

COMUNICACIÓN CORTA

ESTANDARIZACIÓN DE UNA PRUEBA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE *Brucella sp.*

Carlos Padilla R¹, Ysabel Montoya P¹, Carlos Carrillo P²,

¹División de Biología Molecular. Instituto Nacional de Salud. Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

²Departamento de Microbiología. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

RESUMEN

Objetivo: Estandarizar una prueba de PCR para la detección de *Brucella spp.* **Materiales y métodos:** Se usó oligonucleótidos reportados que amplifican la secuencia de 16S rRNA de *Brucella spp.* Fueron evaluados dos métodos de extracción de ADN: fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y un kit comercial basado en columnas con afinidad. Para determinar la sensibilidad de la prueba se usó 8 cepas peruanas de *Brucella* y para determinar la especificidad de la prueba se usó otras cepas bacterianas peruanas de *E. coli*, *Shigella*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii* y *Vibrio cholerae*. **Resultados:** Los 2 métodos de extracción de ADN evaluados fueron efectivos. La sensibilidad analítica de la prueba es alta, lográndose detectar 80 femtogramos de ADN de *Brucella spp.* purificado. Todas las cepas peruanas de *Brucella spp.* fueron detectadas por la prueba. Además, la prueba es negativa para cepas peruanas de otras especies bacterianas. **Conclusión:** Se ha estandarizado las condiciones de una prueba de PCR para la detección de cepas peruanas de *Brucella spp.*, la cual es muy sensible y específica en el laboratorio.

Palabras clave: Reacción en Cadena de la Polimerasa; *Brucella*; ADN (Fuente: BIREME)

ABSTRACT

Objective: To standardize a PCR assay for detecting *Brucella spp.* **Materials and methods:** Reported primers targeted at the 16S rRNA gene of *Brucella* were used. Two DNA isolation methods were assessed: phenol-chloroform-isoamyl alcohol method and a commercial kit based on DNA affinity column. Eight Peruvian isolates of *Brucella spp.* were used to assess sensitivity and 7 different bacterial isolates, including *E. coli*, *Shigella*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii* and *Vibrio cholerae* were used to assess specificity. **Results:** Both DNA isolation methods were effective for DNA isolation. The analytical sensitivity of the test was high as we were able to detect at least 80 femtograms of purified DNA. All isolates of *Brucella spp.* were detected by the assay. Furthermore, the test was negative with 7 bacteria species evaluated in this study. **Conclusion:** The conditions of a PCR assay to detect Peruvian isolates of *Brucella spp.*, which has been shown to be very sensitive and specific in the laboratory have been standardized.

Key words: Polymerase Chain Reaction; *Brucella*; DNA (Source: BIREME)

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica adquirida por exposición directa a animales infectados o por el consumo de alimentos contaminados con *Brucella*¹⁻². En el Perú *Brucella melitensis* biotipo 1 causa 97,0% de los casos en el Perú³; por otro lado, en los últimos años 90,0% de los casos son registrados en Lima y la Provincia Constitucional del Callao. Los reportes obtenidos por el Programa Nacional de Control de Zoonosis señalan que en el año 2002 el número de casos fue de 2 566 (tasa: 10,61 x 100 000 hab).

Los procedimientos serológicos usados rutinariamente en el diagnóstico de brucelosis tanto para humanos como para animales muestran reactividad cruzada con ciertos enteropatógenos y otras bacterias como: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* y *E. coli*⁴⁻⁷. La causa de esta reactividad cruzada es la gran similitud del lipopolisacárido (LPS) presente en la superficie de estas bacterias.

Correspondencia: Carlos Padilla Rojas. División de Biología Molecular. Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Dirección: Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú. Teléfono: (511) 4719920 Anexo 129 Fax: (511) 4710179 Correo electrónico: cpadilla@ins.gob.pe

El diagnóstico más seguro es indudablemente el aislamiento de la bacteria por cultivo in vitro, sin embargo, este género es difícil de aislar, y su crecimiento es lento llegando a durar hasta 30 días⁸.

Proponemos que la reacción en cadena de polimerasa (PCR) puede ser aplicada en el Perú como una prueba complementaria para diagnóstico rápido, específico y sensible de esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS

Para la estandarización de esta prueba se utilizó una cepa referencial de *Brucella melitensis* Rev1 y una cepa referencial de *Brucella abortus*, estas cepas fueron obtenidas del cepario del Instituto Nacional de Salud. También se usó 8 aislamientos peruanos de *Brucella melitensis* colectadas en Lima, proporcionados por el Dr. Carrillo, UPCH. Además, las bacterias peruanas de las especies *E. coli*, *Shigella*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii* y *Vibrio*

cholerae fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud.

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADN genómico de las cepas de *Brucella*, previamente inactivadas durante 15 minutos a 100°C, fue purificado por 2 métodos.

Se empleó el método convencional de fenol y cloroformo como ha sido descrito previamente⁹. Los pellets bacterianos fueron resuspendidos en 1 mL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) y lisados por la incubación con 200 µg de lisozima y SDS al 1%. Luego, los restos proteicos fueron digeridos con 500 µg de proteinasa K a 65°C durante 1 hora. Posteriormente, las muestras fueron mezcladas con 1 volumen de fenol-cloroformo-álcohol isomilico (25:24:1) durante 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue colectado y mezclado con 2 volúmenes de cloroformo. Luego, el sobrenadante de las muestras fue colectado y el ADN fue precipitado usando 0,3 M de acetato de sodio y etanol absoluto frío. Finalmente, el ADN genómico fue resuspendido en 100 µL de agua tridestilada.

También se usó el *kit* comercial QIAamp Tissue kit (QiaGen Inc, Valencia, CA) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes¹⁰. Los pellet bacterianos fueron resuspendidos en la solución ATL, luego para provocar las lisis y digerir las proteínas se añadió 200 µg de Proteinasa K y la solución AL incubándose las muestras a 65°C por 1 hora. Luego de añadir etanol absoluto se colocó las muestras en las columnas de purificación. Después de lavados de las columnas, se eluyó el ADN genómico en 100 µL de agua tridestilada. La concentración y la pureza del ADN genómico purificado obtenido fueron calculados mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm⁹.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción fue realizada utilizando 50 nanogramos de ADN purificado, los oligonucleótidos F4 (5'-TCGAGCGCCCGCAAGGGG-3') y R2 (5'-AACCATAGT-

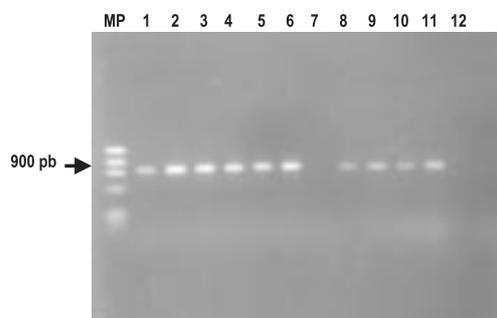


Figura N° 1. PCR para la detección de *Brucella*. Estandarización de concentraciones de cloruro de magnesio, carril 1: 1,5 mM, carril 2: 2 mM, carril 3: 2,5 mM, carril 4: 3 mM, carril 5: 3,5 mM, carril 6: 4 mM, carril 7: 0 mM; y estandarización de concentración de oligonucleótidos, carril 8: 0,5 µM, carril 9: 1 µM, carril 10: 1,5 µM, carril 11: 2 µM, carril 12: 0 µM. La concentración óptima de MgCl₂ es 2 mM y la de oligonucleótidos es 1 µM. MP: marcador de peso molecular φx174/*Hae*III (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

GTCTCCACTAA-3') dirigidos al gen 16S rRNA reportados previamente¹¹, ADN polimerasa termoestable (Amplitaq DNA Gold Polymerase, Perkin Elmer Inc), mezcla de nucleótidos a 200 µM, MgCl₂ a 2 mM y soluciones buffer adecuadas. El volumen final de cada reacción fue de 25 µL. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: una denaturación inicial de 95°C por 10 minutos; 30 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 54°C por 90 segundos, 72°C por 90 segundos; y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Se usó un termociclador modelo Perkin Elmer 9600 (Perkin Elmer Inc.). Los productos de amplificación fueron observados en geles de agarosa al 1%, coloreados durante 10 minutos en una solución de 2 µg/mL de bromuro de etidio y luego fotografiados.

RESULTADOS

Los 2 métodos de extracción analizados fueron eficientes para la purificación de ADN genómico, produciendo ADN en buena cantidad (entre 10 a 500 ng) y de buena calidad (con una proporción de OD₂₈₀/OD₂₆₀ entre 1,5 a 1,8). Se obtuvo un producto de amplificación de 900 pb usando ADN purificado de cepas referenciales de *B. melitensis* y *B. abortus*, conforme a lo reportado previamente y de acuerdo con el tamaño de la secuencia reportada del 16S rRNA de *Brucella*.

Las condiciones de la prueba de PCR fueron optimizadas con los equipos y reactivos disponibles; la concentración óptima de oligonucleótidos fue 1 µM, de ADN polimerasa fue 0,08 U/µL y de MgCl₂ fue 2 mM. Además la temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos fue 54°C.

Esta prueba de PCR presenta gran sensibilidad, llegando a detectar hasta 80 fg de ADN purificado de *Brucella*, el cual corresponde a 20 genomas de esta bacteria. La totalidad de la prueba puede ser realizada en 6 horas y permite obtener un resultado rápido en comparación con el cultivo.

La prueba fue positiva para 8 aislamientos peruanos de *B. melitensis* y no se obtuvo producto de amplificación cuando se evaluó en aislamientos peruanos de otras bacterias como *E. coli*, *Shigella*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii* y *Vibrio cholerae*.

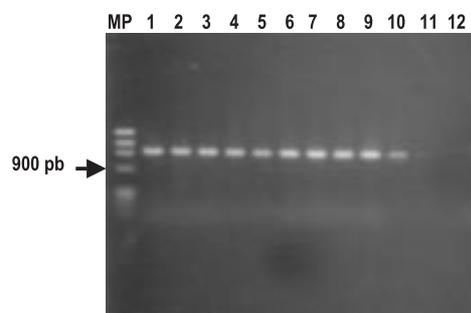


Figura N° 2. Sensibilidad de la prueba de PCR para la detección de *Brucella*. Carril 1: 200 ng, carril 2: 150 ng, carril 3: 100 ng, carril 4: 80 ng, carril 5: 8 ng, carril 6: 0,8 ng, carril 7: 80 pg, carril 8: 8 pg, carril 9: 0,8 pg, carril 10: 80 fg, y carril 12: 8 fg. MP: marcador de peso molecular φx174/*Hae*III (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

DISCUSIÓN

El desarrollo de pruebas de reacción en cadena de polimerasa constituye una importante alternativa para el diagnóstico de muchas enfermedades provocadas por bacterias de crecimiento lento. Diversas pruebas de PCR han sido diseñadas para la detección de *Brucella sp* en muestras clínicas¹¹⁻¹⁶. Sin embargo, la estandarización de estas metodologías constituye una etapa importante para su aplicación en el diagnóstico de la brucelosis.

Se recomienda el uso del *kit* comercial de extracción de ADN debido a su simplicidad, no utiliza reactivos corrosivos (como el fenol y cloroformo) y por la reproducibilidad de producción de ADN purificado.

Las condiciones óptimas de la prueba determinadas en este trabajo difieren de las condiciones reportadas previamente para estos oligonucleótidos¹¹, esto podría explicarse debido al uso de diferentes reactivos y equipos para la estandarización de esta prueba.

Nuestros resultados demuestran que estos oligonucleótidos reconocen cepas de *B. melitensis* peruanas, lo cual indica que esta prueba podría ser útil para el diagnóstico de la brucelosis en el Perú.

Este sistema de PCR detecta específicamente el género *Brucella*, no diferencia especies dentro del género, sin embargo, la identificación del género *Brucella* es adecuada para el diagnóstico de brucelosis humana¹³.

Una comparación realizada para los sistemas de PCR basados en el gen de la proteína de membrana externa omp-2¹⁴, el antígeno de 31 KDa de *Brucella abortus*¹⁵ y el gene de 16S rRNA^{11,16}, ha determinado que la prueba de PCR que hemos evaluado en este estudio es la más sensible para detectar *Brucella sp.* en sangre total¹⁷, sin embargo esta prueba puede ser inhibida por cantidades excesivas de ADN humano.

La aplicación de esta prueba de PCR, previa validación, acortaría el tiempo del diagnóstico para brucelosis. Esta prueba podría ser aplicada directamente a muestras sanguíneas, aspirados de médula, biopsias de hígado, líquido cefalorraquídeo, cultivos primarios de pocos días y alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Blga. Miluska Figueroa por su apoyo para la obtención de cepas bacterianas controles negativos y a la Técnica de Laboratorio Alida Navarro por su aporte técnico para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Taylor JP, Perdue JN. The changing epidemiology of human brucellosis in Texas, 1977-1986. *Am J Epidemiol* 1989; 130(1): 160-5.
2. Chomel BB, DeBess EE, Mangiamele DM, Reilly KF, Farver TB, Sun RK, Barrett LR. Changing trends in the epidemiology of human brucellosis in California from 1973 to 1992: a shift toward foodborne transmission. *J Infect Dis* 1994; 170(5):1216-23.
3. Gotuzzo E, Seas C, Guerra JG, Carrillo C, Bocanegra TS, Calvo A, et al. Brucellar arthritis: a study of 39 Peruvian families. *Ann Rheum Dis* 1987; 46(7):506-9.
4. Goicochea CE, Gotuzzo E, Carrillo C. Cholera-Brucella Cross-Reaction: A New Potential Diagnostic Problem for Travelers to Latin America. *J Travel Med* 1996; 3(1):37-9.
5. Kittelberger R, Reichel MP, Joyce MA, Staak C. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9. III. Specificity of the in vitro antigen-specific gamma interferon test for bovine brucellosis diagnosis in experimentally *Yersinia enterocolitica* 0:9-infected cattle. *Vet Microbiol* 1997; 57(4): 361-71.
6. Notenboom RH, Borczyk A, Karmali MA, Duncan LM. Clinical relevance of a serological cross-reaction between *Escherichia coli* O157 and *Brucella abortus*. *Lancet* 1987; 2(8561):745.
7. Corbel MJ. The relationship between the protective and cross-reacting antigens of *Brucella spp.*, *Yersinia enterocolitica* 0:9 and *Salmonella* serotypes of Kauffmann-White group N. *Contrib Microbiol Immunol* 1979; 5:50-63.
8. Mayer NP, Holcomb LA. *Brucella*. En: Murray PA, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1995. pp 549-555.
9. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. New York.
10. QiaGen Inc. QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA blood Mini Kit Handbook; January 1999.
11. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goñi I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol* 1995; 33(3): 615-17.
12. Garin-Bastuji B, Blasco JM, Grayon M, Verger JM. *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Vet Res* 1998; 29(3-4):255-274.
13. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol* 2002; 90(1-4):435-446.
14. Leal-Klevezas DS, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP. Molecular detection of *Brucella spp.*: rapid identification of *B. abortus* biovar I using PCR. *Arch Med Res* 1995; 26(3):263-7.
15. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* 1992; 95(4):271-5.
16. Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella spp.* by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(6):2099-101.
17. Navarro E, Escribano J, Fernandez J, Solera J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella spp* in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34(2):147-51.