los amplicones obtenidos. Las bandas mostradas son intensas y específicas, con un peso aproximado de 500 pb.

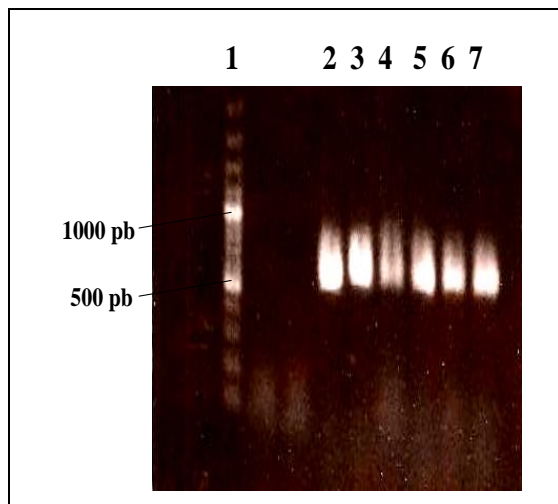


Figura 8. Electroforesis de los PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa y los ADN genómicos de seis especies de *Brucella*. Carril 1: MPM 0323 (Fermentas®). Carril 2: *B. abortus*. Carril 3: *B. melitensis*. Carril 4: *B. suis*. Carril 5: *B. ovis*. Carril 6: *B. canis*. Carril 7: *B. neotomae*.

En la figura anterior se muestra 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, descrita en el apartado 3.4.

Los resultados de todos los protocolos de PCR estandarizados, se muestran a continuación en el cuadro 5.

| | | | |
|--|-------------------------------------|---------|--------------------|
| PCR con la enzima Pfu y cada par de cebadores | Para cebador <i>omp 25</i>: | | |
| | Agua ultrapura estéril | 39,6 uL | 94° C / 5 minutos |
| | Amortiguador PFu, 10X | 5 uL | 30 ciclos de: |
| | Cebador <i>omp 25 up</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | 94° C / 1 minuto |
| | Cebador <i>omp 25 down</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | 55° C / 1 minuto |
| | dNTPs, 10 mM | 1 uL | 72° C / 1 minuto |
| | Enzima PFu, 2,5 u/ uL | 1 uL | 72° C / 10 minutos |
| | ADN | 2 uL | |
| | Para cebador <i>glk</i>: | | |
| | Agua ultrapura estéril | 39,6 uL | 94° C / 5 minutos |
| | Amortiguador PFu 10X | 5 uL | 30 ciclos de: |
| | Cebador <i>glk up</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | 94° C / 1 minuto |
| | Cebador <i>glk down</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | 55° C / 1 minuto |
| | dNTPs, 10 mM | 1 uL | 72° C / 1 minuto |
| | Enzima PFu, 2,5 u/ uL | 1 uL | 72° C / 10 minutos |
| | ADN | 2 uL | |
| | Para cebador <i>trpE</i>: | | |
| | Agua ultrapura estéril | 37,6 uL | 94° C / 5 min |
| | Amortiguador PFu, 10X | 5 uL | 30 ciclos de: |
| | Cebador <i>trpE up</i> , 1 uM | 1,7 uL | 94° C / 1 minuto |
| | Cebador <i>trpE down</i> , 1 uM | 1,7 uL | 55° C / 1 minuto |
| | dNTPs, 10 mM | 1 uL | 72° C / 1 minuto |
| | Enzima PFu, 2,5 u/ uL | 1 uL | 72° C / 10 minutos |
| | ADN | 2 uL | |

| | | | |
|---|-------------------------------------|--------------------|--------------------|
| PCR con la enzima Taq polimerasa y cada par de cebadores | Para cebador <i>omp 25</i>: | | |
| | Agua ultrapura estéril | | |
| | Master mix 2X, 1X | 19,6 uL | 94° C / 5 minutos |
| | Cebador <i>omp 25 up</i> , 0,4 uM | 25 uL | 30 ciclos de: |
| | Cebador <i>omp 25 down</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | 94° C / 1 minuto |
| | ADN | 0,7 uL | 55° C / 1 minuto |
| | | 2 uL | 72° C / 1 minuto |
| | | | 72° C / 10 minutos |
| | Para cebador <i>glk</i>: | | |
| | Agua ultrapura estéril | | |
| | Master mix 2X, 1X | 19,6 uL | 94° C / 5 minutos |
| | Cebador <i>glk up</i> , 0,4 uM | 25 uL | 30 ciclos de: |
| | Cebador <i>glk down</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | 94° C / 1 minuto |
| | ADN | 0,7 uL | 55° C / 1 minuto |
| | | 2 uL | 72° C / 1 minuto |
| | | | 72° C / 10 minutos |
| | Para cebador <i>trpE</i>: | | |
| | Agua ultrapura estéril | | |
| Master mix 2X, 1X | 19,6 uL | 94° C / 5 min | |
| Cebador <i>trpE up</i> , 1 uM | 25 uL | 30 ciclos de: | |
| Cebador <i>trpE down</i> , 1 uM | 1,7 uL | 94° C / 1 minuto | |
| ADN | 1,7 uL | 55° C / 1 minuto | |
| | 2 uL | 72° C / 1 minuto | |
| | | 72° C / 10 minutos | |

| | | | |
|---|-------------------------------------|---------|--------------------|
| PCR Multiplex con la enzima Pfu | Agua ultrapura estéril | 34,8 uL | 94° C / 5 minutos |
| | Amortiguador Pfu 10X | 5 uL | 30 ciclos de: |
| | dNTPs, 10 mM | 1 uL | 94° C / 1 minuto |
| | Cebador <i>trpE up</i> , 1 uM | 1,7 uL | 55° C / 1 minuto |
| | Cebador <i>trpE down</i> , 1 uM | 1,7 uL | 72° C / 1 minuto |
| | Cebador <i>omp 25 up</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | 72° C / 10 minutos |
| | Cebador <i>omp 25 down</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | |
| | Cebador <i>glk up</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | |
| | Cebador <i>glk down</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | |
| | Enzima Pfu, 2,5 u/ uL | 1 uL | |
| ADN | 2 uL | | |
| PCR Multiplex con la enzima Taq polimerasa | Agua ultrapura estéril | 16,8 uL | 94° C / 5 minutos |
| | Master Mix 2X, 1X | 25 uL | 30 ciclos de: |
| | Cebador <i>trpE up</i> , 1 uM | 1,7 uL | 94° C / 1 minuto |
| | Cebador <i>trpE down</i> , 1 uM | 1,7 uL | 55° C / 1 minuto |
| | Cebador <i>omp 25 up</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | 72° C / 1 minuto |
| | Cebador <i>omp 25 down</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | 72° C / 10 minutos |
| | Cebador <i>glk up</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | |
| | Cebador <i>glk down</i> , 0,4 uM | 0,7 uL | |
| | ADN | 2 uL | |

3.3 Purificación de los productos de PCR

Con el objetivo de eliminar los dNTPs y los cebadores de las reacciones (según el protocolo sugerido por SNaPshot Multiplex (Applied Biosystems®) para la extensión de cebador); dos métodos distintos de purificación fueron evaluados. El primero por medio del pasaje en columnas de purificación QIAquick (QIAGEN®) y el segundo por extracción en gel. Para ello se utilizaron los productos de las reacciones del PCR multiplex con la enzima Pfu ADN polimerasa y ADN de *B. abortus* 2308 (figura 9), siguiendo las instrucciones del fabricante QIAquick (QIAGEN®).

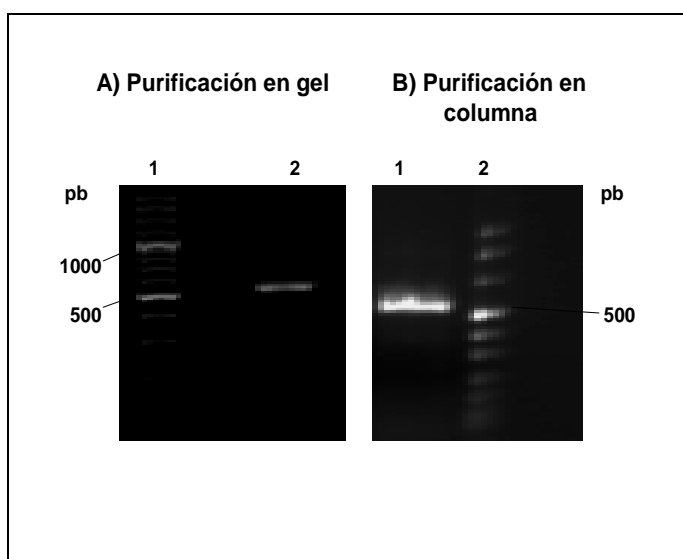


Figura 9. Electroforesis de los productos de PCR multiplex purificados por los métodos de extracción de gel (A) y por pasaje en columna (B), ambas reacciones con la enzima Pfu polimerasa y ADN de *B. abortus* 2308. Carriles 1A y 2B: MPM, carril 2A: PCR purificado por extracción en gel, carril 1B: PCR purificado por pasaje en columna.

Los productos purificados se mostraron con una señal intensa posterior a los métodos aplicados. Por ello ambas muestras fueron utilizadas para realizar la extensión de cebadores.

Igualmente los amplicones obtenidos con los pares de cebadores *glk*, *omp* y *trpE* por separado tanto con la enzima Pfu como con la Taq polimerasa, fueron purificados mediante el pasaje por columnas QIAquick (QIAGEN®). Los resultados se muestran en la figura 10.

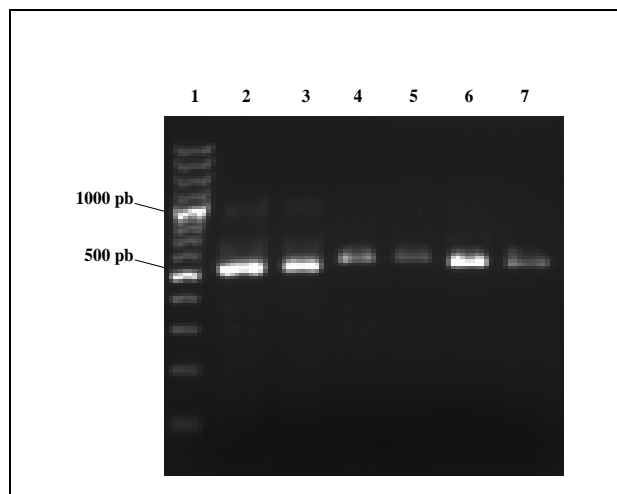


Figura 10. Electroforesis de los productos del PCR con cada par de cebadores antes y después de su purificación por columna, utilizando la enzima Taq polimerasa. Carril 1: MPM 0323 (Fermentas®), carril 2: PCR de *glk*, carril 3: PCR de *glk* purificado, carril 4: PCR de *omp25*, carril 5: PCR de *omp25* purificado, carril 6: PCR de *trpE*, carril 7: PCR de *trpE* purificado. Los resultados con Pfu fueron similares.

Los resultados fueron semejantes para las reacciones de PCR con la enzima Pfu (figura no mostrada) así como con la Taq polimerasa. En los amplicones purificados se observó una leve disminución de la intensidad en las señales, posiblemente porque existe pérdida de parte del producto en el proceso de purificación. Aún así, las señales continúan siendo específicas e intensas con un peso aproximado de 500 pb.

3.4 Ensayo de extensión de cebadores

Con el objetivo de diferenciar los SNPs en las especies de *Brucella* (anexo 4), se llevó a cabo el ensayo de extensión de cebadores seguido por el tratamiento con la enzima fosfatasa alcalina, siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes. Para ello se utilizaron los productos purificados del PCR multiplex y del PCR con cada par de cebadores *glk*, *omp* y *trpE* por separado (anexo 2, B y C).

Cada reacción detallada en este apartado, fue acompañada por un control positivo y un control negativo, descritos en el anexo 2, A. La interpretación de los resultados provenientes del analizador genético Applied Biosystems® se detalla en la figura 11.

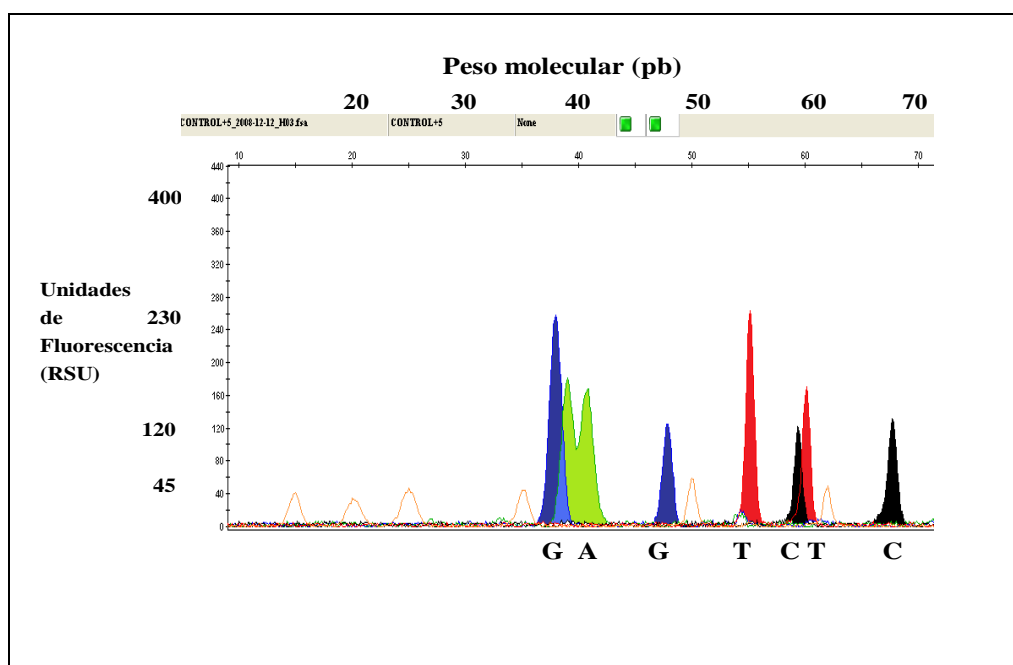


Figura 11. Electroferograma del control positivo de la extensión de cebadores. Cada uno de los nucleótidos se representa con la forma de un “pico” coloreado por uno de los cuatro colores designados. Así, el color negro corresponde al nucleótido citosina (C), el verde para adenina (A), el azul para guanina (G) y el color rojo para timina (T) o uracilo (U) (ABI Prism SNaPshot Multiplex, Applied Biosystems®).

A continuación se presentan los resultados obtenidos según las variantes realizadas para la estandarización del protocolo de extensión.

3.4.1 Reacción de cebadores con distintas temperaturas de extensión

Con el fin de evaluar la reacción de extensión de cebador, se llevaron a cabo dos protocolos de temperatura distintos, expuestos anteriormente en el apartado de materiales y métodos. Ambos ensayos utilizaron los mismos productos del PCR multiplex con la enzima Pfu y el ADN de *B. abortus* cepa 2308, purificados por pasaje en columna. En la figura 12 se presentan los resultados generados por el analizador genético Applied Biosystems®.

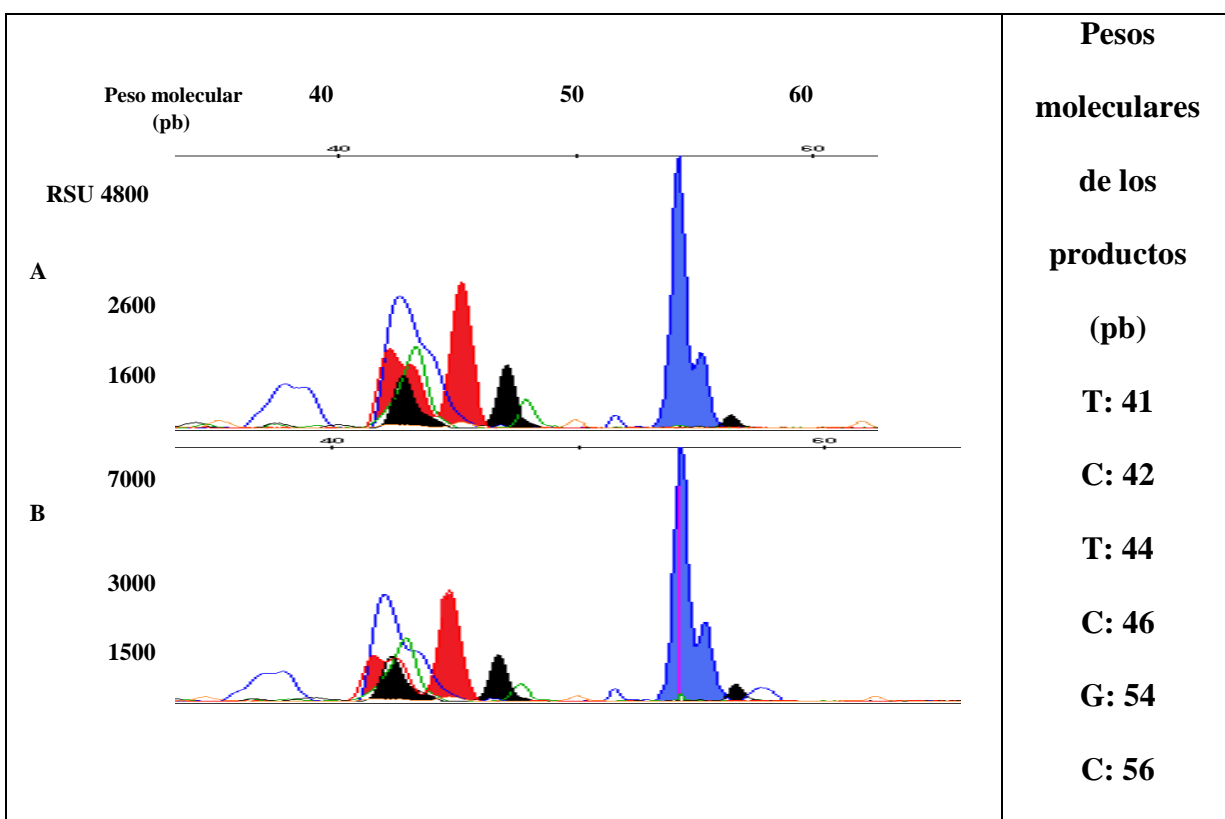


Figura 12. Electroferograma de la extensión de cebadores a partir de PCR multiplex con la enzima Pfu polimerasa y ADN de *B. abortus*, purificado por pasaje en columna; utilizando dos diferentes protocolos de temperaturas de extensión. A: el protocolo de Whatmore et al., 2007; B: el protocolo de Applied Biosystems®.

Los pesos moleculares esperados para los amplicones de las extensiones de cebador según Whatmore et al, 2007, oscilaban entre 21 y 49 pb, como se muestra en el cuadro 3. 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 al, 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.

En ambos protocolos se muestra “ruido de fondo” o también llamado “fluorescencia inespecífica” (Campos, 2008), representado con picos de color azul y verde de aproximadamente 42 pb; el cual según Campos, 2008, está presente en otras reacciones realizadas por el mismo secuenciador, no solamente con el protocolo de este documento.

3.4.2 Extensión de cebadores con productos de PCR purificados a través de columna y por extracción de gel.

Con el fin de comparar los dos métodos de purificación, la extensión de cebadores se realizó con los productos del PCR multiplex con la enzima Pfu polimerasa y ADN de *B. abortus* cepa 2308, purificados por columna y por extracción de gel. Los resultados de ambas reacciones se muestran en la figura 13.

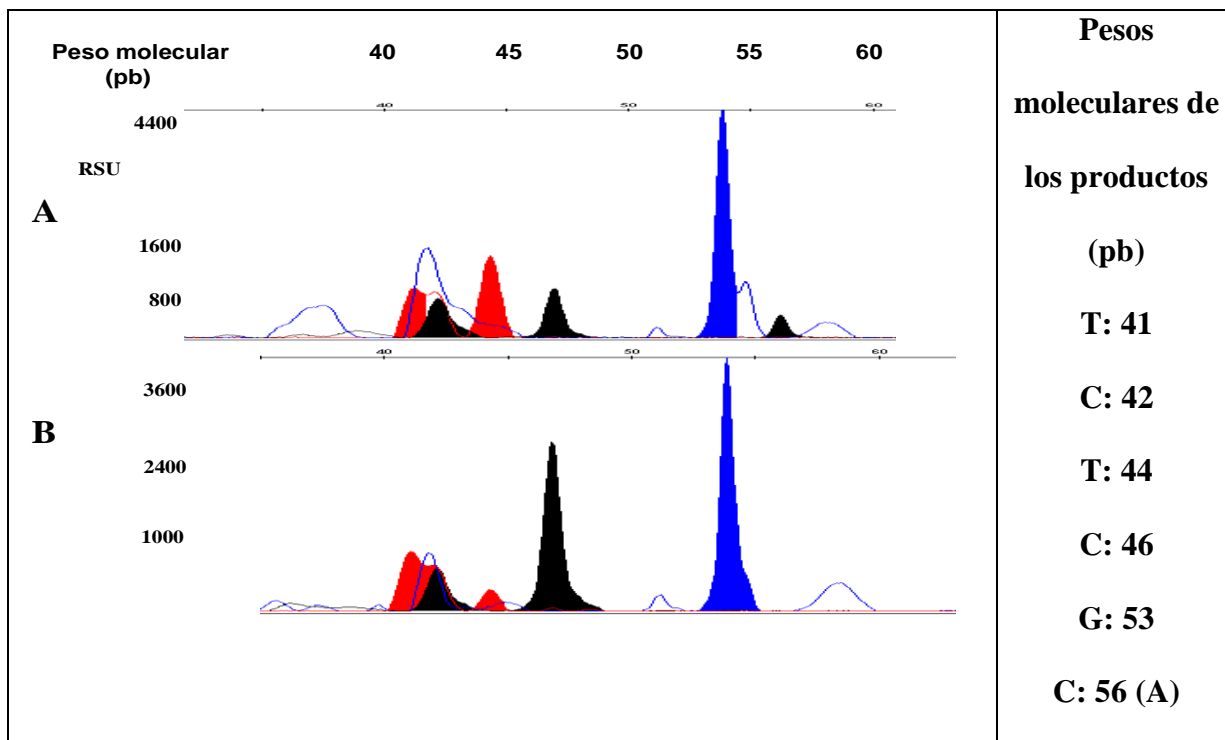


Figura 13. Electroferograma de la extensión de cebadores a partir del PCR multiplex con la enzima Pfu polimerasa y ADN de *B. abortus*; utilizando dos diferentes protocolos de purificación. A: purificación por medio de columnas. B: purificación por extracción de gel.

El protocolo elegido para las posteriores purificaciones de los productos de PCR fue el realizado por medio de columnas, debido a que es un método más corto que el de extracción de gel y se logró obtener los resultados esperados. Por su parte el protocolo de extracción de gel no mostró uno de los picos esperados, correspondiente al nucleótido citosina de la extensión del cebador *trpE290R*, con un peso aproximado de 56 pb, en donde se observa a la vez el pico citosina de aproximadamente 46 pb con una fluorescencia mayor; posiblemente este pico tomó la señal correspondiente al nucleótido citosina que no se representó. En ambas extensiones de cebador se muestra “ruido de fondo”, representado con picos de color azul de aproximadamente 42 pb, cuya explicación se mencionó anteriormente con la figura 12.

3.4.3 Reacción de extensión para cada cebador.

Con el objetivo de analizar individualmente la extensión de cada uno de los cebadores, *glk196R*, *omp151F*, *glk427R*, *omp239F*, *glk255R* y *trp290R* (Scott et al., 2007) (cuadro 3), se utilizaron los productos del PCR tanto con la enzima Pfu como con la Taq polimerasa, con los pares de cebadores *glk*, *omp25* y *trpE* por separado y el ADN de *B. abortus* cepa 2308. La descripción de los componentes de estas reacciones se encuentra en el anexo 2, C. Los resultados obtenidos fueron similares con ambas enzimas y se muestran a continuación en las figuras 14, 15 y 16.

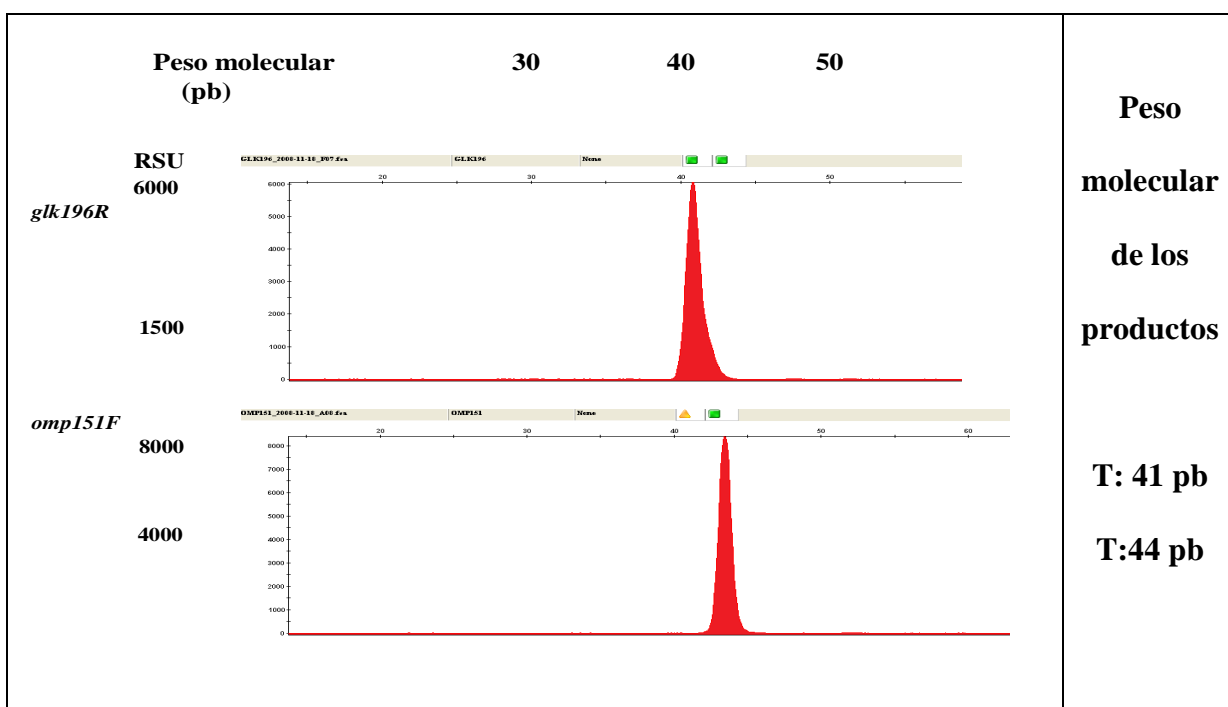


Figura 14. Electroferograma de la extensión de cebador para *glk196R* y *omp151R* a partir de los productos del PCR con la enzima Pfu, con ADN de *B. abortus* 2308 y los pares de cebadores *glk* y *omp25* por separado, purificados por columna.

Los picos obtenidos para los cebadores *glk196R* y *omp151R* representan timinas, y tienen un peso molecular de aproximadamente 41 y 44 pb respectivamente.

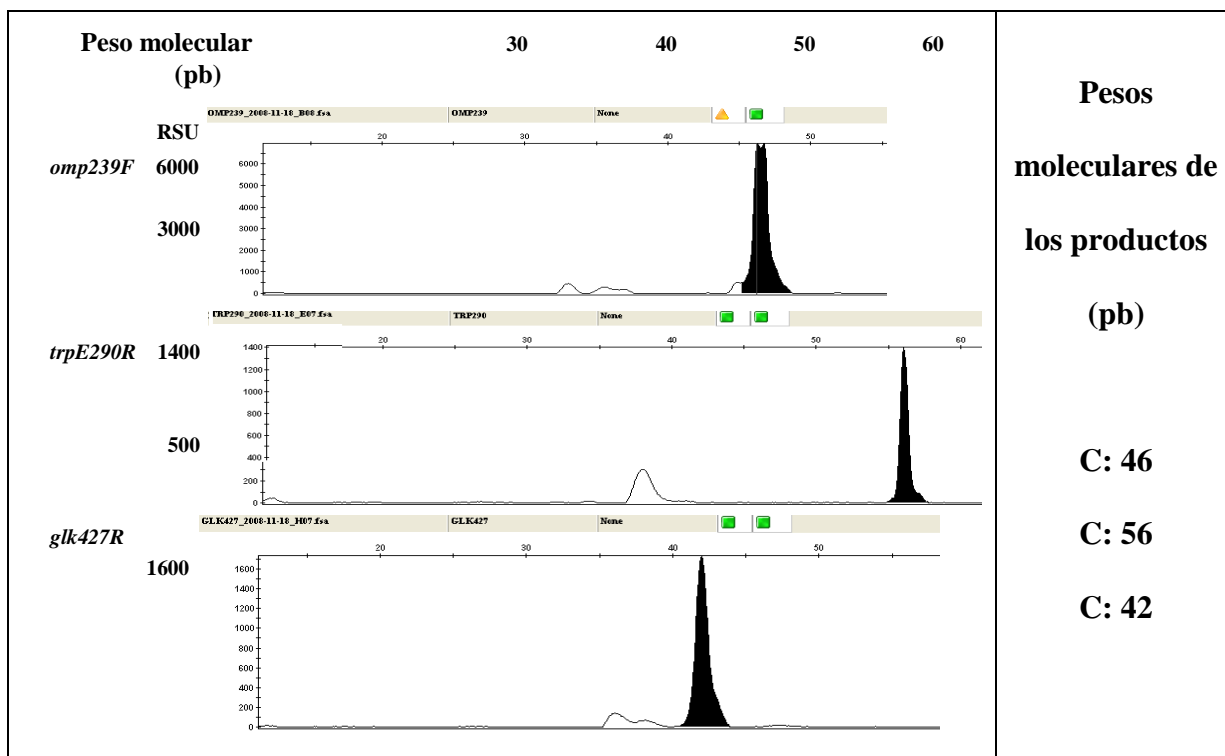


Figura 15. Electroferograma de la extensión de cebador para *omp239F*, *trpE290R* y *glk427R* a partir de los productos del PCR con la enzima Pfu, con ADN de *B. abortus* 2308 y los pares de cebadores *glk*, *trpE* y *omp25* por separado, purificados por columna.

Los picos para *omp239F*, *trpE290R* y *glk427R* corresponden con el nucleótido citosina, y sus pesos moleculares oscilaron en 46 pb, 56 pb y 42 pb, respectivamente. Los tres presentan señales de fluorescencia alta y muy poco ruido de fondo.

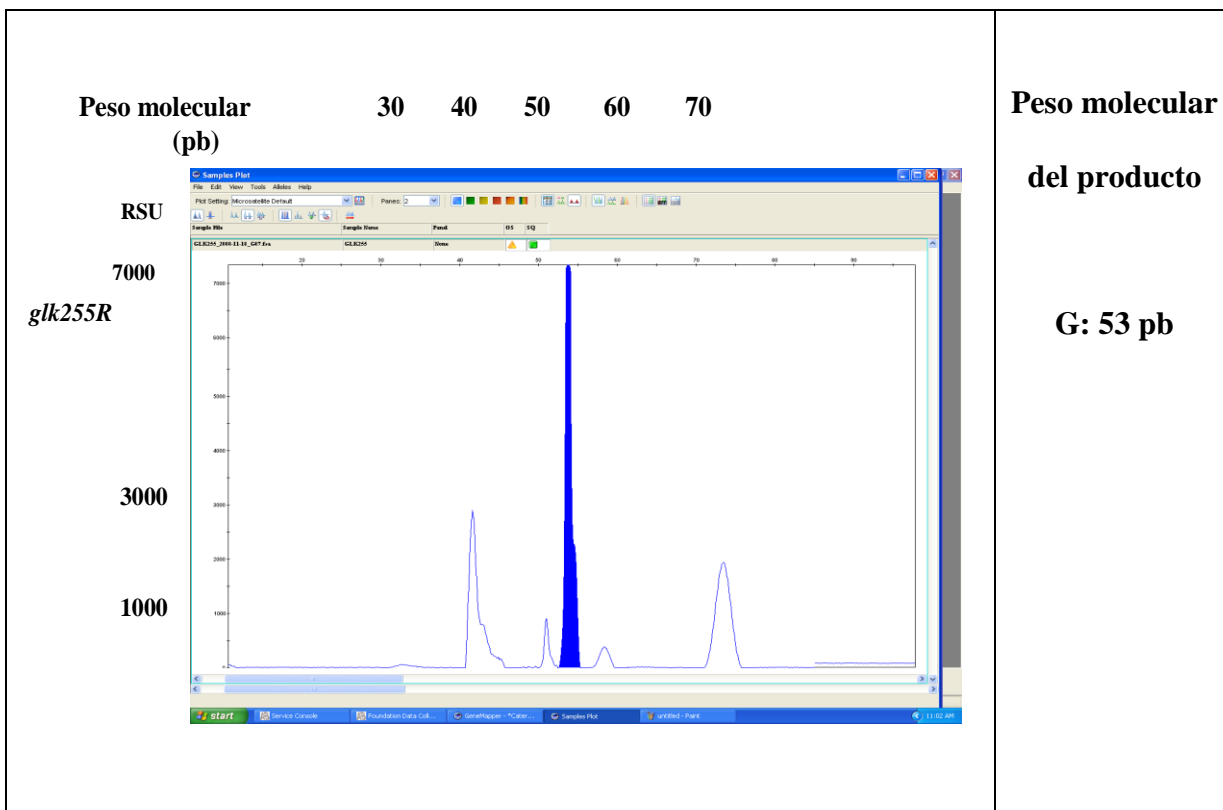


Figura 16. Electroferograma de la extensión de cebador para *glk255R* a partir de los productos del PCR con la enzima Pfu, con ADN de *B. abortus 2308* y los pares de cebadores *glk*, purificados por columna.

Para el cebador *glk255R* se muestra un pico azul que se interpreta como guanina, de aproximadamente 53 pb. Además se muestran otras señales correspondientes a fluorescencia inespecífica las cuales presentan diferentes pesos moleculares, 40, 50, 60 y 70 pb aproximadamente, cuya presencia se podrá evidenciar en las reacciones de extensión con PCR multiplex más adelante.

Los resultados observados en las figuras 14, 15 y 16 correspondientes a los pesos moleculares de los nucleótidos, reflejan un aumento con respecto a los pesos esperados para cada amplicón, mostrados en el cuadro 3. Por otra parte, el amplicón del cebador *omp151F*

presentó un peso molecular mayor (44 pb) que el amplicón del cebador *glk427R* (42 pb), por lo que podría haber una variación a la hora de interpretar los resultados para *B. abortus*. Así, el orden de aparición de los nucleótidos según los pesos moleculares, en orden de menor a mayor, correspondería de la forma indicada en el cuadro 6.

Cuadro 6: Pesos moleculares de la extensión de cada cebador por separado utilizando los amplicones del PCR con los pares de cebadores por separado, la enzima Pfu o Taq polimerasa y el ADN de *B. abortus* 2308, posterior a la purificación por columna.

| Nombre del Cebador | Orden de interpretación según los pesos moleculares | Peso molecular esperado para los amplicones según Whatmore et al., 2007 |
|--------------------|---|---|
| glk196R | 41 | 21 |
| glk427R | 42 | 32 |
| omp151F | 44 | 27 |
| omp239F | 46 | 39 |
| glk255R | 53 | 43 |
| trp290R | 56 | 49 |

Los pesos moleculares de la extensión de cada cebador podrían presentar diferencias de tamaño debido al uso de diferentes matrices para la corrida electroforética., ya que en el documento de Whatmore et al., 2007; se utiliza otra marca comercial de secuenciador y matriz. Las diferencias de peso molecular oscilan entre 7 a 20 pb aproximadamente entre los cebadores homólogos, como se observó en el cuadro anterior.

3.4.4 Reacciones de extensión de cebador a partir del PCR multiplex.

Con el fin de corroborar la efectividad del protocolo múltiple descrito por Whatmore et al., 2007; el ensayo de extensión de cebador se realizó con los productos del PCR multiplex obtenidos a partir del ADN de *B. abortus* cepa 2308, tanto con la enzima Pfu como con la Taq polimerasa; purificados por columna y con la temperatura de extensión recomendada por el fabricante Applied Biosystems®. El resultado obtenido con ambos protocolos coincidió con picos de similares tamaños y fluorescencia, como se muestra en la figura 17.

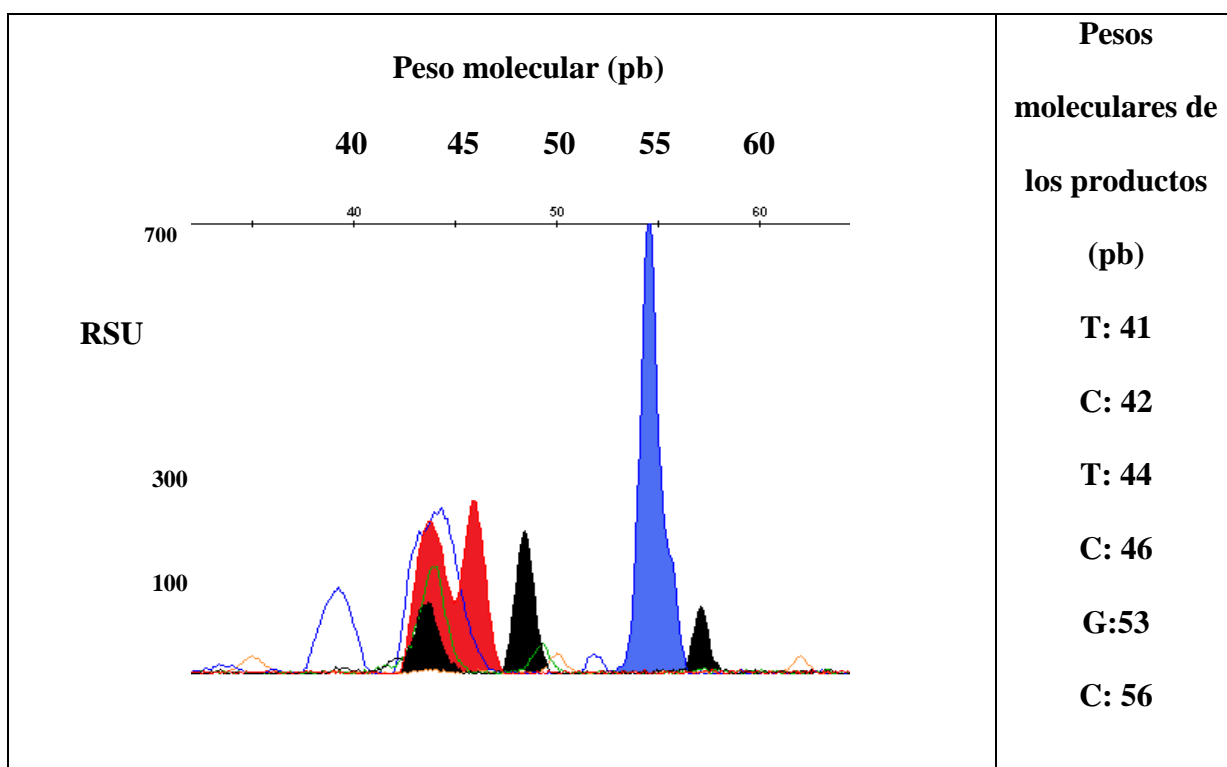


Figura 17. Electroferograma de la extensión de cebadores a partir de los productos purificados por columna del PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa y ADN de *B. abortus* 2308.

Según el anexo 4, la interpretación para los amplicones generados y representados en la figura anterior, en orden ascendente de sus pesos moleculares sería: T C T C G C. Sin

embargo, la explicación del apartado anterior aclara que 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 al., 2007, esto debido posiblemente al uso de diferentes matrices para la corrida electroforética utilizadas entre ambos ensayos. Así la lectura para esta reacción debe ser: T T C C G C, correspondiente a la extensión de cebadores para la especie *B. abortus*.

Con el objetivo de validar el protocolo de extensión de cebador, se realizaron las extensiones de cebadores con la temperatura recomendada por el fabricante, utilizando los productos del 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 de la figura 18 a la 23. Además, en el anexo 5 se muestran los electroferogramas de las seis especies en versión resumida.

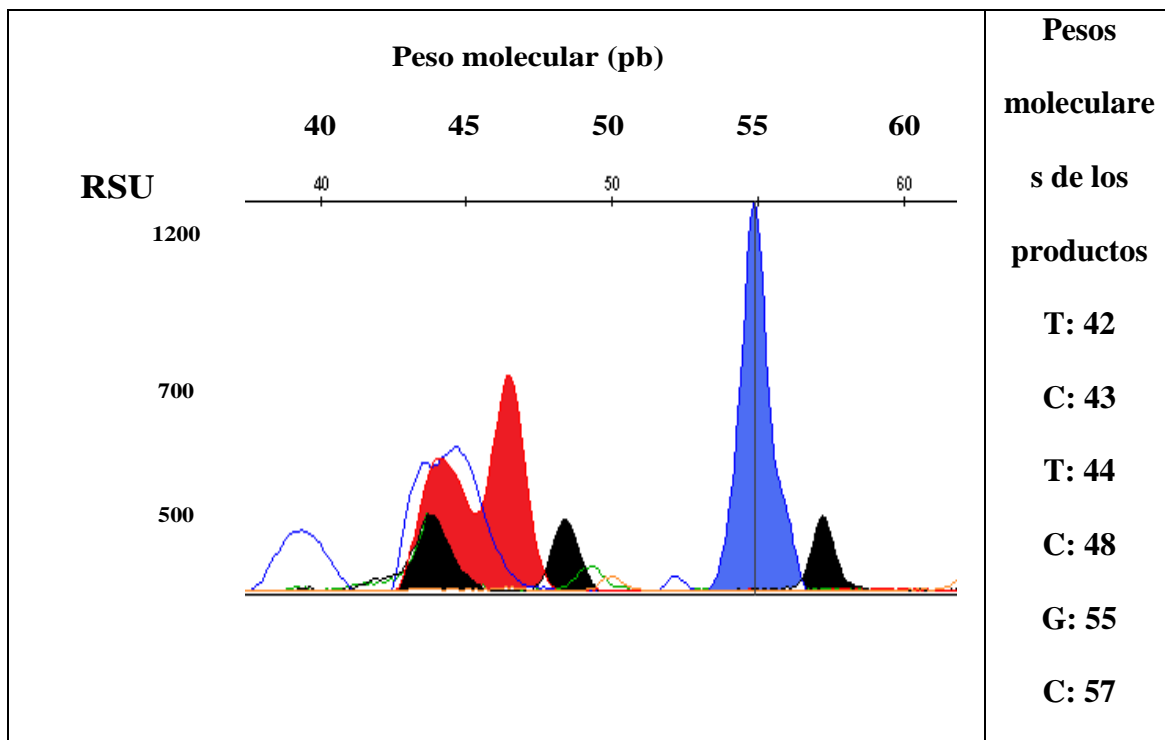


Figura 18. Electroferograma de la extensión de cebador para *B. abortus* a partir de los productos del PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa y ADN de *B. abortus*, purificados por columna.

Según los pesos moleculares y las señales de fluorescencia obtenidas, la interpretación para esta figura corresponde a: T C T C G C, en donde la señal para el gen *glk427R* tiende a anteponerse a la de *omp151F* en esta especie de *Brucella*. 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 ADN 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 comparte en la señal entre los tres picos.

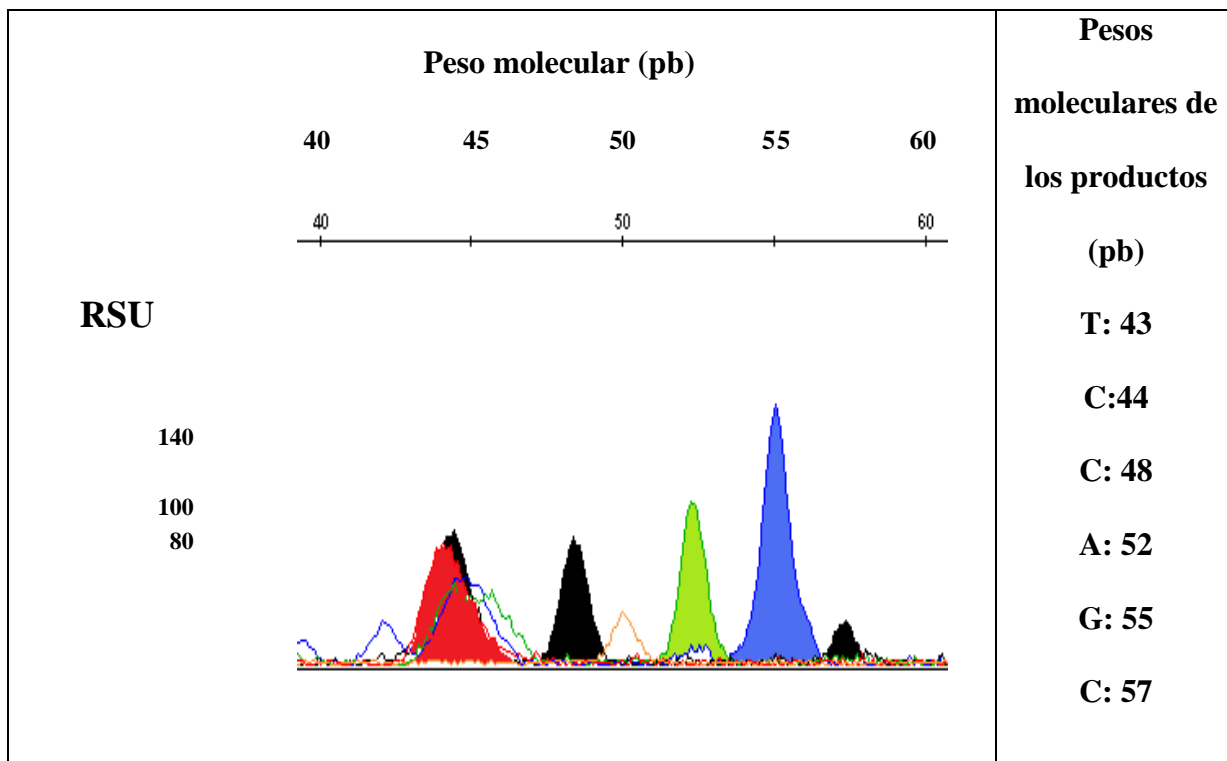


Figura 19. Electroferograma de la extensión de cebador para *B. canis* a partir de los productos purificados por columna del PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa.

Según los pesos moleculares y las señales de fluorescencia obtenidas, la interpretación para esta figura corresponde a: T C C A G C, compatible con *B. canis*. En la figura se muestra el aumento de los pesos moleculares en 1 o 2 pb con respecto a las extensiones de cebadores realizadas anteriormente, sin embargo el orden esperado de los picos no se alteró. 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.

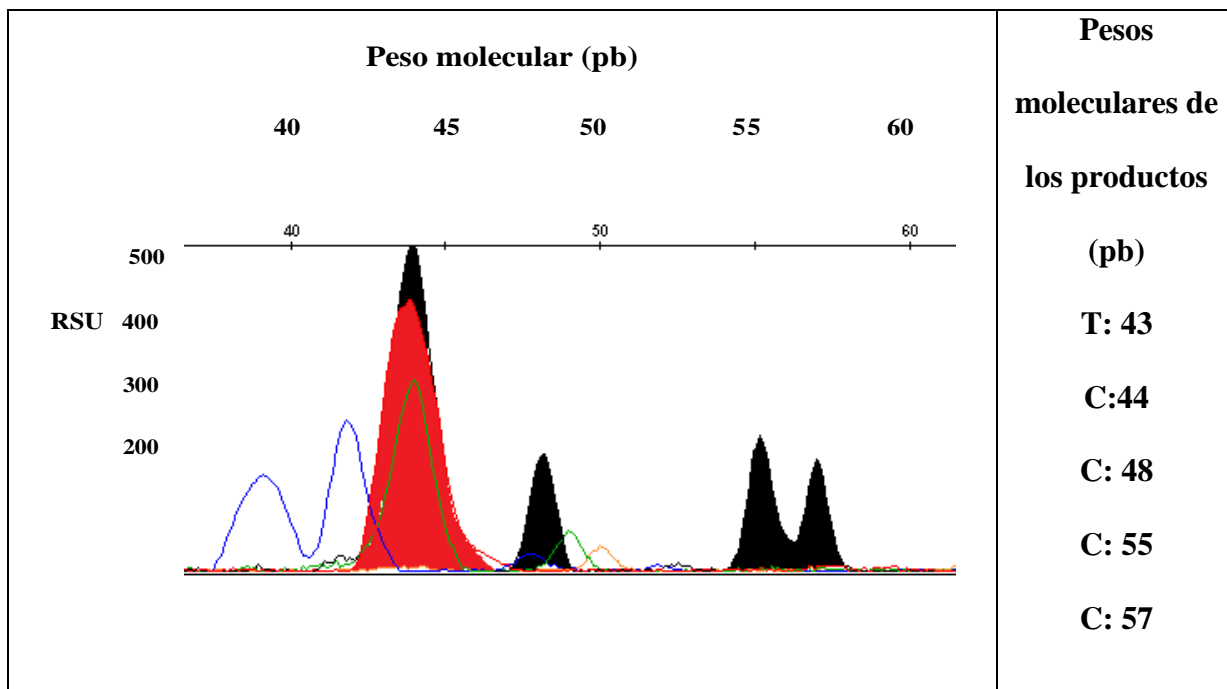


Figura 20. Electroferograma de la extensión de cebador para *B. melitensis* a partir de los productos purificados por columna del PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa.

Según los pesos moleculares y las señales de fluorescencia obtenidas, la interpretación para esta figura corresponde a: T C C C C compatible con *B. melitensis*. La extensión de cebador para esta especie de *Brucella* 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 PCR con ADN de *B. melitensis*, presentaron igual patrón de las señales en los electroferogramas, en donde se evidencia 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. Aún así la causa se desconoce con certeza.

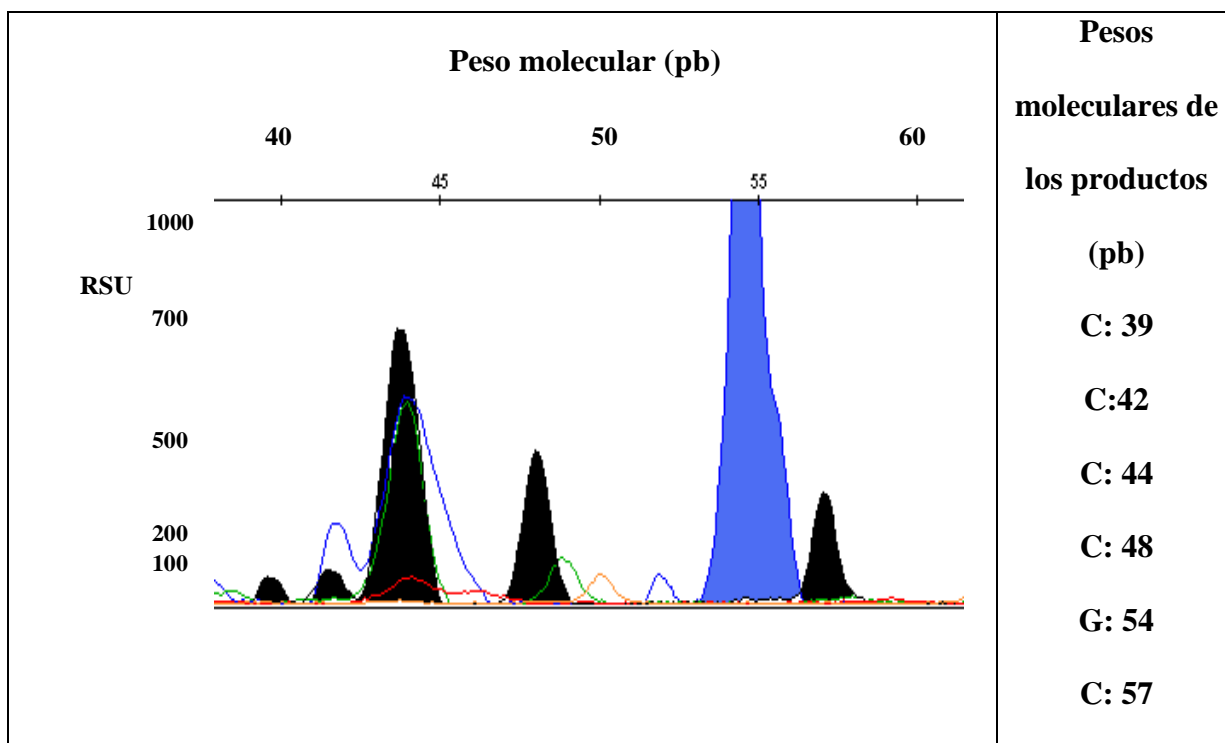


Figura 21. Electroferograma de la extensión de cebador para *B. neotomae* a partir de los productos purificados por columna del PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa.

Según los pesos moleculares y fluorescencia, la interpretación para esta figura es compatible con *B. neotomae*. La extensión de cebador para esta especie se diferencia debido a que es la única en la que ningún gen se representa como timina (pico rojo).

Por su parte la señal negra 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. Aún así las señales obtenidas conservaron el patrón esperado: C C C C G C.

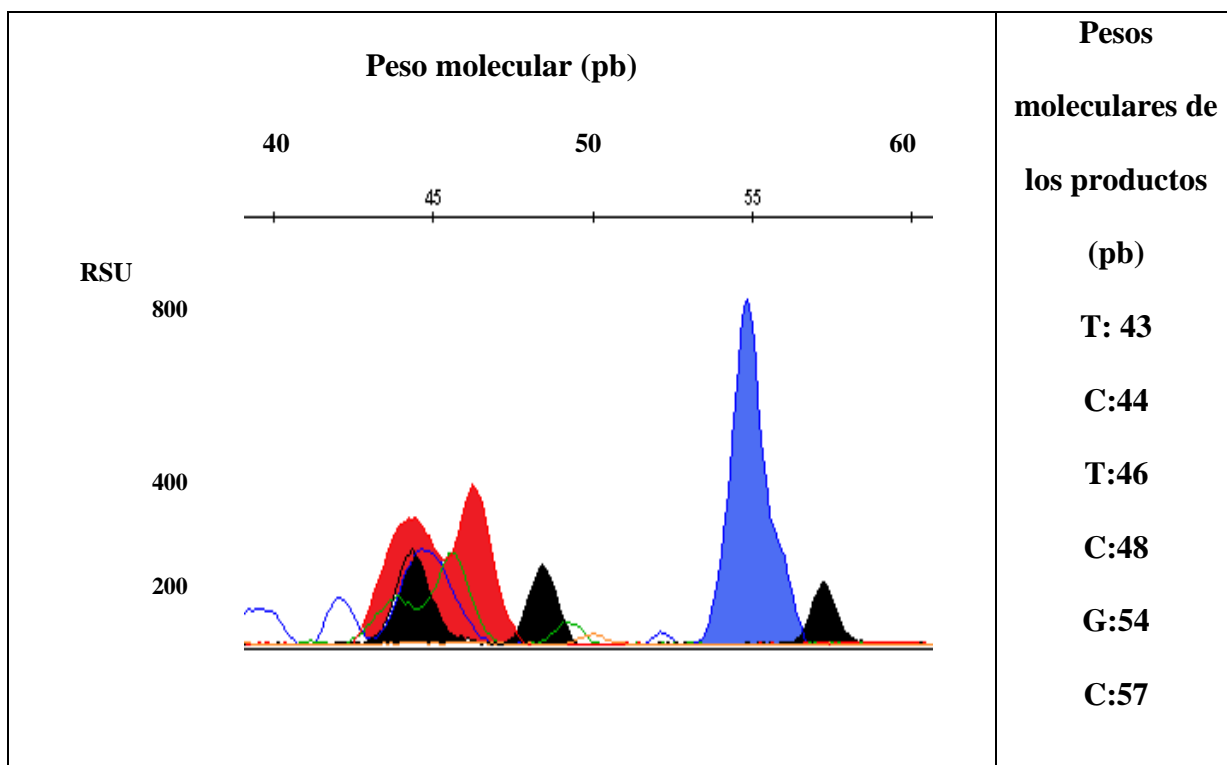


Figura 22. Electroferograma de la extensión de cebador para *B. ovis* a partir de los productos purificados por columna del PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa.

Los picos obtenidos en la figura 22 se representan con la señal y orden esperados, compatibles con *B. ovis*. En ella se observa el mismo patrón de las extensiones de cebador descritas anteriormente, en donde las unidades de fluorescencia son menores a mayor cantidad de señales del mismo color. Así los picos correspondientes a citosinas presentan la RSU menor que la timina (picos de color rojo) y esta a su vez es menor que la RSU de la señal de guanina (azúl). 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.

4. 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*. El PCR multiplex, la purificación de los productos de PCR y la extensión de cebador es posible completarlas en dos días; contrario a los varios días de tipificación y cultivos que las otras técnicas implican. Aún 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. La estandarización 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 PCR, las 48 electroforesis, 55 purificaciones de productos de PCR y aproximadamente 50 reacciones de extensión de cebador; necesarias para estandarizar en el laboratorio de Bioquímica de EMV-UNA 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 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. Aún 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 los 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 al., 2007; pasando de 53°C a 55°C.

El método de purificación de productos de PCR elegido, tanto por ser mas corto en términos de tiempo así como por brindar mejores resultados, fue la purificación por pasaje a través de columnas QIAGEN®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El protocolo de temperaturas indicado por el fabricante Applied Biosystems® fue el elegido para las reacciones de extensión de cebador, ya que presentó los mismos resultados que el protocolo sugerido por Whatmore et al., 2007, así como la ventaja de ser mas corto.

5. RECOMENDACIONES

- Con la finalidad 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 EMV-UNA. 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.
- 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.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

Boschiroli M.L., V. Foulongne & D. O'Callaghan. 2004. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current Opinion Microbiology*. 4: 58-64.

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

Center for Food Security and Public Health (CFSPH). 2003. Brucellosis (en línea). Iowa State University College of Veterinary Medicine. (Consultado el 20 de mayo, 2008 > <http://www.cfsph@iastate.edu>)

Cloeckaert A., J. M. Verger, M. Grayon & N. Vizcaíno. 1996. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiology Letters*. 145: 1-8.

Cloeckaert A., M. Grayon, O. Grépinet & K. S. Boumedine. 2003. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-

- PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes and Infection*. 5: 593-602.
- Corbel M. J. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases*. 3: 213-221.
- Cutler S. J., A. Whatmore & N. J. Commander. 2005. Brucellosis- new aspects of an old disease. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 1270-1281.
- DelVecchio V. G., V. Kapatral, P. Elzer, G. Patra & C. Mujer. 2002. The genome of *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology*. 90: 587–592.
- Foster G., B. J. Osterman, J. Godfroid, I. Jacques & A. Cloeckaert. 2007. *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: 2688-2693.
- Godfroid J., A. Cloeckaert, J. P. Liautard, S. Kohler, D. Fretin, K. Walravensa, B. Garin-Bastuji & J. J. Letesson. 2005. 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: 313-326.
- Gorvel J. P. & E. Moreno. 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*. 90: 281–297.

Groussaud P., S. J. Shankster & M. S. Koylass. 2007. Molecular typing divides marine mammal strains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences. *Journal of Medical Microbiology*. 56: 1512-1518.

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

Hidalgo W. 2004. 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. Universidad Nacional, Heredia.

Hoover D. L. & A. M. Friedlander. 1997. Brucellosis. p. 513-521. In R. Zajtchuk, Medical aspects of chemical and biological warfare. Department of Army, USA.

Ko J. & Splitter G. A. 2003. Molecular host- pathogen interaction in brucellosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 16: 65-78.

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

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

McDonald W. L., R. Jamaludin, G. Mackereth, M. Hansen, S. Humphrey, P. Short, T. Taylor, J. Swingle, C. E. Dawson, A. M. Whatmore, E. Stubberfield, L. L. Perrett & G. Simmons. 2006. 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: 4363-4370.

Michaux S., J. Paillisson, M. J. Casles-Nurit, G. Bourg, A. Allardet-Servent & M. Ramuz. 1993. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *Journal of Bacteriology*. 175: 701-705.

Ministerio de Agricultura y Ganadería. 2008. Boletines epidemiológicos (en línea). Servicio Nacional de Salud Animal, Costa Rica. (Consultado el 2 de junio, 2008><http://www.senasa.go.cr/boletinepidemiologico.htm>)

Moreno E. 2002. Brucellosis in Central America. *Veterinary Microbiology*. 90: 31-38.

Moreno E. & I. Moriyón. 2002. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences*. 99: 1-3.

Organización Panamericana de la Salud. 2000. Boletín epidemiológico (en línea).

(Consultado el 16 de setiembre, 2008> [http://www.paho.org /Spanish/SHA/be_v21n3-casos.htm](http://www.paho.org/Spanish/SHA/be_v21n3-casos.htm))

Pizarro J., E. Moreno & J. P. Gorvel. 1999. *Brucella abortus* invasion and survival within professional and nonprofessional phagocytes. Advanced Cellular and Molecular Biology Membrans and Organs. 6: 201-232.

Ratushna V. G., D. M. Sturgill, S. Ramamoorthy, S. A. Reichow, Y. He, R. Lathigra,

N. Sriranganathan, S. M. Halling, S. M. Boyle & C. J. Gibas. 2006. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. BMC Microbiology. 6: 1-20.

Sambrook J. & D. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3ra. ed. Cold Spring Harbor, USA.

Sangari F. & J. Agüero. 1991. Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. Microbiology and Phatology. 11: 443-446.

Scholz H., Z. Hubalek, J. Nesvadbova, H. Tomaso, G. Vergnaud, G. Le Fléche, A. Whatmore, S. Dahouk, M. Kruger, C. Lodri & M. Pfeffer. 2008. Isolation of *Brucella microti* from soil. Emerging Infectious Diseases. 14: 1316-1317.

- Scott J., M. S. Koylass, M. R. Stubberfield & A. Whatmore. 2007. Multiplex assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *Brucella* isolates at the species level. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 7331-7337.
- Smith L. D. & T. A. Ficht. 1990. Pathogenesis of *Brucella*. *Critical Reviews in Microbiol.* 17: 209-230.
- Ugalde R. A. 1999. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes and Infection*. 1: 1211–1219.
- Vizcaíno N., J. M. Verger, M. Grayon, M. S. Zygmunt & A. Cloeckaert. 1997. 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: 2913-2921.
- Whatmore A., L. L. Perret & A. P. MacMillan. 2007. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiology*. 7: 1-15.

7. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de obtención y extracción de ADN a partir de la cepa pura de *Brucella abortus* 2308 (López, 2008).

Preparar en un envase de centrifugación estéril 564 uL de NET.

Resuspender las colonias recogidas con una pipeta Pasteur de cristal estéril.

Poner a baño María a 80°C por 10 minutos; y luego ponerlo en hielo.

Agregar 30 uL de SDS al 10%.

Agregar 6 uL de proteinasa K 10 mg/ml y 12 uL ARNasa A 100 mg/ml y mezclar bien.

Incubar a 37°C durante 60 minutos

Agregar 100 uL NaCl 5 M, 80 uL de CTAB/NaCl (precalentados a 65°C)

Incubar a 65°C durante 10 minutos

Hacer segundo tratamiento con ARN e incubar a 37°C durante 10 minutos

EXTRACCIÓN:

FENOL-CLOROFORMO-ISOAMILICO, (25:24:1), 700 uL

Centrifugar 13000 rpm, durante 6 minutos

Recoger fase acuosa en un eppendorf nuevo

CLOROFORMO-ISOAMILICO, (24:1), 700 UI

Centrifugar 13000 rpm, durante 6 minutos

Recoger fase acuosa en un eppendorf nuevo

ISOPROPANOL, 420 uL

Centrifugar 13000 rpm, durante 6 minutos

Retirar sobrenadante y recoger el sedimento.

ETANOL 70%, 1 ml

Centrifugar 13000 rpm, durante 6 minutos

Retirar sobrenadante con una pipeta. Lo importante es el sedimento.

Incubar a 37°C, con la tapa abierta, durante 8 minutos

Resuspender en 50 uL de agua ultrapura estéril y conservar a -20°C.

Anexo 2: Protocolo de extensión de cebadores, ABI PRISM SNaPshot

A) Componentes de las reacciones control

| Componentes | Control Positivo (uL) | Control negativo (uL) |
|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Mezcla de Reacción del Kit | 5 | 5 |
| Cebador control del Kit | 1 | 1 |
| ADN control del Kit | 2 | 0 |
| Agua ultrapura esteril | 2 | 4 |
| Volumen Total | 10 | 10 |

B) Componentes de la reacción de extensión a partir de PCR multiplex purificado

| Componentes | Volumen (uL) |
|--|----------------------------------|
| Mezcla de reacción del Kit | 5 |
| Producto de PCR multiplex purificado | 3 |
| Mezcla de cebadores <i>glk196R</i> , <i>omp151F</i> , <i>glk427R</i> , <i>omp239F</i> , <i>glk255R</i> y <i>trp290R</i> | 1 (Concentración final: 2 µM) |
| Agua ultrapura esteril | 1 |
| Total | 10 |

C) Componentes de la reacción de extensión para cada cebador, a partir de los amplicones obtenidos de los PCR con los pares de cebadores *glk*, *omp25* y *trpE* por separado y purificados. El análisis en el secuenciador se hizo por separado para cada reacción.

| Nombre de la reacción | Componentes de la reacción | Volumen (uL) |
|------------------------------|----------------------------------|--------------|
| Reacción para <i>glk196R</i> | Mezcla de reacción del Kit | 5 |
| | Producto de PCR con <i>glk</i> | 3 |
| | Cebadores <i>glk196R</i> , 2 uM | 1 |
| | Agua ultrapura estéril | 1 |
| Reacción para <i>omp151F</i> | Mezcla de reacción del Kit | 5 |
| | Producto de PCR con <i>omp25</i> | 3 |
| | cebadores <i>omp151F</i> , 2 uM | 1 |
| | Agua ultrapura estéril | 1 |
| Reacción para <i>glk427R</i> | Mezcla de reacción del Kit | 5 |
| | Producto de PCR con <i>glk</i> | 3 |
| | cebadores <i>glk427R</i> , 2 uM | 1 |
| | Agua ultrapura estéril | 1 |

| | | |
|------------------------------|----------------------------------|---|
| Reacción para <i>omp239F</i> | Mezcla de reacción del Kit | 5 |
| | Producto de PCR con <i>omp25</i> | 3 |
| | cebadores <i>omp239F</i> , 2 uM | 1 |
| | Agua ultrapura estéril | 1 |
| Reacción para <i>glk255R</i> | Mezcla de reacción del Kit | 5 |
| | Producto de PCR con <i>glk</i> | 3 |
| | cebadores <i>glk255R</i> , 2 uM | 1 |
| | Agua ultrapura estéril | 1 |
| Reacción para <i>trp290R</i> | Mezcla de reacción del Kit | 5 |
| | Producto de PCR con <i>trpE</i> | 3 |
| | cebadores <i>trp290R</i> , 2 uM | 1 |
| | Agua ultrapura estéril | 1 |

Ciclo de termociclaje para A, B y C.

94°C / 5 minutos

25 ciclos de: 96°C / 10 s, 50°C / 5 s, 60°C / 30 s.

72°C / 10 minutos

Anexo 3. Matrices de condiciones analizadas para la estandarización del PCR con el par de cebadores *trpE* y el ADN de *B. abortus* 2308, tanto con la enzima Pfu como con la Taq polimerasa.

A) Matriz de concentraciones para el cebador *trpE*

| Volumen en uL del cebador <i>trpE</i>- f (30 uM) | Volumen en uL del cebador <i>TrpE</i>-r (30 uM) | Concentración final en uM del cebador <i>trpE</i> en la reacción de PCR |
|---|--|--|
| 0,41 | 0,41 | 0,25 |
| 0,7 | 0,7 | 0,42 |
| 1 | 1 | 0,6 |
| 1,33 | 1,33 | 0,8 |
| 1,7 | 1,7 | 1 |

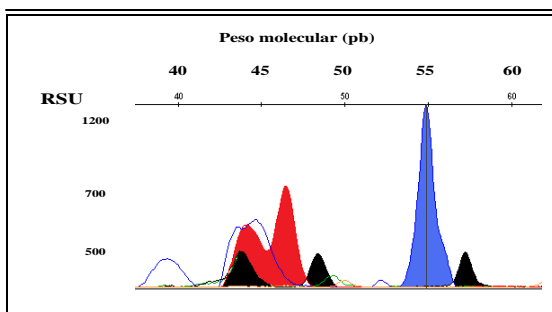
B) Matriz de temperaturas de anillamiento para el cebador *trpE* según las concentraciones finales presentadas en la matriz A.

| Concentración final (uM) del cebador <i>trpE</i> en la reacción de PCR | Temperaturas de anillamiento probadas (°C) | | | | | | | | |
|---|---|----|----|----|----|----|----|----|--|
| 0,25 | 48 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 58 | 60 | |
| 0,42 | 48 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 58 | 60 | |
| 0,6 | 48 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 58 | 60 | |
| 0,8 | 48 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 58 | 60 | |
| 1 | 48 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 58 | 60 | |

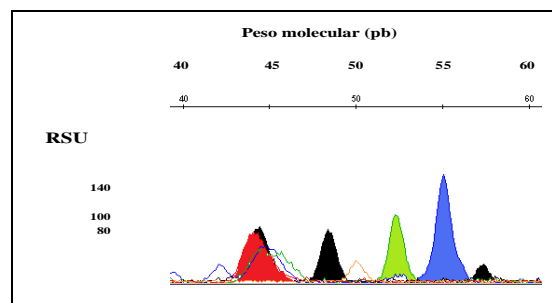
Anexo 4: SNPs específicos que diferencian las especies de *Brucella* (Whatmore et al., 2007).

| Organismo/ Cebador | glk196R | omp151F | glk427R | omp239F | glk255R | trp290R |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>B. abortus</i> (genotipo A) | T | T | C | C | G | C |
| <i>B. abortus</i> (genotipo B) | C | T | C | C | G | C |
| <i>B. melitensis</i> | T | C | C | C | C | C |
| <i>B. suis</i> | T | C | C | C | G | C |
| <i>B. ovis</i> | T | C | T | C | G | C |
| <i>B. canis</i> | T | C | C | A | G | C |
| <i>B. neotomae</i> | C | C | C | C | G | C |

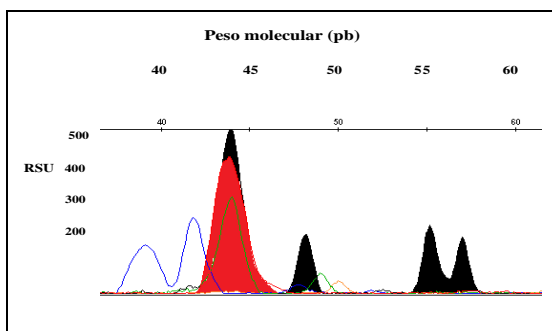
Anexo 5. Electroferogramas de la extensión de cebador para las seis especies terrestres de *Brucella*, utilizando los PCR multiplex con la enzima Taq polimerasa, purificados en columna.



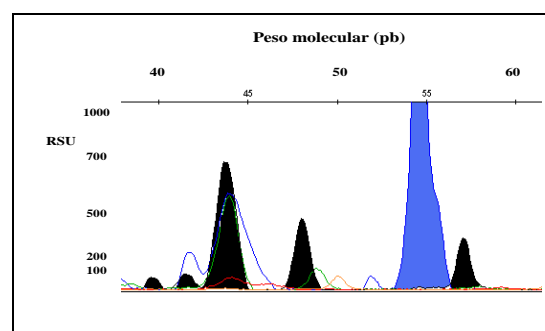
B. abortus



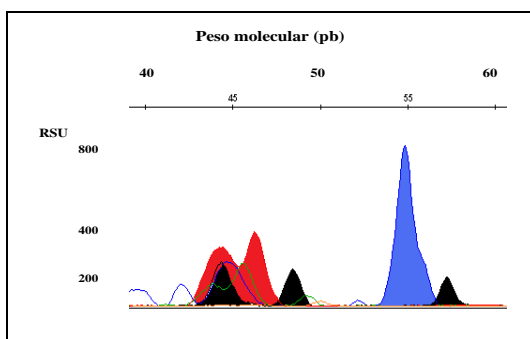
B. canis



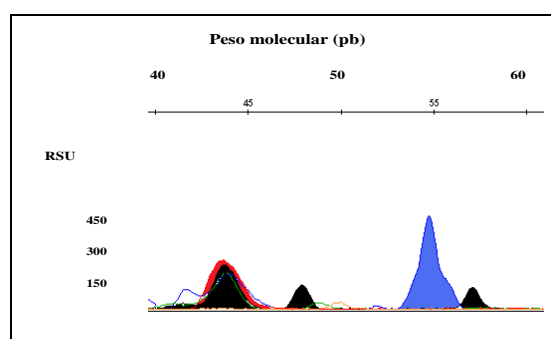
B. melitensis



B. neotomae



B. ovis



B. suis

Anexo 6. Resumen de la metodología a seguir para la realización de la extensión de cebador, con los parámetros de los protocolos estandarizados en el desarrollo de este documento.

- 1) Extracción de ADN a partir de la cepa pura de *B. abortus* 2308 para obtener un ADN de referencia para las reacciones de PCR y de extensión de cebadores, utilizando el protocolo descrito en el anexo 1.
- 2) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con el producto de la extracción de ADN.
- 3) Tratamiento del producto de la extracción de ADN con la enzima ARNasa A, a una concentración final de 2 mg/ml.
- 4) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con el producto de la extracción de ADN posterior al tratamiento con la enzima ARNasa.
- 5) PCRs para la validación del ADN genómico de *B. abortus* 2308 como control positivo, utilizando cebadores L12/L7 y la enzima termoestable Taq polimerasa (Fermentas®), siguiendo el protocolo descrito en el cuadro 5.
- 6) Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la evaluación de la reacción anterior.
- 7) PCRs para la evaluación de los pares de cebadores *glk* (0.42 μ M), *omp25* (0.42 μ M) y *trpE* (1 μ M) por separado, utilizando la enzima Taq polimerasa (Fermentas®) y el ADN genómico de *B. abortus* 2308, siguiendo el protocolo descrito en el cuadro 5.
- 8) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la evaluación de los amplicones de la reacción descrita anteriormente.

- 9) PCR multiplex utilizando los pares de cebadores *glk* (0.42 μ M), *omp25* (0.42 μ M) y *trpE* (1 μ M), la enzima Taq polimerasa (Fermentas®) y el ADN genómico de *B. abortus* 2308, siguiendo el protocolo descrito en el cuadro 5.
- 10) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la evaluación de los amplicones de la reacción descrita anteriormente.
- 11) PCR multiplex utilizando los pares de cebadores *glk* (0.42 μ M), *omp25* (0.42 μ M) y *trpE* (1 μ M), la enzima Taq polimerasa (Fermentas®) y el ADN genómico de las especies terrestres de *Brucella*, siguiendo el protocolo descrito en el cuadro 5.
- 12) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la evaluación de los amplicones de la reacción descrita anteriormente.
- 13) Purificación por pasaje en columnas de los productos del PCR con los pares de cebadores *glk*, *omp25* y *trpE* por separado y del PCR multiplex, siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN®).
- 14) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con los productos de PCR purificados.
- 15) Extensión de cebador utilizando el ABI PRISM SNAPshot (Applied Biosystems ®), siguiendo las instrucciones del fabricante descritas en los apartados A, B y C del anexo 4.
- 16) Tratamiento con 1 Unidad de la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternero CIAP (Fermentas®), siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 17) Análisis de los resultados de la extensión de cebadores a través del analizador genético 3130 Applied Biosystems ®.