

PCR multiplex' para diagnóstico de brucelosis, leptospirosis y neosporosis

Hismelda Rubí García-Bustamante¹., Irene Victoria Vitela-Mendoza ², María Leonor Valderrama-Cháirez³

¹Estudiante de Doctorado en Ciencias en Agrobiotecnología del ITTJ (Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco) km 10 carr. San Miguel Cuyutlan Municipio de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco Ap. Postal #12, CP 45640; ²Profesor Investigador del ITEL (Instituto Tecnológico de El Llano Aguascalientes) km 18 carr. Aguascalientes – San Luis Potosí Ap. Postal 74-2 CP 20041, ³, Profesor Investigador del CUCBA Universidad de Guadalajara Km 15.5 carr. Cuagalajara-Nogales, predio las agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco

Correo-e mvzrubi@gmail.com

Introducción

En la Republica Mexicana, la producción de carne y leche son una de las actividades pecuarias más importantes, ya que hay una gran demanda de productos cárnicos y lácteos por lo que esta actividad se realiza prácticamente en todo el territorio nacional. En la actualidad México ocupa el 11^o lugar en producción, cuenta con aproximadamente 28 millones de cabezas de ganado, incluyendo un millón de cabezas de ganado lechero, siete millones de ovinos y siete millones de caprinos. El 85 % de las importaciones de carne en México son de procedencia norteamericana, siendo México su primer mercado de importancia pues representa el 25% de sus exportaciones rompiendo record en los últimos 9 años y se estima que seguirá creciendo en corto y mediano plazo (SAGARPA 2006).

En el año del 2003 la producción nacional de ganado para carne fue de 29, 306, 931 cabezas. En el estado de Aguascalientes la producción en el año 2003 fue de 30, 202 cabezas. El 73.1% de la producción de leche Nacional en el 2004 la aportaron 9 entidades federativas entre ellas el estado Jalisco aportó 17.2% y Aguascalientes 4.1% (SAGARPA 2006).

En el ganado productor de carne al igual que el de leche, hay muchas enfermedades que merman la producción entre las mas importantes son las enfermedades reproductivas, ya que causan perdidas económicas fuertes, provocando además un efecto negativo en el programa de reposición de los animales a corto plazo (Vitela 2004). La infertilidad es la disminución o la ausencia de la capacidad de reproducir descendencia. El origen de los abortos desde el punto de vista clínico es de origen multifactorial aunque es posible agruparlos en dos tipos: infecciosos y no infecciosos, e donde los infecciosos son de tipo bacteriano, viral, parasitario y micótico; mientras que los no infecciosos son mas comúnmente por problemas genéticos, fallas nutricionales y mal manejo (Rivera y Zúñiga 2003). Las infecciones que reducen la ovulación, las proporciones de fertilidad, la supervivencia embrionaria, la supervivencia fetal o la supervivencia perinatal, es el resultado de infertilidad en las vaca. Los patógenos que afectan la reproducción son; *Leptospira*, *Campylobacter*, *Hemophilus*, *Brucella*, el herpes virus-1 bovino, el virus de diarrea viral bovino y *Neospora caninum*, entre otros. La infertilidad infecciosa puede prevenirse o controlarse con vigilancia

apropiada y vacunación (Givens 2006). La brucelosis bovina es una enfermedad infecciosa limitante del desarrollo ganadero así como una zoonosis de importancia mundial (OIE 2003), transmitida por bacterias del género *Brucella*. Se trata no solo de una zoonosis que se puede transmitir a través de la ingestión de productos lácteos contaminados y no pasteurizados, es también considerada una infección de riesgo ocupacional, incluida en la lista de las enfermedades profesionales debido a las actividades ocupacionales de alto riesgo como: atención de animales enfermos, la administración de vacunas a los animales, el trabajo en laboratorio y manipulación de productos, y subproductos y desechos como tejidos de excreciones de animales enfermos. Se controla en bancos de sangre y ha emergido en los últimos años en nuevas especies animales (Samartino 2002). En México, la incidencia de brucelosis en humanos alcanza un promedio de 5363 casos nuevos anuales durante el periodo de 1990 a 1997; de estos, hasta un 94,3% adquirió la infección como consecuencia de consumo de alimentos contaminados, especialmente leche cruda y quesos elaborados con leche no pasteurizada (SAGARPA 2006) Esta información refleja la importancia de la brucelosis bovina en comparación con otros orígenes de la enfermedad humana.

La Neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria provocada por *Neospora caninum*, un protozooario identificado en los últimos años y que afecta a una gran variedad de animales entre ellos al ganado, provocando abortos en el segundo y tercer tercio de la gestación, teniendo un impacto importante en los parámetros reproductivos y productivos del ganado bovino, es considerada actualmente como una de las principales causas de aborto en ganado lechero (Dubey 2006). En México, existe a la fecha escasa información acerca de la distribución de esta enfermedad en los hatos de ganado de carne mantenidos en pastoreo, y de la importancia que pueda tener como una de las causas principales de aborto y pérdidas de becerros al nacimiento; en la literatura se menciona que la presencia de este parásito afecta también la producción de leche y particularmente la ganancia diaria de peso en los becerros infectados (Barling *et al.* 2000). Por otra parte, se tiene información y evidencias que nos permiten conocer la presencia de *Neospora caninum* y su amplia diseminación por el país, particularmente en el ganado lechero (Morales *et al.* 2001; García *et al.* 2005). *Neospora caninum* se transmite generalmente al ganado por el contacto con ooquistes excretados por los perros y coyotes, el huésped definitivo, a través de las heces fecales, aunque frecuentemente se presenta también la transmisión vertical, de una vaca infectada a su cría dentro del útero (Dubey 2006).

La leptospirosis es una zoonosis emergente de distribución mundial con un comportamiento endémico. La infección presenta no sólo un problema con implicaciones epidemiológicas sino económicas y sociales (García *et al.* 2001). La presentación de la enfermedad es mas frecuente en regiones tropicales, sus principales reservorios son animales domésticos que infectan al hombre por exposición directa con tejidos, vísceras, secreciones de animales infectados, contacto con agua o suelos contaminados e incluso a través de heridas o piel intacta (Levett *et al.* 2001). La leptospirosis tiene como reservorio a los animales de vida libre (ratas, comadrejas, reptiles etc.), quienes actúan como portadores y eliminadores constantes por intermedio de la orina, contaminando el medio. En estos animales la bacteria puede persistir por

largos periodos en los túbulos renales, estableciendo una relación simbiótica, sin evidencias de enfermedad de enfermedades o cambios patológicos (Odriozola 2001).

El aborto bovino es un problema de gran impacto económico y un factor limitante del desarrollo ganadero en todos los países del mundo. Los agentes infecciosos con o sin tropismo por la membranas fetales y/o fetos son la *Leptospira*, *Brucella*, diarrea viral bovina, *Aspergillus* sp., y *N. caninum* etc. (Rivera y Benito 2004). El control epidemiológico de la brucelosis bovina tiene por objeto detener la propagación de la enfermedad, para ello la Organización Panamericana de Salud propone 3 medidas compulsorias que son: realizar diagnóstico mediante pruebas serológicas, aislamiento y marcado de reactores y sacrificio de reactores (OPS 2000), dicho objetivo sería alcanzado con mayor eficiencia si los diagnósticos se realizan utilizando metodologías con mayores índices de sensibilidad como es el PCR; de igual manera esta metodología puede ser aplicada en diagnóstico otras enfermedades que tiene impacto económico, social y de salud pública como lo son leptospirosis por ser una zoonosis de distribución mundial y Neospora, que aunque no una zoonosis representa pérdidas económicas cuantiosas a la industria de la ganadería en México.

Las enfermedades causantes de aborto como Leptospirosis, Brucelosis y Neosporosis bovina son reconocidas como infecciones causales de importantes pérdidas económicas en la industria de la carne y leche (Dubraska y Diaz 2005).

La PCR es de especial utilidad para el diagnóstico de infecciones y seguimiento de casos (Segura-Luque 2005); además la PCR Multiplex' se proyecta como una herramienta de diagnóstico muy útil en el futuro inmediato (Rivera 2007).

El objetivo general del presente trabajo es desarrollar un PCR múltiple y su evaluación como herramienta para el diagnóstico de brucelosis, leptospirosis y neosporosis de manera simultánea.

Materiales y Métodos

El presente trabajo se realiza en laboratorios de El ITde El Llano, Aqs. Mastitis y diagnóstico molecular, Toxicología y Salud Pública, de la Universidad de Guadalajara en colaboración con CENID-Microbiología Animal; que proporcionará la cepas de referencia utilizadas en el presente estudio, durante el periodo comprendido entre 2007 y 2009.

Se tomaron muestras de sangre de la vena caudal de 1900 vacas, se trasladaron al laboratorio en condiciones de refrigeración, para realizar la extracción de suero, y fueron mantenidos a -20° C, y posteriormente fueron sometidos a las pruebas de diagnóstico convencionales: tarjeta o rosa de bengala, Rivanol e Inmunodifusión Radial (IDR).

Se realizó un análisis bioinformático para monitorear los genomas de *Brucella* spp, *Leptospira* spp, y *Neospora caninum* en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Y posteriormente se realizó la selección y el diseño de oligonucleótidos de acuerdo a las características recomendadas (Sambrook y Russel 2001; Montiel 2002).

Para la selección de los iniciadores, cálculo de T_m y probar la posibles interacciones entre iniciadores, se utilizaron programas bioinformáticos (Mu-Plex (Universidad de Toronto), CLC Bio, y BLAST. Los iniciadores seleccionados que fueron se están sometiendo al análisis y evaluación bioinformática para desarrollo de la PCR múltiplex virtual.

El cultivo y conservación de las cepas de referencia se llevó a cabo en el CENID-Microbiología Animal. Se sembraron masivamente las cepas de los agentes etiológicos en placas de agar del medio bacteriológico, se dejaron incubando por 24 horas para su posterior tratamiento.

Para la obtención de ADN de cepas de referencia, se usaron cultivos bacterianos, se cosecha el cultivo con asa desechable estéril, y se deposita en un tubo de 1.5 ml para resuspenderlo en 1ml de TE., se homogeneizan utilizando métodos mecánicos. Se separarán las células por centrifugación a 10,000 rpm por tres minutos a 4°C, se desecha el sobrenadante, se resuspende el paquete en 500µl de de TE 10X, se adiciona Lisozima a una concentración final del 10mg/ml e incuba a temperatura ambiente por 10 minutos, se agrega 200 µl SDS al 10%. Se incuba la muestra en baño María a 65° C durante 15 minutos hasta que la solución se aclare. Para continuar con la extracción fenólica y se conserva a -20° C, hasta su posterior uso.

Cuantificación de ADN en este método se utiliza un espectrofotómetro en un rango de absorbancia de 260 nm a 280 nm.

Se realizó la infección experimental de muestras de alimentos (leche) para el consumo humano con bacterias y posteriormente la extracción de ADN con los protocolos descritos por Leal-Klevezas *et al*, (1999) y Sambrook, *et al*, (2001) con adecuaciones y modificaciones obteniendo datos de cuantificación mediante espectrofotometría a los cuales se les aplico un diseño estadístico.

Se realizarán ensayos y establecimiento de las condiciones de amplificación para estandarizar la técnica, usando ADN de cepas de referencia; y con un diseño experimental tomando en cuenta dos variables: tiempo y temperatura, esta última con dos niveles y comparación de medias por Duncan, tomando en cuenta la menor diferencia significativa. La evaluación de la sensibilidad y especificidad de la PCR multiplex' será mediante la detección de los agentes en muestras de fluidos de bovino y de alimentos para humanos infectados experimentalmente con diferentes diluciones de los microorganismos de interés y la inclusión de organismos íntimamente relacionados.

- Análisis de muestras: Las muestras que serán analizadas mediante el PCR multiplex' podrán ser: sangre, fluidos fetales y/o fetos abortados. Dichas muestras serán procesadas con los protocolos ya mencionados y sometidos al PCR multilex'.

- Muestreo y análisis de productos comerciales destinados al consumo humano, estos productos serán sometidos a la extracción de ADN y posteriormente al PCR multiplex'

Para la evaluación de especificidad y sensibilidad:

Se realizará un análisis de muestras infectadas experimentalmente utilizando diferentes diluciones e inclusión de agentes microbianos relacionados. Para la confrontación el muestreo y análisis se tomaran fluidos corporales de bovinos para someterlos la PCR múltiplex y pruebas convencionales Se realizará un muestreo y análisis de productos comerciales destinados al consumo humano que serán sometidos también a la PCR múltiplex y pruebas convencionales. Se confrontarán los resultados obtenidos por PCR múltiplex' contra los obtenidos por las pruebas convencionales y aprobadas por la norma oficial mexicana. Se realizara la confrontación de los resultados obtenidos mediante las pruebas convencionales y las pruebas de PCR múltiplex, utilizando un análisis estadístico.

Resultados y Discusión

Una vez analizadas las muestras de suero bovino se obtuvieron los resultados mostrados en el cuadro 1:

Cuadro 1. Diagnóstico de Brucelosis por pruebas serológicas.

| Prueba | Reactores | | Negativos | | Total |
|---------|-----------|-------|-----------|-------|-------|
| | Número | % | Número | % | |
| Tarjeta | 650 | 34.46 | 1236 | 65.54 | 1886 |
| Rivanol | 569 | 92.82 | 44 | 7.18 | 613 |
| IDR | 296 | 63.38 | 171 | 36.62 | 467 |

En la prueba de rivanol fueron analizadas solo los reactores a la prueba de tarjeta y así mismo en IDR solo los reactores a rivanol, y sin embargo se obtuvieron 36.62% y 7.18% negativos en las dos ultimas pruebas respectivamente por lo que las pruebas de diagnóstico serológicas son poco confiables como lo reporta Rivera en 2007.

Los protocolos de extracción de ADN evaluados fueron los descritos por Leal-Klevezas *et al* (1999) y Sambrook *et al* (2001) con adecuaciones y modificaciones obteniendo datos de cuantificación mediante espectrofotometría a los cuales se les aplico un diseño estadístico obteniendo los resultados que se muestran en el cuadro 2,

Cuadro 2. Concentraciones promedio de dos Protocolos de extracción de ADN

| MUESTRA | PROTOCOLO Sambrook, <i>et al</i> (2001) Concentración (µg/ml) | PROTOCOLO Leal-Klevezas <i>et al</i> (1999) Concentración (µg/ml) | DIFERENCIAS |
|------------|---|---|-------------|
| 1 | 450 | 562.5 | 112.5 |
| 2 | 1062.5 | 262.5 | 800 |
| 3 | 325 | 575 | 250 |
| 4 | 787.5 | 500 | 287.5 |
| 5 | 1462.5 | 137.5 | 1325 |
| 6 | 837.5 | 3750 | 2912.5 |
| 7 | 2037.5 | 287.5 | 1750 |
| 8 | 1075 | 662.5 | 412.5 |
| 9 | 400 | 725 | 325 |
| 10 | 925 | 475 | 450 |
| Sumatorias | 9362.5 | 7937.5 | 8625 |

Estimadores:

- Desviación Estándar: 890.556
- Valor de Fc= 3.062
- Valor de Ft= 2.262

Como $T_c > T_a$ Rechazamos H_0 por lo tanto con 95% de confianza el protocolo Sambrook, *et al*, (2001) y el protocolo de Leal-Klevezas *et al*, (1999) son diferentes estadísticamente, resultando mejor el protocolo Sambrook, *et al*, (2001)

Por el momento se cuenta con ADN de *Leptospira* (10 serovariedades) *Brucella abortus* (RB51 y S19) y *Neospora canunim*.

Agradecimientos

Se agraden al Dr. Francisco Morales Javier Carreón-Amaya, Juan Carlos Serratos-Arévalo, Hugo Castañeda-Vazquez, Ricardo Flores-Castro por las facilidades prestadas para la realización de dicho proyecto, así como colaboradores y participes del mismo y a las instituciones colaboradoras para la obtención de los resultados, ya que han sido un pilar importante en el inicio y desarrollo de dicho proyecto.

Bibliografía

Barling, K.S., Sherman, M., Peterson, M.J., Thompson, J.A., McNeill, J.W., Craig, T.M., Garry Adams, L., 2000. Spatial associations among density or cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. J. Am. Vet. Med. Assoc.

- Dubey, J. P., Schares, G.** 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 140: 1-34.
- Dubraska V. Díaz C.,** 2005. Manual de Ganadería Doble propósito. Leptospirosis, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia. Maracaibo, Venezuela.
- García, V. Z.** 2001. Diagnóstico y Epidemiología de la Neosporosis bovina. 1er. Simposio Nacional de Infertilidad en la vaca lechera. Zacatecas, Zac. México, Memorias, pp. 95-101.
- García-Vázquez Z, Rosario CR, Ramos AA, Cruz-Vázquez C, Mapes SG.,** 2005 *N. caninum* seropositivity and association with abortion in dairy cows in Mexico. *Vet Parasitol* (In Press).
- Givens-Daniel. M.,** 2006. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. Departments of Pathobiology and Clinical Sciences, 127 Sugg Laboratory, College of Veterinary Medicine, Auburn University, Auburn, AL 36849-5516, USA
- Levett P.** 2001 Leptospirosis, *Clin Microbiol Rev.* Am soc Microbiol; 2001, 14: 296-326.
- Morales SE, Trigo TF, Ibarra F, Puente E, Santacruz M.** 2001. Neosporosis in Mexican dairy herds: Lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. *J Comp Path*; 125: 58-63.
- Odrizoloa E.,** 2001. Leptospirosis Grupo de Sanidad Animal, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce INTA
- OIE** 2003. Clasificación OIE de las enfermedades. En: IE Disponible: <http://www.oie.int/esp/maladies/esclafication.htm>. 29marzo2007
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD.** 2000. Organización Mundial de la Salud, Centro Panamericana de Fiebre Aftosa .2000, Publicación N° 1PANAFTOSA/OPS/OMS.
- Rivera Ch., B. E.** 2007. Diagnóstico y epidemiología Molecular de Brucelosis. *En: IV Foro Nacional de Brucelosis. Memorias.* Suárez G., F (eds.). México, D.F. Noviembre 2007. FMVZ-UNAM.
- Rivera, J. H., Benito Z. A.** 2004. Manual de Etiología del aborto bovino Universidad Mayor de San Marcos, Lima Perú 189pp.
- Samartino L.** 2002. Brucelosis in Argentina. *Vet. Microbiol.* 90:71-80.
- Segura-Luque, J. C.** 2005. Servicio de Medicina interna. Hospital de Hellín. Albacete. Servicio de Salud de Castilla, La Mancha (SESCAM) España. Guías Clínicas; 5 (25).
- SIAP-SAGARPA, 2006.** Bovinos de carne. Población Ganadera por cabezas, 1990-2003. www.siap.sagarpa.gob.mx 16octubre2007

