

DETECCIÓN SIMULTANEA DE *Brucella* spp. Y ORGANISMOS DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis* MEDIANTE PCR-MULTIPLEX.

Alberto Morales-Loredo¹, María Flores-Briones², Pola Becerril-Montes² e Irma O. Martínez-Vázquez². ¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. ²Universidad Autónoma de Nuevo León (INIFAP). Apartado postal 128-F, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L.

Correo electrónico: irmartin@ccr.dsi.uanl.mx.

Palabras clave: PCR-Multiplex, brucelosis, tuberculosis.

Introducción: En México, la brucelosis y tuberculosis son zoonosis importantes porque provocan pérdidas económicas en la ganadería e impactan en la salud pública. Una de las limitantes para establecer el diagnóstico de las dos enfermedades, es la ausencia de algún síntoma característico que las defina con precisión en sus primeras etapas (1). La prueba contundente es el aislamiento del agente causal, pero ésta es tardada, laboriosa y tiene un grado variable de sensibilidad (2). El diagnóstico serológico de las dos enfermedades no permite detectar infecciones primarias asintomáticas (2). El diagnóstico individual de brucelosis y tuberculosis mediante PCR ya ha sido reportado (3, 4, 5) y prácticamente no existen reportes de la detección de los dos patógenos en una sola prueba. Se planeó el presente estudio para desarrollar la prueba de PCR-Multiplex para el diagnóstico simultáneo de brucelosis y/o tuberculosis con rapidez, especificidad y sensibilidad altas.

Metodología: Para la extracción de DNA de cepas de *Brucella* spp. y del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*B. abortus* 544, *B. melitensis* M-16, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, S19 y RB51 (BIVE), *M. bovis* AN5, *M. tuberculosis* H37RV), se utilizó el método fenol-cloroformo (6). Se seleccionaron iniciadores para *Brucella* spp. (6, 4) y para el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (7, 8). Con estos iniciadores y las secuencias de *Mycobacterium* y *Brucella* reportadas, se realizaron simulaciones de PCR con el programa Amplify 1.2 (9). Se realizaron experimentos de gradiente de temperatura de alineamiento. Las reacciones *in vitro* de PCR-Multiplex se realizaron en 25 µl.

Resultados y discusión: En el PCR-Multiplex con los genomas de *Mycobacterium*, *Brucella* y los tres iniciadores, se obtuvieron dos fragmentos en *B. abortus* 544 (813 y 690 pb) y uno en *M. tuberculosis* H37RV (309 pb), confirmando la presencia de los dos microorganismos. La amplificación obtenida de *M. bovis* fue ligeramente más débil con respecto al fragmento obtenido de *M. tuberculosis*, lo que puede deberse, según Kathleen y cols., 1993 (10) a que la secuencia IS6110 se encuentra en mayor número de copias en *M. tuberculosis* (10 a 20), mientras que en *M. bovis* se encuentran de 1 a 5.

Conclusiones: Se estandarizó la técnica de PCR-Multiplex para la amplificación simultánea de fragmentos específicos de DNA de *Brucella* spp. y especies del complejo *M. tuberculosis*, mediante el uso de tres iniciadores en una sola reacción de PCR.

Agradecimiento: SIREYES (Proyecto 19980602009), FP, A.C. y CPFPP-NL.

Bibliografía: 1. Hernández M.I. 1998. Importancia de la brucelosis en la salud pública: Diagnóstico por el Laboratorio. En III Foro Nacional de Brucelosis. Luna-Martínez JE y Suárez Guemes F, eds. SAGAR, UNAM, Oficina Sanitaria Panamericana, Acapulco, Guerrero, México, p. 17.
2. Sada E. 1990. An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30, 000 kDa native antigen of *Mycobacterium*. J Infect Dis; 162 (928).
3. Herman L, y Ridder HD. 1992. Identification of *Brucella* spp. by Using the Polimerase Chain Reaction. Appl Env Microbiol; 58 (2099).
4. Leal-Klevezas DS, López-Merino A, and Martínez-Soriano JP. 1995a. Molecular detection of *Brucella* spp.: rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. Arch Med Res; 26 (263).
5. Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-Merino A, and Martínez-Soriano JP. 1995b. Single Step PCR for the Detection of *Brucella* spp. from Blood and Milk of Infected Animals. J Clin Microbiol; 33 (3087).
6. Martínez-Vázquez IO. 1997. Estudio longitudinal en fluidos, secreciones y exudados de caprinos inoculados, para la detección temprana de *Brucella melitensis*. Fac. de C. Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

7. Wilson SM, Mc Nerney R, Nye PM, Godfrey-Faussett PD, Stoker NG, y Voller A. 1993. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol; 31 (776).
8. Miller JJ, Rhyhan J, Saari D y Suárez D. 1997. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organism. J Vet Diagn Invest; 9 (244).
9. Engels B. 1992. Amplify, for Analyzing PCR Experiments. University of Wisconsin, Madison, WI 53706.
10. Kathleen DM, Eisenach D, Cave y Crawford JT. 1993. PCR Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. En *Diag. Mol. Microbiol. Principles and Applications*. D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White., eds. ASM. Washington, D.C.