



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## DESARROLLO DE UNA PCR MULTIPLEX PARA SU POTENCIAL USO EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA BRUCELOSIS

Ana Laura Márquez-Aguirre (1), Bernardo de Santiago-León (1), Beatriz Arellano-Reynoso (2), Oscar Pizano-Martínez (1), Hugo Esquivel-Solis (1), Ciro Estrada-Chávez (1)

(1) Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, CIATEJ, Guadalajara Jalisco, 44270, [amarquez@ciatej.net.mx](mailto:amarquez@ciatej.net.mx)  
(2) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

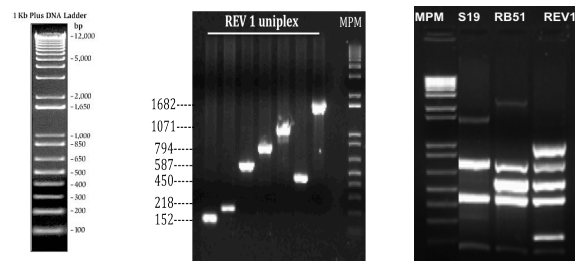
**Palabras clave:** diagnóstico molecular, PCR, brucelosis

**Introducción.** La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de origen bacteriano, causada por los coccobacilos Gram negativos del género *Brucella*, que afecta al humano así como a diferentes especies de mamíferos domésticos y silvestres. Es de distribución mundial y se considera zoonótica en México y la zoonosis bacteriana más importante. Se adquiere por exposición directa a animales infectados, la ingesta de alimentos lácteos sin hervir o pasteurizar, o bien por el consumo de alimentos contaminados como carne y vísceras. En México, el diagnóstico oficial se realiza por serología (NOM 022-SSA2-1994). Sin embargo, la principal desventaja de estas pruebas es que son indirectas y durante su desarrollo se pueden presentar reacciones cruzadas con otras bacterias. Por lo que el objetivo de este trabajo fue estandarizar una PCR multiplex para su potencial uso en el diagnóstico molecular de la brucelosis.

**Metodología.** Para el desarrollo de la técnica se utilizaron las cepas vacunales *RB51*, *C19* y *Rev 1*, así como cepas silvestres de *B. abortus* y *B. mellitensis* y las de referencia. La obtención del DNA genómico de las bacterias se realizó a través de la lisis con Lizozima (0.2 µg/µl), SDS 1% y Proteinasa K (1µg/µl) y una posterior extracción por el método de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para finalmente evaluar su pureza a través de la relación de absorbancia a 260/280 nm. La PCR se realizó utilizando 500 ng de DNA templado y de manera simultánea los ocho pares de oligonucleótidos para amplificar las regiones específicas de cada una de las especies (80 nM de cada uno de los oligos), 400 µM de una mezcla de dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 U de Taq DNA pol y su buffer en un volumen de 25 µl, con las siguientes condiciones: 95°C 5 min, 30 ciclos de 94°C 40 seg, 58°C 35 seg y 72°C 2 min, con una extensión final de 72°C 10 min.

**Resultados.** Las condiciones empleadas permitieron la estandarización y desarrollo de la PCR multiplex. La cepa *RB51* presenta una inserción de 711 pb con el iniciador 1. *REV1* es la única cepa que amplifica un segmento de 218 pb con el iniciador 7. Para la *S19* encontramos que es necesario utilizar los iniciadores 2, 4 y 5, y que es la única que no amplifica un segmento con el iniciador 5.

Por su parte la cepa de *B. abortus* amplifica 5 de los iniciadores y *B. mellitensis* 6. Esto permite la identificación diferencial de cada una de las cepas a través de un patrón característico de bandas para cada uno de las cepas según las secuencias diferenciales en su genoma.



**Fig. 1.** Los productos de PCR se observaron por corrimiento electroforético en agarosa 1.2 % y 2µg/ml de bromuro de etidio.

**Tabla 1.** Secuencias de oligonucleótidos y amplicones diferenciales para las cepas vacunales y de referencia de *Brucella*.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tamaño de amplicón (pb)	Cepas vacunales			Cepas de referencia		
			REV 1 ( <i>B. mellitensis</i> )	C19 ( <i>B. abortus</i> )	RB51 ( <i>B. abortus</i> )	S19 S-65 ( <i>B. canis</i> )	2388 ( <i>B. abortus</i> )	2389 ( <i>B. abortus</i> )
1	ATC GTA TGG GGC GSA TAA GG GCT TGG GAT TTT CAC TGT AGC GCG GAT TCT TGA GGT ATT AA	1,082 (2924)			2924			
2	CGC AAG CCA AAA GAG CTA TAA TTT ACA GAG GGA ATC GAG GA	450 (1,320)						
3	GCG TTC AGT TGT TGT TGA TG ACG CAG ACG AGC TTC GGT AT	1,071						
4	TTT ATC GAT CCG GCT GTC AG GCG GCT ATT ATG TGG ACT GG	794						
5	AKT GAC TTC ACG GTC GTT CG GGA ACA CTA CCG CAG CTT GT	587						
6	GAT GGA GCA AAC GCT AAA G GAG GCA AAC GCT GAG AAG C	272						
7	GAT GTC GTA ACG CAG ACC AA CGC AGA CAG TGA CCA TGA AA	218						
8	GTA TTC ACG GCG GGT TAC GT	152						

**Conclusiones.** La PCR multiplex nos permitió la identificación de las diferentes cepas del género de *Brucella*. Lo anterior ofrece una prueba potencial para el diagnóstico rápido y específico de brucelosis así como posibles rutas epidemiológicas de la enfermedad.

**Agradecimiento.** FOMIX JALISCO clave: 2009-05-123627

### Bibliografía.

- NOM 022 SSA 1994, Norma Oficial Mexicana para la prevención y control de la brucelosis. SSA. SAGAR. Diario Oficial de la Federación.
- <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>. Vigilancia epidemiológica. Casos de enfermedades zoonóticas. Semana 34, 2009.
- García-Yoldi, López-Goñi (2006) Multiplex PCR Assay for the Identification and Differentiation of all *Brucella* Species and the Vaccine Strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella mellitensis* Rev 1.