

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA IDENTIFICACIÓN DE *Brucella* spp EN BOVINOS DE RAZA "CURRALEIRO PÉ-DURO"

por Freitas, M.S.T.; Romani, F.A.; Moura, M.I.; Duarte, C.S.; Rosinha, S.G.M.; Custódio, S.M.; Juliano, S.R.; Fioravanti, S.M.C. TIPO DE PRESENTACIÓN: Cartel. ÁREA: Enfermedades infecciosas, parasitarias

Introducción

La brucelosis aún es uno de los principales problemas sanitarios del rebaño bovino brasileño. El Programa Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis (PNCEBT) fue instituido por el Ministerio de Agricultura Pecuaria y Desarrollo (MAPA) en 2001, a fin de disminuir el impacto negativo de esas zoonosis en la salud humana y animal. Según el PNCEBT el diagnóstico del rebaño de la brucelosis bovina debe ser obtenido por medio de pruebas serológicas, empleándose como test de selección el antígeno acidificado tamponado (AAT), seguido de confirmación por la combinación de las pruebas de soro-aglutinación lenta (SAL) y del 2-mercaptoetanol (2-ME) (BRASIL, 2006).

De acuerdo con citaciones de MEIRELLES-BARTOLI & MATHIAS (2010) en estudios epidemiológicos de brucelosis en poblaciones bovinas el AAT revela buena sensibilidad, rapidez y simplicidad de ejecución, Sin embargo animales vacunados con muestras B-19 pueden presentar reacciones falso-positivas. Pruebas confirmatorias de mayor especificidad deben ser realizadas para evitar el sacrificio de animales negativos. El 2-ME se caracteriza por su eficacia, no obstante hay posibilidad de resultados falso-negativos y de menor sensibilidad para animales recién-infectados, además de constituirse en un test más laborioso (NIELSEN, 2002).

Técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han mostrado valiosas para detección de ADN, caracterizándose en alternativa promisorias para el diagnóstico de brucelosis. Para MUKHERJEE et al. (2007) PCRs géneros específicos son adecuados y de fácil ejecución para diagnóstico de la brucelosis bovina en muestras de campo. ASAAD & ALQAHTANI (2012) afirmaron que tales métodos son más adecuados para el diagnóstico clínico de casos agudos de la infección, se ha visto que en casos crónicos la carga bacteriana en la corriente sanguínea es baja.

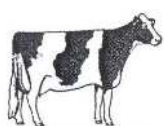
A PCR para pesquisa de *Brucella abortus* ha sido aplicado a diversos especímenes clínicos de bovinos, tales como tejidos, leche, semen y sangre (BRICKER, 2002). O' LEARY et al. (2006) testaron diferentes *primers* para la detección de *Brucella* spp. en muestras sanguíneas de bovinos soro-reactivos y no detectaron el agente en tales condiciones. MUKHERJEE et al. (2007) también emplearon esta técnica en el mismo espécimen clínico y obtuvieron buenos resultados en el diagnóstico de brucelosis en animales con diferentes resultados serológicos. YU & NIELSEN (2010) citaron que a pesar de ser frecuentemente empleadas en la PCR, muestras sanguíneas poseen sustancias inhibitorias que interfieren en los resultados del test y recomiendan el tratamiento a fin de aumentar la sensibilidad de la técnica.

Diversas regiones del genoma de la bacteria han sido empleadas en ensayos de PCR. BAILY et al. (2002) desarrollaron un ensayo para detección de secuencia del gen BCSP31 que codifica proteína antigénica de membrana externa de 31kDa, de función desconocida, conservada en todas las especies del género *Brucella*, con excepción de *Brucella ovis*. BRICKER (2002) afirmó que en varios estudios el ensayo se reveló robusto, sensible y específico. Fueron encontrados resultados falso-positivos apenas para *Ochrobactrum anthropi* biotipo D, que consiste en microorganismo genéticamente relacionado a *Brucella* spp.

Considerando la rapidez y la facilidad de ejecución de la PCR, el objetivo de este estudio fue detectar la infección por *Brucella* spp. en bovinos empleando técnicas serológicas y PCR convencional a fin de verificar la concordancia entre los resultados de estas pruebas.

Material y métodos

Fueron empleadas muestras oriundas de un banco de especímenes clínicos de bovinos, relacionadas a actividades de la Red Pró-Centro Oeste, del proyecto "Caracterización, Conservación y Uso de las Razas Bovinas Locales Brasileñas: "Curraleiro y Pantaneiro". Las muestras de sangre eran provenientes de once rebaños de la raza "Curraleiro



Pé-Duro”, testándose especímenes clínicos de 159 animales.

Para detección de anticuerpos anti-*Brucella abortus* fue realizada la prueba de soro-aglutinación AAT (Instituto de Tecnología de Paraná - Tecpar, Curitiba, Paraná), siguiendo la recomendación de MAPA (BRASIL, 2006). Los sueros reactivos fueron encaminados al órgano oficial, Laboratorio de Análisis y Diagnóstico Veterinario (LABVET), para ser sometidos al test confirmatorio por la combinación de las pruebas de soro-aglutinación lenta y del 2-ME.

Para extraer el ADN total, el material escogido para la realización de la técnica de PCR fue la sangre. Se adoptó el protocolo de extracción desarrollado por ARAÚJO et al. (2009). Después de la extracción, todas las muestras de ADN fueron cuantificadas en espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific®) y sometidas a electroforesis en gel de agarosa 0,8% colorido con *Sybr Safe* (Invitrogen® Life Technologies) para visualización.

En la amplificación de los genes por la PCR, para la investigación de *Brucella* se empleó el par de oligonucleótidos diseñado por BAILY et al. (1992) para amplificación de un producto de aproximadamente 223 pares de bases, que corresponde a una región del gen *BCSP31*, que se mostró conservada en todas las especies de *Brucella* examinadas. Se emplearon los oligonucleótidos B4 (forward): 5' - TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA - 3' e B5 (reverse): 5'- CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG- 3'.

Después de la dilución de las muestras extraídas, estas fueron sometidas a la PCR. La mezcla fue preparada con 12,5 µL de agua ultra pura (Gibco®, Life Technologies), 2 µL de solución tampón de PCR 10x (200 mM Tris-Hcl com pH 8.4 e 500 mM KCl) (Invitrogen®, Life Technologies), 0,6 µL de clorato de magnesio a 1.5 mM (Invitrogen®, Life Technologies), 1 µL de cada oligonucleótidos a 0.25pmol (BCPS31F/BCPS31R para *Brucella sp.*), 0,6 µL de solución de dNTPs (Invitrogen®, Life Technologies) e 0,3 µL de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen®, Life Technologies).

De la mezcla preparada, fue dividida la alícuota de 18µL para cada micro tubo de PCR y adicionado 2µL del producto de la extracción de ADN a 50ng/µL, o 1µL del producto de extracción a 100ng/µL. Para la verificación de ADN de *Brucella spp*, se empleó la cepa S2308 de *Brucella abortus*.

La reacción de PCR para amplificación del fragmento de 223 pares de bases por el *primer* BCPS31 fue realizada en termociclador (Eppendorf mastercycler gradient®) y el protocolo de amplificación consistió en 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificación (94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 45 segundos), después la reacción fue interrumpida a 72°C por 10 minutos y enfriada para 4 °C por tiempo indeterminado, según protocolo descrito por NAVARRO et al. (2002). Las muestras amplificadas fueron guardadas en refrigerador hasta el momento da electroforesis.

En la electroforesis se utilizó gel de agarosa en la concentración de 0,8% para la visualización del fragmento de 223 pares de bases del gen BCPS31 del genero *Brucella*. Se empleó como tampón de corrida el TBE 1X (100mL de Tris-EDTA borato diluido en 900 mL de agua destilada).

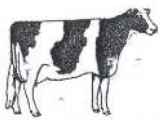
En el gel de agarosa fueron aplicados 10 µL de cada muestra, previamente homogeneizadas con 2 µL de tampón de corrida en cada una. El voltaje medio de la electroforesis fue de 90 voltios. El tampón era preparado en el propio laboratorio a partir de la mezcla de 0.25% de azul de bromo fenol, 0.25% de xileno cianol, 30% de glicerol e 7 mL de agua destilada. Después de la electroforesis, los geles de agarosa fueron sumergidos en la solución conteniendo SYBR® Safe (Life Technologies) y TBE (Tris-EDTA borato), en la proporción de 8 µL del colorante para 400 mL de TBE 1X.

Resultados

De las muestras de los 159 bovinos testados para el diagnóstico de brucelosis bovina, nueve fueron positivos en serología y pruebas, tres también positivos en la PCR. En cuanto a los 150 bovinos que no reaccionaron en la serología, nueve presentaron PCR positivo (Tabla 1).

TABLA 1 – Resultados del test PCR y del test de antígeno acidificado tamponado con confirmación por la combinación de AAT + (SAL+2-ME) para detección de la infección por *Brucella spp* en bovinos de la raza “Curraleiro Pé-Duro”

PCR Brucelosis	AAT + (SAL+2ME)		
	Negativo	Positivo	Total
Negativo	141	6	147
Positivo	9	3	12
Total	150	9	159



Discusión

Al observar los resultados de la PCR para *Brucella* spp. y de las pruebas serológicas se nota pequeña concordancia entre los mismos. En apenas 33,3% (3/9) de los bovinos soro-reactivos fueron obtenidas PCRs positivas. O'LEARY et al. (2006) no consiguieron encontrar la *Brucella* spp. al utilizar la técnica molecular en muestras sanguíneas de bovinos positivos en la serología. Para los autores PCRs negativas en la presencia de respuesta serológica consisten en fato plenamente justificable, pues cuando anticuerpos ya están presentes es probable que la *Brucella* haya dejado la corriente circulatoria o esté en cantidad muy pequeña para ser detectada. Además, cuando se emplea sangre como espécimen clínico, la presencia de grandes cantidades de ADN genómico bovino puede ejercer efecto inhibitorio en la prueba. Todavía se postula que la posible presencia de otros agentes inhibidores también puede haber contribuido para la falla en la detección de *Brucella* spp en bovinos soro-reactivos.

MUKHERJEE et al. (2007) también obtuvieron una concordancia débil, a ejemplo, la encontrada en el presente estudio, entre serología por el ELISA y PCR convencional con los *primers* desarrollados por BAILY et al. (2002). Los autores confirmaron la sensibilidad especificidad de los *primers* en ADN genómico de *Brucella* spp. No obstante, la PCR en sangre de bovinos oriundos de rebaños positivos, no fue hábil en detectar 6,8% (6/87) de las muestras de animales positivos en el ELISA. En este trabajo no fue posible obtener confirmación por la PCR en 66,6% (6/9) de los individuos positivos en la serología.

En el trabajo de MUKHERJEE et al. (2007) fueron detectados 47% (24/51) de animales soro-negativos como positivos en la PCR. En el presente estudio tal hecho ocurrió en 6% de las muestras. Es posible que los bovinos soro-negativos fuesen recién-infectados y aún no presentaran anticuerpos o la PCR sea falso-positivo por consecuencia de reacciones cruzadas con *Ochrobactrum anthropi*. ILHAN et al. (2008) también obtuvieron reacciones de PCR positivas en ovejas soro-negativas. Estos resultados apuntan para la importancia de emplearse más de un tipo de método de diagnóstico para la detección de animales positivos para brucelosis, especialmente con fines epidemiológicos.

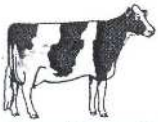
Estudios realizados por AL-AJLAN et al. (2011) y ASAAD & ALQAHTANI (2012) demostraron la eficacia de los *primers* B4 y B5 en la detección de *Brucella* spp en muestras sanguíneas. Sin embargo la falta de estandarización y uniformidad en la PCR está entre los factores que pueden haber llevado la baja concordancia entre los resultados de los métodos aquí empleados. Así se sugiere que sean evaluados tanto el espécimen clínico ideal como el método de extracción en estudios más amplios.

Para YU & NIELSEN (2010) la sensibilidad y especificidad de los ensayos de PCR no están bien establecidas para muestras clínicas. En los estudios analizados son encontrados resultados divergentes, indicando la necesidad de investigaciones para validación y estandarización de los métodos, antes de emplearlos como test diagnóstico de rutina para brucelosis. De esa manera, mientras no sean estandarizados y probados ensayos de PCR en muestras clínicas, estos no deben substituir técnicas serológicas en estudios epidemiológicos. No obstante, se sugiere que el empleo conjunto de tales métodos pueda aumentar las chances de suceso y la confiabilidad del diagnóstico, después del mejoramiento y la validación de la PCR.

La concordancia de los resultados obtenidos por la PCR en muestras sanguíneas y por la serología para identificación de la infección por *Brucella* spp. Fue débil, lo que refuerza la necesidad de validación de la PCR teniendo en vista que el diagnóstico es más confiable cuando es obtenido por medio de varios métodos.

Literatura citada

1. AL-AJLAN H.H.; IBRAHIM, A.S.; AL-SALAMAH, A. A. Comparison of different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, p. 27-33, 2011.
2. ARAÚJO, F. R.; RAMOS, C. A. N.; LUÍZ, H. L.; SCHABIB, I. A. H.; MARÇAL, R. H.; OLIVEIRA, I. I. F. S.; RUSSI, L. S. Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. *Comunicado técnico 120, Campo Grande: Embrapa Gado de Corte*. p. 1-5, 2009.
3. ASSAD, A. M.; ALQAHTANI, J. M. Serological and molecular diagnosis of human brucellosis in Najran, Southwestern Saudi Arabia. *Journal of Infection and Public Health*, v. 5, p. 189-194, 2012.
4. BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S.; STOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. London. v.95, p.271-275, 2002.
5. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal, 2006. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico**. Brasília: MAPA / DAS / DSA, 2006, 188p.
6. BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 435-446, 2002.
7. ILHAN, Z.; AKSAKAL, A.; EKIN, I. H.; GULHAN, T; SOLMAZ, H.; ERDENLIG, S. Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, p. 301–306, 2008.
8. MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; MATHIAS, L. A. Estudo comparativo entre os testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 1, p.



- 11-17, 2010.
9. MUKHERJEE, F.; JAIN, J.; PATEL, V.; NAIR, M. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. **Journal of Medical Microbiology**. Edinburgh, v.56, p. 1309-1316, 2007.
 10. NAVARRO, E.; ESCRIBANO, J.; FERNÁNDEZ, J. A.; SOLERA, J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.34, n. 2, p. 147-151, 2002
 11. NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by sorology. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.90, p.447-459, apr. 2002.
 12. O'LEARY, S.; SHEAHAN, M.; SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. **Research in Veterinary Science**, London, v. 81, p.70-176, 2006.
 13. STODDARD, R. A.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P.; CAUSTLAND, K. M.; HOFFMASTER, A. R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**.v. 64, p. 247-255, 2009.
 14. YU, W. L.; NIELSEN, K. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. **Croatian Medicine Journal**. v.51, p. 306-313, 2010.