



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE GUAYAQUIL

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DE *BRUCELLA SPP.* MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN DE BRUCELOSIS

*Trabajo de titulación previo a la obtención del título
de Ingeniera en Biotecnología*

AUTORA:

MEI LI CRISTINA CUMBE WANG

TUTORA:

M^sC. ROSA MARCELA VEGA VILLACIS

GUAYAQUIL – ECUADOR

2025

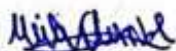
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

**Yo, Mei Li Cristina Cumbe Wang con documento de identificación N° 0924234321
manifiesto que:**

**Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la
Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera
total o parcial el presente trabajo de titulación.**

Guayaquil, 31 de enero del año 2025

Atentamente,



Mei Li Cristina Cumbe Wang

C.I.: 0924234321

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, **Mei Li Cristina Cumbe Wang** con documento de identificación No 0924234321, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo experimental: **IDENTIFICACIÓN DE BRUCELLA SPP. MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN DE BRUCELOSIS**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero/a en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 31 de enero del año 2025

Atentamente,



Mei Li Cristina Cumbe Wang

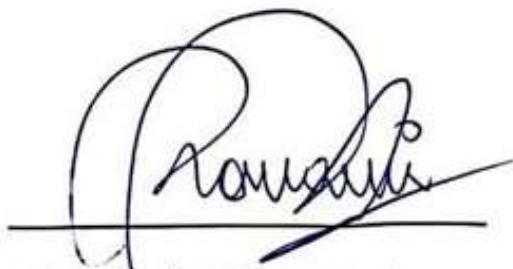
C.I.: 0924234321

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Rosa Marcela Vega Villacis** con documento de identificación N° 0603452566, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **IDENTIFICACIÓN DE BRUCELLA SPP. MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN DE BRUCELOSIS**, realizado por **Mei Li Cristina Cumbe Wang** con documento de identificación N° 0924234321, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 31 de enero del año 2025

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rosa Villacis', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Rosa Marcela Vega Villacis

CI: 060345256-6

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Naomi Daniela Mora Jaramillo con documento de identificación N° 0927529990 Analista de Laboratorio y Solón Alberto Orlando Narvárez con documento de identidad N° 1308496007 Investigador Auxiliar 1 del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – INSPI – “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez”, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **IDENTIFICACIÓN DE BRUCELLA SP. MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN DE BRUCELOSIS**, realizado por Mei Li Cristina Cumbe Wang con documento de identificación N° 0924234321, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 30 de enero del año 2025

Atentamente,



Naomi Daniela Mora Jaramillo

CI: 0927529990

Analista de Laboratorio



Solón Alberto Orlando Narvárez

C.I: 1308496007

Investigador Auxiliar 1

Agradecimiento

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana por brindarme la oportunidad de realizar el desarrollo de integración curricular y apoyarme durante todo el proceso de mi carrera profesional.

Agradezco al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – INSPI – “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez” por abrirme las puertas hacia esta nueva oportunidad de realizar la parte experimental de mi proyecto de tesis.

A la Ingeniera Naomi Daniela Mora Jaramillo y al Dr. Solón Alberto Orlando Narvaez por ser ese apoyo incondicional en cada etapa en el desarrollo, y apoyarme en el financiamiento de este proyecto investigativo.

A la Ingeniera Rosa Marcela Vega Villacis, por ser una tutora excepcional durante el proceso de redacción y ser un soporte, guía y brindarme sus recomendaciones para un adecuado trabajo de investigación.

A mis padres, por ser ese apoyo incondicional en cada etapa de mi etapa estudiantil y brindarme su amor profundo para poder alcanzar todas las metas que me propongo y ser esa motivación que me aportan día tras día.

Resumen

La brucelosis es una enfermedad zoonótica causada por una bacteria Gram negativa intracelular llamada *Brucella spp.* Es causante de la brucelosis, enfermedad que afecta a seres humanos y animales como vacas, cerdos, perros, gatos, ovejas, entre otros. Esta enfermedad se transmite por medio del contacto directo con animales infectados o mediante el consumo de sus carnes o derivados de la leche. Es por esta razón, que es esencial la detección rápida y temprana de la bacteria para evitar una epidemia. Entre los principales métodos de detección tenemos a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final, caracterizada por su alta especificidad y sensibilidad. En este trabajo de investigación, se desarrolló un protocolo para el análisis por PCR en punto final. El trabajo práctico fue realizado en el Centro Multidisciplinario de Investigación, del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – INSPI – “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez”. Con este protocolo, se analizaron 30 muestras de sangre bovina colectadas de la provincia de Manabí. Los productos de la amplificación por PCR de punto final se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Como primer control positivo, se utilizó una vacuna comercial de cepa 19, que presentó una concentración de 11 ng/uL, obteniendo una amplificación para *Brucella melitensis* (151 pb). Se emplearon, adicionalmente, un segundo control positivo a partir de un concentrado de cultivo de *Brucella*, propiedad del INSPI, con concentración de 243 ng/uL; así también, un tercer control positivo, la vacuna comercial Bovilis RB-51, con una concentración de 19 ng/uL. Estos últimos, presentaron productos de amplificación para dos especies: *B. abortus* (248 pb) y *B. melitensis* (151 pb). Se realizó la identificación semi-cuantitativa de la sensibilidad del protocolo, a través de diluciones seriadas por duplicado del segundo control positivo. Se identificó que la sensibilidad mínima fue de 0,03 ng/uL con fragmento observable en gel de agarosa de 248 pb y 151 pb. En tanto, las muestras de bovinos no presentaron amplificación para ninguno de los agentes causales de brucelosis identificados.

Palabras clave: PCR, electroforesis en gel de agarosa, Brucelosis, *Brucella spp.*, *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*,

Abstract

Brucellosis is a zoonotic disease caused by an intracellular Gram-negative bacterium called *Brucella spp.* It causes brucellosis, a disease that affects humans and animals such as cows, pigs, dogs, cats, sheep, among others. This disease is transmitted through direct contact with infected animals or through the consumption of their meat or milk derivatives. For this reason, rapid and early detection of the bacteria is essential to avoid an epidemic. Among the main detection methods we have the end-point polymerase chain reaction (PCR), characterized by its high specificity and sensitivity. In this research work, a protocol for end-point PCR analysis was developed. The practical work was carried out at the Multidisciplinary Research Center of the National Institute for Public Health Research – INSPI – “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez”. With this protocol, 30 bovine blood samples collected from the province of Manabí were analyzed. The end-point PCR amplification products were visualized by 2% agarose gel electrophoresis. As a first positive control, a commercial vaccine strain 19 was used, which had a concentration of 11 ng/uL, obtaining an amplification for *Brucella melitensis* (151 bp). In addition, a second positive control was used from a *Brucella* culture concentrate, property of INSPI, with a concentration of 243 ng/uL; as well as a third positive control, the commercial vaccine Bovilis RB-51, with a concentration of 19 ng/uL. The latter presented amplification products for two species: *B. abortus* (248 bp) and *B. melitensis* (151 bp). The semi-quantitative identification of the protocol sensitivity was performed through serial duplicate dilutions of the second positive control. The minimum sensitivity was identified as 0.03 ng/uL with observable fragments in agarose gel of 248 bp and 151 bp. Meanwhile, the bovine samples did not present amplification for any of the identified causal agents of brucellosis.

Keywords: PCR, agarose gel electrophoresis, Brucellosis, *Brucella spp.*, *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*.

Índice de contenido

Capítulo 1	1
1. Antecedentes	1
1.1 Introducción	1
1.2 Planteamiento del problema	2
1.3 Justificación	3
1.4 Objetivos	5
1.4.1 Objetivo General	5
1.4.2 Objetivos Específicos	5
1.5 Hipótesis	5
Capítulo 2	6
2. Marco Teórico	6
2.1 Distribución geográfica	6
2.2 Características generales <i>Brucella sp</i>	7
2.3 Taxonomía de <i>Brucella sp.</i>	7
2.4 Ciclo biológico de <i>Brucella</i>	9
2.5 Patogénesis	9
2.6 Signo clínico	12
2.7 Métodos tradicionales	12
2.8 Pruebas moleculares o no tradicionales	15
2.9 Ventajas y desventajas de las pruebas moleculares vs. Pruebas tradicionales	17
Capítulo 3	19
3. Materiales y Metodología	19
3.1. Identificación de las secuencias dianas	19
3.2 Selección de cebadores	19
3.3 Obtención y evaluación inicial del protocolo aplicado con controles positivos	20
3.4 Obtención de muestras biológicas y controles positivos	21
3.5. Condiciones de amplificación de la PCR	22
3.6 Visualización de fragmentos en gel de agarosa	23
Capítulo 4	25
4. Resultados y discusión	25
4.1. Resultados.	25
4.1.1 Identificación de secuencias dianas	25
4.1.2 Cuantificación del ADN de los controles positivos	26

4.1.3. Ensayo de las condiciones de la PCR y prueba con muestras biológicas y controles positivos	27
4.1.4. Evaluación semi – cuantitativa de la sensibilidad	29
4.1.5. Curva estándar del control positivo.....	31
4.2 Discusión.....	32
Capítulo 5.....	35
5.1 Conclusiones	35
5.1.2 Identificación de secuencias dianas.....	35
5.1.3 Evaluación del plásmido de ADN de los controles.....	35
5.1.4 Optimización de las condiciones de los controles y muestras biológicas	35
5.2 Recomendaciones	36
Referencias Bibliográficas	37
Anexos.....	41

Abreviaturas

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BCV	Células virulentas de <i>Brucella</i>
eBCV	Endocitosoma de <i>Brucella</i> en etapa temprana
EEA1	Antígeno endosoma temprano 1
Rab5	Proteína de unión al GTP
LAMP-1	Proteína asociada a lisosoma 1
virB	Forma parte de la infección de bacterias y se conforma de varios marcos de lectura abiertos (ORFs)
RE	Retículo endoplasmático
Rab7	Pequeña proteína GTPasa
T4SS	Sistema de secreción tipo IV
ULK1	Serina/treonina proteína quinasa que forma parte del completo Atg/ULK
Atg14	Regulador de autofagia
IRE1 α – UPR	Quinasa de serina/treonina que forma parte de la membrana del retículo endoplasmático
LPS	Lipopolisacáridos o endotoxinas
Beclin-1	Proteína que se desempeña en los procesos celulares
IgM	Inmunoglobulinas M
dNTPs	Trifosfatos de desoxinucleótidos
aBCV	Autofagia de la BCV

Índice de tablas

<i>Tabla 1: Clasificación taxonómica de brucelosis</i>	<i>8</i>
<i>Tabla 2: Regiones prevalecientes de Brucelosis en Ecuador</i>	<i>8</i>
<i>Tabla 3: Componentes en la reacción en cadena de la polimerasa</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 4: Rampas de amplificación</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 5. Cebadores seleccionados en el estudio.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 6. Concentraciones de los conrtroles positivos</i>	<i>31</i>

Índice de imágenes

Imagen 1. Proceso fisiológico de Brucella spp.....	10
Imagen 2. Transporte intracelular de Brucella en macrófagos	11
Imagen 3. Tinción Ziehl-Neelsen de Brucella.....	12
Imagen 4. Metodología fase 1.....	21
Imagen 5. Metodología fase 2.....	23
Imagen 6. Secuencias dianas evaluadas previamente.....	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 7. Especificidad y sensibilidad.....	45
Imagen 8. Visualización de controles en gel de agarosa al 2%	26
Imagen 9. Primera ronda de muestras con el control positivo 1	27
Imagen 10. Segunda ronda de muestras con el control positivo 2	29
Imagen 11. Comparación de los controles positivos 2 con diferentes concentraciones	30

Índice de Anexos

<i>Anexos 1. Equipos empleados en el proceso experimental de la extracción de ADN y PCR ...</i>	<i>41</i>
<i>Anexos 2. Reactivos empleados en el proceso experimental de la extracción de ADN y PCR .</i>	<i>41</i>
<i>Anexos 3. Termociclador</i>	<i>42</i>
<i>Anexos 4. Vacuna Brucelosis cepa 19.....</i>	<i>42</i>
<i>Anexos 5. Vacuna Bovilis RB-51.....</i>	<i>43</i>
<i>Anexos 6. Mini Fluorómetro Ultrasensible</i>	<i>43</i>
<i>Anexos 7. Sistema de electroforesis.....</i>	<i>44</i>

Capítulo 1

1. Antecedentes

1.1 Introducción

La brucelosis es una de las enfermedades zoonóticas más relevantes mundialmente afectando a los mamíferos incluso perjudicando la salud de los seres humanos. Esta enfermedad es dada por una bacteria intracelular Gram negativa llamada *Brucella* (Emmanouil y otros 2024). De acuerdo con la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) la enfermedad es transmitible hacia seres humanos y animales por contacto directo y mencionada como una enfermedad bacteriana que afecta a los animales (Rahimoon y otros, 2024). Existe una gran variedad de especies con diferentes hospederos como la *B.abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. suis*, *B. neotomae*, entre otros, que perjudican a los animales terrestres, mientras que la *Brucella ceti* y *Brucella pinnipedialis* afectan a los animales marinos (Carolina Elías y otros, 2024).

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos es una técnica que abarca la sensibilidad y especificidad para un diagnóstico eficaz en la identificación de una enfermedad, entre las cuales una de ellas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha tenido una evolución progresiva en la amplificación con dianas específicas de *Brucella* desde la amplificación tradicional con electroforesis en gel de agarosa hasta la más avanzada con la PCR en tiempo real (Yagupsky y otros, 2019).

La detección rápida y eficaz de la bacteria *Brucella* es esencial para el control y la prevención de brotes de la enfermedad de Brucelosis, por esta razón la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha manifestado con una herramienta esencial en el diagnóstico de esta

enfermedad debido a su elevado nivel de sensibilidad y especificidad, también por su beneficio de identificar microorganismos en etapa inicial en el proceso de una infección (Behroozikhah y otros, 2022).

En el capítulo 1 se describe el problema de estudio y los objetivos que enmarcan este trabajo. En el capítulo 2 se brinda al lector a detalle sobre las características de la *Brucella*, su ciclo biológico, la patogenicidad, y los métodos de detección tanto tradicionales como no tradicionales. Aquí se hace énfasis en la importancia de la técnica molecular que es objeto del presente trabajo de investigación. En el capítulo 3 se hace el abordaje metodológico del protocolo desarrollado. En el capítulo 4 se presentan los resultados obtenidos. En el capítulo 5

1.2 Planteamiento del problema

La brucelosis se ha descrito como una de las enfermedades bacterianas más importantes a nivel nacional y a nivel mundial, por lo que afecta no solo en el ámbito ganadero (vacas, cabras, ovejas, cerdos) sino también ocasiona graves daños en la salud de los seres humanos (Kurmanov y otros, 2022). Esta bacteria es transmitida a los seres humanos mediante el consumo de sus derivados lácteos como el de sus carnes contaminadas con el patógeno, por lo que es de vital importancia establecer un protocolo estandarizado para la detección de la brucelosis (Andrade Guzmán y otros, 2023). Durante la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico se encuentra la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *Brucella sp.*, por lo que el presente trabajo busca la estandarización de un protocolo, con empleo de herramientas moleculares, para la identificación de esta bacteria para una detección rápida y eficaz realizada a nivel nacional (Behroozikhah y otros, 2022)

1.3 Justificación

La brucelosis es una enfermedad zoonótica que afecta tanto a los animales como a los seres humanos, por lo que es imprescindible realizar diversos estudios acerca de su detección. Para ello, esta investigación busca validar un protocolo diagnóstico molecular lo cual se deberá llevar a cabo bajo los estándares de calidad y regulación nacional. (Álvarez-Hernández y otros, 2015). Mundialmente, se ha dado esta enfermedad en diversas regiones como África, Asia, el Mediterráneo, América Central y Latinoamérica, causando anualmente 500,000 afectados es por esta razón que la brucelosis se la ha considerado como una enfermedad zoonótica de alto grado de importancia (Moreno, 2023). De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OMS) describe que en Latinoamérica en el 2024 se presencia alrededor de 5,000 a 48,000 casos de brucelosis (OPS, 2024) y con un índice de prevalencia aproximadamente entre 0.5 – 10%, pero dependiendo del país puede variar este índice como en Uruguay con un 0,04%, en Argentina 2.10%, en Bolivia con un 2.27%, Paraguay con un 3.15% de brucelosis (Salazar Abramonte, 2020). En Ecuador, según la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (ARCFZ) se han descrito 95 casos positivos en el ganado bovino solo durante el mes de junio del presente año a lo largo del país (Vaca Granja, 2024). De acuerdo con Ibarra y otros (2023) menciona que anualmente existen pérdidas de terneros y muerte neonatal con un costo de alrededor 79'170,00 dólares americanos por lo que para ello se realizan exámenes y tratamientos de dichos animales abortados con un costo de 20.000,00 dólares americanos al año.

Existen diversas pruebas tradicionales en la detección de brucelosis como la prueba de rosa de bengala, la prueba de aglutinación, la prueba de Coombs, el ensayo de inmunoadsorción ligada a la enzima (ELISA), cultivos bacteriológicos (Helmy et al., 2025). Sin embargo, para

una mayor precisión en sus resultados, superando las pruebas inmunológicas o microbiológicas, existe el desarrollo de las pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del ADN de *Brucella sp.*, que puede ser: PCR en tiempo real, PCR transcriptasa inversa, PCR punto final (Carolina Elías et al., 2024)

Se han desarrollado pruebas de PCR multiplex para la identificación específica de especies, como la aplicación de la prueba AMOS (Abortus, Melitensis, Ovis, Suis) PCR para la identificación de cuatro especies de *Brucella*, las cuales son *B. Abortus*, *B. Melitensis*, *B. Ovis*, *B. Suis* (Yagupsky et al., 2019).

En la actualidad realizar este tipo de análisis varía dependiendo del tipo de examen que se requiere, por ejemplo, en Agrocalidad se realizan pruebas en PCR en tiempo real, Rosa de Bengala, y PCR de múltiples especies, su precio oscila entre \$24.07, \$2.33, \$9.26 respectivamente (Agrocalidad, 2023).

El investigar e informar de manera exhaustiva las diversas formas de abordar y solucionar la brucelosis, se ha vuelto una obligación por el impacto en la salud de los animales, y su relación directa en la seguridad alimentaria de las poblaciones que dependen de estos animales para su sustento (Salud, 2023). Al abordar esta cuestión, el objetivo no es solo mejorar la salud de los seres humanos y los animales, sino también, promover un desarrollo sostenible en el sector agrícola y reforzar la seguridad alimentaria en la región. Así, la inversión en este tipo de investigaciones se convierte en un paso fundamental hacia un futuro más seguro y saludable para todos (Salud, 2023).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Identificar la bacteria *Brucella spp.* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras animales con la finalidad de mejorar el diagnóstico y prevención de la brucelosis.

1.4.2 Objetivos Específicos

- 1) Identificar las secuencias genéticas diana para la detección de *Brucella sp.* mediante PCR.
- 2) Optimizar las condiciones de la amplificación de la PCR (temperatura de termociclado, número de ciclos, concentración de magnesio) para obtener una mayor sensibilidad y especificidad.
- 3) Determinar la sensibilidad de la prueba desarrollada.

1.5 Hipótesis

H₀: No se detecta ADN de *Brucella spp.* en las muestras analizadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

H₁: Se detecta ADN de *Brucella spp.* en las muestras analizadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Capítulo 2

2. Marco Teórico

2.1 Distribución geográfica

Los diversos estudios realizados al pasar del tiempo han permitido la creación de diagnósticos más precisos y la implementación de medidas eficaces para controlar la enfermedad. En particular, la necesidad de innovar en los métodos de detección ha cobrado relevancia en respuesta a diversos factores que han influido en la epidemiología de la brucelosis (Behroozikhah y otros, 2022). En el 2023 la Revista La Granja se mencionó que se tiene conocimiento de 12 especies de *Brucella* las cuales son *B. melitensis* afectando a algunos animales como cabras y seres humanos, *B. suis* afectando a los cerdos, *B. canis* infectando a los perros, *B. ovis* afectando a las ovejas, *B. neotomae* afectando a las ratas y dos especies que fueron aisladas de animales marino *B. pinnipedialis* y *B. ceti*, *B. microti* fue identificado en animales como el jabalí y topillo, *B. papionis* en el babuino, *B. vulpis* en los zorros rojos, y finalmente la *B. inopatia* se ha observado en seres humanos aunque aún no se la ha encontrado en animales, además de ello la *B. abortus* también ha sido encontrada en seres humanos (Andrade Guzmán y otros, 2023).

A nivel mundial la brucelosis se da con más frecuencia en países del Mediterráneo, África, Asia Central y Latinoamérica con 500.000 afectados por año por lo que se lo considera una enfermedad zoonótica con un elevado grado de importancia (Moreno, 2023). En Latinoamérica el índice de prevalencia es de 0.5 – 10% y dependiendo del país varía, en Uruguay es de 0,04%, en Chile de 0,2%, en Argentina 2.10%, en Bolivia 2.27% y en Paraguay 3.15% nivel de brucelosis (Salazar Abramonte, 2020). En Ecuador, de acuerdo con la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario se observaron 95 casos positivos en el ganado bovino durante el mes de junio del año

2024, entre ellos se encontraban las provincias de Manabí, Zamora Chinchipe, Pichincha, Cotopaxi, Los Ríos, Azuay, entre otros (Vaca Granja, 2024).

2.2 Características generales *Brucella sp*

El agente patogénico de la brucelosis son unos pequeños cocobacilos aerobios Gram negativos provenientes del género *Brucella*, estas bacterias se identifican por ser parásitos intracelulares que no poseen flagelos, ni cápsulas, ni endosporas, ni plásmidos y se multiplican en el interior de las células monocito – macrófagos (Kurmanov et al., 2022). De manera fenotípica la *Brucella* se puede fraccionar en lisas y rugosas y esto dependerá de su estructura lipopolisacárida (LPS), una membrana externa que es uno de los principales componentes de estas bacterias Gram negativas. (Kurmanov et al., 2022). Hasta el momento se han registrado 13 diversas especies filogenéticas de *Brucella*, siendo las siguientes especies *b. abortus*, *b. melitensis* y *b. suis* las más comunes causas en la brucelosis humana (Emmanouil y otros, 2024).

2.3 Taxonomía de *Brucella sp.*

El género *Brucella* presenta un elevado grado de patogenicidad y establece como agente causal de la brucelosis, enfermedad que ha causado una gran incidencia de forma negativa en la salud de los seres humanos y en los animales, por lo cual causa pérdidas económicas (De la Puente López y otros, 2020). Uno de los géneros que se encuentra más cercanos en el árbol filogenético al género *Brucella* es el género *Ochrobactrum* debido a que posee el 97% de igualdad en sus secuencias dado que son fundamentales para la identificación y diagnóstico de la infección (Yagupsky et al., 2019). De acuerdo con la clasificación (Tabla 1) de la bacteria se puede visualizar la taxonomía de *Brucella*.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de brucelosis

Familia	<i>Brucellaceae</i>
Orden	<i>Rhizobiales</i>
Clase	<i>Alphaproteobacteria</i>
Género	<i>Brucella</i>
Especies	<i>B. Abortus, B. suis, B. canis, B. melitensis, B. ovis, B. neotomae, B. pinnipedialis, B. papionis</i>

Fuente: (Castillo Iglesias, 2023)

De acuerdo con Lastra Cabezas (2023) mencionó que se realizaron diversas encuestas a lo largo del país con el objetivo de registrar la prevalencia de cada región en el Ecuador, por esa razón observamos la siguiente también junto a sus porcentajes por región y su metodología de diagnóstico.

Tabla 2: Regiones prevalecientes de Brucelosis en Ecuador

Región	Provincias	Prevalencia	Diagnostico
Costa	Esmeralda, Manabí, Santa Elena, El Oro, Los Ríos, Santo Domingo de los Tsáchilas	4.2 – 10.62 % (Alta)	Rosa de Bengala (RB) Ensayo de Inmunoadsorción ligado a la enzima (ELISA)
	Imbabura, Carchi, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Pichincha.	1.97 – 10.62% (Alta)	Rosa de Bengala (RB) Ensayo de Inmunoadsorción ligado a la enzima (ELISA)

Fuente: (Lastra Cabezas, 2023)

2.4 Ciclo biológico de *Brucella*

Una de las esenciales vías de transmisión de *Brucella* en los animales es a través de la placenta, los líquidos fetales y los fluidos vaginales evacuados de la hembra que ha sido infectada, dado por un aborto o meses posterior al parto o aborto (Carolina Elías et al., 2024). Cuando la bacteria se introduce en el organismo las células que son capaces de liberarse del sistema inmunitario son capaces de viajar hasta los ganglios linfáticos de la parte posterior (cabeza) y la parte superior media (cuello) por lo que su vía de ingreso es oral – digestiva (Carolina Elías et al., 2024). El ciclo biológico de la brucelosis se da en diversas etapas:

La infección de esta enfermedad se da por la biodiversidad de *Brucella*, cuando el animal consume pasto, agua, o alguno otro alimento que este contaminado con las excreciones o fluidos vaginales de los animales infectados con la bacteria, incluso por la mala manipulación de embriones (Xiao et al., 2022). Después de que la bacteria es diseminada por todo el organismo del animal, estas bacterias se ubican de forma extracelular que son expuestas ante los mecanismos de defensa del hospedador por lo que son capturas y exterminadas por el mismo sistema inmune, el periodo de incubación oscila entre 5 días a 2 semanas, entre sus síntomas se encuentra dolor articular, cefalea, escalofríos, malestar, fiebre intermitente de 1 a 5 semanas aproximadamente (Bush & Vazquez-Pertejo, 2024).

2.5 Patogénesis

El contagio por células del género *Brucella* es un proceso fisiológico bastante extenso (**Imagen 1**) en la que las células con factor de virulencia son albergadas para generarse células virulentas con *Brucella* adquiriendo marcadores tempranos como EEA1/Rab5 para posteriormente obtener proteínas lisosomales endosómicas tardías como LAMP-1/ Rab7, la BCV requiere de un sistema de secreción llamado T4SS virB para llegar al retículo endoplasmático (RE), una vez que la célula

virulenta de *Brucella* (BCV) interactúa con los lisosomas se replican en el Retículo Endoplasmático (RE) y luego se relacionan con las proteínas (ULK1, Atg14, IRE1 α – UPR) que están interactuando con la autofagia del huésped en donde la principal fuente de carbono de *Brucella* es el eritritol, dando a cabo la excreción de la bacteria y llevando a cabo un nuevo inicio del ciclo de replicación en las células del animal recién nacido (Xiao et al., 2022).

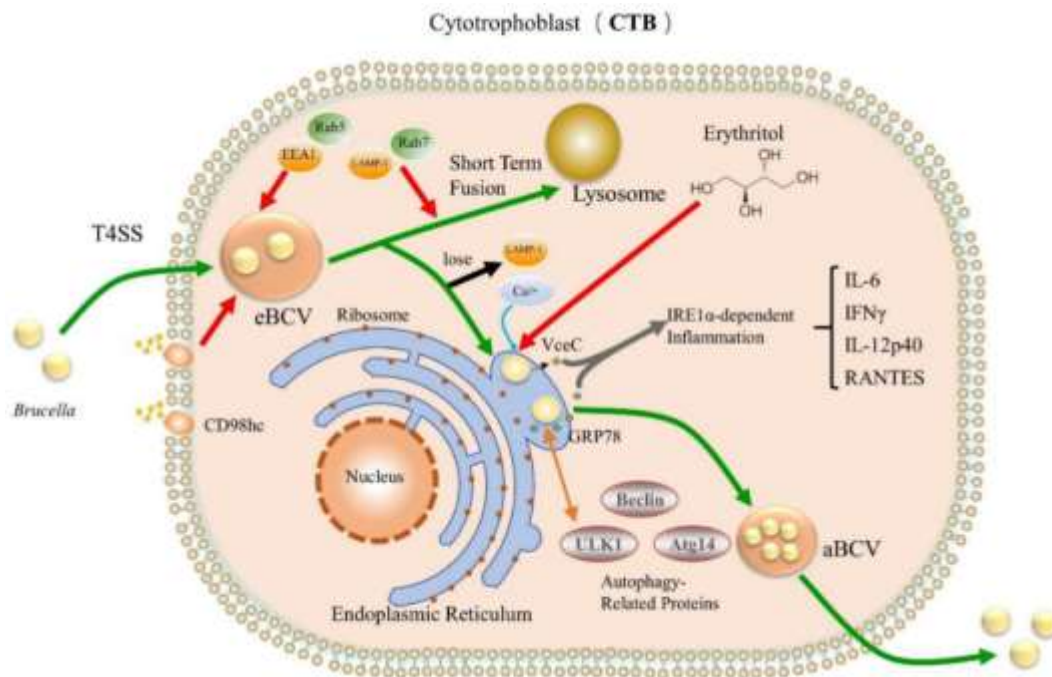


Imagen 1. Proceso fisiológico de *Brucella* spp. Fuente: Obtenido de (Xiao et al., 2022)

Leyenda de la imagen: Las flechas verdes en la imagen muestran la vía de infección de brucella, las rojas adsorción, obtención o captura, las flechas anaranjadas muestran las interacciones, las flechas azules muestran uniones y las flechas negras nos muestran eliminación o pérdida.

En la **Imagen 2** se puede observar que el lisosoma interactúa con la endocitosoma de *Brucella* (eBCV) y activa la transcripción de proteínas efectoras del T4SS. Estas proteínas efectoras facilitan el transporte de la eBCV hacia los sitios de salida del retículo endoplásmico (ER), donde la vacuola interactúa con la superficie de las regiones de salida del ER (ERES), adquiriendo sus características

estructurales y funcionales para transformarse en compartimento de replicación derivado del ER (rBCV). Las proteínas clave de la autofagia, como ULK1, ATG14L y Beclin-1, juegan un rol fundamental en la formación de la autofagia de BCV (aBCV), lo que finalmente permite la liberación del patógeno fuera de la célula. El mecanismo de entrada de las variantes rugosas de LPS de *Brucella* en las células aún no se comprende completamente; sin embargo, una vez dentro, *Brucella* es degradada por fagocitosis lisosomal. En la ilustración podemos observar las flechas simples indican el flujo de los procesos intracelulares de *Brucella*, mientras que las flechas dobles representan las interacciones dentro de este ciclo.

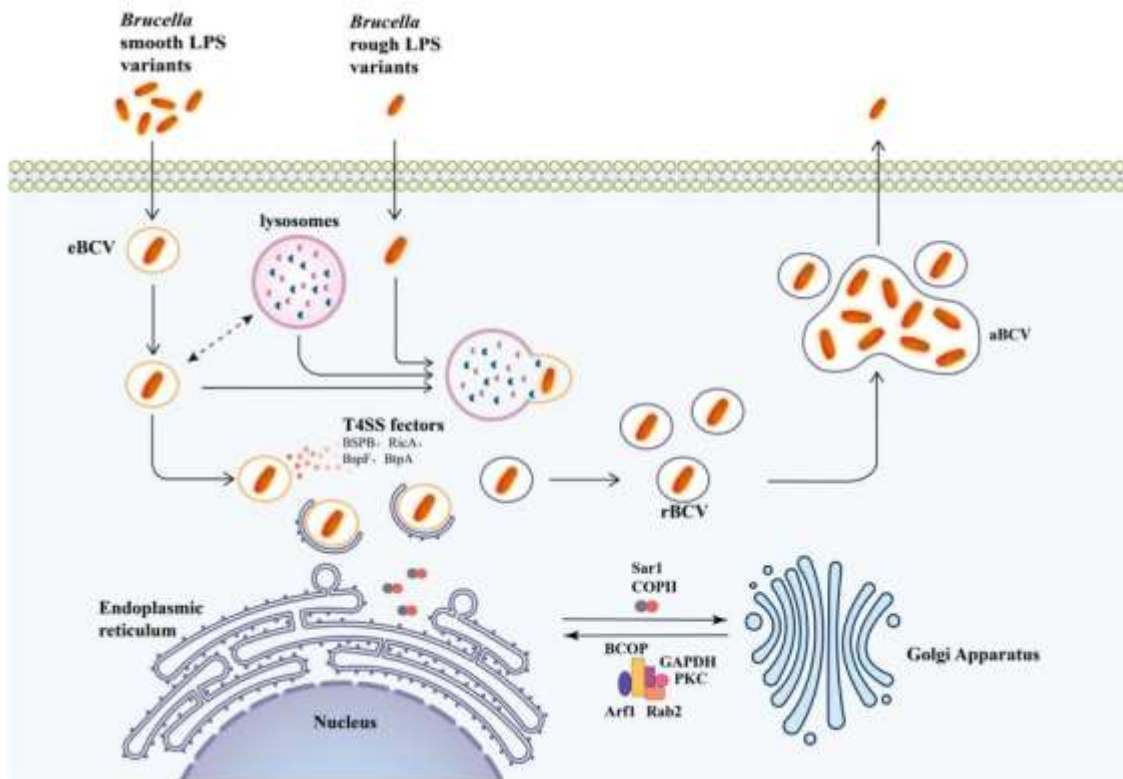


Imagen 2. Transporte intracelular de *Brucella* en macrófagos Fuente: Obtenido de Guo et al., (2023)

2.6 Signo clínico

En el momento en el que exista un indicio de aborto u orquitis en el ganado es cualquier sospecha para la enfermedad de brucelosis dado sus antecedentes, es por ello por lo que es vital realizar los debidos estudios de laboratorio para su diagnóstico, para ello existen diversas pruebas tradicionales y no tradicionales (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022).

2.7 Métodos tradicionales

2.7.1 Métodos de tinción

El género *Brucella* es una bacteria cocobacilo Gram negativo por ende son resistentes a cambios de color en presencia de ácidos débiles, por este motivo la tinción Ziehl-Neelsen es eficaz y se resultado se tiñe de un color rojo y en presencia de calor posee un fondo azulado como podemos observar en la Imagen 3 (Kurmanov et al., 2022).

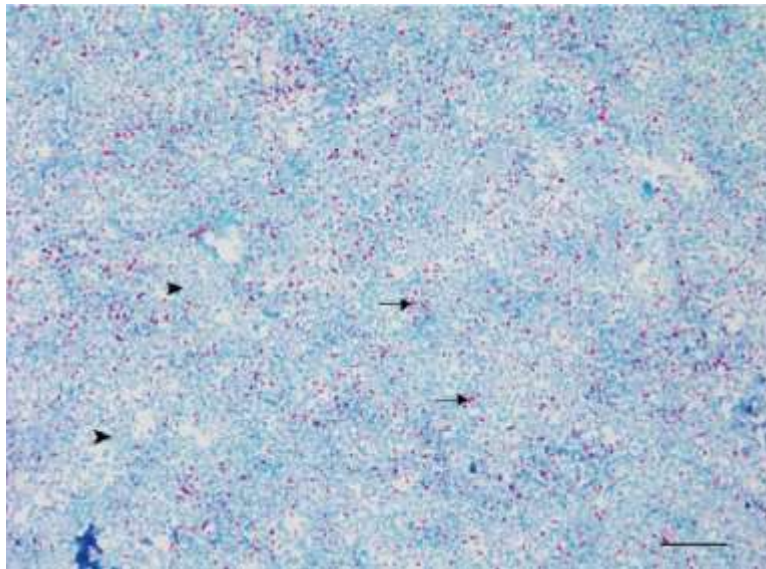


Imagen 3. Tinción Ziehl-Neelsen de *Brucella* Fuente: Obtenido de Egloff et al., (2018).

Leyenda de la imagen: Tinción de Ziehl-Neelsen de muestra de tejido de perro (*B. canis*)

2.7.2 Cultivo de muestras

Para la confirmación de la brucelosis, el aislamiento bacteriológico es fundamental para su detección de la enfermedad para ello se tienen diferentes tipos de medios de cultivo para realizar la identificación de *Brucella* (Kurmanov et al., 2022).

2.7.3 Medios basales

El aislamiento de *Brucella* por lo general se da en un medio sólido, por lo que es un método apropiado, es claro que se aplican diversos medios de cultivo por lo que limitan el crecimiento de otros agentes patógenos, para ello se requiere de la aplicación de 2-5% del suero del animal en el medio de cultivo, como el agar triptosa/ tripticasa soja (TSA), el agar suero dextrosa (SDA) o el agar glicerol dextrosa, por lo general el medio SDA suele utilizarse para la identificación morfológica de la bacteria (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022).

2.7.4 Medios selectivos

Para la preparación de un medio selectivo es recomendable utilizar los medios basales descritos anteriormente con la adición de antibióticos adecuados para limitar el crecimiento de agentes externos a *Brucella*, un ejemplo de ello es el de Farrell modificado que contiene sulfato de polimixina B, bacitracina, natamicina, ácido nalidíxico, y nistacina liofilizado, pero debido a que el ácido nalidíxico y bacitracina inhiben el crecimiento de cepas de *B. abortus*, *B. melitensis*, y *B. suis* se recomienda usar de forma alternada este y el Thayer-Martin modificado (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022).

2.7.4 Método de hemocultivo

De acuerdo con la Sociedad de Microbiología Americana y la Organización Mundial de la Salud recomienda que el periodo de incubación en hemocultivo de cuatro semanas y posterior a eso

realizar un subcultivo de ello, por lo que este método tiene un elevado costo y requiere bastante tiempo, por ende retrasa el diagnóstico del paciente a tratar, la sensibilidad de este método será calculado mediante una pequeña fracción del vial con un periodo de incubación de 5 a 7 días adicionales (Yagupsky et al., 2019).

2.7.5 Rosa de bengala

La prueba de rosa de bengala está basada en la aglutinación mediante los anticuerpos si se encuentra en estado positiva, uno de sus beneficios es que la prueba es rápida y accesible para el laboratorio, en donde se añaden la muestra a analizar en cajas Petri o en una placa de 96 pocillos junto a su antígeno de la cepa de *Brucella abortus* con una concentración de 8%, por esta razón se la considera una de las pruebas más rápidas y económicas en su detección (Castillo Iglesias, 2023).

2.7.6 Prueba de 2-mercaptoetanol

Esta prueba es similar a la prueba de aglutinación con la diferencia que se le añade 2-mercapto etanol (2-ME) a la muestra junto a solución salina, esta reacción al poseer un agente reductor realiza una ruptura en los enlaces disulfuros y despolimeriza al pentámero de la IgM sin perjudicar la aglutinación de la IgM (Martínez-Romero et al., 2022).

2.7.7 Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

El ensayo de inmunoabsorción ligado a la enzima (ELISA) es una prueba en la que se requiere el uso de diferentes preparaciones antigénicas con una variedad de antiglobulinas con enzimas y diversos sustratos o cromógenos, para producir estos antígenos se aplica la cepa 99 y 1119-3 de la especie *Brucella abortus* y la cepa 16M de *Brucella melitensis*, para ello se utilizan diversas kits comerciales dependiendo de la disponibilidad (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022)

2.8 Pruebas moleculares o no tradicionales

En los últimos años se ha realizado pruebas de diagnóstico de enfermedades mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los laboratorios clínicos dada por su alta sensibilidad y especificidad para detectar el agente causal de la enfermedad de brucelosis, siendo la PCR más rápida que los cultivos y con más sensibilidad que las pruebas serológicas (Lugo Suárez y otros, 2024). La PCR es una herramienta efectiva en el diagnóstico de la bacteria *Brucella* debido a que es una prueba con alta sensibilidad y especificidad, este tipo de pruebas se dividen en varios tipos: PCR convencional, PCR en tiempo real, y PCR múltiple (Lugo Suárez y otros, 2024).

2.8.1 PCR convencional

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa de punto final es una de las primeras técnicas usadas en el análisis molecular, los estudios amplificados en PCR convencional se visualizan en electroforesis en gel de agarosa mostrando su sensibilidad ante la detección de brucelosis (Yagupsky et al., 2019). Los ensayos de PCR convencional son esenciales en la detección de ADN viral resultando rápido y con un elevado índice de sensibilidad y especificidad, puesto que algunos estudios realizan diseño en sus cebadores dado que se realizan modificaciones en sus genes dianas en zonas específicas dependiendo de la especie a analizar (Granda Moncayo y otros, 2023).

2.8.2 PCR en tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real o reacción en cadena de la ligasa es una prueba rápida y eficaz en la que es efectivo en la identificación de secuencias específicas utilizando sondas moleculares del género *Brucella*, además es útil en el análisis de epidemias de la brucelosis, estas sonda son oligonucleótidos de cadena simple que son mencionados por su tallo y su lazo, este lazo es complementado con su cebador realiza una eliminación del agente fluorescente del fluoróforo (Zhao et al., 2020). Diversos estudios han mencionado el uso del sistema SYBR Green y las sondas

TaqMan® en su análisis debido a su capacidad de amplificación exponencial en cada uno de sus ciclos térmicos (Granda Moncayo y otros, 2023)

2.8.3 PCR múltiple

La PCR multiplex es perfecta para realizar análisis en diferentes muestras clínicas con cebadores específicos de la especie que se quiere analizar, amplificando de forma simultánea diversas muestras y así ahorrándonos bastante tiempo de reacción a diferencia a que si hiciéramos muchas pruebas (Zamanian et al., 2020). Las pruebas AMOS está basada en un polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) en consecuencia de la localización de una especie específica. Un estudio realizado por Paul y otros (2020) utilizó la reacción en cadena de la polimerasa multiplex en el análisis de cinco especies de *Brucella* la cual fue bastante significativa dado que se estableció una diferenciación entre especies dando una sensibilidad y especificidad significativa en muestras clínicas (Paul et al., 2020).

2.8.4 Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

De acuerdo por el autor Del Pozo Rodríguez (2024) menciona que la espectrometría de masas posee la capacidad de identificar los microorganismos se aplica a partir de frascos de hemocultivos con una duración estimada de tres horas, es una técnica muy esencial en la identificación del agente causal. Según Kornspan y otros (2021) mencionaron que la espectrometría de masas MALDI-TOF mediante la aplicación de etanol y ácido fórmico es una alternativa rentable pero que requiere de bastante tiempo para realizar la diferenciación con ciertas cepas de la especie *Brucella*.

2.9 Ventajas y desventajas de las pruebas moleculares vs. Pruebas tradicionales

2.9.1 Ventajas de las pruebas moleculares

- 1) **Alta sensibilidad y especificidad:** Las pruebas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden identificar pequeñas cantidades de ADN bacteriano eficaz para la identificación de infección en etapa inicial (OMS, 2023)
- 2) **Rápida detección:** Las pruebas nos permiten identificar el patógeno en un lapso corto a diferencia de los métodos tradicionales como los cultivos que podrían llegar a tardar semanas (OMS, 2023).
- 3) **Diferenciador de especies:** Las pruebas son eficaz durante el control epidemiológico y realizar un protocolo para su intervención (Bodenham y otros, 2021)
- 4) **Bajo riesgo de contaminación cruzada:** Esta prueba disminuye casi al máximo la capacidad de generarse una contaminación a diferencia de cultivos bacterianos (OMS, 2023)

2.9.2 Desventajas de las pruebas moleculares

- 1) El uso de estas técnicas tiene un elevado costo de reactivos, equipos y el personal capacitado limitando el procedimiento de éstas (OMS, 2023).
- 2) Para realizar este tipo de pruebas se requiere de un laboratorio bien equipado con altos estándares de calidad para evitar obtener un falso positivo o negativo (OMS, 2023).
- 3) La calidad de las muestras de ADN podría alterar de forma significativa los resultados a obtener (OMS, 2023).

2.9.3 Ventajas de las pruebas tradicionales

- 1) Las pruebas tradicionales como las serológicas (Rosa de Bengala, hemocultivo, 2-mercaptoetanol) y los cultivos son analizados en regiones rurales y con limitados recursos (Bodenham et al., 2021)
- 2) Estas pruebas no requieren de equipos ni reactivos costosos a diferencia de las pruebas moleculares (Bodenham et al., 2021).
- 3) La mayoría de las pruebas serológicas se encuentran estandarizadas y con aprobación para su aplicación comercial a nivel mundial (Bodenham et al., 2021).

2.9.4 Desventajas de las pruebas tradicionales

- 1) Al ser un método tradicional poseen menor sensibilidad y especificidad por lo cual podrían dar como resultado un falso positivo debido a que es fácil que se dé una contaminación cruzada (Bodenham et al., 2021)
- 2) Este tipo de pruebas no detectan un patógeno sino un anticuerpo por lo que puede ser complicado detectar los patógenos (Bodenham et al., 2021).
- 3) El tiempo de obtención de los resultados pueden llegar a tardar varios días hasta semanas lo cual retrasa el diagnóstico (Bodenham et al., 2021)

Capítulo 3

3. Materiales y Metodología

3.1. Identificación de las secuencias dianas

Para la presente investigación se realizó previamente una búsqueda bibliográfica sobre los cebadores y su especificidad, eficiencia y sensibilidad, mediante las herramientas bioinformáticas como lo es *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para la evaluación del gen más eficiente que se va a investigar. Para la determinación de estos cebadores, se emplearon las herramientas bioinformáticas del *National Center for Biotechnology* (NCBI), como: *Primer-Blast* y el *Nucleotide-Blast*. Esto ayudó a establecer las secuencias de los posibles cebadores y analizar la homología de acuerdo con las bases de datos. También se empleó la plataforma *UniProt uGene* que es un software de código abierto que nos aporta en el alineamiento de secuencias múltiples para así tener un mejor entendimiento sobre el diseño de cebadores y su filogenia.

3.2 Selección de cebadores

El primer par de cebadores seleccionados corresponden a los presentados por Yagupsky y otros (2019) para el cebador GB1 (Forward: GCCCCTGACATAACCCGCTT, Reverse: GAGCGTGACATTTGCCGATA) para una secuencia 1030 pb de longitud. El segundo par de cebadores seleccionados, corresponden a los presentados por Behroozikhah y otros (2022) para la cepa VBI22 (Forward: TGCCGATCACTTTCAAGGGCCTTCAT, Reverse: GCGCGGTTTTCTGAAGGTTTCAGG) con 285 pb, y los últimos cebadores fueron seleccionados de Probert y otros (2003) con los siguientes cebadores: cebador 3 ARQ-070 (Forward: GCTCGGTTGCCAATATCAATGC, Reverse: GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG) con 151 pb, cebador 4 IVRI-544 (Forward: GCGGCTTTTCTATCACGGTATTC, Reverse: CATGCGCTATGATCTGGTTACG) con 489 pb y cebador 5 ARQ-070 (Forward: AACAAGCGGCACCCCTAAAA, Reverse: CATGCGCTATGATCTGGTTACG) con 279 pb.

Los cebadores seleccionados, obtenidos de las publicaciones referidas, sirven para la identificación de: *Brucella spp.*, *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*.

3.3 Obtención y evaluación inicial del protocolo aplicado con controles positivos

Para el control positivo se aplicaron dos vacunas atenuadas liofilizadas y un consorcio de cepas de *Brucella spp.* propiedad del INSPI. El primer control positivo aplicado fue una vacuna atenuada liofilizada, de nombre comercial “CDVac Brucelosis Cepa 19” (TADEC), el segundo control positivo fue el de propiedad del INSPI y por último el tercer control positivo fue la vacuna atenuada liofilizada de nombre comercial bovilis RB-51 (MSD Salud Animal), almacenada en una cadena de frío a 4°C. Posterior a su almacenamiento, se realizó la extracción de ADN con el kit comercial Quick DNA/RNA™ Viral de la marca Zymo Research, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El DNA obtenido se almacenó a 4°C hasta su análisis.

3.3.1 Cuantificación de los controles positivos

Para la cuantificación de los controles se empleó el kit de la marca Promega QuantiFluor One dsDNA® siguiendo los protocolos brindados por el fabricante, utilizando los controles 1 (vacuna cepa 19), controles 2 (brindado por un laboratorio del INSPI) y controles 3 (vacuna Bovilis RB-51).

3.3.2 Evaluación semi – cuantitativa de la sensibilidad

Posterior a la adquisición de los controles, se realizaron diluciones seriadas a partir de 10⁻¹ hasta 10⁻⁶. Con el uso del kit comercial QuantiFluor™ One dsNDA System® de la marca Promega, se realizó la cuantificación por duplicado del DNA. El kit contiene un DNA *lambda* QuantiFluor™ One que actúa como estándar y una solución de dsDNA QuantiFluor™ One que es el control positivo.

3.4 Obtención de muestras biológicas y controles positivos

3.4.1 Recolección de muestras

Para la presente investigación de brucelosis se tomó en cuenta la aplicación de muestras biológicas provenientes del ganado bovino. Se tomaron 30 muestras de sangre total, provenientes de una granja privada de la provincia de Manabí. Se recolectaron muestras de sangre total en tubos de recolección color lila con el reactivo *Ácido Etilendiaminotetraacético* (EDTA), para luego ser transportadas al *Centro de Investigación Multidisciplinario* (CIM) del *Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación* (INSPI). Se realizó la extracción del ADN con el kit comercial Quick-DNA/RNA™ Viral de la marca Zymo Research, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante y posteriormente se almacenaron a 4°C hasta su análisis en el laboratorio.

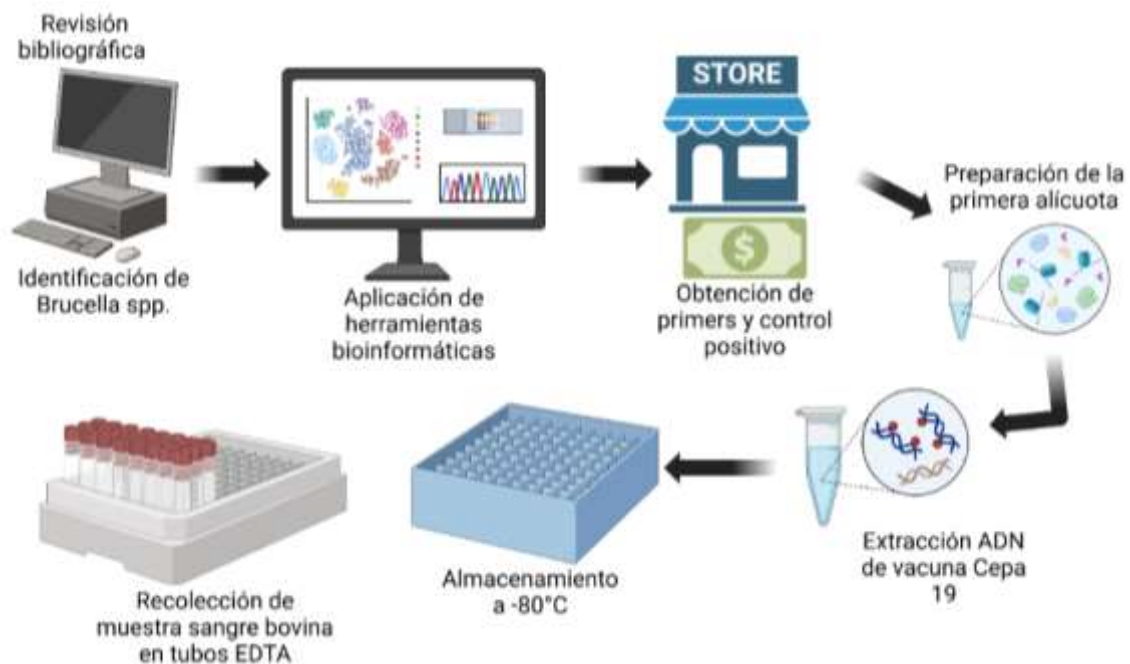


Imagen 4. Metodología fase 1. Fuente: Cumbe, M. (2024).

3.5. Condiciones de amplificación de la PCR

Se realizó una PCR Multiplex en la cual se emplearon los componentes descritos en la tabla 3. Para ello, se trabajó con un volumen final de reacción de 25 μ l, se empleó la enzima GoTaq Green[®] Máster Mix 2x que es una solución premezclada que contiene ADN polimerasa Taq de origen bacteriana, dNTPs, MgCl₂ y tampones de reacción para una óptima amplificación. Esta enzima contiene colorantes fluorescentes (azul y amarillo) para su visualización mediante electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 3: Componentes en la reacción en cadena de la polimerasa

Componentes	Volumen (1x) reacción	Volumen (2x) reacción
GoTaq Green [®] Máster Mix 2x	12.5 μ l	25 μ l
Bru_F 10 μ M	0.5 μ l	1 μ l
Bru_R 10 μ M	0.5 μ l	1 μ l
Bru_ab F μ M	0.5 μ l	1 μ l
Bru_ab R μ M	0.5 μ l	1 μ l
Bru_mel F μ M	0.5 μ l	1 μ l
Bru_mel R μ M	0.5 μ l	1 μ l
Bru_suis F μ M	0.5 μ l	1 μ l
Bru_suis R μ M	0.5 μ l	1 μ l
ADN templado	5 μ l	5 μ l
Agua libre de nucleasa	3,5 μ l	7 μ l

Las condiciones en la reacción en cadena de la polimerasa multiplex para la desnaturalización, amplificación y extensión, están descritas en la tabla 4. Para la primera prueba de amplificación de punto final, se utilizaron los cebadores de *Brucella spp.*, *Brucella abortus*, y *Brucella melitensis*.

Tabla 4: Rampas de amplificación

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	5 minutos	1
Amplificación	95°C	30 segundos	35
	57°C	1 minuto	
	72°C	1 minuto	
Extensión	72°C	5 minutos	

3.6 Visualización de fragmentos en gel de agarosa

Para la preparación del gel de agarosa para electroforesis se utilizó agarosa al 2%, preparado en solución de tampón TAE (Tris - acetato - EDTA) al 1X de concentración. La distribución en el gel de agarosa fue de la siguiente manera: 4 pocillos, en el primer pocillo se depositó el marcador de peso molecular que contiene el DNA Ladder y un colorante Blue/ Orange 6x loading Dye que es muy común su uso en la electroforesis de gel por lo general en gel de agarosa o poliacrilamida; en el segundo y tercer pocillo se encuentran muestras de control positivo y en el último se encuentra la muestra con Blue/ Orange 6x loading Dye.

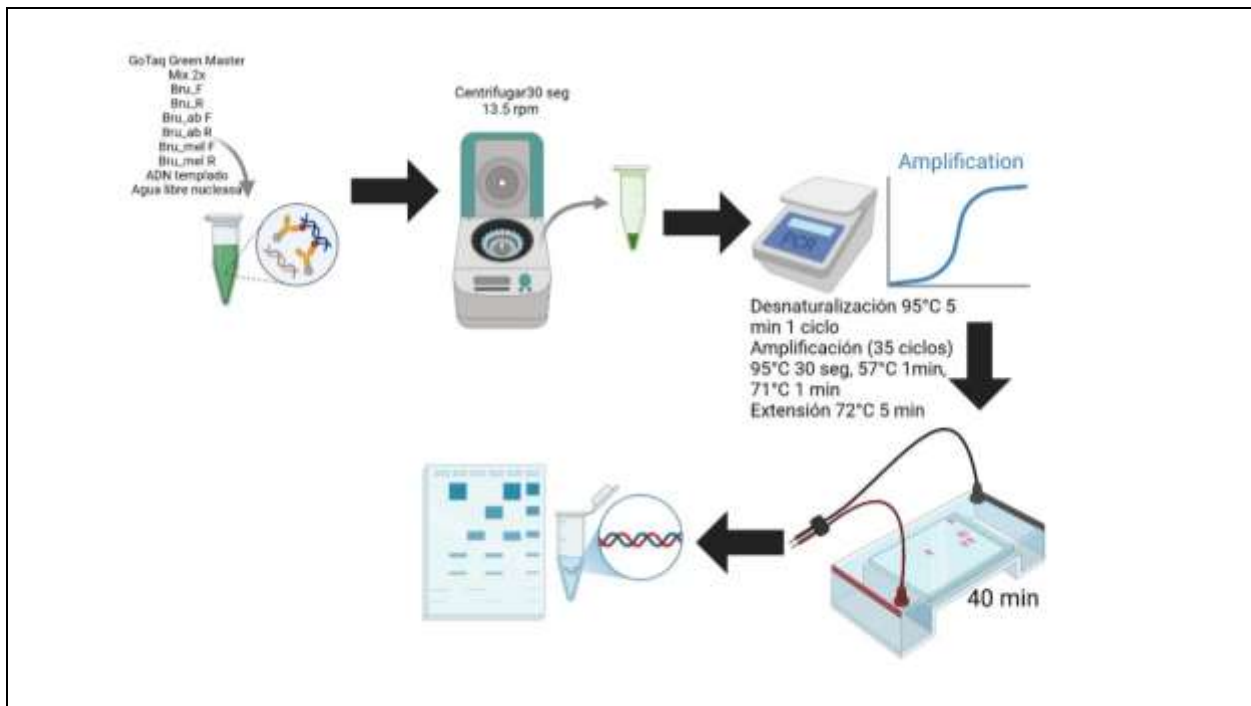


Imagen 5. Metodología fase 2. . Fuente: Cumbe, M. (2024).

Posteriormente, se utilizó como primer control la vacuna comercial de cepa 19, junto con las primeras 15 muestras. Se distribuyó en dos partes: en la parte superior tuvimos se utilizaron 9 pocillos; en el primer pocillo se depositó el marcador de peso molecular; en el segundo pocillo se depositó el control negativo, y el resto de pocillo se depositaron las muestras (1 – 7). En la parte inferior del gel se distribuyó de la siguiente manera: en 10 pocillo, en el primer pocillo se depositó el marcador de peso molecular; a partir de segundo hasta el sexto pocillo se depositaron las muestras (8 – 13); en el séptimo pocillo se depositó en control positivo y los dos últimos pocillos se depositó las muestras restantes (14 – 15).

Capítulo 4

4. Resultados y discusión

4.1. Resultados.

4.1.1 Identificación de secuencias dianas

De acuerdo con las herramientas bioinformáticas aplicadas en esta investigación, se encontraron 5 cebadores con un alto grado de especificidad (**Anexo 8 y 9**). De acuerdo con la información bibliográfica investigada previamente, los cebadores (primers, en inglés) seleccionados mostraron una especificidad de un promedio de 82 – 100% para las secuencias GB1, VBI22, ARQ-070, IVRI - 544 (**Tabla 5**) junto con su gen diana, relativa a las especies de interés: *Brucella spp.*, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, y *Brucella suis*, evaluando los genes dianas y no dianas.

Tabla 5. Cebadores seleccionados en el estudio

Especie diana	Gen diana NCBI	Fragmento del producto (pb)	Primer F (5' – 3')	Primer R (5' – 3')	Especificidad
<i>Brucella spp.</i>	ARQ-070	151	GCTCGGTTGCC AATATCAATGC	GGGTAAAGCG TCGCCAGAAG	98%
<i>Brucella abortus</i>	IVRI-544	489	GCGGCTTTTCTA TCACGGTATTC	CATGCGCTATG ATCTGGTTACG	82%
<i>Brucella melitensis</i>	ARQ-070	279	AACAAGCGGCA CCCCTAAAA	CATGCGCTATG ATCTGGTTACG	100%
<i>Brucella suis</i>	VBI22	285	TGCCGATCACTT TCAAGGGCCTT CAT	GCGCGGTTTTC TGAAGGTCA GG	99%
<i>Brucella melitensis</i>	GB1	1030	GCCCCTGACAT AACCCGCTT	GAGCGTGACA TTTGCCGATA	93%

4.1.2 Cuantificación del ADN de los controles positivos

	Control 1 (Vacuna comercial “Brucelosis cepa 19”)	Control 2 (Propiedad del Laboratorio del INSPI)	Control 3 (Vacuna comercial “Bovilis RB51”)
Concentración (ng/μl)	11 ng/μl	243 ng/μl	19 ng/μl

Se evaluó el primer control adquirido (cepa 19) la cual fue visualizada se realizó en gel de agarosa para lo cual se preparó el gel al 2% la cual dio la amplificación para la especie *Brucella melitensis* con un producto de 151 pb.

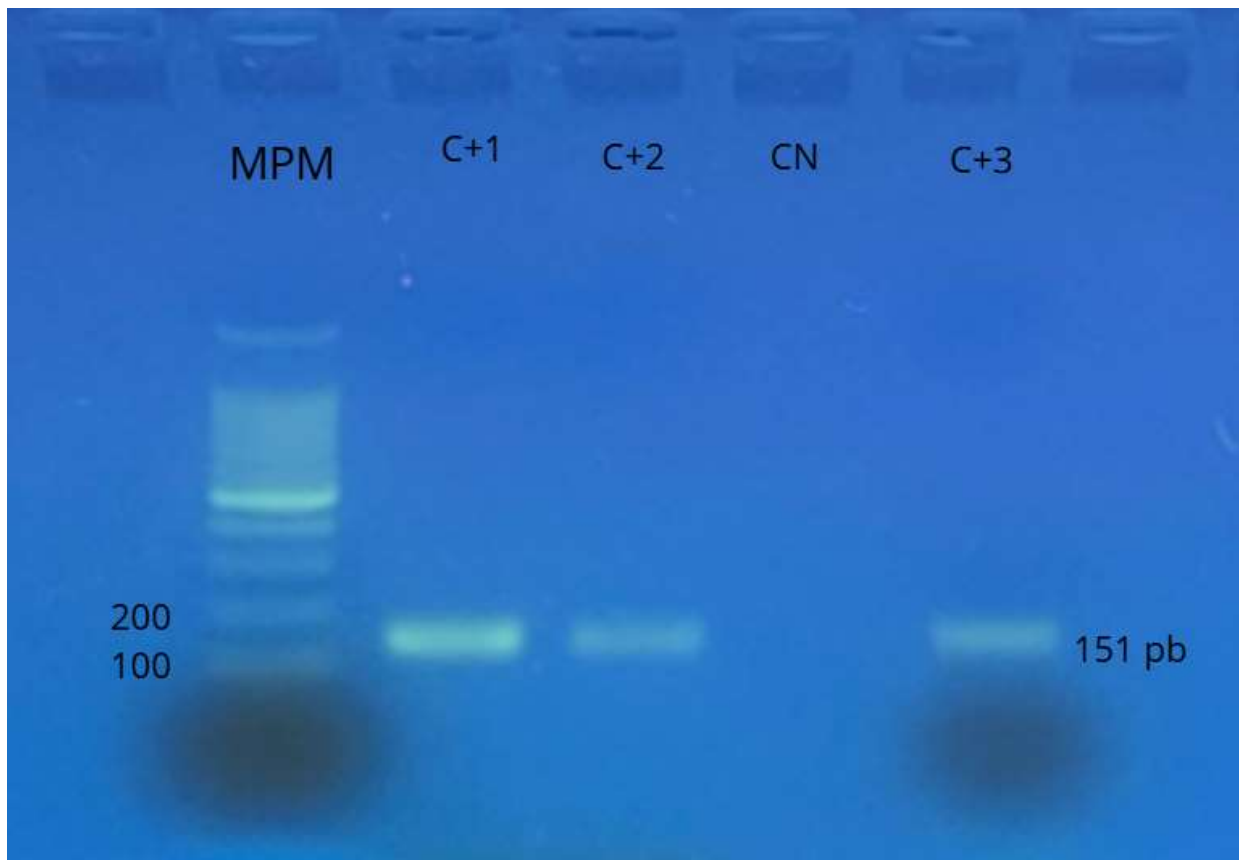


Imagen 6. Visualización de controles en gel de agarosa al 2%.

MPM: marcador de peso molecular de 1000 pb. C+1: control positivo 1; C+2: control positivo 2; CN: control negativo. Los productos de amplificación obtenidos (151 pb), corresponden a *B. melitensis*.

4.1.3. Ensayo de las condiciones de la PCR y prueba con muestras biológicas y controles positivos

Se realizó el ensayo con 30 muestras colectadas de bovinos provenientes de la provincia de Manabí. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa. Según lo descrito en la metodología, se realizó la extracción del DNA de acuerdo con las especificaciones descritas por el fabricante de las 30 muestras biológicas recolectadas: las primeras 15 muestras bovinas fueron comparadas con el control 1, que presentó amplificación para la especie *Brucella spp.* con un producto de amplificación de 151 pb (**Imagen 7 y 8**), como se refiere en la sección anterior.

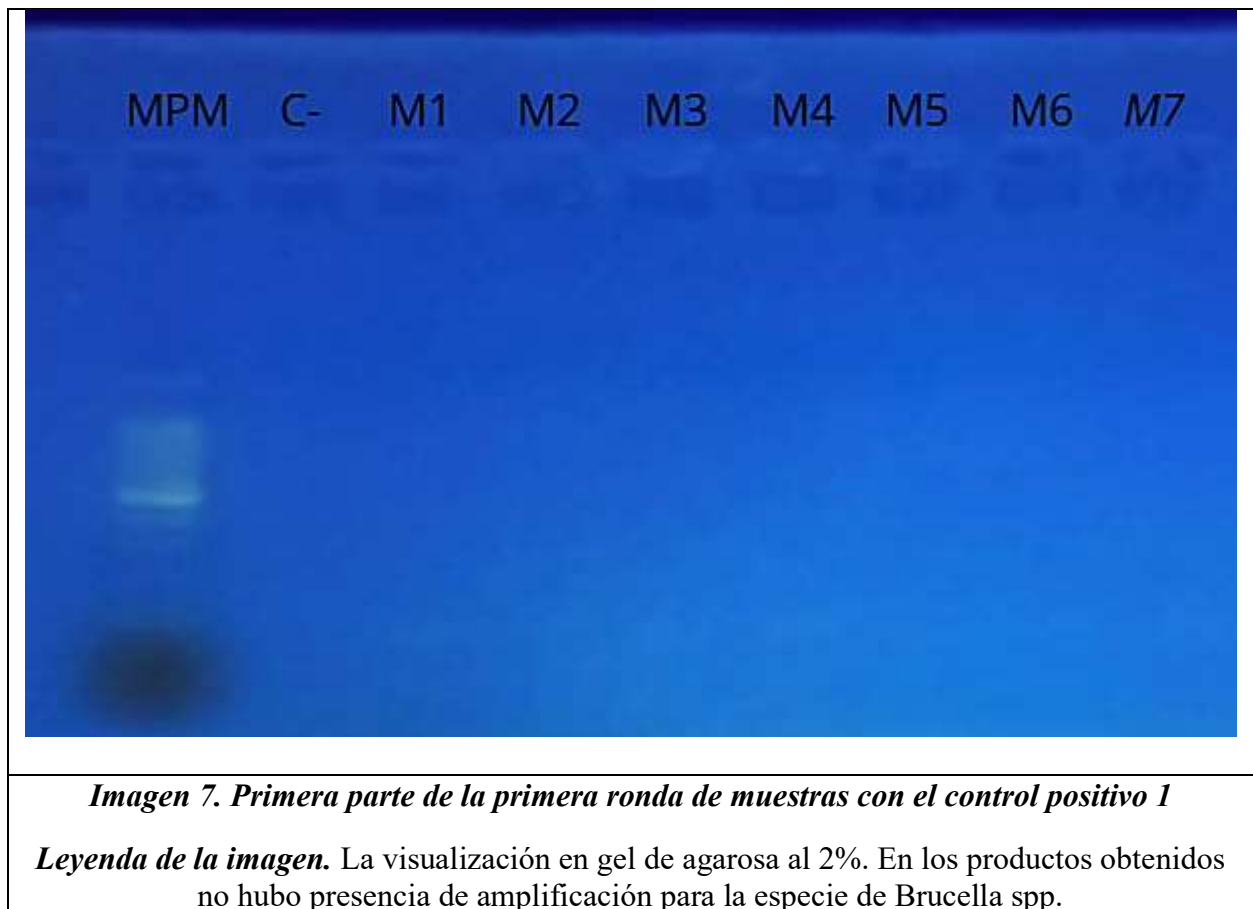




Imagen 8. Segunda parte de la primera ronda de muestras con el control positivo 1

Leyenda de la imagen. La visualización en gel de agarosa al 2%. Los productos obtenidos dieron negativo para la especie *Brucella* spp, con relación al control positivo con 151 pb.
MPM: Marcador de peso molecular, C-: control negativo, C+: control positivo.

Las siguientes 15 muestras (**Imagen 9 y 10**), se procesaron de acuerdo con lo descrito. Se empleó el control 2, de mayor concentración de DNA (proveniente de un laboratorio del INSPI) en el que se visualizaron la amplificación de los fragmentos correspondientes a *Brucella melitensis* (151 pb), y *Brucella abortus* (489 pb). Las imágenes 9 y 10 corresponden a un mismo gel de agarosa, en la imagen 9 podemos visualizar la distribución de la siguiente manera; en el pocillo 1 se depositó el marcador de peso molecular, en el pocillo 2 se depositó el control negativo, a partir del pocillo 3 – 14 se encuentran las muestras (16 – 27). En la imagen 10 podemos visualizar la distribución de la siguiente forma: en el pocillo 1 se depositó el marcador de peso molecular, en los pocillos 4, 7 y 8 se encuentran las muestras (28 – 30) y en los pocillos 5, 6 se depositaron los controles positivos

propiedad del Laboratorio del INSPI y en el pocillo 11 se depositó el control positivo 3 de la vacuna comercial RB51.

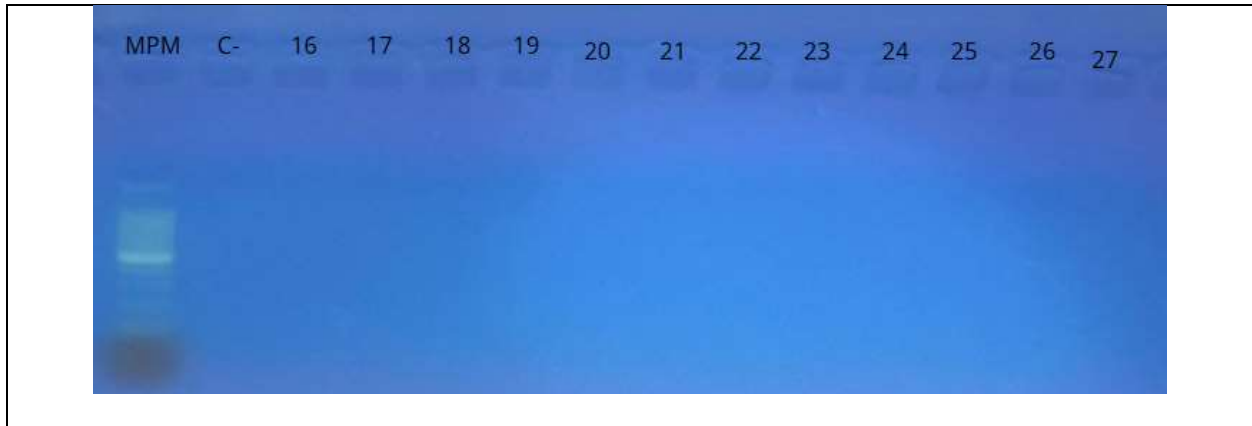


Imagen 9. Segunda ronda de muestras con el control positivo 2

Leyenda de la imagen. Se visualizó en el gel de agarosa que no se obtuvo la presencia de la especie *Brucella spp.*

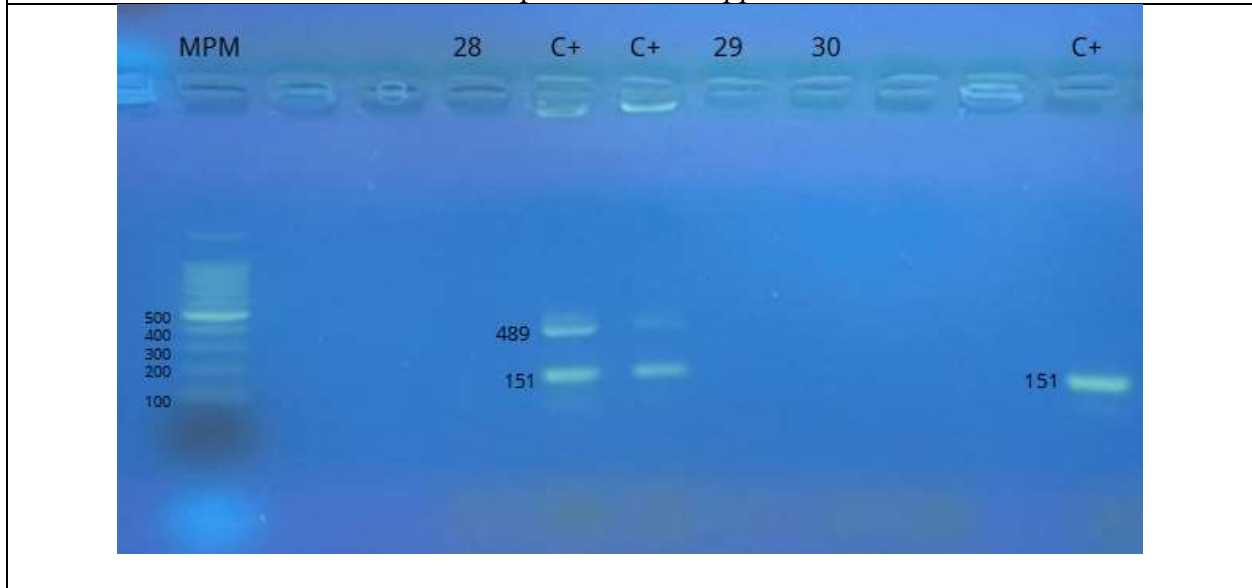


Imagen 10. Visualización de controles y muestras

Leyenda de la imagen. Los productos de los controles positivos (obtenidos del INSPI) se visualizó la amplificación para las especies *Brucella spp.* (151 pb) y *Brucella abortus* (489 pb)

4.1.4. Evaluación semi – cuantitativa de la sensibilidad

Se aplicaron diversas cantidades del control positivo en el gel de agarosa al 2% en solución tampón TAE, con una potencia de 90 voltios, que se muestran en las imágenes 11 y 12. Se observa

productos de amplificación de 151 pb y 489 pb, correspondientes a *Brucella spp.* y *B. abortus*, respectivamente. Las imágenes 11 y 12 pertenecen al mismo gel distribuidos de la siguiente manera; en el pocillo 1 se depositó el marcador de peso molecular, en el pocillo 2, 3 y 4 se depositaron los controles positivos; a partir del pocillo 5 se encuentran las diluciones seriadas del control positivo 2 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}) y por último en el pocillo 11 se depositó el control negativo.

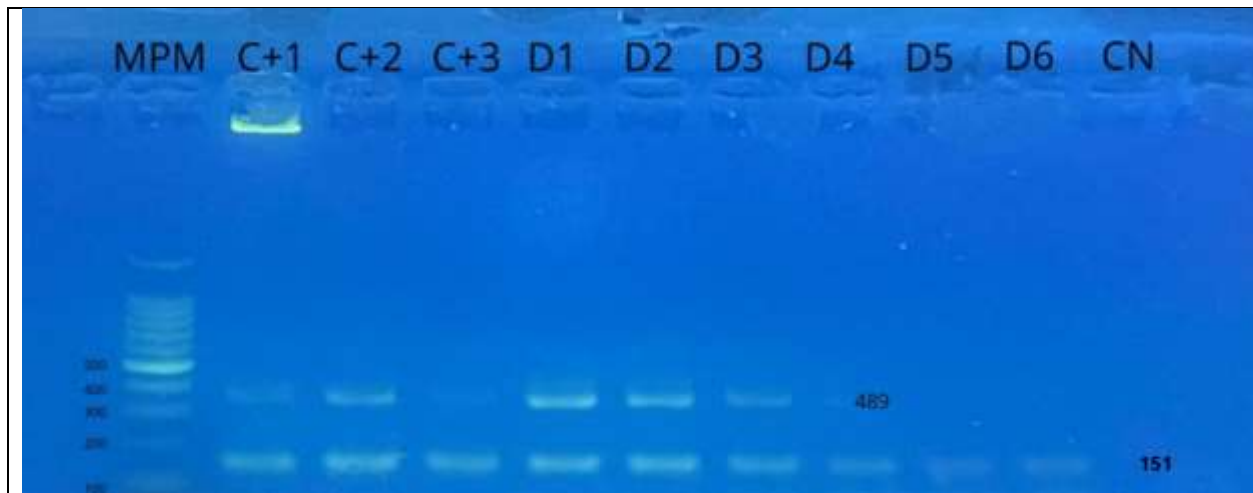


Imagen 11. Evaluación semi – cuantitativa de dos controles (Primera replica)

Leyenda de la imagen. Los controles 1 y 2 pertenecen al control 2 mencionado en la metodología. Se observa mayor concentración en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} ; con menor concentración en las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}

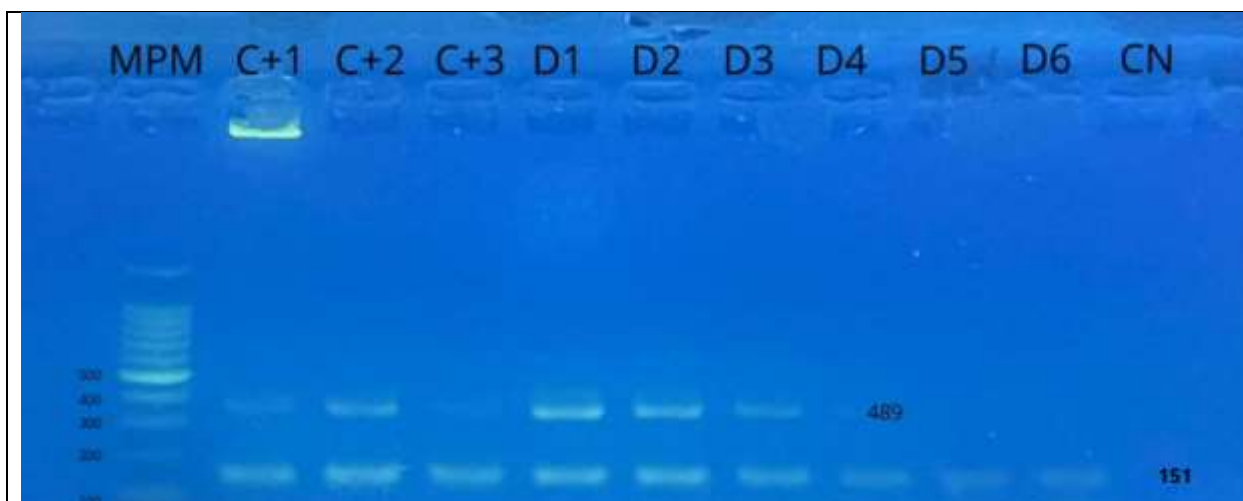


Imagen 12. Evaluación semi - cuantitativa de dos controles (Segunda replica)

Leyenda de la imagen. MPM: marcador de peso molecular. Se observa mayor concentración en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} ; con menor concentración en las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}

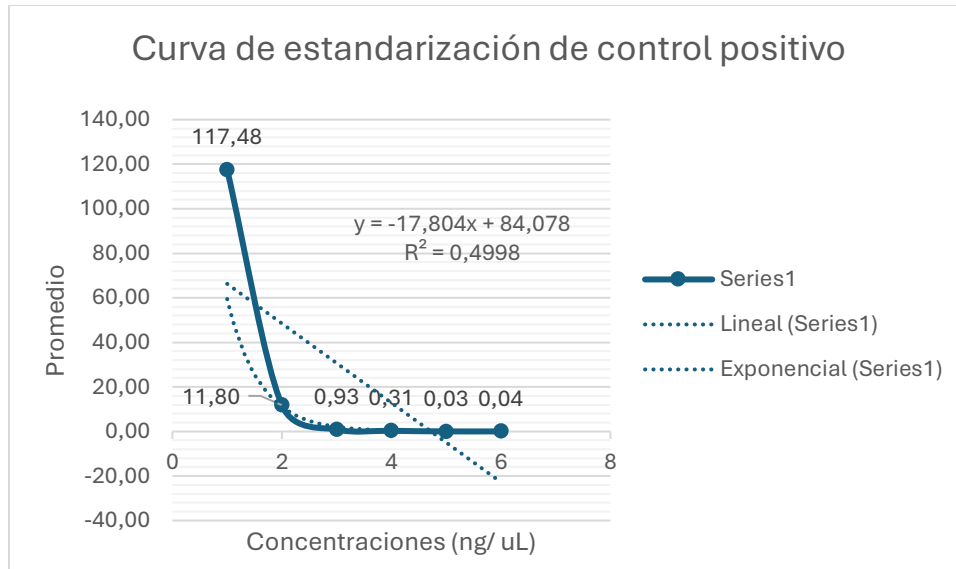
4.1.5. Curva estándar del control positivo

De acuerdo con lo mencionado en el capítulo anterior se determinó la concentración del control positivo con mayor concentración de DNA (**Tabla 6**), a la cual se realizó la amplificación por PCR. Se observaron productos de amplificación de acuerdo con las bandas con mayor concentración, para las diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Las diluciones de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} no presentaron fragmentos de amplificación visibles (imagen 11 y 12).

Tabla 6. Concentraciones de los controles positivos

Diluciones	Concentración Lectura 1 (ng/uL)	Concentración Lectura 2 (ng/uL)	Desviación estandar	Promedio
10^0	160	179	13,4350288	117,48
10^1	16	18	1,41421356	11,80
10^2	1,18	1,43	0,1767767	0,93
10^3	0,392	0,475	0,05868986	0,31
10^4	0,0376	0,0536	0,01131371	0,03
10^5	0,0332	0,0631	0,02114249	0,04

Imagen 12. Curva de estandarización



En la Imagen 12 se aprecia que las concentraciones observables en el gel de agarosa fueron 10^{-1} con una concentración 11,80 ng/uL; la dilución 10^{-2} con una concentración de 0,93 ng/uL; la dilución 10^{-3} con una concentración de 0,31 ng/uL; la dilución 10^{-4} con una concentración de 0,03 ng/uL; y por último la dilución 10^{-5} con una concentración de 0,04 ng/uL.

4.2 Discusión

En el diagnóstico confirmativo del agente causal de la enfermedad brucelosis se aplica la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha tenido ventaja significativa en comparación con las pruebas tradicionales. La aplicación de estas técnicas ha sido beneficiosa debido a su rapidez y eficacia en el diagnóstico de *Brucella*.

Los controles aplicados en el estudio fueron tres: “Brucelosis cepa 19”, una vacuna atenuada liofilizada que durante su amplificación se visualizó el amplicón de *Brucella melitensis* con un producto de 151 pb; la vacuna RB51, una cepa mutagénica rugosa atenuada procedente de una cepa virulenta de la especie *Brucella abortus* la cual se empleó su ADN la cual se visualizaron dos amplicones: uno de 151 pb, para la especie *B. melitensis* y 489 pb para *B. abortus*.

Durante la selección de los cebadores para la PCR de punto final, se encontraron cinco cebadores los cuales mostraron un alto grado de especificidad para las especies descritas previamente que fueron cinco: *Brucella spp.* (151 pb), *Brucella abortus* (489 pb), *Brucella melitensis* con dos productos de 279 pb y 1030 pb, y por último *Brucella suis* (285 pb).

En el estudio realizado por Andrade – Guzmán y otros (2023), emplearon oligonucleótidos en la técnica de AMOS – PCR con la capacidad de amplificar y diferenciar diversas especies de *Brucella* como *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* y *Brucella ovis* en muestras de leche y de sangre de 128 animales seropositivos originarias de la provincia del Azuay. En este estudio se analizaron 127 muestras en total provenientes de diferentes cantones de Azuay, 65 muestras de leche bovina y 62 muestras de sangre las cuales 70 fueron seropositivas. Previo a su amplificación se realizaron pruebas serológicas, luego se dio la PCR – AMOS se observaron amplicones correspondientes a las especies *Brucella spp.* (261 pb) y *B. abortus* (498 pb).

Los autores Román – Cardenas y colaboradores (2020) realizaron un estudio en la provincia de Loja en la que utilizaron 115 muestras de nódulos linfáticos de bovinos faenados. En su amplificación se visualizaron cinco muestras correspondientes a los fragmentos de la especie *B. abortus* (223 pb) del gen BCSP31, al igual que el control positivo.

De acuerdo con Cruz – Aviña realizaron un estudio en la ciudad de México, en el que evaluaron 263 muestras de peces, fueron previamente analizadas mediante pruebas serológicas. La visualización mostró la amplificación de 24 muestras correspondientes a *Brucella spp.* (1029 pb) del gen BP26.

En el presente estudio, empleó cebadores para la identificación de *Brucella* en muestras de sangre bovina provenientes de una granja privada de la provincia de Manabí, de las cuales no se

visualizaron la presencia de las especies de *Brucella*, por lo cual podemos evidenciar que las vacunas empleadas como controles positivos dieron una amplificación para las especies *Brucella melitensis* y *Brucella abortus*. De acuerdo con el Andrade – Guzmán y otros (2023), evidenció que en muestras sanguíneas es poco probable encontrar la presencia de ADN de otras especies con diversas especies de su filogenia y eso también puede depender de que el animal infectado se encuentre en una etapa aguda o crónica.

Sin embargo, se requiere la aplicación de un mayor número de muestras con animales de diversos lugares geográficos para evaluar la prevalencia de la enfermedad de la brucelosis debido a que en el sitio evaluado no se encontró la presencia del patógeno.

Capítulo 5

5.1 Conclusiones

5.1.2 Identificación de secuencias dianas

Dado que se realizó una exhaustiva investigación acerca de los cebadores utilizados, se estimaba la amplificación de las especies *Brucella spp.*, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, con un rango de productos entre 151 – 1030 pb respectivamente. Es por esta razón que podría existir una variación entre ellas debido a que en la experimentación no resultó como se esperaba. Esto evidencia la vital importancia de la aplicación de las herramientas bioinformáticas como una de las técnicas esenciales en el diseño o selección de cebadores a utilizar en un estudio molecular.

5.1.3 Evaluación del plásmido de ADN de los controles

Para este estudio fue importante la aplicación de diversos controles positivos debido a que cada uno de ellos amplificaba para una especie diferente, sin embargo se debe tener en cuenta que posiblemente no amplifican para la especie mencionada como la vacuna cepa 19 que mencionaba que amplificaba para la especie *Brucella abortus* a diferencia de la vacuna Bovilis RB-51 la cual amplificó no solo para *B. abortus* sino que también para *B. melitensis*.

5.1.4 Optimización de las condiciones de los controles y muestras biológicas

Durante la experimentación se analizaron 30 muestras, las cuales fueron separadas en dos partes para el uso de los diferentes controles positivos las cuales dieron una amplificación para dos especies de *Brucella* las cuales fueron *Brucella abortus* con un producto de 489 pb y *Brucella melitensis* con un producto de 151 pb, dándonos a entender que no hay presencia para última especie adquirida la cual fue *Brucella suis*.

5.2 Recomendaciones

De acuerdo con las evaluaciones y experimentos realizados, se establecen las siguientes recomendaciones para las aplicaciones sobre esta práctica a futuro:

Se debe tener un registro a detalle acerca de las condiciones en las experimentaciones esencialmente en las concentraciones utilizadas en los controles y muestras para mejores resultados.

Generar una guía práctica sobre los protocolos empleados en los controles, dilución, mix para la PCR así podremos tener un mejor entendimiento de la sensibilidad que cada variable.

Previo a la manipulación de cada área o instrumento cerciorarnos que se encuentren en buen estado y con condiciones asépticas adecuadas, ya que puede existir alteraciones en sus resultados.

Se recomienda procesar las muestras biológicas dentro de la cabina de flujo laminar o una cabina de bioseguridad siguiendo los estándares de cada laboratorio para asegurar un correcto proceso y evitar la contaminación externo.

Referencias Bibliográficas

- Agrocalidad. (2023). *Códigos y Tarifas del año 2023 de los servicios de laboratorio de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario*. Obtenido de <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2023/05/Servicios-Laboratorios.pdf>
- Álvarez-Hernández, N., Díaz_Flores, M., & Ortiz-Reynoso, M. (Diciembre de 2015). Brucelosis, una zoonosis frecuente. *Revista de Medicina e Investigación*, 3(2), 129-133. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medicina-e-investigacion-353-articulo-brucelosis-una-zoonosis-frecuente-S2214310615000382>
- Andrade Guzmán, O. S., Vintimilla Rojas, A. E., López Espinoza, M. D., Guevara Riera, G. E., & Rivera Pirela, S. E. (01 de Septiembre de 2023). Prevalencia y factores de riesgo asociados a brucelosis en ganaderías lecheras de la provincia del Azuay-Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 38(2), 138-151. <https://doi.org/https://doi.org/10.17163/lgr.n38.2023.10>
- Animal, O. M. (2023). *Validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas de animales terrestres*. Obtenido de Manual Terrestre de la OMSA : https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.06_Validaci%C3%B3n.pdf
- Behroozikhah, A. M., Dadar, M., Asli, E., & Hosseini, S. D. (01 de Junio de 2022). Estudio molecular de aislamientos de campo de *Brucella melitensis* mediante PCR basada en secuencias de proteína de membrana externa 31. *Instituto Arch Razi*, 77(3), 1261-1267. <https://doi.org/https://doi.org/10.22092/ARI.2021.355107.1664>
- Bush, L. M., & Vazquez-Pertejo, M. T. (Junio de 2024). *Manual MSD*. Obtenido de Brucelosis: https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-Gramnegativos/brucelosis#Prevenci%C3%B3n_v11559581_es
- Castillo Iglesias, I. S. (23 de Enero de 2023). Determinación de la prevalencia de brucelosis bovina en la hacienda "Rancho Shilla". Riobamba, Cañar, Ecuador. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/18655/1/17T01843.pdf>
- De la Puente López, V., Cutiño Jiménez, A. M., & López González, T. (01 de Marzo de 2020). Marcadores moleculares para la taxonomía e identi. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 39(1). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002020000100011
- Del Pozo Rodriguez, D. (2024). *Identificación microbiana directa a partir de frascos de hemocultivo positivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF*. Obtenido de Universidad de Valladolid: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/69510/TFG-H3461.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Granda Moncayo, D., Proaño Pérez, F., Garrido Haro, A., & Barrera Valle, M. (Diciembre de 2023). Ensayo de PCR en tiempo real basado en SYBR Green para la detección del virus de la diarrea epidémica porcina. *Revista de Salud Animal*, 45. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v45/2224-4700-rsa-45-e05.pdf>
- Lastra Cabezas, K. F. (06 de Enero de 2023). Prevalencia de brucelosis mediante las pruebas serológicas Rosa de Bengala y ELISA en el gantón general Antonio Elizalde. Bucay, Guayas, Ecuador. Obtenido de <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/LASTRA%20CABEZAS%20KIARA%20FERNANDA.pdf>
- Lugo Suárez, O., Obregón Fuentes, A. M., Echeverría Pérez, E., & Rodríguez Olivera, Y. (21 de Enero de 2024). Implementación en Cuba de un ensayo molecular para la detección de *Brucella* spp. en humanos. *Revista de Salud Animal*, 46, ISSN: 2224-4700. Obtenido de *Revista de Salud Animal*: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v46/2224-4700-rsa-46-e01.pdf>
- Moreno, E. (11 de Septiembre de 2023). *Organización Panamericana de la Salud*. Obtenido de *Abordaje Integral de la Brucelosis en el Marco de una Salud*: <https://www.paho.org/es/noticias/11-9-2023-seminarios-web-abordaje-integral-brucelosis-marco-salud#:~:text=La%20brucelosis%20sigue%20siendo%20una,por%20los%20casos%20en%20humanos.&text=En%20el%20seminario%20web%20se,de%20enfrentamiento%20a%20la%20enfermedad>
- OPS. (08 de Mayo de 2024). *Con el apoyo de la OPS, Colombia avanza en la respuesta a la brucelosis a través del trabajo intersectorial, en el marco de una salud*. Obtenido de *Organización Panamericana de la Salud*: <https://www.paho.org/es/noticias/8-5-2024-con-apoyo-ops-colombia-avanza-respuesta-brucelosis-traves-trabajo-intersectorial>
- Organización Mundial de Sanidad Animal*. (2022). Obtenido de Capítulo 3.1.4. Brucelosis (Infección por *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*): https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELL.pdf
- Rahimoon, M. M., Mirani, A. H., Sahito, J. K., Bhutto, A. L., & Khoso, P. A. (2024). Brucellosis and its Diagnostic Techniques in Animals: a Comprehensive Review. *Journal of Bioresource Management*, 11(3), 151-170. Obtenido de <https://corescholar.libraries.wright.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1762&context=jbm>
- Salazar Abramonte, J. C. (12 de Febrero de 2020). Prevalencia serológica de brucelosis bovina, mediante la prueba rosa de bengala. Lima, Perú. Obtenido de <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/8315?show=full>

- Salud, O. M. (11 de Septiembre de 2023). *Abordaje integral de la Brucelosis en el marco de una salud*. Obtenido de <https://www.paho.org/es/noticias/11-9-2023-seminarios-web-abordaje-integral-brucelosis-marco-salud>
- Vaca Granja, A. A. (Junio de 2024). *Enfermedades de los animales terrestres confirmadas en Ecuador*. Obtenido de Agrocalidad: https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2024/08/INFORME-PAG-WEB-JUNIO-2024-signed-signed-signed_compressed.pdf
- Bodenham, R. F., Mazeri, S., Cleaveland, S., Crump, J. A., Fasina, F. O., de Glanville, W. A., Haydon, D. T., Kazwala, R. R., Kibona, T. J., Maro, V. P., Maze, M. J., Mmbaga, B. T., Mtui-Malamsha, N. J., Shirima, G. M., Swai, E. S., Thomas, K. M., Bronsvoort, B. M. deC., & Halliday, J. E. B. (2021). Latent class evaluation of the performance of serological tests for exposure to *Brucella* spp. in cattle, sheep, and goats in Tanzania. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *15*(8), e0009630. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009630>
- Carolina Elías, I., Viola, M. N., Russo, A. M., & Signorini Porchietto, M. (2024b). Factores de riesgo asociados a la presentación de brucelosis en establecimientos mixtos de caprinos-bovinos de la provincia de Formosa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.10.003>
- Egloff, S., Schneeberger, M., Gobeli, S., Krudewig, C., Schmitt, S., Reichler, I. M., & Peterhans, S. (2018). *Brucella canis* infection in a young dog with epididymitis and orchitis. *Schweiz Arch Tierheilkd*, *160*(12), 743–748. <https://doi.org/10.17236/sat00190>
- Emmanouil, M., Vourvidis, D., Kyrma, A., Makka, S., Horefti, E., & Angelakis, E. (2024). Epidemiological Investigation of Animal Brucellosis in Domestic Ruminants in Greece from 2015 to 2022 and Genetic Characterization of Prevalent Strains. *Pathogens*, *13*(9), 720. <https://doi.org/10.3390/pathogens13090720>
- Guo, X., Zeng, H., Li, M., Xiao, Y., Gu, G., Song, Z., Shuai, X., Guo, J., Huang, Q., Zhou, B., Chu, Y., & Jiao, H. (2023). The mechanism of chronic intracellular infection with *Brucella* spp. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1129172>
- Helmy, N., Zaki, H., & Saad, A. (2025). Comparable Study of Immunological, Bacteriological, and Molecular Techniques for Detecting Brucellosis in Milk of Reproductively Problematic Cows. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, *56*(1), 149–157. <https://doi.org/10.21608/ejvs.2024.259043.1751>
- Kurmanov, B., Zincke, D., Su, W., Hadfield, T. L., Aikimbayev, A., Karibayev, T., Berdikulov, M., Orynbayev, M., Nikolich, M. P., & Blackburn, J. K. (2022). Assays for Identification

- and Differentiation of *Brucella* Species: A Review. *Microorganisms*, 10(8), 1584. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081584>
- Martínez-Romero, A., Ortega-Sánchez, J. L., Cervantes-Flores, M., Guerrero-Manriquez, G. G., & Alba-Romero, J. de J. (2022). Diagnóstico de Brucelosis en caprinocultores y su ganado caprino en ejidos de la Comarca Lagunera. *South Florida Journal of Environmental and Animal Science*, 2(1), 20–35. <https://doi.org/10.53499/sfjeasv2n1-004>
- Paul, S., Peddayelachagiri, B. V., Gogoi, M., Nagaraj, S., Ramlal, S., Konduru, B., & Batra, H. V. (2020). Genome-wide unique insertion sequences among five *Brucella* species and demonstration of differential identification of *Brucella* by multiplex PCR assay. *Scientific Reports*, 10(1), 6368. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62472-3>
- Xiao, Y., Li, M., Guo, X., Zeng, H., Shuai, X., Guo, J., Huang, Q., Chu, Y., Zhou, B., Wen, J., Liu, J., & Jiao, H. (2022). Inflammatory Mechanism of *Brucella* Infection in Placental Trophoblast Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13417. <https://doi.org/10.3390/ijms232113417>
- Yagupsky, P., Morata, P., & Colmenero, J. D. (2019). Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-19>
- Zamanian, M., Jahani, E., & Mahmoudi, H. (2020). Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Detection of the *Brucella* Genus in Human Whole Blood and Serum. *The Open Microbiology Journal*, 14(1), 242–246. <https://doi.org/10.2174/1874434602014010242>
- Zhao, C., Xu, W., & Gao, W. (2020). A real-time quantitative PCR based on molecular beacon for detecting *Brucella* infection. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72(3), 1039–1046. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11133>

Anexos

Anexos 1. Equipos empleados en el proceso experimental de la extracción de ADN y PCR

Equipo	Marca
Cabina de Flujo Laminar Horizontal	Labconco
Microcentrifugadora 5420	Eppendorf
Mini centrifugadora Spin/ Spin Plus	Eppendorf
Termociclador	Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400
Transiluminador UV fijo de mesa M-15	Benchtop UV Transiluminator
Mini Fluorometro ultrasensible	QuantiFluor® ONE dsDNA System
Sistema de electroforesis	MGU-502T

Fuente: Elaboración propia

Anexos 2. Reactivos empleados en el proceso experimental de la extracción de ADN y PCR

Reactivo	Composición	Volumen (uL)
DNA/ RNA Shield 2x		200 µl
Viral DNA/ RNA Buffer		800 µl
Viral Wash Buffer		500 µl
DNase/ RNase free water		20 µl
Etanol 95 – 100%	C ₂ H ₆ O	500 µl

Fuente: Elaboración propia

Anexos 3. Termociclador



Fuente: Elaboración propia

Anexos 4. Vacuna Brucelosis cepa 19



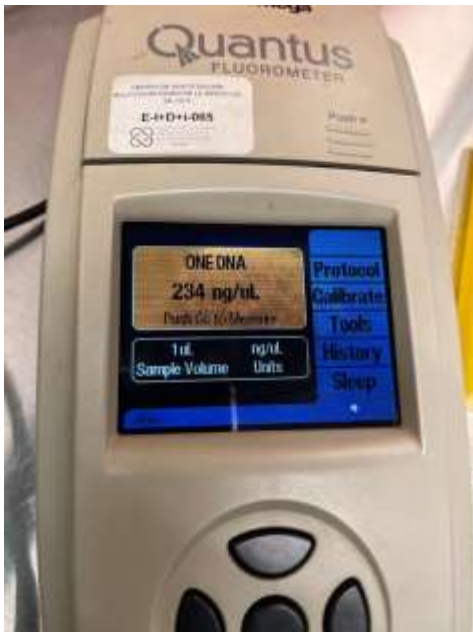
Fuente: Elaboración propia

Anexos 5. Vacuna Bovilis RB-51



Fuente: Elaboración propia

Anexos 6. Mini Fluorómetro Ultrasensible



Fuente: Elaboración propia

Anexos 7. Sistema de electroforesis



Fuente: Elaboración propia

Anexos 8. Secuencias dianas evaluadas previamente

Diana a spp							Diana FISHMATELLESI					MEDICAMENTO				
Estudio	Enlace	Especie	Diat	Gen Diana	Prodot size	Gen Diana R	Expected Size R	Primer F (5'-3')	Primer R (3'-5')	Otros F	DIAGNÓSTICO TOTAL (F)	Diana F	DIANA FISHMATELLESI	Diana Mte	Estados	Estados
Vignati et al. (2011)	https://doi.org/10.1007/s11287-011-9212-0	<i>S. malinche</i>	malinche	malinche	102 pb	102	102	GCCTCCAGCATAGCTGGCTT	GAGTGTGATTTTGTGATG	39	39	39	39	39	1	1
Vignati et al. (2011)	https://doi.org/10.1007/s11287-011-9212-0	<i>S. malinche</i>	malinche	malinche	102 pb	102	102	GCCTCCAGCATAGCTGGCTT	GAGTGTGATTTTGTGATG	39	39	39	39	39	1	1
Vignati et al. (2011)	https://doi.org/10.1007/s11287-011-9212-0	<i>S. malinche</i>	malinche	malinche	102 pb	102	102	GCCTCCAGCATAGCTGGCTT	GAGTGTGATTTTGTGATG	39	39	39	39	39	1	1
Broockhuijs et al. (2012)	https://doi.org/10.1007/s11287-011-9212-0	<i>S. malinche</i>	malinche	malinche	102 pb	102	102	GCCTCCAGCATAGCTGGCTT	GAGTGTGATTTTGTGATG	39	39	39	39	39	1	1
Prober et al. (2001)	https://doi.org/10.1007/s11287-011-9212-0	<i>S. malinche</i>	malinche	malinche	102 pb	102	102	GCCTCCAGCATAGCTGGCTT	GAGTGTGATTTTGTGATG	39	39	39	39	39	1	1
Prober et al. (2001)	https://doi.org/10.1007/s11287-011-9212-0	<i>S. malinche</i>	malinche	malinche	102 pb	102	102	GCCTCCAGCATAGCTGGCTT	GAGTGTGATTTTGTGATG	39	39	39	39	39	1	1
Prober et al. (2001)	https://doi.org/10.1007/s11287-011-9212-0	<i>S. malinche</i>	malinche	malinche	102 pb	102	102	GCCTCCAGCATAGCTGGCTT	GAGTGTGATTTTGTGATG	39	39	39	39	39	1	1

Anexos 9. Especificidad y sensibilidad de los cebadores seleccionados

No. clones totales	Especificidad	Sensibilidad	DIANAS SONI	DIANA SONO* TOTALES
4	93%	1.0%		
83	100%	51.6%		
0	98%	86.6%		
0	99%	41.3%		
2	98%	90.1%	397	403
0	82%	26.6%	371	382
0	100%	57.8%	377	379