

Rafael Delpiazzo Antón

Desarrollo de una técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para la detección de *Brucella abortus*

INFORME FINAL DE PASANTÍA

Licenciatura en Biología Humana

Universidad de la República

Tutor: Dr. Luis Calegari

Co-tutor: Dr. Carlos Azambuja

Lugar: Laboratorio GENIA – Genética Molecular

Dr. Carlos Azambuja
Director del Laboratorio Genia

Dr. Luis Calegari
Tutor de la Licenciatura en Biología Humana

Rafael Delpiazzo

Desarrollo de una técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para la detección de *Brucella abortus*

Rafael Delpiazzo

RESUMEN

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para detectar la presencia de *Brucella abortus* puede ser una técnica eficaz para el correcto diagnóstico de la brucelosis en nuestro país. La brucelosis es una zoonosis, y por lo tanto todo lo que se haga para su control y prevención en los animales repercute en la salud humana. Luego de una extensa búsqueda bibliográfica, se realizaron pruebas para poner a punto el ciclo de amplificación. Se estableció un protocolo para el procesamiento de las muestras, la purificación del ADN y sus condiciones de amplificación, considerando el control positivo y el control de inhibición. Al tener desarrollada la técnica, se analizaron 20 muestras que envió el DILAVE de abortos bovinos con causa desconocida, encontrando una muestra positiva. En las demás muestras no se detectó la presencia de ADN de la bacteria. Además de estos resultados, también se analizó la sensibilidad de detección de la técnica. Si bien la PCR tiene una alta sensibilidad para detectar la presencia de *B. abortus*, las pruebas serológicas que se utilizan en nuestro país también son válidas y de gran utilidad.

Palabras clave: PCR, diagnóstico, brucelosis, zoonosis.

INTRODUCCIÓN

La salud animal y la salud humana están estrechamente relacionadas. Las personas dependen de los animales para la nutrición, para el desarrollo socioeconómico y para la compañía. Sin embargo, los animales pueden transmitir numerosas enfermedades a los seres humanos. Las enfermedades transmitidas entre los animales vertebrados y los seres humanos se denominan **zoonosis** y algunos de ellos son potencialmente devastadoras (World Health Organization, 1997).

La Brucelosis bovina es una zoonosis muy importante de nuestro país, provocada por la bacteria *Brucella abortus*. De acuerdo a la información disponible, se trata de una de las enfermedades más importantes del ganado bovino tanto en América Latina como en otras zonas de desarrollo preindustrial (Acha & Szfres, 2003, p. 30).

El control de esta enfermedad es de gran importancia, no sólo porque puede ser transmitida de los animales a los hombres, sino también por las grandes pérdidas económicas que produce, tanto a nivel de ganado lechero como a nivel de ganado de carne. Esta disminución considerable de la rentabilidad en los establecimientos agropecuarios afectados es debida a los efectos que provoca esta enfermedad, como los abortos espontáneos en el último tercio de la gestación y la infertilidad del rodeo. Además, en caso de comprobarse la existencia de animales infectados, estos deben ser eliminados, y para evitar nuevos focos deben controlarse a los animales que ingresan al predio.

La vacunación del rodeo es fundamental para el control y prevención de la enfermedad, ya que no hay tratamientos eficaces y todo el esfuerzo debe centrarse en la prevención.

Se puede clasificar a la brucelosis como una enfermedad reproductiva, ya que se caracteriza por causar aborto e infertilidad. No es una enfermedad venérea propiamente dicha, dado que la principal vía de transmisión es la vía digestiva y no la sexual.

En nuestro país, si bien se desarrollan programas de control y erradicación, existen en la actualidad 343 focos activos (A. Garin, 2009).

Brucella abortus posee 8 biotipos denominados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9, los cuales difieren entre sí solamente en sus caracteres bioquímicos, inmuno-serológicos o en ambos, pero causan una enfermedad similar (Casas Olascoaga, 2008).

Enfermedad en el hombre

La brucelosis es una enfermedad bacteriana sistémica que puede tener dos formas de presentación: una forma *aguda* de comienzo brusco o una forma *crónica* que puede manifestar episodios agudos. Clínicamente se caracteriza por fiebre intermitente de hasta 40 °C, escalofríos y malestar general, con fuertes dolores osteoarticulares.

B. abortus puede adquirirse por diferentes vías: ingestión del agente infeccioso, penetración de la bacteria por las conjuntivas y piel indemne, vía aerógena o por contaminación con la ubre durante el ordeño, o con la leche cruda de una vaca infectada.

Pero la forma más común y grave de infección es consecuencia de la manipulación de restos placentarios de vacas que abortaron, o el contacto con fetos abortados. Es por esto que los trabajadores rurales, tanto en los tambos como en establecimientos ganaderos, junto con veterinarios, personal de laboratorio, y personal de frigorífico, son la población de riesgo más alto, y constituye así una enfermedad laboral. No existe vacunación para prevenir la enfermedad en humanos, por lo tanto deben cuidarse las medidas de manejo preventivas.

La brucelosis es curable con un tratamiento adecuado y prescrito bajo vigilancia médica. El tratamiento recomendado en la brucelosis aguda es de una dosis diaria de 600 a 900 mg de rifampicina, combinada con 200 mg diarios de doxiciclina, durante 6 semanas por lo menos. Con este tratamiento, las recaídas son muy raras. En el caso de una recaída, debe repetirse el tratamiento. (Acha & Szfres, 2003, p. 32).

Enfermedad en los animales: Brucelosis bovina

Definición

La brucelosis bovina es una enfermedad producida por la bacteria *Brucella abortus*, que se caracteriza fundamentalmente por presentar aborto en el último tercio de la gestación, y causar infertilidad en los rodeos.

El agente etiológico es *Brucella abortus*. Es una bacteria con forma de coco-bacilo, gram negativo, aerobio. Es resistente al medio ambiente, y el huésped afectado es el bovino y el hombre.

Epidemiología

La brucelosis es una enfermedad presente en nuestro país desde 1926, cuando fue diagnosticada por primera vez por la Facultad de Veterinaria. Es una zoonosis reconocida que representa un destacado problema de salud veterinaria a nivel mundial, con una gran importancia económica y sanitaria.

Cadena epidemiológica

La cadena epidemiológica de la enfermedad, tanto para humanos como para bovinos, se podría describir de la siguiente manera:

- Fuente de Infección: En una vaca infectada, *Brucella abortus* se encuentra en el útero gestante, en el feto, en la placenta y puede encontrarse también en la leche.
- Puerta de salida: Por la placenta, líquido amniótico, corrimientos útero-vaginales, fetos abortados, y en la leche. También se puede encontrar en semen de toros infectados.
- Rutas de Transmisión: En los animales se transmite por contacto directo, y por vía digestiva. En el hombre se transmite por contacto con la placenta o fetos vacunos abortados; por ingestión, penetración de la conjuntiva y piel indemne, y contaminación de la ubre durante el ordeño. También se puede transmitir por ingestión de leche cruda y quesos frescos infectados.
- Puerta de Entrada: La vía de entrada es la digestiva y por contacto directo.
- Huésped Susceptible: Bovinos y humanos. Otras especies del género *Brucella* también pueden afectar a ovinos, suinos y caninos.

Control y prevención

La brucelosis bovina puede controlarse con un programa de vacunación eficaz o mediante la erradicación, usando un programa de prueba y sacrificio de animales positivos. En el Uruguay, la vacunación con la vacuna RB51 se realiza en forma estratégica, aplicándose en focos, perifocos y zonas problema. La vacuna RB51 es un cultivo vivo liofilizado, del laboratorio Shering-Plough Veterinaria S.A, de la cual 2 ml contienen entre 10.000 y 34.000 millones de células viables de *B. abortus* – cepa RB 51.

Otra medida de control es la eliminación de los animales positivos, ya que son una fuente potencial de contagio para otros animales y para el hombre. La legislación sobre sanidad animal vigente indica la manera y la forma en que estos animales deben ser eliminados, además de establecer la indemnización correspondiente para los productores.

Actualmente, se requiere la serología negativa obligatoria previa al movimiento de animales que provienen de las zonas de riesgo, identificadas a partir de los antecedentes epidemiológicos, por existencia de focos en actividad o focos cesados en el último año.

En cuanto a las medidas higiénicas, se incluyen aislamiento o sacrificio de animales infectados, eliminación de fetos abortados, placentas y secreciones uterinas, y desinfección de áreas contaminadas. Es particularmente importante que las vacas infectadas sean aisladas durante el parto (Radostits *et al.*, 1988, p 671)

Después de un programa exitoso de vacunación, puede considerarse que se ha logrado la erradicación de la brucelosis en una región cuando el nivel de infección es de menos del 4% de la población de bovinos (Radostits *et al.*, 1988, p. 672)

JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA

De todo lo anteriormente expuesto, se puede deducir los enormes costos productivos y sociales que insume el control de la brucelosis. De allí la gran importancia de disponer de métodos de diagnóstico sensibles, específicos, de más bajo costo y de fácil aplicación para el estudio de grandes poblaciones de animales, con el fin de identificar en forma eficiente y eficaz la presencia de *B. abortus* y su extensión regional.

Asimismo es necesario contar con métodos de alta sensibilidad y especificidad, de fácil realización para el diagnóstico de la brucelosis humana, que frecuentemente se presenta en forma sub-clínica con las consiguientes dificultades para su adecuado encare y tratamiento. Se han desarrollado distintos tipos de pruebas serológicas, basadas en el estudio de la presencia/ausencia de anticuerpos contra la bacteria en suero, leche, cuajo, secreción vaginal, o semen. Las pruebas de aglutinación directa, lenta o rápida, o con el agregado del colorante Rosa de Bengala son las más utilizadas como técnicas de screening. La fijación del complemento (FC), pruebas inmunoenzimáticas ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), o aglutinaciones directas con tratamiento previo con Rivanol o 2 Mercapto-Etanol, se utilizan como técnicas confirmatorias (MGAP, 2008).

Los métodos que identifican directamente a la bacteria y permiten un diagnóstico de certeza, están representados por los estudios bacteriológicos clásicos. Lamentablemente los mismos son de realización compleja y de baja sensibilidad.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) es un método directo alternativo, que en este caso tiene por objeto poner de manifiesto la presencia de la bacteria mediante la identificación de parte de su genoma. Es una técnica de biología molecular descubierta por Kary Mullis en 1986, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular (amplificación), partiendo de una copia original de ese fragmento.

Las grandes ventajas que presentan en general las técnicas de PCR son en cuanto a su sensibilidad y especificidad (ambas muy cercanas al 100 %) y que pueden ser desarrolladas para uso masivo, incluso automatizado, en equipos que ofrecen alta confiabilidad y reproducibilidad de resultados.

OBJETIVO

Objetivo general

El objetivo general es el desarrollo de una técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para la detección de *Brucella abortus*.

La PCR para diagnóstico de *Brucella abortus* aún no es de uso rutinario en nuestro país, aunque el Instituto Miguel C. Rubino (Dirección de Laboratorios Veterinarios D.I.L.A.V.E) ha comenzado a utilizarlo.

La importancia del desarrollo de técnicas de PCR radica en que pueden ser una excelente forma de la detección de la bacteria, por su alta sensibilidad y especificidad y rápidos resultados. Esto será de gran utilidad en el diagnóstico de la Brucelosis y en los estudios epidemiológicos que se hagan en el futuro.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos son:

- la revisión crítica de la literatura sobre los antecedentes relativos a la PCR para el diagnóstico de *B. abortus*.
- la elaboración de un plan de trabajo, la implementación y la puesta a punto de los distintos componentes y etapas del proceso. De esta manera ir avanzando en los ensayos hasta establecer las condiciones más favorables para realizar la PCR.
- el aprendizaje de técnicas de biología molecular, y la práctica del manejo y el trabajo en un laboratorio de biología molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda bibliográfica

Previo al inicio del trabajo de laboratorio, se realizó una búsqueda a fondo sobre trabajos previos en los cuales se haya utilizado la PCR para la detección de la presencia de la *Brucella abortus*.

El fin que buscábamos con esto era, en primer lugar, tener una noción más clara del uso de esta técnica para la detección de la bacteria a partir de experiencias anteriores y en segundo lugar, tener al alcance distintos diseños de primers y condiciones de amplificación, para luego elegir un protocolo sobre el cual nos basaríamos para iniciar las pruebas y poner a punto el sistema.

Luego de un análisis de las distintas variantes y posibilidades, se eligieron dos artículos, los cuales creíamos que darían mejores resultados. El artículo llamado “**A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle**” se utilizó para el diseño de los primers BRU – F y BRU – R (Sreevatsan *et al.*, 2000).

Por otro lado, se utilizó el artículo “**Evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la brucelosis en un rebaño lechero infectado con *Brucella spp.***” (Lavaroni *et al.*, 2004), de la Revista Argentina de Microbiología, para poner a punto las condiciones de amplificación. Luego se hicieron algunas modificaciones a los efectos de optimizar el ciclo para obtener los resultados esperados.

Control positivo

Para la puesta a punto del control positivo de la técnica, se purificó el ADN de *Brucella abortus* a partir de la vacuna RB51, que es la utilizada en la actualidad para la prevención de la enfermedad en bovinos.

La purificación del ADN de la vacuna se realizó utilizando un kit comercial (DNA Purification Kit Wizard Genomic Promega, Wisconsin, USA), al igual que el resto de las muestras analizadas.

Se utilizó para las corridas de electroforesis una escalera de peso molecular conocido con una escala de 100 pares de bases, como se puede ver en las figuras, de la marca Fermentas (O'Gene Ruler DNA Ladder, Low Range, Nueva York, USA).

Origen de las muestras

Se analizaron 20 muestras, junto con sus respectivos controles de inhibición, de distintos individuos. Las muestras fueron remitidas al Laboratorio Genia por el Instituto Miguel C. Rubino (Dirección de Laboratorios Veterinarios D.L.A.V.E). Estas muestras contenían jugo abomasal de distintos fetos bovinos abortados, de los cuales se desconocía el agente causante del aborto, o se sospechaba que fuera de alguna enfermedad venérea.

Control de inhibición

A los efectos de poner en evidencia la presencia de posibles inhibidores de la reacción de amplificación, se incluyó en los ensayos una reacción en la que la muestra fue contaminada con control positivo.

Diseño de primers

La secuencia de primers utilizados (a partir de Sreevatsan *et al.*, 2000) se encuentran ubicados desde los nucleótidos 844 al 864 (5' ACG CAG TCA GAC GTT GCC TAT 3' - **BRU forward**) y desde los nucleótidos 1154 al 1131 (5' TCC AGC GCA CCA TCT TTC AGC CTC 3' - **BRU reverse**) del gen que codifica la proteína 31-kDa (o de la región correspondiente al gen BCSP31K) de la *Brucella*. Estos primers amplificarán una región específica de 311 pb.

Las secuencias de estos primers se mandaron a sintetizar a la empresa Invitrogen (California, USA).

Optimización del ciclo

Como primer paso, se buscó poner a punto la correcta amplificación del control positivo. Una vez obtenida la amplificación para el control positivo, se procedió a analizar las muestras.

Se observó en el gel de electroforesis la banda específica del tamaño esperado, pero además, se observó la presencia de bandas inespecíficas. Por lo tanto, a los efectos de aumentar la astringencia de la reacción de amplificación, se optó por ensayar distintas pruebas modificando la temperatura de annealing. Para esto se utilizó la herramienta de gradiente de temperatura que tiene el termociclador *MJ Research PTC – 225 (Peltier Thermal Cycle, Nueva York, USA)*

Se hicieron dos rondas de amplificación. La primera tenía un gradiente de 53 °C a 59 °C y se obtuvo un resultado óptimo a 58 °C. La segunda ronda se hizo entre 59 °C y 65 °C y si bien el control positivo siguió amplificando a todas las temperaturas, los controles de inhibición no amplificaron. Las condiciones de amplificación se encuentran en el siguiente protocolo.

Protocolo

Purificación del ADN

Se purificó ADN utilizando un kit comercial (DNA Purification Kit Wizard Genomic Promega, Wisconsin, USA) a partir de líquido abomasal de fetos bovinos abortados. Mediante la lisis de la membrana plasmática y nuclear, precipitación de proteínas y centrifugado de las muestras, se obtuvieron pellets de ADN.

Condiciones para la PCR

Para todas las muestras, la PCR se realizó en un volumen final de 20 µL. En cada reacción se utilizó 4 µL del buffer de amplificación 5X (STR 5X) compuesto por: 10 µL de cada

desoxirribonucleótido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP a 25mM cada uno), 500 µL de Buffer 10X (500mM KCl, 100mM TRIS-HCl, y 1% Tritón X-100), 300 µL de MgCl₂ 25mM, y 160 µL de H₂O destilada. Luego, se agregó al mix de amplificación: 1 µL de primers (BRU forward + BRU reverse) a una concentración de 10 µM; 0,5 U de *Taq* polimerasa (Fermentas), y 1 µL del ADN de la muestra. Se completó con 13,9 µL de H₂O destilada y autoclavada.

Para cada muestra, se amplificó también el control de inhibición, agregando 0,5 µL de ADN de la muestra, y 0,5 µL de ADN del control positivo.

Amplificación

Luego de colocados los tubos en el termociclador, se amplificó con las siguientes condiciones: 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58 °C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, seguido luego de una extensión final a 72 °C por 3 minutos y mantenimiento a 4°C (modificado de Lavaroni *et al.*, 2004).

Electroforesis

Las muestras amplificadas se corrieron en un gel de acrilamida nativa al 6%, con una escalera de peso molecular conocido ya mencionada.

Revelado

Se siguió el protocolo de tinción con nitrato de plata (modificado de Sanguinetti *et al.*, 1994). Los pasos que se siguieron para el revelado de los geles fue el siguiente:

- a. Se sumergió el gel en el recipiente que contiene la Solución Fijadora 20 minutos.
- b. Se escurre bien el gel y seguidamente se sumerge en el recipiente que contiene la Solución de Plata por 20 minutos, no más, porque de lo contrario el gel queda negro.
- c. Se escurre bien el gel y posteriormente se sumerge en el recipiente que contiene la Solución Reveladora por 20 min. Las bandas aparecen lentamente y su intensidad irá variando con el tiempo de inmersión en la solución reveladora. En esta etapa el tiempo no es crítico, y se puede calentar un poco la solución reveladora para acelerar el proceso de revelado.
- d. Por último se sumerge el gel en un recipiente que contiene agua desionizada, dejándolo por 2-3 min. Se retira y se deja secar.

Lectura e interpretación de resultados

- a. Para el control positivo, se espera encontrar una banda de un tamaño de 311 pb.
- b. En el control negativo se espera no encontrar bandas.
- c. En las muestras:
 - Es positiva, si da una banda de 311 pb.
 - Es negativa, si no aparece ninguna banda y el control de inhibición da una banda de 311 pb.

En cualquiera de estos casos, para que la corrida sea válida, el control negativo y el control positivo deben dar los resultados esperados. De lo contrario la corrida no es válida y debe repetirse toda, desde la amplificación.

RESULTADOS

Las pruebas que se realizaron con el control positivo dieron resultados muy buenos desde el inicio de los ensayos. En la figura 1 se puede observar la banda de 311 pares de bases amplificada.

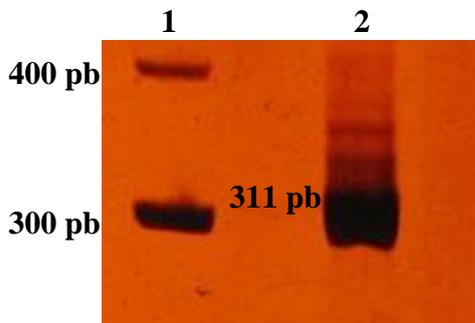


Figura 1. Gel revelado el 11/07/2008. **1.** Escalera de Peso Molecular **2.** C+ sin diluir. La banda amplificada tiene un tamaño que corresponde al esperado de aproximadamente de 311 pb.

Estudio de la sensibilidad

El prospecto de la vacuna utilizada como control positivo de *Brucella abortus* dice que 2 ml contienen entre 10.000 y 34.000 millones de células viables de *B. abortus* – cepa RB 51. De esta manera, se pudo estimar la cantidad de bacterias a las que se les purificó el ADN. Por tanto, se estima que en 1 μ L de la purificación de ADN del control positivo de *B. abortus*, se encuentra el ADN de al menos 5 millones de bacterias.

A partir de esta extracción, se han hecho diluciones de a 10, hasta la dilución 1/1.000.000, que fue la última dilución en la cual se detectó la presencia de *B. abortus* luego de la amplificación. En 1 μ L de esta dilución se encuentran aproximadamente 5 bact/ μ L. Este es el límite de detección de la técnica.

En una primera prueba, se amplificó el control sin hacerle ninguna dilución (ver fig. 1). Al observar una banda de gran espesor, se procedió a hacer dos diluciones, 1/ 100 y 1/1.000. Se observó que el C+ 1/1.000 amplificó bien (ver fig. 2).

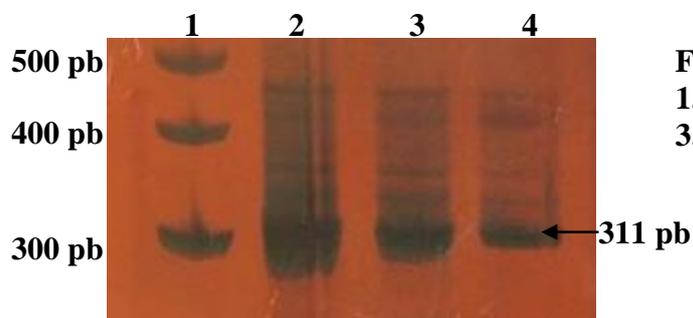


Figura 2. Gel revelado el 15/07/2008. **1.** Escalera de Peso Molecular **2.** C+ **3.** C+ 1/100 **4.** C+ 1/1.000

Posteriormente, se siguieron haciendo pruebas con diluciones seriadas de a 10. Fue así que se probó con 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000.

Los resultados indicaron que en el C+ 1/1.000.000 hubo amplificación (ver fig. 3), aunque sea una banda tenue y poco clara, pero sigue habiendo el suficiente ADN como para que la amplificación se produzca.

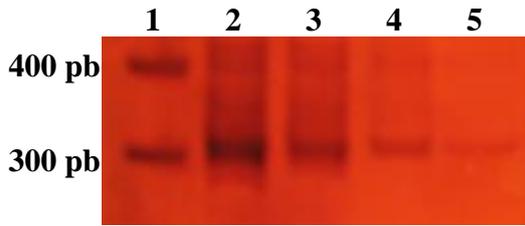


Figura 3. Gel revelado el 31/07/2008. **1.** Escalera de Peso Molecular **2.** C + (1/1.000) **3.** C + (1/10.000) **4.** C + (1/100.000) **5.** C + (1/1.000.000)

Luego se observó que una dilución más, o sea 1/10.000.000, no amplificó (ver fig. 4).

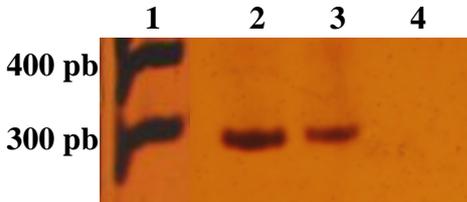


Figura 4. Gel revelado el 8/08/2008
1. Escalera de Peso Molecular **2.** C+ 1/100.000
3. C+ 1/1.000.000 (límite de detección)
4. C+ 1/10.000.000

A los efectos prácticos, se utilizará la dilución 1/100.000 como control positivo.

Análisis de las muestras

De las 20 muestras analizadas, se identificó una sola positiva, la muestra 9 (ver fig. 6). En las demás muestras no se detectó la presencia de ADN de la bacteria.

En las primeras 11 muestras, se analizó por separado la muestra y luego su control de inhibición. Los resultados de las muestras se pueden ver reflejados en las figuras 5 y 6. En la figura 7 se observan los controles de inhibición.

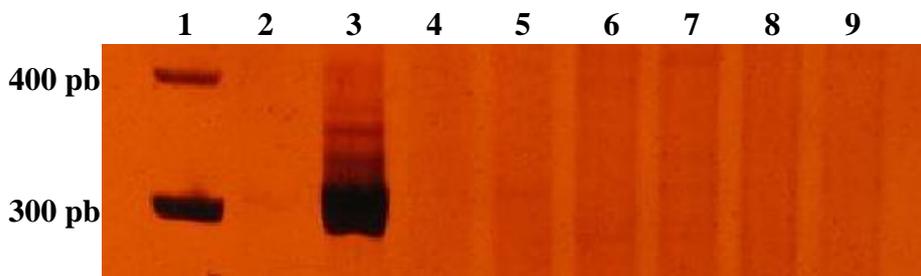


Figura 5. Muestras 1 a 6 **1.** Escalera de Peso Molecular **2.** C- **3.** C+ **4.** Muestra 1 **5.** Muestra 2 **6.** Muestra 3 **7.** Muestra 4 **8.** Muestra 5 **9.** Muestra 6.

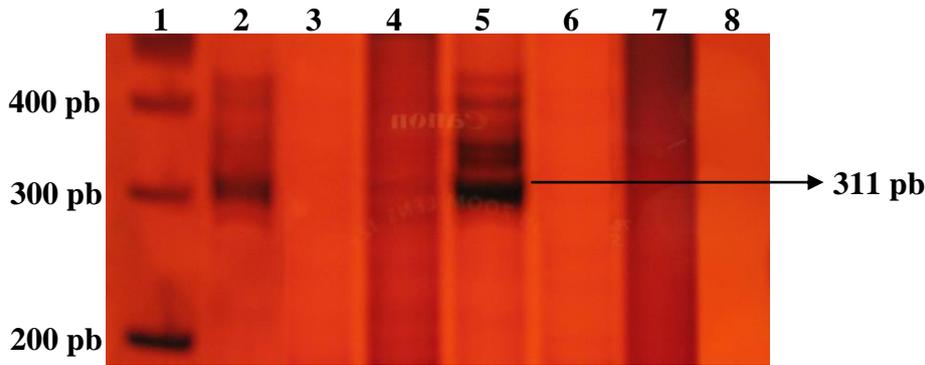


Figura 6. Muestras 7 a 11 1. Escalera de Peso Molecular 2. C + 3. Muestra 7
4. Muestra 8 5. **Muestra 9 (positiva)** 6. Muestra 10 7. Muestra 11 8. C -

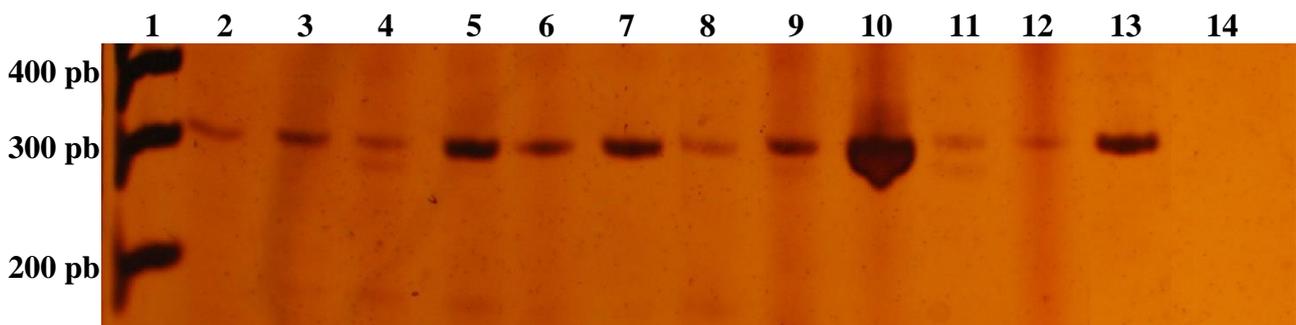


Figura 7. Controles de inhibición (Ci) de las muestras 1 a 11. 1. Escalera de Peso Molecular
2. Ci muestra 1 3. Ci muestra 2 4. Ci muestra 3 5. Ci muestra 4 6. Ci muestra 5
7. Ci muestra 6 8. Ci muestra 7 9. Ci muestra 8 10. **Ci muestra 9 (positiva)**
11. Ci muestra 10 12. Ci muestra 11 13. C+ 14. C-

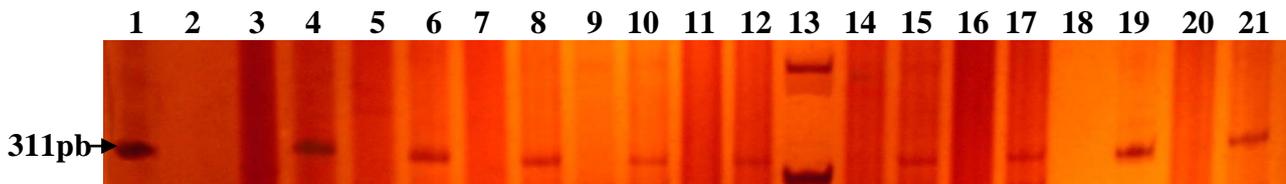


Figura 8. Análisis y controles de inhibición de las muestras 12 a la 20. 1. C+ 2. C-
3. Muestra 12 4. Ci muestra 12 5. Muestra 13 6. Ci muestra 13 7. Muestra 14
8. Ci muestra 14 9. Muestra 15 10. Ci muestra 15 11. Muestra 16 12. Ci muestra 16
13. *Escalera* 14. Muestra 17 15. Ci muestra 17 16. Muestra 18 17. Ci muestra 18
18. Muestra 19 19. Ci muestra 19 20. Muestra 20 21. Ci muestra 20.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados, muestran que la PCR es una técnica eficaz para la detección e identificación de la *B. abortus* a partir de muestras de jugo abomasal de fetos bovinos abortados. En la última década, son numerosos los antecedentes sobre el empleo de la PCR para la detección genómica de *Brucella* spp. en la confirmación del diagnóstico (Lavaroni *et al.*, 2004).

Los primers utilizados resultaron eficaces y aptos para la detección de la *B. abortus*. En todas las pruebas se observó amplificación del control positivo, lo que muestra que el método para la purificación del ADN fue correcto, y que las condiciones de amplificación establecidas tuvieron el éxito esperado.

En nuestro país, para el diagnóstico de la *B. abortus*, se utilizan distintos tipos de pruebas serológicas, basadas en el estudio de la presencia/ausencia de anticuerpos contra la bacteria en suero, leche, cuajo, secreción vaginal, o semen. Se utiliza la prueba de Rosa de Bengala como técnica de screening, la cual es un método de diagnóstico indirecto, simple y rápido, que descubre la infección temprana y puede usarse como prueba inicial de selección (Radostits *et al.*, 1988, p. 665). En los animales que dan positivo a la Rosa de Bengala, se deben realizar pruebas confirmatorias, entre las que se incluyen la fijación del complemento (FC), pruebas inmunoenzimáticas ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), prueba de Rivanol, y la prueba 2 Mercapto-Etanol (MGAP, 2008).

En comparación con estas pruebas, una de las principales ventajas que tiene la identificación genómica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es que ésta es un método directo para la identificación de *Brucella* spp.

Además, los resultados obtenidos en este ensayo, muestran que la PCR tiene una alta sensibilidad para detectar la presencia de *B. abortus*, lo que sería otra gran ventaja a favor de la PCR, además de existir una baja probabilidad de encontrar resultados falsos positivos o negativos. También se podría desarrollar mejor la técnica con la finalidad de que se pueda detectar los distintos tipos de *Brucella* que están presentes, lo que aportaría una información muy importante para su control y erradicación.

Más allá de las ventajas de la PCR mencionadas, es válido decir que los métodos de diagnóstico oficiales que establece la División Sanidad Animal del MGAP, como son las pruebas serológicas (Rosa de Bengala y pruebas confirmatorias), siguen siendo de gran utilidad para realizar en un número elevado de animales, lo que le brindan una mayor utilidad práctica para el diagnóstico en rodeos muy grandes.

En cuanto a los costos, la PCR exige una inversión inicial aproximadamente de US\$ 8.000 en termocicladores y equipamiento de laboratorio, pero luego el estudio de cada muestra cuesta aproximadamente US\$ 14 lo que significa un costo razonable en nuestro país.

Por lo tanto, deberán buscarse los caminos para abaratar los costos de la PCR y buscar la complementación entre todas las técnicas, para así poder establecer el diagnóstico de Brucelosis con mayor exactitud.

Se debería seguir profundizando en la posibilidad de aplicar esta técnica de PCR en casos de enfermedad en humanos, para tener un diagnóstico más rápido y exacto que los que se utilizan actualmente, como son los estudios serológicos con muestras pareadas

CONCLUSIONES

Como trabajo final, fue una excelente experiencia para la formación profesional de la Licenciatura en Biología Humana.

Se emplearon técnicas y equipos de última generación, y se estableció un plan de trabajo que fue muy formativo para quien hace una carrera vinculada a la investigación.

El trabajo que significa desarrollar una técnica de biología molecular fue un desafío importante. Todas las etapas de la pasantía incluyeron el aprendizaje, tanto teórico como práctico, del trabajo en un laboratorio de biología molecular.

La puesta a punto de todos los pasos de la técnica, llevó a que la práctica de laboratorio haya sido una tarea apasionante.

Debido a falta de tiempo, no se pudo llevar a cabo todo este trabajo con otras enfermedades como habíamos pensado, como posibilidad, en el informe de presentación de la pasantía (Leptospirosis, Campylobacteriosis, Diarrea Viral Bovina (BVD) o Rinotraqueitis Infecciosa Bovina). Si bien la búsqueda bibliográfica se realizó, y algunas pruebas se hicieron, no fue posible terminar de poner a punto todos los aspectos de la técnica. Cabe recordar que de estas enfermedades, la Brucelosis y la Leptospirosis son zoonosis de gran importancia en nuestro país.

Agradecimientos

Por último, quiero agradecer a todo el personal del Laboratorio Genia, y a su director, por darme la posibilidad de realizar allí la pasantía.

En las distintas etapas del proyecto, siempre se fueron buscando las alternativas que dieran mejores resultados, bajo la dirección y el consejo de personas técnicamente muy especializadas y con quienes se pudo trabajar muy a gusto.

También quiero agradecer al Dr. Luis Clegari, un excelente tutor, por su constante apoyo y paciencia para atender los distintos pasos de la pasantía.

BIBLIOGRAFÍA

Acha P, Szfres B. 2003. Brucelosis. En: ZONOSIS y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª ed. Vol 1, Bacteriosis y micosis. Organización Panamericana de la Salud. P 28-56.

Casas Olascoaga R. 2008. Brucelosis Bovina. Revista de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay, Vol. 43, N° 170, pp. 7-35.

Garín A. 21 de setiembre de 2009. Informe sobre la situación actual de la Brucelosis Bovina. Acta N° 148 de la Comisión Nacional Honoraria de Salud Animal (CONAHSa).

Lavaroni O, Aguirre N, Vanzini V, Lugaresi C, Torioni de Echaide S. 2004. Evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la brucelosis en un rebaño lechero infectado con *Brucella* spp. Revista Argentina de Microbiología, 36: 101-106.

MGAP, División Sanidad Animal. 17/06/2008. Manual de atención de foco de Brucelosis bovina.

Radostits O M, Blood D C, Henderson J A. 1988. Enfermedades causadas por especies de *Brucella*. En: Medicina Veterinaria, 6ª ed. Ed. Interamericana. P 662-681.

Sanguinetti C, Díaz Neto E, Simpson AJG. 1994. Rapid silver staining and recovery of PRC products separated on polyacrilamide gel. Biotechniques 17(5): 915 – 918.

Sreevatsan S, Bookout J, Ringpis F, Perumaalla V S, Ficht T, Garry A, Adams L, Hagius S D, Elzer P H, Brecker B J, Kumar G, Rajasekhar M, Isloor S, Barathur R. 2000. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. J. Clin. Microbiol. 38: 2602-2610.

World Health Organization. 1997. Fact sheet N173. Brucellosis. World Health Organization, Ginebra, Suiza.