



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

“Identificación de *Brucella abortus* mediante la técnica de qPCR y
el análisis HRM”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniera en Biotecnología

PRESENTA:

DANIELA OLIVIA LÓPEZ RIVERA

Director: Dr. José Abad Zavaleta



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

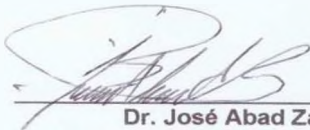
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 12 de noviembre de 2019 a las 17 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Identificación de *Brucella abortus* mediante la técnica de qPCR y el análisis HRM**" presentada por la alumna **Daniela Olivia López Rivera**, con número de matrícula 13090179, aspirante al título de **Licenciatura**.

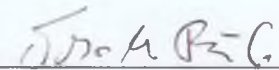
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 12 de noviembre de 2019


ATENTAMENTE LA COMISIÓN REVISORA



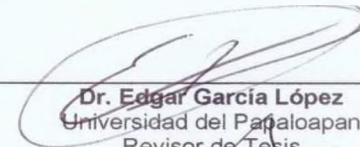
Dr. José Abad Zavaleta
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis



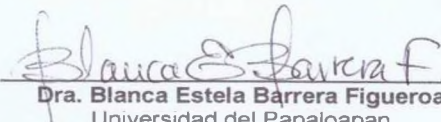
Dr. Julián Mario Peña Castro
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis




Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dr. Edgar García López
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 13 de noviembre de 2019
Oficio No. JCIB/002/11/2019

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Daniela Olivia López Rivera** titulado "**Identificación de *Brucella abortus* mediante la técnica de qPCR y el análisis HRM**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dr. Julián Mario Peña Castro (Presidente)
Dr. Miguel Ángel Peña Rico (Vocal)
Dr. Edgar García López (Secretario)
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa (Primer Suplente)
Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo (Segundo Suplente)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

*Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú*



Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan



c.c.p. Dr. José Abad Zavaleta, Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Daniela Olivia López Rivera, Alumna, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

HOJA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

AGRADECIMIENTOS

*A mi **Familia** porque su apoyo incondicional ha sido la base de todo en mi vida.*

Gracias infinitas...

*A mi director de tesis el **Dr. José Abad Zavaleta** por haberme brindado su confianza, por instruirme y asesorarme. Este logro es suyo también y sin su apoyo no hubiera sido posible. Muchas Gracias...*

*A mi profesor el **Dr. Miguel Ángel Peña Rico** por haberme apoyado y asesorado durante todo el proceso de mi tesis, por haberme brindado su amistad, por sus consejos y su motivación. Muchas Gracias...*

*Al **Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García, Dr. Julián Mario Peña Castro, Dr. Edgar García López, Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa y Dr. Víctor Meza Villalvazo** quienes compartieron sus conocimientos conmigo asesorándome y guiándome para una buena ejecución de mi trabajo. Muchas Gracias...*

*A todos mis **Profesores** quienes durante 5 años me enseñaron un poco de todo y que todo junto se convirtió en una gran montaña de conocimientos.*

Muchas Gracias...

*A mis **amigos, compañeros** de generación y **equipo del laboratorio de Biotecnología Animal** quienes conocen la magnitud del esfuerzo y sacrificios que se hacen para lograr egresar y titularte, porque sin momentos con ellos el proceso hubiera sido más agobiante. Muchas Gracias...*

*A **Javier Ibarra Martínez** por haberme brindado su apoyo y motivación durante todo este tiempo. Muchas Gracias...*

DEDICATORIA

*A mis padres **Olivia** y **Jerónimo** por haberme brindado su apoyo incondicional durante toda mi carrera y sobre todo a lo largo de mi vida, porque ni con dos vidas les pagaría todo el esfuerzo, sacrificios y corajes que les he costado.*

Gracias por la vida, ustedes son la mía.

*A mis Hermanas **Graciela** y **Gabriela** por creer que lo que hago es muy valioso, ellas son mi motivo de superación e inspiración porque quiero mostrarles que todo es posible si lo deseas y trabajas arduamente para conseguirlo. Son parte de mi fortaleza.*

*A **Dios** por permitirme la vida, darme sabiduría y paciencia.*

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Brucelosis en México	3
2.2 Etiología de <i>Brucella</i>	3
2.3 Patología de <i>Brucella</i>	6
2.4 Cuadro clínico y la enfermedad	7
2.5 Diagnóstico clínico	8
2.6 Pruebas moleculares para su detección	10
2.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa	11
2.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	12
2.7 Medidas de control y erradicación de la brucelosis	14
2.8 Normatividad y control de un hato infectado por el género <i>Brucella</i>	14
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo General	18
5.2 Objetivos Particulares	18
6. METODOLOGÍA	19
6.1 Estrategia experimental	19
6.2 Toma de muestra	20
6.3 Obtención de controles positivos y negativos	20
6.4 Extracción de ADN genómico y bacteriano.	20
6.5 Verificación y Cuantificación de ADN bacteriano extraído.	21
6.6 Análisis y búsqueda bioinformática	21
6.7 Amplificación de las muestras de ADN bovino	22

6.8 Análisis HRM (High Resolution Melt Analysis).....	23
6.9 Secuenciación.	24
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
7.1 Análisis de integridad del ADN bovino.	25
7.2 Amplificación del gen <i>GLK</i> en muestras de ADN bovino por medio de qPCR.	25
7.3 Secuenciación	33
7.4 Análisis de alta resolución de las curvas de disociación (High Resolution Melt Analysis). ...	36
8. CONCLUSIONES	40
9. PERSPECTIVAS	41
10. BIBLIOGRAFIA	42
11. ANEXOS.....	46
Anexo 1. Secuencia del gen <i>GLK</i>	46
Anexo 2. Blast y electroferogramas de las muestras secuenciadas	48

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de Brucella. El LPS-S de las formas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO).</i>	6
<i>Figura 2. Corrimiento electroforético de ADN genómico de sangre bovina en geles de agarosa al 1%.</i>	25
<i>Figura 3. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2% de PCR punto final de gradientes de temperatura para la amplificación del gen GLK de B. abortus usando como molde ADN genómico de sangre bovina.</i>	26
<i>Figura 4. Curvas de amplificación mediante qPCR, empleando el gen GLK de B. abortus, como molde ADN genómico de sangre bovina y SYBR Green como fluoróforo.</i>	27
<i>Figura 5. Curvas Melt de las muestras representativas.</i>	31
<i>Figura 6. Curvas de amplificación por qPCR para la detección del gen GLK de B. abortus usando como molde ADN genómico de sangre bovina de las muestras representativas.</i>	32
<i>Figura 7. Corrimiento electroforético en geles de agarosa al 2% con productos de PCR punto final del gen GLK de B. abortus usando como molde ADN genómico de sangre bovina.</i>	32
<i>Figura 8. Multialineamiento de muestras de ADN secuenciadas, mostrando en colores los cambios de base de cada secuencia con respecto al control positivo.</i>	34
<i>Figura 9. Alineamiento de la secuencia del control positivo.</i>	35
<i>Figura 10. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen GLK de B. abortus, del control positivo y muestras de ADN de sangre bovina.</i>	37
<i>Figura 11. Alineamiento de la muestra "M2".</i>	48
<i>Figura 12. Electroferograma de la muestra "M2".</i>	48
<i>Figura 13. Alineamiento de la muestra "M4".</i>	49
<i>Figura 14. Electroferograma de la muestra "M4".</i>	49
<i>Figura 15. Alineamiento de la muestra "M6".</i>	50
<i>Figura 16. Electroferograma de la muestra "M6".</i>	50
<i>Figura 17. Alineamiento de la muestra "M9".</i>	51
<i>Figura 18. Electroferograma de la muestra "M9".</i>	51
<i>Figura 19. Alineamiento de la muestra "M10".</i>	52

Figura 20. Electroferograma de la muestra "M10"52

Figura 21. Alineamiento de la muestra "M12"53

Figura 22. Electroferograma de la muestra "M12"53

Figura 23. Alineamiento de la muestra "M13"54

Figura 24. Electroferograma de la muestra "M13"54

Figura 25. Alineamiento de la muestra "M5"55

Figura 26. Electroferograma de la muestra "M5"55

Figura 27. Alineamiento de la muestra "M14"56

Figura 28. Electroferograma de la muestra "M14"56

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Especies que integran el género Brucella, hospedadores conocidos y características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades</i>	<i>5</i>
<i>Tabla 2. Huéspedes, especies de Brucella, vía de transmisión y patogenicia.....</i>	<i>8</i>
<i>Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para detectar B. abortus.</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 4. Protocolo de la mezcla de reacción NZY qPCR Green Master Mix</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 5. Condiciones de PCR y qPCR.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 6. Correlación de resultados del análisis por qPCR para la detección del gen GLK de B. abortus en muestras de ADN de sangre bovina obtenidas del Laboratorio Centro de Salud Animal de la Unión Ganadera Regional del Norte de Oaxaca, con resultados de la prueba serológica rosa de bengala.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 7. Valores de temperatura melting (Tm) y ciclo threshold (CT) de las muestras representativas.....</i>	<i>31</i>

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Adenosín monofosfato
<i>B. abortus</i>	<i>Brucella abortus</i>
<i>B. canis</i>	<i>Brucella canis</i>
<i>B. maris</i>	<i>Brucella maris</i>
<i>B. melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
<i>B. neotomae</i>	<i>Brucella neotomae</i>
<i>B. ovis</i>	<i>Brucella ovis</i>
<i>B. suis</i>	<i>Brucella suis</i>
<i>B. spp</i>	<i>Brucella sin especie</i>
CFSPH	<i>The center of Food Security and Public Healt</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
g	Fuerza centrífuga relativa
GMP	Guanosín monofosfato
GLK	Gen codificante de la proteína Glucokinasa
HRM	Análisis de alta resolución de fusión
LPS	Lipopolisacárido
LPS-R	Lipopolisacárido rugoso
LPS-S	Lipopolisacárido liso
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
OIE	Organización mundial de sanidad animal
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrogeno
PSO	Polisacárido O
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
s	Segundo
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
Tm	Temperatura media
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPP	Unidades de producción pecuaria
μM	Micrómetros
μL	Microlitro

RESUMEN

Brucella abortus es una bacteria patógena gram negativa que afecta directamente al ganado bovino desde el punto de vista reproductivo y productivo, causando pérdidas económicas en el sector ganadero. La identificación de enfermedades, en específico las generadas por las especies del género *Brucella* sigue siendo un gran desafío por el alto grado de homología que comparten todas ellas en sus genomas. De tal manera, con el objetivo de generar un método de diagnóstico molecular capaz de identificar la especie *Brucella abortus* del género *Brucella* se planteó utilizar técnicas moleculares como la qPCR en conjunto con el análisis HRM, así como la secuenciación de las muestras positivas para verificar los resultados. En este estudio se utilizaron 82 muestras de sangre de ganado bovino como probables sospechosos de infección por *Brucella abortus*. Como control positivo se empleó ADN de la cepa vacunal RB51, como control negativo se usó ADN de *Bacillus thuringiensis* y la mezcla de reacción sin ADN. Mediante qPCR se amplificó un fragmento del gen *GLK*, un gen conservado para dicha especie. Se amplificaron 45 muestras de ADN bovino de las cuales, se eligieron 10 muestras al azar, incluyendo al control positivo, para estudiar los posibles cambios de base se empleó el análisis HRM con un aumento de temperatura de 0.3°C dentro de un rango de 60°C a 95°C utilizando como agente intercalante a SYBR Green, con un aumento de temperatura de 0.3°C dentro de un intervalo de 60°C a 95°C. Los productos de PCR fueron secuenciados para verificar si el segmento amplificado correspondía al esperado. Se identificó la especie *Brucella abortus* en 8 de las 10 muestras, así mismo los primers permitieron identificar a *Brucella melitensis* en una de estas, pudiendo ser diferenciadas mediante el análisis HRM debido al patrón de curvas melting de cada especie identificada, dichos resultados fueron corroborados mediante secuenciación. La secuenciación permitió determinar que el número de cambios de base encontrados en una secuencia es proporcional al cambio en su curva de disociación, es decir entre más cambios de base se observan mayor será la diferencia en la curva de disociación con respecto al control y por ende una mayor probabilidad de que se trate de una especie o cepa diferente. En conjunto los resultados demuestran que la metodología propuesta en este trabajo puede ser utilizada para la identificación específica de *Brucella abortus* y distinguir entre cepas o especies.

Palabras clave: ***Brucella abortus*, Bovino, qPCR, HRM.**

ABSTRACT

Brucella abortus is a pathogenic gram-negative bacterium. It affects directly cattle in reproductive and productive aspects. It causes economic losses. Identification of diseases, specifically caused by *Brucella* genus remains a great challenge due to the high degree of homology in their genomes. In order to generate a molecular diagnostic method capable of identifying the abortus species of *Brucella* genus, we have proposed to use molecular techniques such as qPCR in conjunction with the HRM analysis, as well as the sequencing of the positive samples to verify results. In this study, 82 blood samples from cattle were used as probable suspects of *Brucella abortus* infection. DNA of the vaccine strain RB51 was used as a positive control, *Bacillus thuringiensis* DNA and the reaction mixture without DNA were used as a negative control. A fragment of the *GLK* gene, was amplified by qPCR. 45 samples of bovine DNA were amplified, 10 of them were chosen randomly, including the positive control, in order to get the possible base changes HRM analysis was used with a temperature increase of 0.3 ° C within a range of 60 ° C to 95 ° C using SYBR Green as an intercalating agent, with a temperature rise of 0.3 ° C within a range of 60 ° C to 95 ° C. PCR products were sequenced to verify if the amplified segment corresponded to that expected. *Brucella abortus* was identified in 8 of the 10 samples, likewise the primers allowed to identify *Brucella melitensis* in one of them, being able to be differentiated by HRM analysis due to the pattern of melting curves of each identified species, these results were corroborated by sequencing. Sequencing allowed us to determine that the number of base changes found in a sequence is proportional to the change in its dissociation curve, that is, the more base changes observed, the greater the difference in the dissociation curve with respect to the control and therefore a higher probability that it is a different species or strain. Results showed that the methodology proposed in this work can be used for the specific identification of *Brucella abortus* and distinguish between strains or species.

Keywords: ***Brucella abortus*, Bovine, qPCR, HRM.**

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un gran número de patologías infecciosas causadas por bacterias que afectan al ganado bovino, que son limitantes para el desarrollo ganadero y que impactan negativamente en la productividad agropecuaria del país (Aguilar Romero *et al.*, 2011). Entre estas enfermedades, destaca la brucelosis que ocasiona graves pérdidas por fallas reproductivas, así como por las restricciones normativas aplicadas tanto a los animales infectados como a los productos de éstos. Esta enfermedad es considerada la zoonosis bacteriana más importante en México (Aguilar Romero *et al.*, 2011).

La brucelosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Brucella spp.* que son cocobacilos gram negativos, inmóviles y aerobios estrictos que afectan al ser humano, así como a diferentes especies de animales domésticos y silvestres. Se trata de parásitos intracelulares facultativos, que pueden resistir en las células fagocitarias y se encuentran ubicadas en la lista B de la OIE (Organización mundial de sanidad animal) donde se enumeran enfermedades transmisibles que son importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario a nivel mundial y cuyas repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal son considerables (OIE, 2019).

A la fecha, se conocen 10 especies de *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. maris*, y recientemente descubiertas, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, y *B. microti*, de las cuales sólo las cuatro primeras son zoonóticas y se transmiten directa o indirectamente a los humanos por el bovino, cabra, cerdo y perro, respectivamente. Estos pequeños cocobacilos comparten más del 90% de homología en sus secuencias de ADN entre todas sus especies (Winchell *et al.*, 2010).

Al ser del mismo género, todas las especies de *Brucella* comparten similitudes genómicas, sin embargo, cada una de las especies tienen regiones conservadas que las hace diferentes, incluso entre la misma especie existen diferencias genómicas, originándose así las biovariedades o cepas las cuales suelen ser características del lugar donde se aíslan.

En los últimos años se han descrito varias estrategias moleculares para la identificación y diferenciación entre biotipos y especies de bacterias. Entre estas, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), que permite diferenciar entre especies de un mismo género pero además permite obtener valores cuantificables de la concentración de ácidos nucleicos en cuestión (Reed *et al.*, 2007). Por otro lado, el análisis HRM actualmente ha cobrado relevancia en el área del diagnóstico clínico debido a su gran sensibilidad en detección y diferenciación de bacterias, en el genotipado, la exploración de mutaciones, y la coincidencia de secuencia sin necesidad de sondas marcadas (Reed *et al.*, 2007).

Estas dos técnicas moleculares podrían permitir la detección del género *Brucella* o de algunas de sus especies, dada la urgencia del sector agropecuario, debido a las deficiencias con las que se cuenta actualmente para diagnosticar un hato contaminado por brucelosis, o para conocer la posible contaminación de alguna muestra en particular.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue generar un método de diagnóstico molecular de ADN, que permita la identificación y diferenciación de la especie *Brucella abortus*, debido a su alta patogenicidad y las repercusiones que ocasiona al infectar al ganado bovino, de tal forma que su empleo pueda ser, rápido, económico y confiable.

2. ANTECEDENTES

2.1 Brucelosis en México

Las patologías ocasionadas por infecciones debidas a microorganismos tienen un impacto negativo en la productividad del sector agropecuario en México. La brucelosis destaca entre estas por ocasionar grandes pérdidas por fallas reproductivas. Esta enfermedad es causa de la zoonosis bacteriana más importante en México, cuya prevalencia varía entre regiones, debido a que casi todas las especies de animales domésticos presentan una especie de *Brucella* diferente y son capaces de cambiar de hospederos dada su capacidad de mutación dando como resultado un gran número de variedades de cepas aisladas para este género bacteriano.

En el territorio nacional, la mayor incidencia de brucelosis bovina se observa en el ganado estabulado y en áreas de alta densidad animal, como son las zonas centro, sureste y costeras. La brucelosis caprina (*Brucella melitensis*) tiene una distribución más amplia ya que se le puede encontrar en todo el territorio nacional, la mayor frecuencia se registra en aquellas entidades con gran concentración de cabras: Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Tamaulipas, Guanajuato, Michoacán, Estado de México, Querétaro y San Luis Potosí (Martinez Morellano, 2014).

En el caso de los ovinos (*Brucella ovis*) a pesar de que su participación en la infección en humanos se considera mucho menor a la de bovinos y caprinos, la presencia de brucelosis se ha asociado con el 13% de aumento en la tasa de incidencia en humanos (Méndez-Lozano *et al.*, 2015).

2.2 Etiología de *Brucella*

Brucella es una bacteria gram negativa, con forma microscópica de cocobacilos de 0.5 a 0.7 μm de diámetro y de 0.5 a 1.5 μm de largo. No produce cápsula ni esporas y tampoco posee movilidad. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C a un pH de 6.6 a 7.4. Es aeróbica estricta tiene un transporte de electrones basado en citocromos y utiliza el oxígeno o el nitrato como aceptor final de electrones. Es catalasa positiva y a pesar de ser considerada un organismo estricto por sus requerimientos, en el cultivo puede crecer en medios nutritivos mínimos, tratándose de un patógeno intracelular "facultativo" (Castro *et al.*, 2005; Sbriglio *et al.*, 2007).

El género *Brucella* ha sido clasificado en base a la patogenicidad y al hospedero en diferentes especies, *Brucella melitensis*, *Brucella. abortus*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Brucella neotomae*, *Brucella maris* y *Brucella ovis*, *Brucella ceti*, *Brucella pinnipedialis*, y *Brucella microti*. De estas especies sólo las primeras cuatro son capaces de infectar al hombre. Las especies mencionadas tienen reservorios específicos, así como patogenicidad y virulencia diferente. Hay que señalar que no se ha demostrado la infección entre seres humanos y que no se conoce por completo todos los reservorios (Sbriglio *et al.*, 2007).

Sin embargo, se ha reportado que *Brucella melitensis* es capaz de infectar no solo al ganado caprino el cual es su principal hospedero sino también al ganado bovino, siendo esto una limitante al enfocarse en identificar solo una especie de *Brucella* en el ganado bovino (Doosti & Dehkordi, 2011).

En la tabla 1, se muestran las características antigénicas y bioquímicas, que permiten clasificar a las especies de *Brucella* y sus biotipos.

Tabla 1. Especies que integran el género *Brucella*, hospedadores conocidos y características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades. A y M: configuraciones alternativas del PSO, R: LPS de las cepas rugosas.

Especie	Hospedador	Biotipo	Producción de H ₂ S	Necesidad de CO ₂	Sensibilidad a colorantes		Agglutinación c/sueros monoespecíficos		
					Tirosina	Fucsina	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	Cabras, bovinos	1	-	-	+	+	-	+	-
	Ovino, cánidos,	2	-	-	+	+	+	-	-
	Hombre	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	Bovinos	1	+	+	-	+	+	-	-
	Cánidos, hombre	2	+	+	-	-	+	-	-
		3	+	+	+	+	+	-	-
		4	+	+	-	+	-	+	-
		5	-	-	+	+	-	+	-
		6	-	-	+	+	+	-	-
		7	+	-	+	+	+	+	-
		8	-	+	+	+	+	+	-
		9	+	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	Cerdos, cánidos	1	-	-	+	-	+	-	-
	Hombre	2	-	-	+	-	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	-	-
		4	-	-	+	-	+	+	-
		5	-	-	+	-	-	+	-
<i>B. canis</i>	Cánidos, hombre		-	-	+	-	-	-	+
<i>B. neotomae</i>	Roedores		+	-	-	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	Ovinos		-	+	+	-	-	-	+
<i>B. maris</i>	Focas, leones marinos, delfines, ballenas.								

Fuente: Castro *et al.* (2005).

La composición de la membrana externa de *Brucella* es rica en LPS, el cual es su componente más abundante y mejor estudiado. El LPS también se conoce con el nombre de endotoxina. En él se distinguen tres regiones: el lípido A, inserto en la hoja externa de la membrana, un oligosacárido intermedio llamado núcleo y el polisacárido O (PSO) también conocido como cadena O, ausente o presente con pocos residuos en el LPS-R (Figura 1) (Castro *et al.*, 2005)

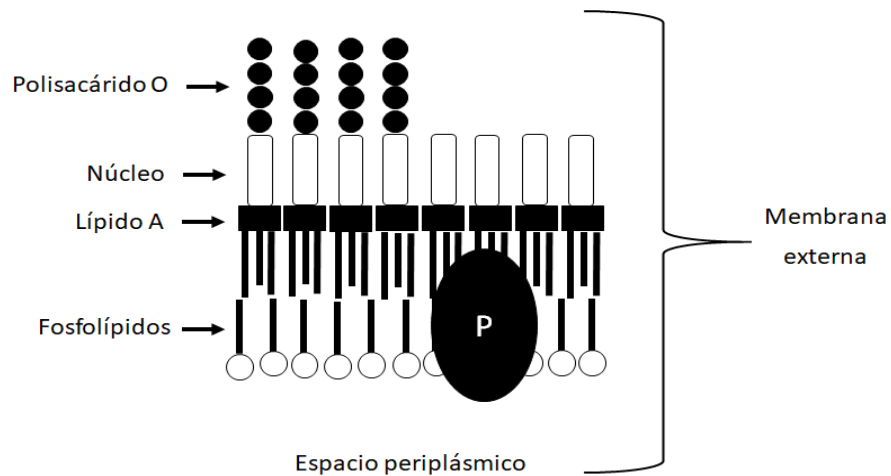


Figura 1. Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de *Brucella*. El LPS-S de las formas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO). El LPS-R de las formas rugosas carece de cadena O está reducida a muy pocos residuos. P: Proteína. Fuente: Imagen tomada de Castro et al. (2005).

Con base al aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella* se clasifican habitualmente como lisas (S) o rugosas (R). Dentro de las primeras se encuentran *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella neotomae* y dentro de las segundas *Brucella ovis* y *Brucella canis*. El aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión del lipopolisacárido LPS en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas, aunque durante su crecimiento en los medios de cultivo pueden experimentar mutaciones que afectan la expresión del LPS (Castro et al., 2005).

Las cepas de *Brucella* en fase lisa son las más virulentas y su ultraestructura es semejante a la de algunas enterobacterias lo cual dificulta su identificación (*Yersinia enterocolítica*, *Salmonella landau*, *Pseudomona maltophilia*, *Escherichia coli*), aunque presenta ciertas diferencias en las características de su membrana externa (Corbel et al., 1984).

2.3 Patología de *Brucella*

Los animales infectados son la principal fuente de dispersión de la bacteria, siendo las secreciones genitales o mamarias el principal vehículo de contaminación. *Brucella* tiene la capacidad de adherirse y penetrar las conjuntivas o la piel lesionada de humanos, luego es fagocitada por

neutrófilos y por monocitos, sobreviviendo intracelularmente, de esta manera evade los mecanismos de defensa celulares y humorales (Sbriglio *et al.*, 2007).

Y además de permitirle desarrollarse dentro de estas células, si los linfocitos T Helper o ayudadores tipo 1 en conjunto con macrófagos no eliminan a las células infectadas, estas llegarán por vía linfática a los ganglios regionales y de ahí penetran al sistema circulatorio, en donde son fagocitadas por los macrófagos y polimorfonucleares y son transportadas a los órganos del cuerpo humano, en los cuales pueden continuar multiplicándose a través de los fagocitos tisulares (Salhi *et al.*, 2003).

2.4 Cuadro clínico y la enfermedad

El cuadro clínico y la evolución de la infección varían en función de la especie animal afectada. En los mamíferos rumiantes y en el ganado porcino la manifestación clínica es el aborto. En el ser humano presenta una gran tendencia a la cronicidad que se caracteriza por fiebre y localización de las bacterias en distintos tejidos (articulaciones, hueso, endocardio y sistema nervioso) (Castro *et al.*, 2005).

En el ganado bovino, *Brucella abortus* causa abortos y mortinatos; los abortos suelen producirse durante la segunda mitad de la gestación. Algunos terneros nacen débiles y pueden morir poco tiempo después de nacer. Además de retención de placenta y metritis secundaria (CFSPH, 2013).

Después del primer aborto, existe una disminución del período de lactancia, las preñeces posteriores suelen ser normales; aun así, las vacas pueden excretar a el microorganismo en la leche y en las descargas uterinas. Algunas veces se observan epididimitis, vesiculitis seminal, orquitis o abscesos testiculares en los toros. La infertilidad ocurre en ambos sexos debido a la metritis o a la orquitis/epididimitis (CFSPH, 2013).

Se puede producir artritis en algunas infecciones prolongadas. Los síntomas sistémicos no suelen aparecer en infecciones sin complicaciones, y las muertes son poco comunes, excepto en el feto o el neonato. Normalmente, la enfermedad es asintomática en hembras no gestantes. En los camellos, bisontes, búfalos de agua, borregos muflones y otros rumiantes, los síntomas se asemejan a los del ganado bovino. También se han informado abortos en llamas infectadas de manera experimental. Otros animales herbívoros pueden contraer formas más graves de la

enfermedad, por ejemplo los alces mueren rápidamente en las infecciones experimentales (Mantur *et al.*, 2007).

La mayoría de los autores consideran el desarrollo de dos fases en la enfermedad: la aguda y la crónica. La etapa aguda se manifiesta con fiebre elevada, escalofríos, sudoración, dolores musculares y articulares. Es difícil la identificación de la enfermedad en esta etapa, ya que los signos y síntomas pueden ser comunes a otras enfermedades como la salmonelosis, fiebre tifoidea, tuberculosis y leptospirosis (Castro *et al.*, 2005).

En la tabla 2, muestra un resumen de los hospederos de las especies de *Brucella*, su vía de transmisión y la patogenicidad que desencadenan en cada huésped.

Tabla 2. Huéspedes, especies de *Brucella*, vía de transmisión y patogenicidad

Huésped	Especie de <i>Brucella</i>	Vía de transmisión	Patogenicidad
Bovinos	<i>B. abortus</i>	Oral, nasal y conjuntival	Abortos. Orquitis. Epididimitis. Ocasionalmente artritis
Cerdos	<i>B. suis</i>	Oral y genital	Abortos. Esterilidad. Orquitis
Ovinos	<i>B. ovis</i>	Genital	Abortos. Epididimitis
Perros y otros cánidos	<i>B. melitensis</i>	Oral y genital	Abortos. Esterilidad. Epididimitis. Dermatitis escrotal
	<i>B. abortus</i>		
	<i>B. canis</i> y <i>B. suis</i>		
Humanos	<i>B. melitensis</i>	Inoculación	Fiebre aguda e intermitente.
	<i>B. abortus</i>	conjuntival.	Adenopatías.
	<i>B. canis</i>	Inhalación.	Hepatoesplenomegalia.
	<i>B. suis</i>	Cutánea. Digestiva.	Complicaciones osteoarticulares

Fuente: Castro *et al.* (2005).

2.5 Diagnóstico clínico

Actualmente existen diversas técnicas para diagnosticar la presencia de *Brucella*, como los cultivos bacterianos, las pruebas serológicas o moleculares.

El examen microscópico de frotis de tejidos teñidos por el método de Ziehl-Neelsen modificado por Stamp *et al.* (1950) permite un diagnóstico presuntivo sobre la morfología de las bacterias, pero por sí solo este examen da resultados certeros, comúnmente se utilizan pruebas serológicas para respaldar el examen microscópico e identificar a *Brucella*. Sin embargo, las especies de *Brucella* no son verdaderamente ácido-alcohol resistente es decir que no siempre se obtienen

resultados favorables y verdaderos ya que no sufren decoloración con ácidos débiles, y se tiñen de rojo sobre un fondo azul, por tal motivo esta prueba no es concluyente. Los miembros de la familia *Brucella* son cocobacilos o bacilos cortos, dispuestos de manera aislada y algunas veces en pares o pequeños grupos, aunado a esto existen microorganismos como *Chlamydomphila abortus* y *Coxiella burnetii* que pueden semejarse a la morfología de *Brucella* dando resultados falsos positivos. Así mismo, se ha empleado la inmunotinción para identificar *Brucella* en los frotis (Mantur *et al.*, 2007).

Se puede utilizar la serología para obtener un diagnóstico presuntivo de la brucelosis o para controlar los hatos ganaderos. Las pruebas serológicas utilizadas para examinar hatos y animales individuales incluyen pruebas del antígeno *Brucella* tamponado (la prueba de rosa de Bengala y la prueba de aglutinación en placa con antígeno tamponado), fijación del complemento y los ensayos indirectos o competitivos con sustancias inmuoabsorbentes ligadas a enzimas (ELISA) (Mantur *et al.*, 2007).

En México, el diagnóstico de la brucelosis se basa en la detección de anticuerpos por métodos serológicos, existen laboratorios aprobados por la SAGARPA para el diagnóstico de la enfermedad a partir de muestras de suero sanguíneo, leche, líquidos corporales y de tejidos en las que se realizan pruebas inmunológicas y estudios bacteriológicos aprobados por SAGARPA. En el caso de las pruebas serológicas, estas solo podrán ser realizadas en los laboratorios aprobados (Aguilar Romero *et al.*, 2011).

La prueba de tarjeta o rosa de bengala es una de las pruebas oficiales que se realizan al ganado en México para detectar brucelosis y consiste en confrontar el suero problema con el antígeno de *B. abortus* cepa 1119-3 a una concentración de 8% para el diagnóstico en bovinos y de 3% en caprinos. Con esta prueba se detecta la presencia de anticuerpos circulantes de IgG e IgM de origen vacunal o debidos a infecciones naturales. Esta prueba es de rutina y tiene buena sensibilidad dando resultados con pocos o ningún animal falso negativo; además es sencilla, económica y práctica. Sin embargo, existe el riesgo de dar resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con bacterias como *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia* y *Pseudomonas* (Aguilar Romero *et al.*, 2011).

La prueba de precipitación con rivanol (RIV), detecta anticuerpos específicos IgM y otras macroglobulinas contra cepas lisas de *Brucella*. No obstante solo se lleva a cabo cuando la prueba rosa de bengala o prueba de tarjeta resulta positiva, por lo que se considera una prueba complementaria cuantitativa (Mejía Martínez & Lemus Flores, 2012).

Actualmente, se sugiere el uso de los ensayos ELISA para confirmar los resultados de las pruebas mencionadas anteriormente, el ELISA permite detectar la presencia de los anticuerpos específicos que se seleccionen (IgG, IgM o IgA), con unos valores altos de sensibilidad y especificidad. El antígeno absorbido sobre placas de poliestireno es el lipopolisacárido de *Brucella* en fase lisa. Los anticuerpos IgM, por su rápida desaparición son valorables, pero no puede olvidarse que los anticuerpos IgG pueden persistir en sujetos curados. Aunque este ensayo permite conocer con una mayor precisión del perfil de las inmunoglobulinas en el curso de la enfermedad, no ofrece la posibilidad de establecer un criterio para discernir entre un animal en proceso de curación o una evolución a cronicidad (Mejía Martínez & Lemus Flores, 2012).

Un diagnóstico definitivo puede obtenerse si se cultiva *B. abortus* de un animal. Se puede aislar *Brucella spp.* en diversos medios comunes o selectivos tales como el medio de Farrell o el medio de Thayer-Martin. Las colonias de *Brucella* suelen ser visibles después de dos días de incubación. A los cuatro días, las colonias son redondas, con un diámetro aproximado de 1 a 2 mm y con bordes lisos. Cuando se observan las placas a la luz del día a través de un medio transparente, las colonias son translúcidas variaciones y aparecen formas rugosas. En la tinción con cristal violeta, las colonias rugosas se tiñen de rojo y las colonias lisas se tiñen de color amarillo pálido *B. abortus* se puede identificar a nivel de especie y biovariedades mediante la tipificación con bacteriófagos y por sus características serológicas, bioquímicas y de cultivo, sin embargo este tipo de diagnóstico suele ser muy tardado, laborioso y costoso, además se requiere de personal altamente capacitado debido al alto riesgo de infección al trabajar con este tipo de bacterias patógenas (Mantur *et al.*, 2007).

2.6 Pruebas moleculares para su detección

La brucelosis se caracteriza por presentar un gran repertorio de métodos de diagnóstico, sin embargo, algunos de ellos son inespecíficos, laboriosos o que implican tiempo de espera muy

largo para el diagnóstico. De ahí la necesidad de elaborar métodos rápidos, de fácil ejecución, exactos y precisos, que identifique a los animales positivos y que permita diferenciar infectados, de vacunados. Se han desarrollado varias pruebas confirmatorias con el propósito de eliminar o disminuir reacciones inespecíficas. La aplicación de métodos de diagnóstico directo como el cultivo bacteriológico, reconocido como “pruebas de oro” para el diagnóstico de las infecciones bacterianas, limitan su aplicación en esta infección, dada su alta exigencia de recursos de laboratorio, tiempo y personal especializado; lo cual la colocan en desventaja frente otros métodos. El desarrollo de técnicas de biología molecular con un alto grado de sensibilidad y especificidad (PCR, RFLP) para detectar y amplificar secuencias específicas del genoma bacteriano (DNA genómico, DNA ribosomal, ADN plasmidial, RNAr, RNAm y RNAt) promueven el interés de su aplicación en la identificación de microorganismos patógenos y en especial los pertenecientes al género *Brucella*, alcanzando incluso la diferenciación del resto de sus especies. Tal precisión, hace de estas técnicas, excelentes alternativas para el diagnóstico de microorganismos infecciosos de difícil cultivo y alto riesgo biológico que afecta a poblaciones animales y a humanos (Pacheco & Mosquera, 2015).

2.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una reacción enzimática que amplifica o copia millones de veces un fragmento específico de ADN durante varios ciclos repetidos. Para ello, utiliza la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar moléculas de ADN. Cuando se utiliza ADN genómico en la reacción esta recibe el nombre de PCR, pero si se usa ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR). Esta última se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y es llevada a cabo por la enzima transcriptasa reversa, que es capaz de convertir el ARNm en ADNc (Tamay de Dios *et al.*, 1990) .

Para realizar esta reacción es indispensable el uso de los siguientes elementos: el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{2+}), una solución amortiguadora y H_2O . Todos estos elementos interactúan en tres etapas de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión o alineamiento. Finalmente, para corroborar si

se amplificó la secuencia de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa. Hoy en día, la PCR se aplica en diferentes áreas de las ciencias biológicas y de la salud, formando parte del quehacer científico de muchos laboratorios de investigación que la utilizan principalmente para expresión génica, genotipificación, detección de patógenos y análisis de mutaciones (Tamay de Dios *et al.*, 1990).

En la última década son numerosos los antecedentes sobre el empleo de la PCR para la detección genómica de *Brucella spp.* en la confirmación del diagnóstico. En bovinos, la mayoría de estos trabajos han sido evaluados a partir del cultivo *in vitro* de *Brucella spp.* y en menor escala de muestras biológicas obtenidas de bovinos infectados en hatos o animales estabulados.

En el 2003, Medina *et al.* demostraron que el uso de la PCR con muestras de leche fue más eficiente al aislamiento bacteriano y puede ser útil en la confirmación rápida de *Brucella spp.* o en su defecto para detectar diferentes especies de *Brucella* mediante la amplificación de regiones específicas de cada una de éstas, siendo una prueba de diagnóstico precisa, rápida y eficaz (CFSPH, 2013). Por otro lado, Mosquera *et al.* en el 2008, mostraron las ventajas del uso de la PCR para la detección de *Brucella abortus* en sangre y leche de ganado bovino, en comparación con la prueba serológica PAL (prueba de anillo en leche) utilizada comúnmente, haciendo referencia a un mayor índice de especificidad y sensibilidad al obtener resultados positivos por PCR en comparación con los resultados a la prueba de anillo en leche.

En el 2002 Hamdy & Amin, señalan a la PCR cómo un sistema de diagnóstico superior a los medios de cultivo para la detección de *Brucella*, en cuanto a rapidez y sensibilidad de resultados, al analizar muestras de leche de diferentes mamíferos infectados por *Brucella*.

2.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La PCR en tiempo real fue creada para detectar y cuantificar secuencias específicas de ácidos nucleicos, haciendo uso de reporteros fluorescentes en la reacción. Esta técnica se basa en el principio de una PCR convencional, en donde se lleva a cabo la desnaturalización, alineación y finalmente una extensión de la secuencia blanco en cuestión, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente.

A diferencia de la PCR punto final la qPCR puede detectar los productos amplificados en cada ciclo de la reacción, además es capaz de cuantificar la cantidad de ADN en la muestra. Estas características brindan ventajas en el uso de la qPCR, ya que el producto de la amplificación puede ser monitoreado conforme transcurre la reacción (Tamay de Dios *et al.*, 1990), sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final.

Sin embargo, actualmente el solo diagnóstico con la qPCR para la genotipificación de este género ya no basta. El análisis HRM (High-Resolution Melt Analysis) ha resultado muy útil para identificar diferentes biovars o identificar polimorfismos entre especies de *Brucella spp.* ya que estas pequeñas diferencias entre secuencias pueden reflejar en la patogenicidad de cada una de ellas, así también su uso se extiende en la exploración de variantes, coincidencia de secuencias, análisis de metilación, detección de alelos raros y análisis de número de copias (Farrar & Wittwer, 2017).

El análisis HRM utiliza la fluorescencia que previamente se manifiesta en las muestras al ser analizadas mediante la qPCR, en donde la fluorescencia es resultado del uso de una molécula intercalante, aprovechando esta característica fluorescente el análisis HRM mide los cambios en la intensidad al disminuir la temperatura del termociclador a una velocidad constante. Estos cambios de temperatura serán dados de acuerdo con la conformación de los nucleótidos en la secuencia y se analizarán como cambios en su temperatura melting (T_m). La T_m indica la temperatura a la que el 50% de la molécula de ADN se ha desnaturalizado y es posible ser analizada. El valor del cycle threshold (C_t) indica el número de ciclos que se necesita para que cada curva alcance un umbral en la señal fluorescencia, la comparación del C_t con las muestras permite conocer la cantidad de ADN específico, es decir que, mientras mayor cantidad de ADN blanco haya en una muestra menor será el número de ciclos (C_t) que se requiere para alcanzar el umbral (Reed *et al.*, 2007).

El uso de la qPCR y el análisis HRM, tienen considerables ventajas al utilizarse en conjunto, ya que aumentan el índice de precisión y confiabilidad, por ejemplo, para la identificación y diferenciación de especies del género *Brucella* en muestras de diferentes fluidos de animales y seres humanos, Winchell *et al.* (2010), realizaron estudios para una rápida identificación y

diferenciación de aislados de *Brucella* en distintas muestras aisladas de diferentes poblaciones, con el fin de obtener todas las especies reportadas actualmente de este género, excluyendo unas de otras mediante el patrón de curvas del análisis HRM y descubriendo una posible especie aun no reportada (Winchell *et al.*, 2010).

2.7 Medidas de control y erradicación de la brucelosis

El control de la brucelosis depende principalmente de la prevención a la exposición del ganado ante el microorganismo y en general, del aumento de la resistencia mediante vacunación (CFSPH, 2013).

El uso de las vacunas vivas, propicia una respuesta inmune de tipo celular que ayuda a controlar a las bacterias de vida intracelular como la *Brucella*, basándose en su capacidad para generar células de memoria después de una primera infección y desarrollar una inmunidad prolongada. Las vacunas vivas deben ser aplicadas a hembras negativas a brucelosis, para proporcionarles una adecuada inmunidad mediada por anticuerpos y protegerlas ante la infección (Aguilar Romero *et al.*, 2011).

El término vacuna hace referencia a productos biológicos o inmunógenos que son aplicados para proteger a los animales contra enfermedades. La aplicación de vacunas de virus o bacterias atenuadas (vivas) le brinda al animal una respuesta citotóxica mediada por linfocitos T de memoria. Adicionalmente, la respuesta inmune se origina principalmente en el sitio natural de infección, lo que favorece la inmunidad tanto a nivel sistémico como de mucosas (Aguilar Romero *et al.*, 2011).

2.8 Normatividad y control de un hato infectado por el género *Brucella*.

Al confirmar la presencia de brucelosis en el hato se procede a definir las medidas que se implementarán para prevenir, controlar y erradicar el problema. SAGARPA indica que el manejo de los animales infectados se basará en el tiempo y el costo económico que ello implique (Aguilar Romero *et al.*, 2011).

En un hato infectado son obligatorias las siguientes actividades:

- Realizar pruebas serológicas.

- Determinar la incidencia y prevalencia de la enfermedad.
- Establecer un sistema de cuarentena precautoria.
- Eliminar a los animales positivos o separarlos de los animales sanos.
- Confirmar la presencia de la enfermedad (aislamiento del agente patógeno).
- Continuar con las pruebas de diagnóstico para otras especies animales que se encuentren dentro de la explotación.
- Separar a los animales en grupos por edad.
- Manejo sanitario de las crías, poniendo especial cuidado en la edad a la que deben ser vacunadas.
- Implementar calendarios de vacunación y desparasitación.
- Desinfectar instalaciones, depósitos de almacenamiento de agua, remover el estiércol, eliminar los depósitos de agua comunitarios, etc.
- Restringir la entrada o salida de animales para otros ranchos.
- Asignar personal por áreas específicas (ropa exclusiva por área).
- Revisar el estado de salud del personal que labora en el rancho.
- Limitar la entrada a la granja de animales de otras especies, y controlar roedores, perros y fauna nociva.

La NOM-041-ZOO-1995, señala que para el caso de animales reactivos, bajo el programa de hatos libres y los del programa de control-erradicación que no vayan a ser enviados a unidades de producción controlada, deben ser sacrificados y sus restos incinerados en un rastro autorizado por la Secretaría, en un periodo entre 3 y 10 días posteriores a la notificación del resultado. En el caso de ovinos reactivos a la prueba diagnóstica de *Brucella ovis*, deben ser sacrificados e incinerados en un rastro autorizado en un periodo no mayor de treinta días (Norma Oficial Mexicana, 1994).

Cabe destacar que dentro de las medidas de seguridad e higiene que se mencionan se encuentran también, las medidas de aislamientos y sacrificios de los animales infectados, destrucción de los fetos abortados, placentas, excreciones uterinas y desinfección de las instalaciones contaminadas, así como el aislamiento de vacas enfermas en el momento del parto y de igual

forma las demás vacas gestantes que llegan al hato, puesto que algunas vacas no dan reacciones positivas en el suero sanguíneo hasta después de haber parido o abortado, por ello la necesidad de generar un método de diagnóstico fácil, rápido y sensible permitiría el conocimiento del estado de salud del animal en cualquier etapa de la infección. Por otro lado la vacunación constituye uno de los métodos más valiosos para luchar preventivamente contra la brucelosis, todas estas medidas no deben pasarse por alto (Norma Oficial Mexicana, 1994).

3. JUSTIFICACIÓN

En la Cuenca del Papaloapan y lugares aledaños, la producción de ganado bovino es uno de los sectores económicos y alimentarios más importantes. Sin embargo, las pérdidas económicas por enfermedades causadas por microorganismos patógenos en el sector ganadero son muy grandes. En este sentido, el género *Brucella*, es uno de los microorganismos con mayor incidencia en el ganado, provocándole a los animales infectados abortos, contaminación de la leche y de los productos derivados de la misma.

Por lo anterior surge la necesidad de generar métodos de diagnóstico rápidos y exactos para su identificación, debido a que los métodos actuales presentan una serie de desventajas, por ejemplo, los cultivos bacterianos son muy costosos, laboriosos, tardados y existe un gran porcentaje de infección ya que se trabaja con las bacterias vivas, por otro lado, las pruebas serológicas son de poca especificidad y poca sensibilidad ya que pueden dar resultados falsos positivos o negativos.

Actualmente, el uso de métodos de diagnóstico molecular ha sido de gran utilidad para detección de material genético de microorganismos presentes en muestras problema de sangre bovina o en la leche. Por lo que, en este trabajo, se propone la generación de un método de diagnóstico molecular capaz de identificar hatos ganaderos infectados con la bacteria *Brucella abortus*, de manera rápida y confiable.

4. HIPÓTESIS

La especie *abortus* del género *Brucella*, que afecta al ganado bovino, se podrá identificar y diferenciar mediante la técnica de qPCR y el análisis HRM.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

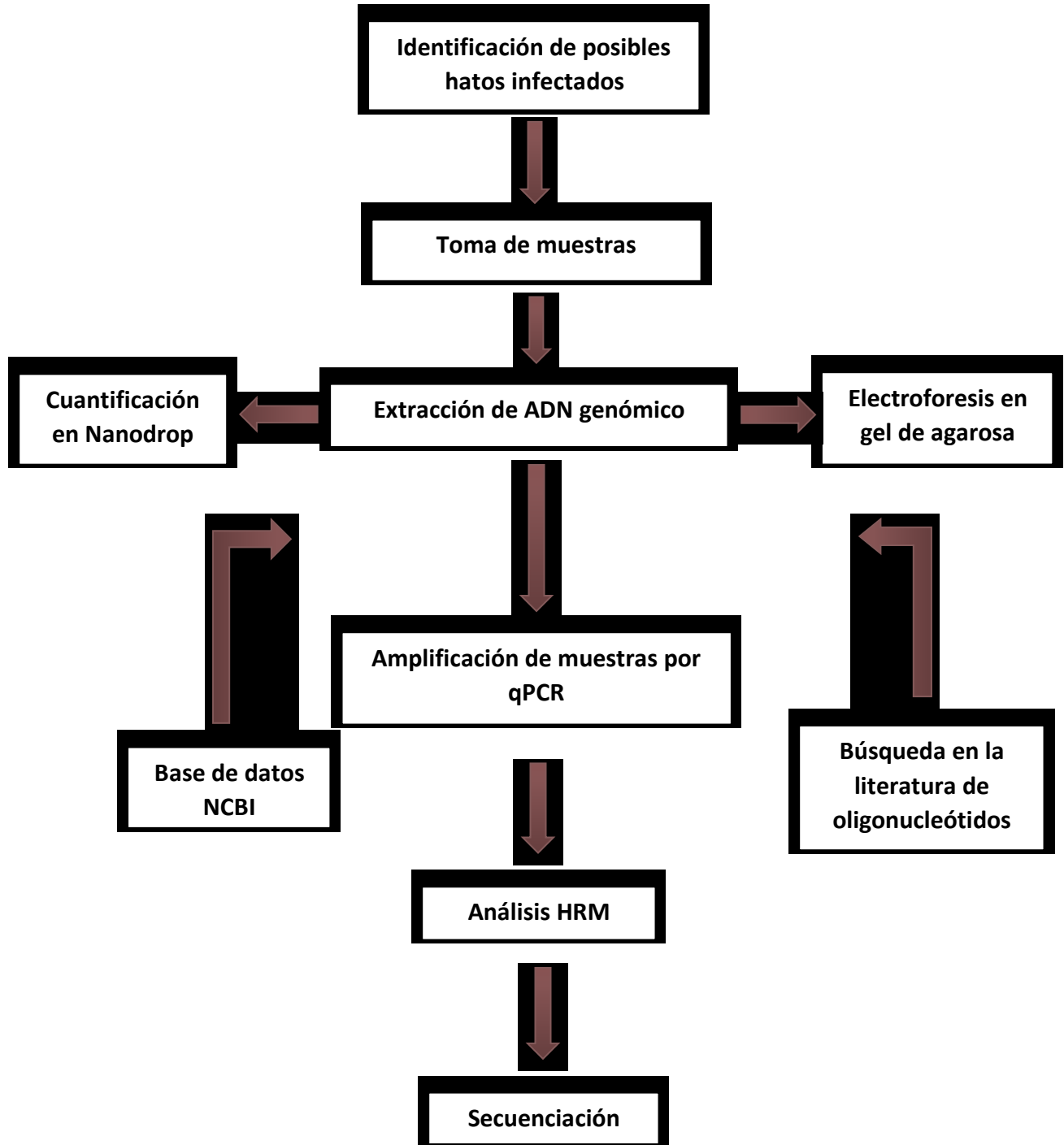
Generar un método de diagnóstico molecular, capaz de identificar y diferenciar a *Brucella abortus* en bovinos, mediante el uso de la técnica de qPCR y el análisis HRM.

5.2 Objetivos Particulares

- Recolectar muestras sanguíneas de bovinos infectados con *Brucella abortus*.
- Amplificar ADN bacteriano en muestras infectadas mediante qPCR.
- Analizar las curvas de disociación de los experimentos de qPCR y sus controles.
- Validar por secuenciación los resultados de identificación por el análisis HRM.

6. METODOLOGÍA

6.1 Estrategia experimental



6.2 Toma de muestra.

Las muestras fueron recolectadas en diferentes hatos bovinos de la región, sospechosos de infección por brucelosis, información que se obtuvo a través de SAGARPA y contactos privados. Se recolectaron alrededor de 71 muestras de 5 a 10 mL de sangre en tubos Vacutainer® con EDTA como anticoagulante, las cuales fueron transportadas al laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad del Papaloapan a una temperatura de 4°C y se conservaron a -20°C de temperatura hasta su procesamiento. Por otro lado, se obtuvieron 11 muestras de sangre por parte del Laboratorio Centro de Salud Animal de la Unión Ganadera Regional del Norte de Oaxaca, a las cuales previamente se le había realizado un análisis serológico empleando la prueba rosa de bengala resultando positivas 9 de las 11 muestras.

6.3 Obtención de controles positivos y negativos

Se utilizó como control positivo el ADN de la cepa vacunal RB51 la cual contiene exclusivamente bacterias atenuadas liofilizadas para la especie *Brucella abortus*. Como testigo se utilizó el ADN la bacteria *Bacillus thuringiensis* el cual fue donado por la Dra. Navarro Martínez Ana Karin de la Universidad del Papaloapan y una de mezcla de control de los templados (NTC) en donde solo se contienen los oligonucleótidos, la enzima y agua grado biología molecular.

6.4 Extracción de ADN genómico y bacteriano.

Para la extracción de ADN de las 82 muestras de sangre bovina, se utilizó el kit de extracción Quick-gDNA™ miniPrep de la marca Zymo Research #D3006, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La extracción del ADN de *Brucella abortus* se realizó a partir de la cepa vacunal RB51, mediante el kit de extracción de ADN comercial Quick-gDNA™ miniPrep de la marca Zymo Research #D3006, siguiendo las instrucciones del fabricante. Teniendo de esta forma una referencia o control positivo para la técnica de qPCR.

El protocolo seguido para la extracción del ADN de sangre bovina y de la cepa vacunal RB51 se describe a continuación.

En un tubo para centrifugado se colocaron 200 μL de la cepa vacunal RB51, y se agregaron 800 μL de buffer de Lisis Genómico, se mezcló 6 s. en vórtex y se dejó reposar por 10 min. La mezcla se transfirió a una columna Zymo-Spin™, se centrifugó a 10,000 g durante 1 min. y se descartó el líquido filtrado, se lavó la columna con 200 μL el buffer DNA Pre-Wash, se centrifugó a 10,000 g durante 1 min. y se descartó el líquido filtrado, se realizó un segundo lavado a la columna con 500 μL del buffer gDNA Wash posteriormente se centrifugó a 10,000 g durante 1 min. Finalmente, la columna se colocó en un tubo nuevo donde se recolectó el ADN extraído, se adicionaron 50 μL de Buffer de Elución y se centrifugó a 15,000 g por 8 min. El líquido filtrado se conservó a una temperatura de entre 4°C y -20°C hasta su procesamiento.

6.5 Verificación y Cuantificación de ADN bacteriano extraído.

El ADN extraído se analizó en el Nanodrop 2000® para obtener la cuantificación y pureza de cada muestra. De la misma forma a partir de cada una de las muestras de ADN se verificó la integridad mediante corrimiento electroforético, cargando 4 μL de ADN más 1 μL de buffer de carga 6X Orange DNA Loading Dye de Thermo Scientific #R0631, en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X por 40 min a 100 Volts, posteriormente los geles fueron revelados en una solución de bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron en un sistema de fotodocumentación, en donde se observaron bandas propias del ADN genómico.

6.6 Análisis y búsqueda bioinformática.

Se realizó una búsqueda en la literatura para obtener información sobre oligonucleótidos ya reportados, que fueran específicos para amplificar regiones de *Brucella abortus*. Se encontró en el artículo de Winchell *et al.* (2010) quienes reportaron un par de oligonucleótidos específicos para el gen *GLK* que codifica a la proteína Glucokinasa, el cual es un gen conservado de *Brucella abortus*, Mohamed Zahidi *et al.* (2015) reportaron también el uso específico del mismo par de oligonucleótidos para la amplificación del gen *GLK* en *Brucella abortus*, de esta manera se decidió hacer uso de ese par de oligonucleótidos (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para detectar *B. abortus*.

Nombre	Orientación	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Gen
Boa	<i>F</i>	GACCTCTTCGCCACCTATCTGG	163 pb	GLK
	<i>R</i>	CCTTGTGCGGGGCCTTGCCT		

Por otro lado, se realizó una búsqueda en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para encontrar el genoma de *Brucella abortus* (NC: AE017224.1), en donde se localizó el gen de interés *GLK* (NC: U21919.1) localizado en un CDS del genoma (1559-2600pb) y se ubicaron los oligonucleótidos en esa región (Anexo 1).

6.7 Amplificación de las muestras de ADN bovino.

A partir del ADN extraído de las muestras de sangre, se amplificó el gen *GLK* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), utilizando los oligonucleótidos descritos previamente (Tabla 3). La amplificación del fragmento de interés se llevó a cabo mediante el protocolo de reacción NZY qPCR Green Master Mix (2X) de la marca NzyTech Genes & Enzymes (Lote: 17041), reactivo que contiene el agente intercalante SYBR Green para la mezcla de reacción usando el termociclador StepOne™ Real-Time PCR Systems. Los parámetros que se siguieron en la reacción de qPCR se establecieron después de haber realizado una serie de pruebas mediante PCR punto final, en el termociclador One Step Plus de Applied Biosystems con la enzima y los oligonucleótidos antes descritos, para poder así tener condiciones de lectura óptimas (Tabla 5).

Para todas las amplificaciones se utilizó una concentración de oligonucleótidos de 10 µM, para el ADN genómico bovino y ADN bacteriano se emplearon a una concentración de 50 ng/µL en cada reacción.

Tabla 4. Protocolo de la mezcla de reacción NZY qPCR Green Master Mix

Reactivos	Cantidad
NZY qPCR Green Master Mix (2X)	10 μ L
Oligonucleótido Forward (10 μ M)	1 μ L
Oligonucleótido Reverse (10 μ M)	1 μ L
Templado	\geq 50 μ g/ μ L
Agua libre de Nucleasas	Aforar a 20 μ L
Volumen final	20 μ L

El protocolo que se utilizó en el termociclador se efectuó como se muestra a continuación.

Tabla 5. Condiciones de PCR y qPCR

PASOS	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Inicial desnaturalización	95°C	10 min.	1
Desnaturalización	95°C	15 s.	40
Alineamiento	60°C	30 s.	

6.8 Análisis HRM (High Resolution Melt Analysis).

La técnica HRM permitió hacer el análisis de las gráficas de qPCR para detectar las variaciones entre las secuencias de interés previamente obtenidas.

Para cada amplicón se realizó una curva de disociación con un incremento de la temperatura de 0.3°C dentro de un intervalo de 60°C a 95°C. Con los datos obtenidos del termociclador StepOne™ Real-Time PCR Systems, se analizaron las diferencias mediante el programa *online* de HRM llamado uMelt (<https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html>) utilizando como criterio de discriminación los cambios en el ΔH , en donde se compararon las curvas de disociación o también llamada *melting curve* detectando los cambios de fluorescencia entre cada muestra, de igual manera se realizó un análisis de las curvas de diferencia en donde se observaron las variaciones

en las curvas de cada secuencia al ir aumentando la temperatura, esto asociándose a los cambios de base que se presentan en las secuencias.

6.9 Secuenciación.

Se realizó una selección de muestras representativas, tomando en cuenta el comportamiento de la desnaturalización del producto de qPCR mostrado con respecto al control positivo en las curvas del análisis HRM. Aquellas curvas que se solapaban respecto a las curvas del control y aquellas que mostraban el mismo comportamiento entre sí. Esto permitirá corroborar y validar que la secuencia del amplicón resultante corresponde al gen en cuestión. Los productos se enviaron a secuenciar al instituto CINVESTAV-LANGEBIO mediante el método de secuenciación capilar.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis de integridad del ADN bovino.

Se evaluó la integridad del ADN genómico mediante el análisis del corrimiento electroforético de ácido nucleico resultantes de una electroforesis en geles de agarosa al 1%. En la figura 2, se muestra el patrón característico de las bandas obtenidas del corrimiento electroforético, la presencia de una sola banda en cada uno de los carriles, indica que la integridad del ADN genómico fue idónea.

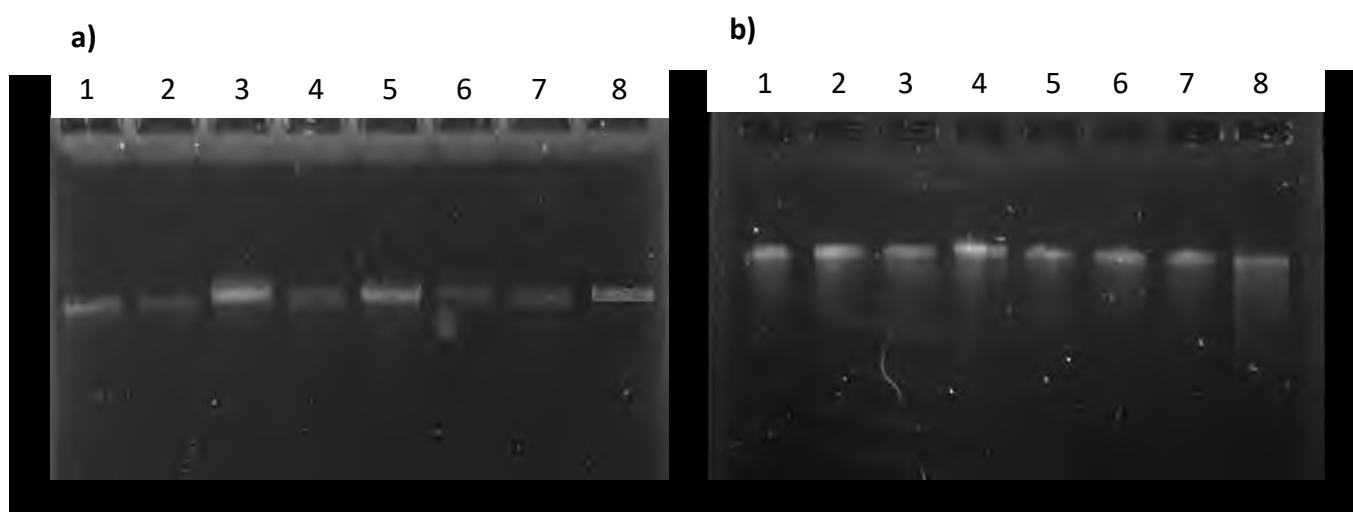


Figura 2. Corrimiento electroforético de ADN genómico de sangre bovina en geles de agarosa al 1%. a) Carril 1: Muestra Vacuna. Carril 2: Muestra M12. Carril 3: Muestra M4. Carril 4: Muestra M18. Carril 5: Muestra M13. Carril 6: Muestra M6. Carril 7: Muestra M14. Carril 8: Muestra M25 b) Carril 1: Muestra M22. Carril 2: Muestra M10. Carril 3: Muestra M2. Carril 4: Muestra M5. Carril 5: Muestra M37. Carril 6: Muestra M9. Carril 7: Muestra M41. Carril 8: Muestra M51.

7.2 Amplificación del gen *GLK* en muestras de ADN bovino por medio de qPCR.

Para la amplificación del gen *GLK* se realizaron una serie de gradientes de temperatura mediante PCR punto final en donde se determinó como temperatura óptima 60°C, para el alineamiento de los primers con el ADN (Figura 3), posteriormente estos parámetros se utilizaron en el termociclador en tiempo real.

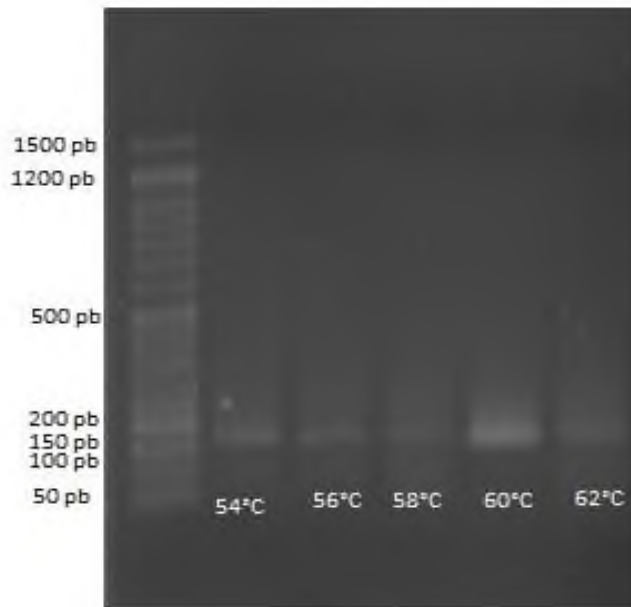


Figura 3. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2% de PCR punto final de gradientes de temperatura para la amplificación del gen *GLK* de *B. abortus* usando como molde ADN genómico de sangre bovina. Carril 1: Marcador de peso. Carril 2: Amplificación a 54°C. Carril 3: Amplificación a 56°C. Carril 4: Amplificación a 58°C. Carril 5: Amplificación a 60°C. Carril 6: Amplificación a 62°C.

Para evaluar la presencia de *Brucella abortus* en las 82 muestras recolectadas, se realizó la amplificación del gen *GLK* que codifica a la proteína glucokinasa, empleando oligonucleótidos específicos (Tabla 3), mediante la técnica de qPCR. Los resultados indican que 62 de un total de 82 muestras amplificaron para el gen *GLK* de *B. abortus*.

En la figura 4, se presentan las curvas de amplificación de las muestras de ADN, en rojo se ve al control positivo que fue la curva de referencia, las cuales fueron analizadas empleando un termociclador en tiempo real, así mismo se observan las curvas para el control sin molde o NTC (línea negra) y para el testigo (*B. thuringiensis*) (línea rosa) las cuales no mostraron una amplificación de ADN.

El análisis de los diferentes patrones de amplificación (Figura 4), indican que sólo una de las curvas en su fase exponencial presentó una pendiente mayor e inició antes que la curva del grupo control (línea morada). Esto podría deberse a que dicha muestra tiene un mayor número de copias del gen *GLK*, es decir, que probablemente el animal se encontraba en un pico máximo de infección, mientras que, en la mayoría de las muestras restantes, su fase exponencial inició entre los ciclos

17 al 25. Por otro lado, existen curvas que inician la fase exponencial en el rango de ciclos entre el 25 al 32, lo que posiblemente se atribuye a una menor presencia de fragmento de ADN del gen amplificado y, por ende, un menor grado de infección. Estudios explican que cuando existe una muestra con un número de copias alto de ADN patógeno, su curva exponencial en la qPCR tenderá a aparecer primero, y las muestras con menor cantidad de copias de ADN aparecerán después. Por ejemplo, una muestra con 10^6 copias de ADN patógeno inicia su curva de amplificación aproximadamente en el ciclo 13, mientras que otra muestra con 10^4 copias de ADN inicia en el ciclo 19 aproximadamente (UDG, 2009). Kaynak-Onurdag *et al.* (2016) determinaron que, para su estudio, el rango del número de ciclos para una amplificación adecuada va de los 20- 30 ciclos, obteniendo datos viables para un posterior análisis de HRM.

En el análisis de las curvas de amplificación también se observó que existen muestras que no presentan una curva y por ende no existe amplificación. Esto significa que en este estudio se encontraron muestras infectadas con el microorganismo y muestras de animales sanos (Figura 4).

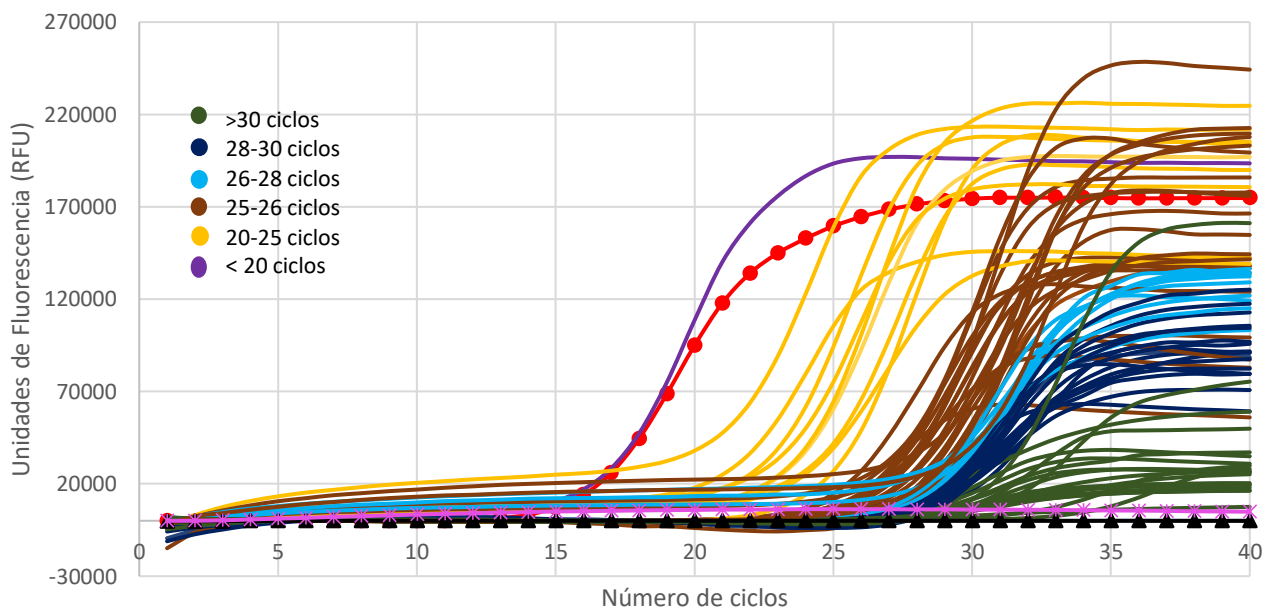


Figura 4. Curvas de amplificación mediante qPCR, empleando el gen GLK de *B. abortus*, como molde ADN genómico de sangre bovina y SYBR Green como fluoróforo. Color rojo: Curva de amplificación del control positivo. Color Negro: Curva de amplificación del NTC. Color Rosa: Curva de amplificación del control negativo (*B. thuringiensis*). El resto de las curvas representan el total de las muestras de ADN amplificadas.

De las 82 muestras analizadas, 62 de ellas presentaron una amplificación para el gen *GLK* de *Brucella abortus*, de estas muestras amplificadas se tomaron 10 muestras representativas que incluyeron al control. La selección se hizo por bloques tomando en cuenta el número de ciclo en el que iniciaron la fase exponencial, así como el valor de las Unidades de Fluorescencia (RFU), y su valor de ciclo threshold (C_T). Estas muestras posteriormente se analizaron mediante HRM para observar las diferencias en las variaciones entre sus secuencias y finalmente una secuenciación para confirmar los datos. Los resultados obtenidos de los valores de la temperatura Melting (T_m) y los valores del ciclo threshold (C_T) de este análisis se presentan en la tabla 7.

De las muestras seleccionadas al azar se observó que, algunas de ellas previamente habían sido diagnosticadas como negativas en la prueba serológica de rosa de bengala, mientras que en el análisis por qPCR estas resultaron positivas, es decir que amplificaron el gen *GLK*. Se cree que estas diferencias en los resultados se deben principalmente al grado de sensibilidad del análisis por qPCR comparado con pruebas serológicas. Leal-Klevezas *et al.* (2000) encontraron casos de animales clínicamente sanos, empleando la prueba serológica rosa de bengala, pero que al ser analizados por PCR algunos de ellos resultaron positivos. Los investigadores se lo atribuyen al tiempo de contacto con la bacteria patógena y el día de la toma de muestra está directamente relacionada con la efectividad de la detección de la infección por métodos serológicos, ellos establecen que si las muestras fueron tomadas en los primeros 10 días post-infección, estas darán negativas en las pruebas serológicas, debido a una nula o baja producción de anticuerpos, mientras si son tomadas posterior a los 18 días post-infección, estas darán positivo para *Brucella* dado a la presencia de un mayor título de anticuerpos (Leal-Klevezas *et al.*, 2000). En este sentido Simpson *et al.* (2018) realizaron un estudio de la relación en donde evaluaron la reacción serológica en terneras al aplicar una dosis alta ($5-8 \times 10^{10}$ UFC) de la cepa vacunal S19, evaluando el comportamiento de la producción de anticuerpos a partir del día cero. El suero fue analizado repetidamente y probado para anticuerpos a *Brucella* usando la prueba de rosa de bengala (RBT) y un ensayo ELISA. Los casos mostraron una rápida respuesta de anticuerpos con positividad a rosa de bengala (98%) a las 2 semanas y positividad a ELISA (95%) a las 8 semanas, disminuyendo el número de resultados positivos a 14% para la prueba rosa de bengala y 32% al ensayo ELISA a las 59 semanas. Finalmente a los 4.5 años, el 57% (4/7 casos) demostró una respuesta inmune

persistente en ambas pruebas (RBT, ELISA), ellos concluyen que puede ser difícil diferenciar por medio de los títulos de anticuerpos una respuesta a infección por *Brucella abortus* debido a la enfermedad o debido a una vacunación y recomiendan usar una dosis "baja" de UFC al realizar un nuevo ensayo para poder encontrar una menor o nula producción de anticuerpos conforme transcurra el tiempo y poder así diferenciar la producción de anticuerpos debidos a una vacunación de una enfermedad, sin embargo su estudio no fue capaz de detectar resultados positivos antes de las 2 semanas de contagio, debido a que la presencia de anticuerpos es nula o indetectable (Simpson *et al.*, 2018).

En la tabla 6 se indica la relación del diagnóstico con la prueba serológica y el análisis qPCR de algunas muestras, en donde se puede comparar los resultados obtenidos, se observan similitud de los resultados en 9 muestras para ambas pruebas, mientras que en 2 muestras los resultados discernieron, dando resultados positivos por qPCR, pero en la prueba serológica negativos.

Tabla 6. Correlación de resultados del análisis por qPCR para la detección del gen GLK de B. abortus en muestras de ADN de sangre bovina obtenidas del Laboratorio Centro de Salud Animal de la Unión Ganadera Regional del Norte de Oaxaca, con resultados de la prueba serológica rosa de bengala.

Muestra	Prueba serológica	Análisis qPCR
M2	-	+
M4	+	+
M5	-	+
M6	+	+
M7	-	-
M9	+	+
M10	+	+
M12	+	+
M13	+	+
M14	+	+
M22	-	-

Aunado a esto, otro estudio ha descrito que el diagnóstico serológico de animales recién abortados falla debido a que los títulos detectables por serología aparece después de las dos

semanas la infección (Padilla Poester *et al.*, 2010) con base a estos reportes se puede explicar la ausencia de anticuerpos en animales posiblemente infectados, al realizarle una prueba serológica. Una opción para evitar diagnósticos equivocados es el uso de las técnicas de moleculares, Wareth *et al.* (2015) mencionan que el ADN de la bacteria es una herramienta útil para un diagnóstico fiable. Por lo tanto, el diagnóstico serológico de brucelosis es solo una evidencia presuntiva de infección y la confirmación requiere del aislamiento de bacterias o la detección de ADN de *Brucella* por PCR (Wareth *et al.*, 2015). Con base en las anteriores evidencias experimentales el uso de la qPCR puede detectar la infección con el microorganismo en etapas tempranas de la enfermedad.

Las curvas de disociación se muestran en la figura 5, y los intervalos de valores obtenidos de la T_m están entre 88.60°C y 90.13°C, mientras que los valores de la C_t se encuentran en el rango de 7.99 a 24.52 (Tabla 7).

Winchell *et al.* (2010) recomiendan como valores óptimos de C_t dentro del rango de 15 a 35 los cuales muestran las características curvas sigmoides para datos confiables en el análisis HRM. Masjedian Jazi *et al.* (2017) diseñaron un método para detectar especies patógenas de *Brucella* mediante qPCR y HRM de muestras clínicas y no clínicas, en donde el rango de C_t obtenido fue de 15.39 a 25.15 por qPCR, sin embargo, con base a su estudio recomiendan que los valores de la C_t deben estar entre 15 y 30 para obtener respuestas aceptables en las curvas sigmoideas en el HRM y para poder diferenciar la especie *Brucella abortus* de *Brucella melitensis* mediante las curvas melt reportaron valores de T_m de 90.10°C ± 0.4 y 89.70°C ± 0.4 respectivamente.

En este estudio el valor de C_t de la "M13" fue de 11.1 y de la "M14" de 7.99, ambos valores según reportes por Masjedian Jazi *et al.* (2017) y Winchell *et al.* (2010) se encuentran fuera del rango que algunos autores consideran como ideal para la detección de *Brucella abortus*, sin embargo, se decidió seleccionarlas para su posterior análisis, debido al comportamiento de su curva de amplificación ya que esta inicia en el ciclo 17 y 20 respectivamente (figura 6) las cuales se encuentran en rangos idóneos de amplificación, en cuanto a las T_m para la "M13" es de 90.13°C y de 88.73°C para la "M14" que son valores aceptables y característicos para identificar esta especie (Masjedian Jazi *et al.*, 2017; Winchell *et al.*, 2010).

Tabla 7. Valores de temperatura melting (T_m) y ciclo threshold (CT) de las muestras representativas

Muestra	T_m	CT
Ctrl +	89.16	15.91
M2	89.62	24.52
M4	88.60	16.14
M5	88.98	21.15
M6	88.88	21.19
M9	88.61	24.40
M10	88.64	22.39
M12	88.78	20.07
M13	90.13	11.1
M14	88.73	7.99

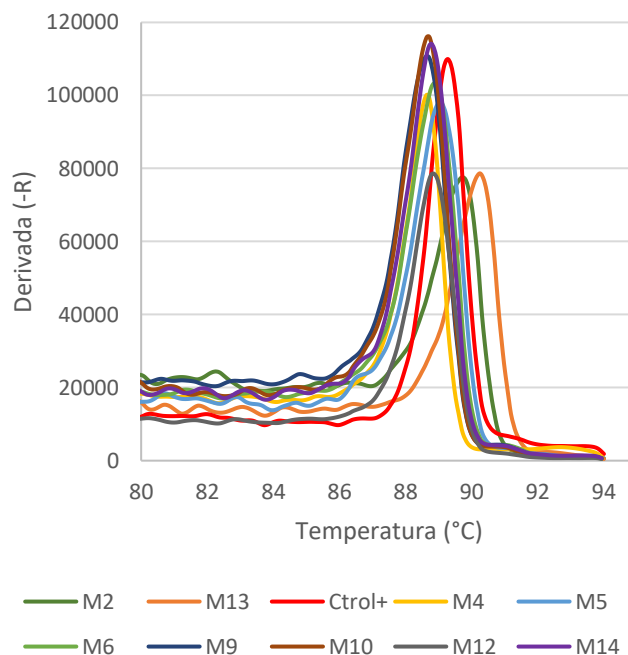


Figura 5. Curvas Melt de las muestras representativas.

Kaynak-Onurdag *et al.* (2016) analizaron muestras virulentas infectadas por el microorganismo (*Brucella abortus*), con respecto de muestras que contienen la cadena de ADN de la vacuna S19, es decir, muestras de animales que previamente fueron vacunados, en donde establecen que los valores de CT para cadenas de *Brucella abortus* virulentas deben estar entre el rango 25.15 y 28.52 y para cadenas de *Brucella abortus* de la vacuna S19 entre 21.5 y 28.46.

Kaynak-Onurdag *et al.* (2016) también determinaron que los valores de T_m en el análisis de las curvas melt para muestras virulentas deben encontrarse en el rango de 89.5°C a 90°C, mientras que para muestras de productos de PCR con la cadena de *Brucella abortus* S19 (vacuna) el rango de la T_m corresponde entre 82°C y 82.5°C de esta manera describen que su método de qPCR puede diferenciar entre las cadenas de *B. abortus* virulentas y las cadenas de *B. abortus* de la vacuna S19, tomando como referencia los valores de T_m y CT (Kaynak-Onurdag *et al.*, 2016).

La figura 6, representa el comportamiento de las curvas de amplificación de las muestras seleccionadas por bloques, en donde se eligieron curvas con patrones diferentes, es decir curvas que inician la fase exponencial en distinto número de ciclo, así como de valores de RFU, posteriormente se les realizó análisis HRM y secuenciación.

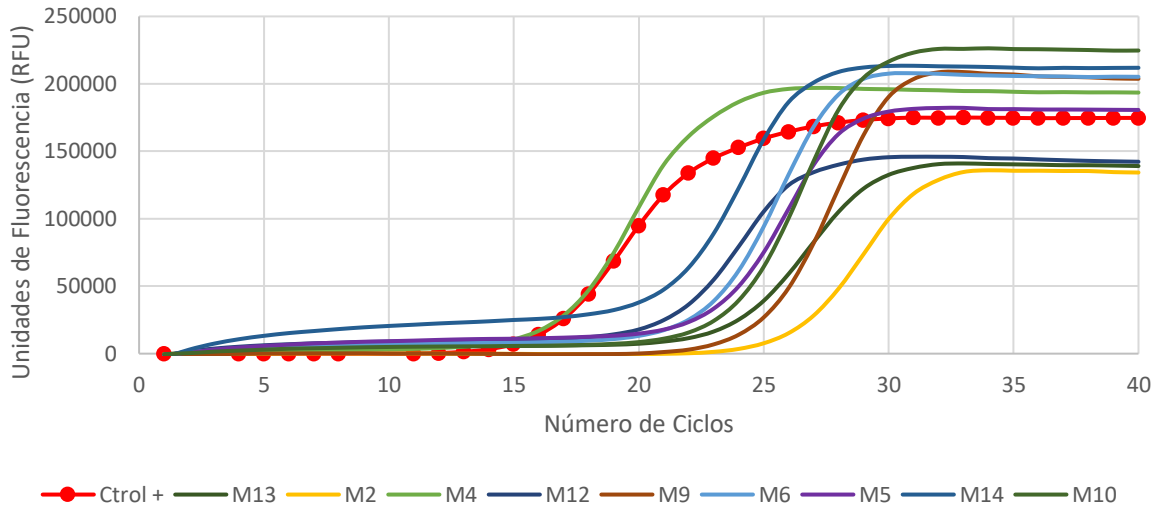


Figura 6. Curvas de amplificación por qPCR para la detección del gen GLK de *B. abortus* usando como molde ADN genómico de sangre bovina de las muestras representativas.

El tamaño obtenido de los amplificados de qPCR fueron verificados mediante geles de agarosa al 2% en TAE 1X, mostrando bandas de un tamaño esperado del amplicón de aproximadamente 163pb como se muestra en la figura 6, el marcador de peso molecular utilizado fue de 50pb DNA Ladder (NZYTech).

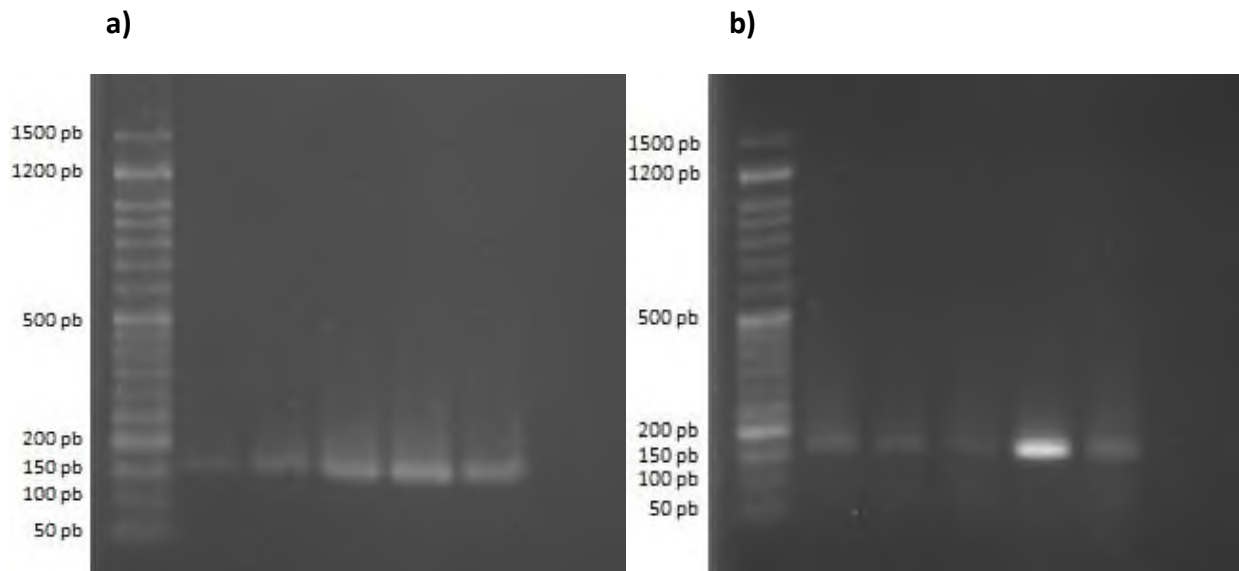


Figura 7. Corrimiento electroforético en geles de agarosa al 2% con productos de PCR punto final del gen GLK de *B. abortus* usando como molde ADN genómico de sangre bovina. **a)** Carril 1: Marcador de peso. Carril 2: Muestra M12. Carril 3: Muestra M4. Carril 4: Ctrl+. Carril 5: Muestra M13. Carril 6: Muestra M6. Carril 7: Muestra M14. **b)** Carril 1: Marcador de peso. Carril 2: Muestra M10. Carril 3: Muestra M2. Carril 4: Muestra M5. Carril 5: Ctrl+. Carril 6: Muestra M9.

7.3 Secuenciación

Para verificar que los amplicones seleccionados correspondieran a la secuencia flanqueada del gen *GLK* de *B. abortus*, los productos de las PCR se secuenciaron y posteriormente se les realizó un multialineamiento (Figura 8), mediante el uso del programa bioinformático BioEdit, donde se alinearon las secuencias de ADN con respecto a la secuencia control de ADN bacteriano, así mismo se ubicaron los oligonucleótidos en el alineamiento, obteniendo de este análisis la alineación satisfactoria de 9 de las 10 muestras analizadas. Los multialineamientos indican la existencia de los cambios de base en casi todas las muestras analizadas. Solo la secuencia de la muestra “M14” tuvo una total discrepancia en el alineamiento, debido a una sobrelapación de señales vistas en su electroferograma (Anexo 2).

Por otro lado se observó que las secuencias de las muestras “M6” y “M13” no presentaron ningún cambio de base tomando como referencia la secuencia del control, mientras que la secuencia de la “M10” mostró un gap en la posición 123 del fragmento amplificado, por otro lado en la secuencia de la “M9” en la posición 158 tuvo un cambio de base C→G y en la “M12” se encontraron dos cambios de base (A→C y de A→T) en las posiciones 161 y 167 respectivamente.

Así mismo se encontraron 3 cambios de base de C→A para la secuencia de la “M4” en las posiciones 153, 157 y 212 del fragmento amplificado, 8 cambios de base para la secuencia “M2” de los cuales 4 cambios son de C→T en las posiciones 153, 154, 156 y 158, y los 4 cambios restantes de A→T en las posiciones 155, 161, 167 y 176 del fragmento amplificado. En cuanto a la secuencia de la “M5” se observaron 45 cambios de base en el fragmento amplificado. Para la secuencia de la muestra “M14” la cual no se incluyó en el alineamiento debido a que no existió una similitud en su secuencia con respecto a las demás, se procedió a realizarle una Blast para conocer de qué secuencia se trataba.

Todos estos cambios observados están relacionados con diferentes tipos de biovares de *Brucella abortus*, o diferentes tipos de especies ya que es bien conocido que más de una especie puede ser patógena en los bovinos (Wareth *et al.*, 2015).

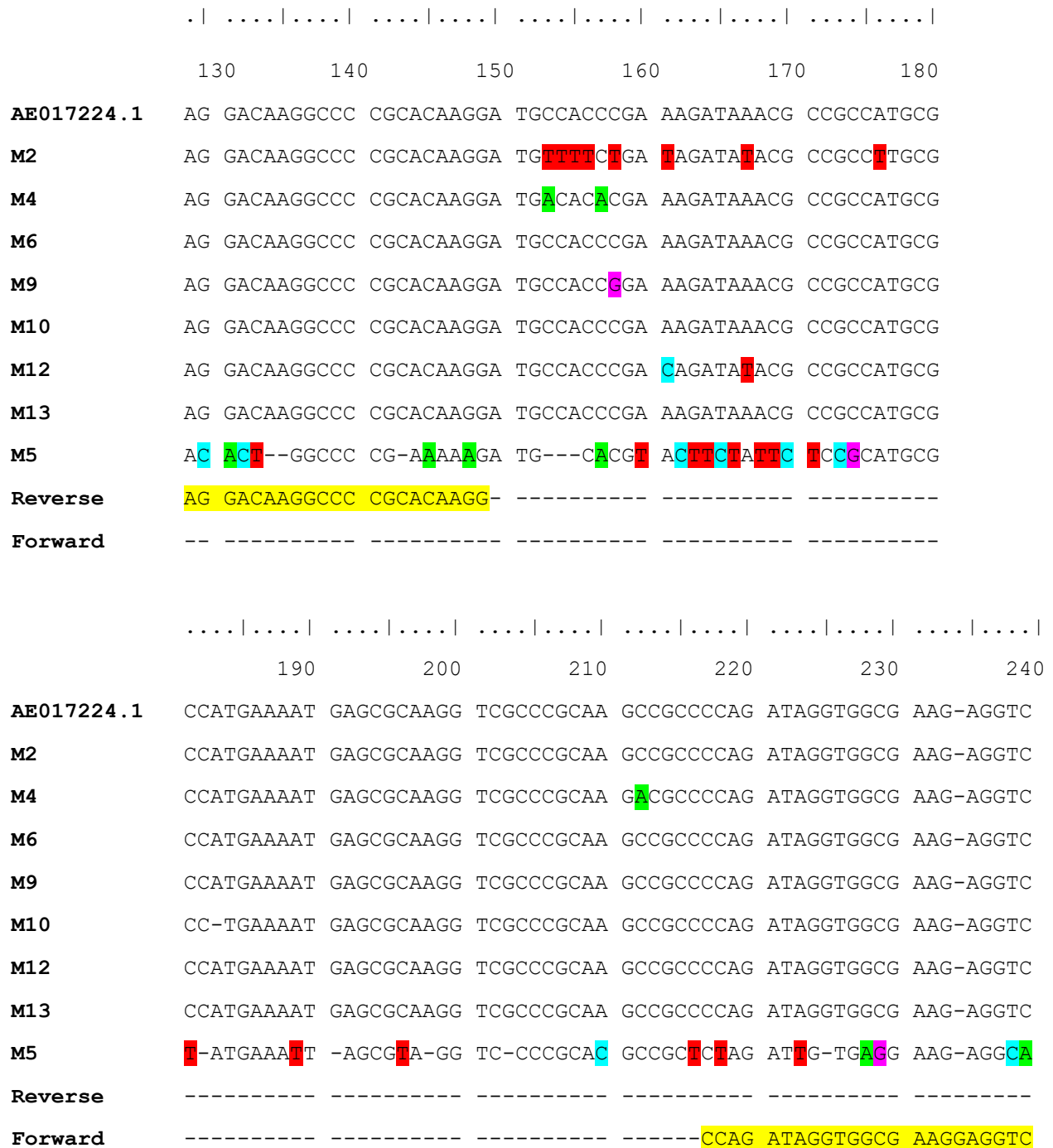


Figura 8. Multialineamiento de muestras de ADN secuenciadas, mostrando en colores los cambios de base de cada secuencia con respecto al control positivo. Verde: Adenina, Azul: Citosina, Rojo: Timina y Violeta: Guanina, así mismo en color amarillo se identifican los oligonucleótidos.

Así mismo se realizó un BLAST a cada una de las secuencias alineadas para verificar los datos de la secuenciación y encontrar el porcentaje de identidad con el gen *GLK* en la especie de *Brucella abortus* (Anexo 2). En el análisis se observó que la secuencia control tiene un porcentaje de identidad del 98.39% con la secuencia de *Brucella abortus* (NC: [AE017224.1](#)) que coincide con la secuencia que se ha estado trabajando en este estudio (Figura 9).

Para el Blast del resto de las secuencias se observa también con el mayor porcentaje de identidad la secuencia de *Brucella abortus* con número de acceso [AE017224.1](#) (Anexo 2) sin embargo, el Blast realizado para el fragmento amplificado de la “M5” en donde se observaron 45 cambios de base en el alineamiento presentó un porcentaje de identidad del 89.13% con secuencias de la especie *Brucella melitensis*. Mientras que la secuencia de la “M14” la cual no se incluyó en el alineamiento mostró resultados con diversos géneros de bacterias diferentes al género *Brucella*, debido a una posible infección del animal con más de un microorganismo (Anexo 2).

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BJ1 chromosome 2, complete sequence	217	390	69%	3e-52	98.39%	CP033080.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain IVRI/95 chromosome II, complete sequence	217	390	69%	3e-52	98.39%	CP034696.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain A19 chromosome 2, complete sequence	217	390	69%	3e-52	98.39%	CP030752.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain Wisconsin genome assembly, chromosome: 2	217	390	69%	3e-52	98.39%	LT671513.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain NCTC 10505 chromosome 2 sequence	217	390	69%	3e-52	98.39%	CP007701.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BDW chromosome 2, complete sequence	217	390	69%	3e-52	98.39%	CP007680.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus A13334 chromosome 2, complete sequence	217	390	69%	3e-52	98.39%	CP003177.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus S19 chromosome 2, complete sequence	217	390	69%	3e-52	98.39%	CP000888.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 chromosome II, complete sequence	217	390	69%	3e-52	98.39%	AE017224.1

Figura 9. Alineamiento de la secuencia del control positivo.

Estudios realizados por Doosti & Dehkordi (2011) describen que *B. melitensis* es capaz de infectar al ganado bovino viéndose no solo afectado por *B. abortus* sino también por *B. melitensis*, ellos diseñan un método de diferenciación mediante el uso de qPCR entre *B. melitensis* y *B. abortus* en ganado bovino utilizando los siguientes oligonucleótidos BMEI10466 y BruAb2_0168 respectivamente, este estudio permitió la identificación correcta de dos especies de *Brucella* (*B.*

abortus y *B. melitensis*) el cual podría simplificar el procedimiento al analizar el presunto genoma de *Brucella* tomado directamente de muestras de sangre bovina, así como el uso de la sonda TaqMan ofrece una especificidad mayor que la de la electroforesis en gel (Doosti & Dehkordi, 2011).

Recientemente Wareth *et al.* (2015) reportaron que *B. melitensis* fue encontrada en muestras de leche de ganado bovino aparentemente saludable y en búfalos mediante el análisis de qPCR además de la detección de ADN de *B. abortus* y *B. melitensis* en un mismo animal lo cual demostró que un mismo hospedador puede ser infectado con más de dos especies de *Brucella* al mismo tiempo.

De ahí la importancia de contar con un método capaz de identificar a más de una especie de *Brucella*, como el observado en este trabajo.

Si bien las pruebas serológicas permiten identificar etapas de infección tardías por *Brucella*, su sensibilidad permite que en muchos casos no se detecte a esta bacteria como el caso de la M5, la cual dio positiva para *B. melitensis* por qPCR. Esto debido a que rosa de bengala únicamente reconoce anticuerpos para la especie de *B. abortus* y no para *B. melitensis*. Naveen Kumar *et al.* (2018) realizaron un estudio en donde compararon pruebas moleculares (PCR) y pruebas serológicas (ELISA) con un total de 821 muestras de suero bovino, utilizaron dos pares de oligonucleótidos un par específico para el género *Brucella* (BCSP31) y otro específico para la especie *B. abortus* (IS711) como resultado obtuvieron que el 6.7% de las muestras fueron detectadas positivas por la prueba serológica, mientras que en el análisis molecular el 5.72% fue encontrado positivo con el oligonucleótido BCSP31 y el 3.53% con el IS711. En animales seropositivos el 80% de muestras fueron positivas por PCR, ellos concluyen que para una vigilancia epidemiológica eficaz de la brucelosis, se debe hacer los análisis de serología de rutina junto con el análisis de PCR, lo cual ayudaría a la erradicación de la brucelosis.

7.4 Análisis de alta resolución de las curvas de disociación (High Resolution Melt Analysis).

El análisis HRM utilizó el fluoróforo SYBR Green, este ensayo se realizó mediante un control positivo (ADN de la Cepa vacunal RB51), para la identificación del gen *GLK* localizado en el genoma

de *Brucella abortus* bv. 1 str. 9-941 (NC_006933.1). Las curvas de disociación de cada muestra de ADN bovino secuenciada, al ser analizadas mostraron diferencias con respecto a la curva control.

En la figura 10, se muestran las curvas de disociación de las muestras representativas previamente secuenciadas, encontrándose cambios en el comportamiento de cada una de las curvas, diferencias ocasionadas por los cambios de base que presentaron algunas secuencias, como lo reveló el alineamiento.

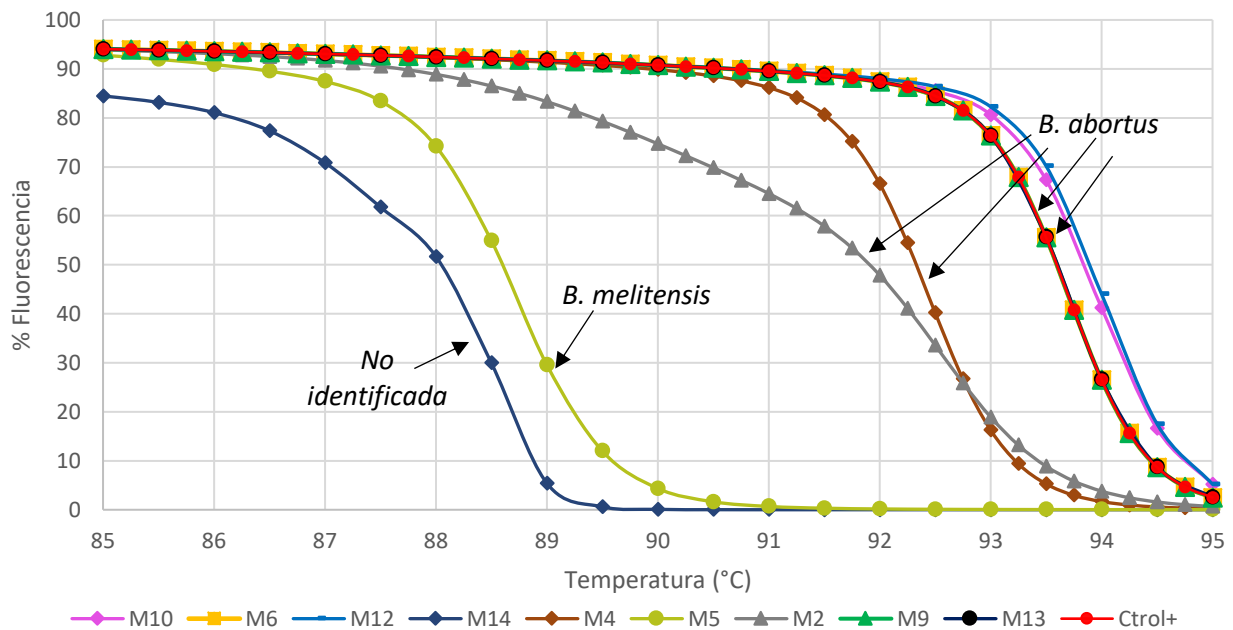


Figura 10. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen GLK de *B. abortus*, del control positivo y muestras de ADN de sangre bovina.

Se observó que las muestras “M6”, “M9” y la “M13” tienen un perfil similar a la curva del control lo que concuerda con los datos del alineamiento de las secuencias en donde las muestras “M6” y “M13” tienen la misma secuencia que la del control por otro lado la “M9” solo presentó un cambio de base de C→G en la posición 158, se observa también que la curva de la “M10” y “M12” tiene una leve desviación entre sí y con respecto al control se cree que es debido a los cambios de base que se vieron en el alineamiento en donde se obtuvo la presencia de un gap para la “M10” en la posición 183 y dos cambios de base para la curva de la “M12” de A→C:161 y A→T:167. Para el caso de la curva de la “M4” se encontraron tres cambios de base todos ellos de C→A en las

posiciones 153, 157 y 212 mostrando una desviación más notoria de la curva con respecto al control, mientras que la curva de la muestra “M2” presenta ocho cambios de base en su secuencia respecto al control, de los cuales 4 son de C→T en las posiciones 153, 154, 156 y 158 y los 4 restantes de A→T en las posiciones 155, 161, 167 y 176, observando una diferencia en el patrón de su curva con respecto a la del control creyendo que pueda ser debido a la cantidad de cambios que presentó la secuencia.

En cuanto a la curva de la muestra “M5” esta presentó 45 cambios de base en su secuencia así mismo mostró una mayor desviación y un patrón diferente de su curva con respecto al control, esto puede atribuirse a que en el análisis por BLAST mostró una identidad del 89.13% con secuencias de la especie *Brucella melitensis*. Finalmente, y a destacar que tras el análisis de las curvas melting, la muestra “M14”, no mostró homología con respecto al control ni con el resto de las muestras, su curva melt tuvo un intervalo de temperatura muy diferente al encontrado. Estos resultados demuestran que el número de cambios observados están directamente asociados con las variaciones observadas en las curvas de disociación. Se sabe que el número de cambios de base en la secuencias influyen en el comportamiento de cada una de las curvas, es decir que entre más cambios de base tenga una secuencia mayor será la diferencia del patrón de su curva con respecto al patrón de la curva del control (Escobar-Chaparro *et al.*, 2017). Por tanto, este trabajo es un primer acercamiento para identificar a *Brucella abortus* y diferenciarla de otras especies.

Cabe destacar que la curva de la “M14” fue la que tuvo intervalo de temperatura con mayor diferencia con respecto al resto de las muestras ya que en las curvas de disociación inicia su desnaturalización de ADN en el rango de 85°C a 87°C mientras que las curvas que corresponden a *B. abortus* lo inician en el rango de 91°C a 93°C, por otro lado la curva que corresponde a *B. melitensis* lo hace a la temperatura de 87°C a 88°C aproximadamente, pudiéndose observar las diferencias.

Sharifi Yazdi *et al.* (2008) usaron como referencia de *Brucella* cepas salvajes y cepas vacunales para desarrollar un ensayo de PCR multiplex, que diferencia dos cepas vacunales con cepas salvajes mediante el uso de diferentes tamaños de fragmentos de ADN, ellos reportaron que el

primer Wbo1 producen un fragmento de 1300pb para la vacuna RB51 y el primer Wbo2 un fragmento de 400pb para las cepas silvestres. Los primers Eri1 y Eri2 producen un fragmento de 178pb para la cepa salvaje y para la vacuna RB51, para la identificación de la cepa vacunal S19 se basaron en la ausencia del fragmento al evaluar el gen Eri ya que este se encuentra presente en todas las cadenas de *Brucella*, pero excepto en la cadena S19 (Sharifi Yazdi *et al.*, 2008).

Winchell *et al.* (2010) reportaron el desarrollo de una técnica en la que utilizan la qPCR con el análisis HRM para detectar específicamente y diferenciar entre especies del género *Brucella*, utilizaron un panel de 7 pares de oligonucleótidos que amplifican 7 locis independientes, probados en 153 aislados de *Brucella spp.* Con una exactitud >99% comparada con las técnicas tradicionales. Esta técnica resulta ser una herramienta en el diagnóstico clínico, epidemiológico e investigaciones veterinarias (Winchell *et al.*, 2010).

Piranfar *et al.* (2015) desarrollaron un método para la detección de muestras clínica de brucelosis utilizando qPCR y el análisis HRM, en donde incluyeron la detección y el análisis de polimorfismos con RFLP para identificar y caracterizar especies de *Brucella*, el método utiliza 5 conjuntos de primers de 5 genes diferentes para caracterizar todas las especies de *Brucella* y sus biovariedades.

Masjedian Jazi *et al.* (2017) emplearon oligonucleótidos que fueron capaces de identificar el género y especies de *Brucella*. Estos primers pueden identificar a *B. abortus* mediante un amplificado de 520 pb y a *B. melitensis* con un amplificado de 398 pb basándose en la diferencia de los tamaños del segmento y la secuencia de los segmentos amplificados siendo esto el factor diferenciador básico de las dos especies. A diferencia de otros estudios en donde utilizan el análisis HRM con diferentes pares de oligonucleótidos para la identificación de diferentes cepas bacterianas, este estudio solo utiliza un par de oligonucleótidos que diferencia a dos especies bacterianas (Masjedian Jazi *et al.*, 2017). Cabe destacar que nuestro estudio es capaz de identificar a dos especies diferentes con un solo par de primers, además el tamaño del amplicón es mucho menor que el tamaño reportado por Masjedian Jazi *et al.* (2017), esta es una ventaja debido a que los tiempos de análisis mediante HRM se acortan.

8. CONCLUSIONES

El uso del gen *GLK* permitió identificar a *Brucella abortus* en 62 muestras de ADN extraído de un total de 82 muestras de sangre total de bovino.

El análisis qPCR fue capaz de identificar el gen *GLK* de la especie *Brucella abortus* en muestras de sangre de ganado bovino de la región, así como también, el análisis HRM fue capaz de diferenciar entre dos especies del género *Brucella*, *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*, quedando esto corroborado con el análisis de secuenciación de ADN.

Se pudo diferenciar a la especie *Brucella abortus* de la especie *Brucella melitensis* de acuerdo al comportamiento de sus curvas ya que el patrón de las curvas que corresponden a *Brucella abortus* se encuentran en un rango de temperatura de 91-93°C, rango donde la secuencia de ADN empieza a desnaturalizarse, mientras que la especie *Brucella melitensis* lo hace a la temperatura de 87-88°C aproximadamente.

Con la secuenciación se identificó el 80% de las muestras representativas, como positivas a *Brucella abortus* y se identificaron los cambios de base en cada una de las secuencias analizadas.

Basadas en las anteriores evidencias experimentales se propone que el uso de la qPCR detectará la infección con el microorganismo en etapas tempranas de la enfermedad mientras que el análisis HRM diferenciará entre cepas o especies del género.

9. PERSPECTIVAS

- Diseñar controles sintéticos para evitar variaciones en los análisis de qPCR y determinar análisis de confiabilidad.
- Evaluar otras especies de animales de interés zootécnico que puedan compartir condiciones similares en pastoreo y de zoonosis.
- Aumentar el número de muestras para realizar la validación de la técnica, así como la sensibilidad, especificidad, valores predictivos (positivo y negativo) y exactitud del método.
- Secuenciar todas las muestras que resulten positivas en la amplificación del ADN para determinar variaciones genéticas
- Determinar si la técnica puede ser repetitiva en otros equipos de qPCR.

10. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar Romero, F., Cantú Covarrubias, A., Díaz Aparicio, E., Favila Humara, L. del C., Enrique, H. L., Moralez Álvarez, J. F., ... Santillán Flores, M. A. (2011). Prevención de brucelosis en rumiantes. Manual de capacitación. *INIFAP-SAGRAPA*, 2(1), 5–38.
- Castro, H. A., González, S. R., & Prat, M. I. (2005). Inmunología Brucelosis: Una revisión práctica. *Acta Bioquímica Clín Latinoam*, 39(2), 203–219.
- Corbel, M. J., Stuart, F. A., & Brewer, R. A. (1984). Observations on serological cross-reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. *Developments in Biological Standardization*, 56, 341–348.
- Doosti, A., & Dehkordi, P. G. (2011). Application of real-time pcr for identification and differentiation of brucella abortus and brucella melitensis in cattle. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 14(2), 109–115.
- Escobar-Chaparro, R. A., Guillén, G., Espejo-Galicia, L. U., Meza-Villalvazo, V. M., Peña-Castro, J. M., & Abad-Zavaleta, J. (2017). qPCR and HRM-based diagnosis of SNPs on growth differentiation factor 9 (GDF9), a gene associated with sheep (*Ovis aries*) prolificacy. *3 Biotech*, 7(3). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0837-z>
- Farrar, J. S., & Wittwer, C. T. (2017). High-Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics. In G. P. Patrinos (Ed.), *Molecular Diagnostics* (3rd ed., pp. 79–102). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00006-7>
- Hamdy, M. E. R., & Amin, A. S. (2002). Detection of *Brucella* species in the milk of infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. *The Veterinary Journal*, 163(3), 299–305. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2001.0681>
- Kaynak-Onurdag, F., Okten, S., & Sen, B. (2016). Screening *Brucella* spp. in bovine raw milk by real-time quantitative PCR and conventional methods in a pilot region of vaccination, Edirne, Turkey. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3351–3357. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10637>
- Leal-Klevezas, D. S., Martínez-Vázquez, I. O., García-Cantú, J., López-Merino, A., & Martínez-Soriano, J. P. (2000). Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. *Veterinary Microbiology*, 75(1), 91–97. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00200-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00200-5)

- Mantur, B., Amarnath, S., & Shinde, R. (2007). Review of clinical and laboratory features of human Brucellosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 25(3), 188–202.
- Martinez Morellano, E. (2014). *Situación actual de la brucelosis en la región mixteca de Oaxaca. (Tesis de Licenciatura)*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón, Coahuila, México.
- Masjedian Jazi, F., Mirnejad, R., Piranfar, V., Amir Mozafari, N., Zahraei Salehi, T., Khormali, M., ... Irajian, G. R. (2017). Real-time PCR and high-resolution melt analysis methods for detection of pathogenic species of Brucella. *LaboratoriumsMedizin*, 41(6), 325–331. <https://doi.org/10.1515/labmed-2017-0030>
- Medina, G., Rentería, T., Licea, A., Navarro, A., Morales, J., Montaña, J., ... Nielsen, K. (2003). Detección de brucelosis en ganado bovino a partir de muestras de leche y colonias sospechosas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *II Simposio Internacional de Brucelosis.*, 47–48.
- Mejía Martínez, K., & Lemus Flores, C. (2012). Comparación de las pruebas rosa de bengala y rivanol con elisa para el diagnóstico de brucelosis bovina - Comparing the rosa de bengala and rivanol in the elisa test for diagnosis of bovine brucellosis. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(2), 1–14.
- Méndez-Lozano, M., Rodríguez-Reyes, E. J., & Sánchez-Zamorano, L. M. (2015). Brucelosis, una zoonosis presente en la población: Estudio de series de tiempo en México. *Salud Publica de Mexico*, 57(6), 519–527.
- Mohamed Zahidi, J., Bee Yong, T., Hashim, R., Mohd Noor, A., Hamzah, S. H., & Ahmad, N. (2015). Identification of Brucella spp. isolated from human brucellosis in Malaysia using high-resolution melt (HRM) analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 81(4), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.12.012>
- Mosquera C, X., Bernal V, C., Muskus L, C., & Berdugo G, J. (2008). Deteccion de Brucella abortus por PCR en muestras de sangre y leche de vacunos. *Revista MVZ Cordoba*, 13(3), 1504–1513.
- Naveen Kumar, V., Vijaya Bharathi, M., Selvaraju, G., Porteen, K., & Vijayarani, K. (2018). Serum based polymerase chain reaction and enzyme linked immunosorbent assays for diagnosis of bovine brucellosis Serum based polymerase chain reaction and enzyme linked

- immunosorbent assays for diagnosis of bovine brucellosis. *Indian Journal of Animal Research*, 1(6), 1–6. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-3542>
- Norma Oficial Mexicana. (1994). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-022-SSA2-1994, "PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA BRUCELOSIS EN EL HOMBRE, EN EL PRIMER NIVEL DE ATENCIÓN. *Diario Oficial de La Federación*.
- OIE. (2019). Organización Mundial de Sanidad Animal. Retrieved from OIE website: <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/el-sistema-mundial-de-informacion-sanitaria/antigua-clasificacion-de-enfermedades-de-declaracion-obligatoria-a-la-oie-lista-b/>
- Pacheco, N., & Mosquera, O. (2015). Detección de *Brucella* sp. por PCR en sangre de bovinos. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 20(2), 26–34.
- Padilla Poester, F., Nielsen, K., Samartino, L. E., & Ling Yu, W. (2010). Diagnosis of Brucellosis. *The Open Veterinary Science Journal*, 4, 46–60. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(70\)92522-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(70)92522-5)
- Piranfar, V., Sharif, M., Hashemi, M., Vahdati, A. R., & Mirnejad, R. (2015). Detection and discrimination of two brucella species by multiplex real-time PCR and high-resolution melt analysis curve from human blood and comparison of results using RFLP. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(9), 909–914.
- Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), 597–608. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.597>
- Salhi, I., Boigegrain, R. A., Machold, J., Weise, C., Cloeckert, A., & Rouot, B. (2003). Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infection and Immunity*, 71(8), 4326–4332. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.8.4326-4332.2003>
- Sbriglio, J. L., Sbriglio, H., & Sainz, S. (2007). Una patología generalmente subdiagnosticada en Humanos y que impactan negativamente en la producción pecuaria y desarrollo de nuestros países. *Revista Bioanálisis*, 13(1), 18–22.
- Sharifi Yazdi, H., Khazrainia, P., Zahraei Salehi, T., & Behroozikhah, A. M. (2008). Development of

- a multiplex polymerase chain reaction assay for differentiation of field strain isolates and vaccine strains S19 and RB51 of *Brucella* in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 9(1), 19–24. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2008.62>
- Simpson, G. J. G., Marcotty, T., Rouille, E., Chilundo, A., Letteson, J. J., & Godfroid, J. (2018). Immunological response to *Brucella abortus* strain 19 vaccination of cattle in a communal area in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 89, 1–7. <https://doi.org/10.4102/jsava.v89i0.1527>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (1990). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Revista de Investigación En Discapacidad*, 2(2), 70–78. <https://doi.org/10.1157/13059826>
- THE CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. (2013). *Brucellosis bovina: Brucella abortus*. Retrieved from http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucella_abortus-es.pdf
- UDG, P. científico de la. (2009). Microbial: Pathogen detection systems by time PCR. Results Interpretation Guide. *Microbial*, pp. 1–18.
- Wareth, G., Melzer, F., Tomaso, H., Roesler, U., & Neubauer, H. (2015). Detection of *Brucella abortus* DNA in aborted goats and sheep in Egypt by real-time PCR Veterinary Research. *BMC Research Notes*, 8(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1173-1>
- Winchell, J. M., Wolff, B. J., Tiller, R., Bowen, M. D., & Hoffmaster, A. R. (2010). Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of Real-Time PCR and High-Resolution Melt Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 697–702. <https://doi.org/10.1128/JCM.02021-09>

11. ANEXOS

Anexo 1. Secuencia del gen GLK

CDS en color verde: 1559-2600pb, amplicón y primers en color gris.

...GAATTCGGGAAATCGATCCATGGCTCAGAAATCCGACTCCAAATTCTGCTCTCGTCTGGTTCTCGCCGC
TTCGCTGGCGGCAATGATCGCGCCCGGCTTCTTGCCGGTGGCTATGGCGGAAGACATGCCCGCCAAACA
GGCTTTCGGTGC GGAGCAATTGCCTATGCTGGCGCAGCAGCCGCAATCCATCGGCTTTTATGCCAAGGG
CTGCCTTGCCGGTGCCGTGGCGCTGCCGACCGACGGCCCAACTGGCAGGTCATGCGCCTTTCGCGCAA
CCGCCGCTGGGGCCACCCGCGCATGATCGCGCTTCTGGAAAAGCTGTGCACGACGCGGCCAGGGACG
GATGGCCGGGCTTGCTGGTCGGGGATATTTCCAGCCGCGCGGGGCCGATGCTGACTGGCCACGCCT
CGCATCAGGTGGGCCTTGATGCCGATATCTGGCTGACGCCCATGCCAAAAAACGTTACCAATGCCGA
ACGTGAGAGCGTTTCCGCCGTTTCCATGCTGAAACCGGATTGCTCTATGTGGACCCGAAAAAGTGGAC
ACCTGCCCGCACCGCGCTTTTGAACATGCCGCCAGCTATCCGGAAGTGGAACGCATCTTCGTGCATCCC
GGCATCAAGAAACA ACTCTGCGACACGGTGACAGGCGACAGAAGCTGGCTCGGCAAGGTTCCGCCCTAT
TGGGGCCACTTCTACCATTCCATGTGCGCCTCACCTGCCAGCCGGGTTCCGCCGAATGCAAGCCCAAC
CCAAGTTCGCGCCCGGCGACGGTTGCGACAAATCGCTTGCATGGTGGTTTACGGATGAGCCGTGGAAG
CCCGCAAAGCCATCCGGCAAACCTGCAAAGAAGCCAAAGCCGGTGATGGTTTCCGATTTGCCGAAAGCC
TGTGCCCGCGTGTGAACGGCCGGCGCCGAACTCTATCGCAGACGTACCTACGGCACAAAATAGAGC
TTTTCGCGCAAGCATGTCCGTCCAGCGCAATTACAGGGCTTGACGCGCACTGACACAATCTGCTTTTCAG
CAGCGCGTGGCTCCGTATAGATTTAAAACGATTTAGCCGCTGAATGACAAGGTTATCAATCGCCAAGGA
CGCCGTTTCATGACCCAACGCCTGCGCATCGCACTGATTGCCCATGACCAGAAAAAGGACGACATGGTT
GCTTTTGGCCGGGCTCATGAGCAGGCATTGTCCCGCTATGATATCGTAGCAACGGGAACGACGGGTGGG
CTCATTCAAGGATGCCTGCCCTTCGCTGAACATTCACCGGGTCAAAGCGGTCCTCTTGCGGGCGACCAGC
AGATCGGCGCGATGATTGCGGAAGGCACGGTGGAAAGTGTCTCATCTTCTTTATCGATCCGCTCTCGCCGCT
TCCCCATGATGTGGATGTGAAGGCCCTGACGCGCCTTGGCAGCGTCTACGATATTCCAATGGCGTTGAAC
CGCGGACCGCTGAAAAGCTGGTCAGGGCGCTGGACTGAACAACCAGCGCCTATCAACATTCAGGTTTG
AAGCATGTTAGCCTGCTCCATGGCGGGCGCGAGACATGACAGGAGAGGACATGCAAGCGATTATCGAC
GCCGAACAGAGTTTCAAGTTTCCGTTTCTCGTCGGCGATATCGGCGGCACCAATGCCCGTTTTTCTATCCT
CGTGGATTCAAACGCGGAGCCGAAGGAGTTTCCCGTGTCTCCAGACGGCGGATTATGCCACAATAGACGA
AGCGATCCAGCACGCCATTCTGGATCAGACGGCCATCCAGCCGCGCTCTGTATTCTGGCCGTGGCAGG
CCCGGTGGACGGCGACGAGATCGACCTACCAATTGCGACTGGTTCGTGCGTCCTAAAAAGATGATCGC
TGATCTGGGCTTTGAAGACGTGACCGTCTCAATGATTTCCAGGCGCAGGCCCTTGCCGTGGTTTCGCTG
GAAGGCCACCATATGGAACAGATCGGCGGCAAACCGGAGGAGGCTGTTGCCACCCGCGTCGTGCTCGG
CCCCGGCACGGCCTTGCGTGGCAGGTCTGTTTCGCACACGTATGCATGGGTTCCGGTTCGCGTGA
AGGCGGTCATATCGATATCGGTCCACGCACCGAACGCGACTACCAGATTTCCGCATATCGAACGCATC
GAAGGGCGTGTACCGGCGAGCAAATTTAGCGGGCGGGGCTGCGCAACCTCTATCTGGGCATCTGC
GCCGCCGACAAGATCACGCCACCC
TTGAGACGCCAGTAGACATTACATCCGCCGACTGGACGGCAGCAATCCACAAGCCGCGAGAAACGCTTG
ACCTCTTCGCCACCTATCTGGGGCGGCTTGCGGGCGACCTTGCCTCATTTTCATGGCGCATGGCGGCGT
TTATCTTTCGGGTGGCATCCCGGTGCGCATCTTTCCGCCCTCAAGGCCGGTTCGTTCCGCGCAACCTTCG
AGGACAAGGCCCGCACAAAGCCATCATGCGCGACATACCGGTCCGCGTTATCACATATCAACTGGCGG
CCTTAACCGGGCTTTCGCTTTCGCCCGCACCCCTCGCGCTTGAAGTTTCGACCGAGGGCCGCGCTG

GCGCATGCGCCGCTAGAGCATTCCGAGCCAAAAGTGCGAAGCGGTTCCGTTCCATTAATTGACCAGT
CCCGCGCCTGGTCTTGATCTTAGGATGGTCAAGCCGCGCGGATGACGTTATAGAAACGCTGCGATGGAA
TTACGCTTCGCTTTTTTCATTGTGGCGTCCCATGCGAGAGAACGCATTGTTCAACGATAGCCGCCGGC
AACCGGGGCCAGAGACAAAAGCGTTTTGCACGTGAGTCTATTCAAGAAGAAAAACAGGAAGATCGA
TCCGGGCGAAGCCACCCGCGTGATCCGGCGCATGATGTGCGAAAACATCCGCGAATATAAGCAGAATTA
CCTCATTGCGATCATCGCATCACTGATCGTGGGCGGGTCCAATGGCGCGCTCGCCTATATGATGAAGCCG
ATGATCGACAAGATTTTCTATGAGCAGAATCTTGCTCTGGTCTGGGTCATCTGCGGCGCATTGCTGACGA
TTTTCGTATTGCGCGGCATTTTCGGGCTATGTGCAGGCGGTGAGCTGGCAAAGATCGGCAATAATCTGG
TCGCGCGCTATCAGAAACGCATTTTCGACCACTTGATGAAGCTCGGCCTCGACTTCTATAACGACACGCG
CTCCGGCCATCTGGCGGCGCAAATCAACCAGAATGTTGCCGGCATTGCGGATCTTCTCAACATGACCATC
TCGTGATTGCGCGCGATTTTCATTTTCGTTGTGCGGTCTCGTGGGATGATGTTCTACATGGATCCGGTCT
TTCTGTTGCGATTTTCCTGATCGGCCCCGCGCTCATTCTGGCCGTCGCCTATATTTTCGCGCCGATCCGCTC
CGTTACCCGCGAGGTGTCATCTCAACTCCCATCTTCTGGGAGCCATGCAGGAATCGATCCAGGGAATT
GCCATCGTGAAAGCCTTTACGATGGAAGACCAGCTTCGCGCCAAAATCGACGATCTGATTGATCAATCCG
AAGGCCGAGCAACAAGATTGCCAAGTTTTCCGAGCGCACGACGCCTATTTCCGAAATACTGGCCGGCG
TCGCTGTTTCCGGCGTGCTGGTCTATAGCGGCTATCGCGCCATTCTCGAACACCAGCCGCCCGGCCAC
TTTTGCCTTCATCACCGCAATGCTGCTTGCCTATGACCCGGCCCGCTGCCTCGCCCGCTGCAAGTCGGCC
TGGAAAAAGCCCTGGTCAATGCGCGCATGATCTATGAAGTTCTGGATATCGAACCAGCGCCAGCGCGACC
TTCAAGGTGCGACGGAAGTAAAGCCGGCCCCGGTAAATCCGCTTCGACAATATTTATTTCTCTATAA
CCAGACTGCCCCGGTGTGTCATGGTGTACCTTCATGGCCAAGGCGGGCGAAACCAGGCCGTTGTGCGG
CGGTCTGGCGCTGGCAAATCGACCCTCATCAGCCTCGTCCAGCGTTCTATGACCTCGACCGGGGAAG
GATCCTTTTCGATGGGCAGGATATTGCCGGGGTACGAAACAGTCGCTGCGTCACGCCATCGCCTATGTC
TCGCAACAGCCCTATCTGTTTGAAGGCACGATTGCCGATAATATCCGCTATGGCCGTCTGACGCGAGCG
ATGAGGAGATCATCGAAGCGGCCAAGCTTGCCCATGCGCATGAATTC...

Anexo 2. Blast y electroferogramas de las muestras secuenciadas

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BJ1 chromosome 2, complete sequence	198	332	87%	1e-46	95.97%	CP033080.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain IVRI/95 chromosome II, complete sequence	198	332	87%	1e-46	95.97%	CP034696.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain A19 chromosome 2, complete sequence	198	332	87%	1e-46	95.97%	CP030752.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain Wisconsin genome assembly, chromosome: 2	198	332	87%	1e-46	95.97%	LT671513.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain CIIMS-NV-4 chromosome II, complete sequence	198	332	87%	1e-46	95.97%	CP025744.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 9510 chromosome 2	198	332	87%	1e-46	95.97%	CP023309.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 33295 chromosome 2	198	332	87%	1e-46	95.97%	CP023214.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 14330 chromosome 2	198	332	87%	1e-46	95.97%	CP023244.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 84573 chromosome 2	198	332	87%	1e-46	95.97%	CP023242.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BDW chromosome 2, complete sequence	198	332	87%	1e-46	96.69%	CP007680.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus A13334 chromosome 2, complete sequence	198	332	87%	1e-46	95.97%	CP003177.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus S19 chromosome 2, complete sequence	198	332	87%	1e-46	95.97%	CP000888.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 chromosome II, complete sequence	198	332	87%	1e-46	95.97%	AE017224.1

Figura 11. Alineamiento de la muestra "M2"

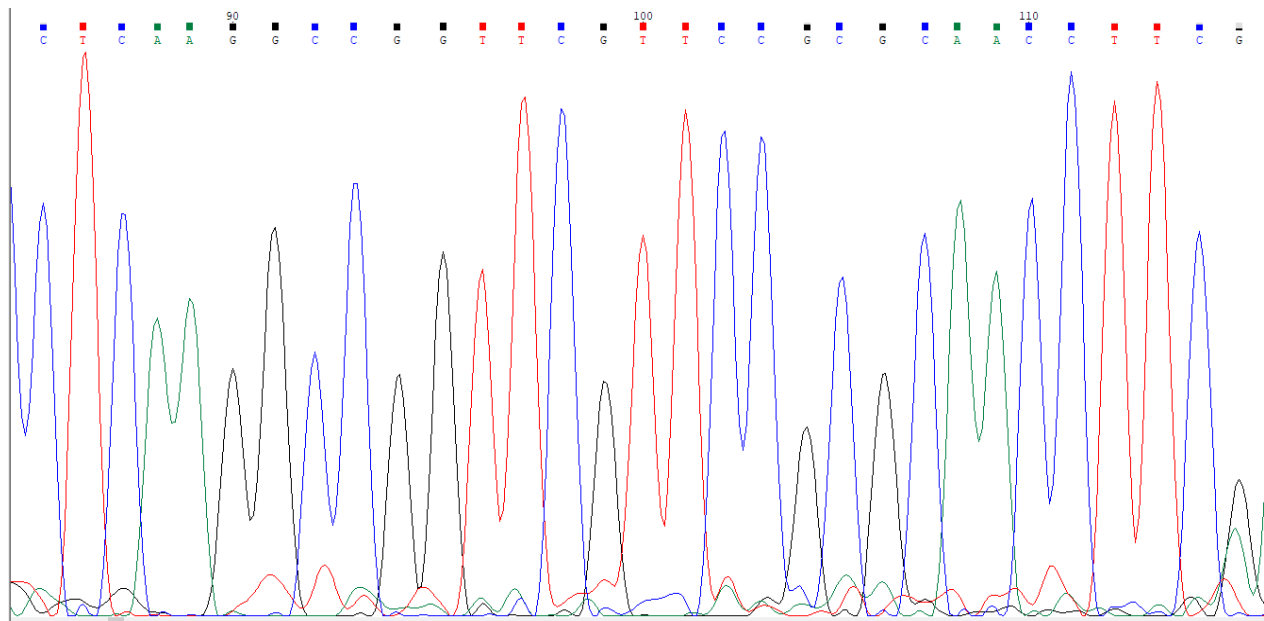


Figura 12. Electroferograma de la muestra "M2"

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BJ1 chromosome 2, complete sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP033080.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain IVRI/95 chromosome II, complete sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP034696.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain A19 chromosome 2, complete sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP030752.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain Wisconsin genome assembly, chromosome: 2	169	325	79%	8e-38	98.94%	LT671513.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain CIIMS-NV-4 chromosome II, complete sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP025744.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 9510 chromosome 2	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP023309.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 2 str. 86/8/59 chromosome 2, complete sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP007764.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 63 75 chromosome 2, complete sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP007662.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 6 str. 870 chromosome 2, complete sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP007710.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 9 str. C68 chromosome 2, complete sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP007706.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain NCTC 10505 chromosome 2 sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP007701.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BDW chromosome 2, complete sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP007680.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus A13334 chromosome 2, complete sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP003177.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus S19 chromosome 2, complete sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	CP000888.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 chromosome II, complete sequence	169	325	79%	8e-38	98.94%	AE017224.1

Figura 13. Alineamiento de la muestra "M4"

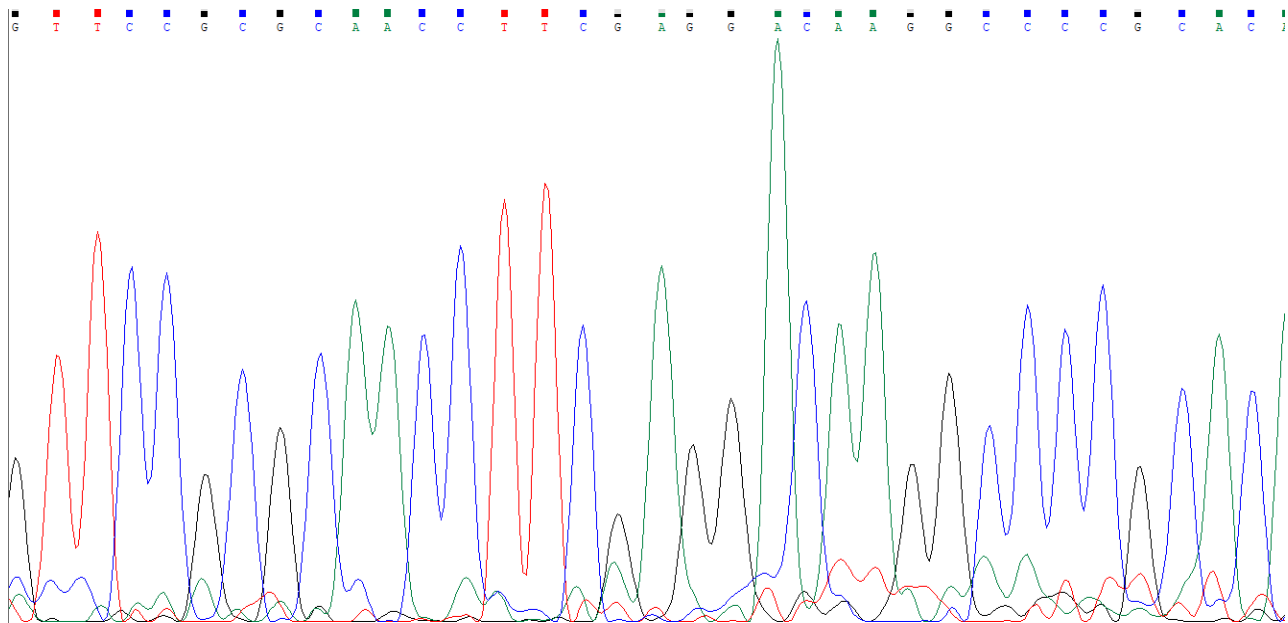


Figura 14. Electroferograma de la muestra "M4"

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BJ1 chromosome 2, complete sequence	196	371	54%	4e-46	95.24%	CP033080.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain IVRI/95 chromosome II, complete sequence	196	371	54%	4e-46	95.24%	CP034696.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain A19 chromosome 2, complete sequence	196	371	54%	4e-46	95.24%	CP030752.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain Wisconsin genome assembly, chromosome: 2	196	371	54%	4e-46	95.24%	LT671513.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain CIIMS-NV-4 chromosome II, complete sequence	196	371	54%	4e-46	95.24%	CP025744.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 9510 chromosome 2	196	371	54%	4e-46	95.24%	CP023309.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 63 75 chromosome 2, complete sequence	196	371	54%	4e-46	95.24%	CP007662.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 6 str. 870 chromosome 2, complete sequence	196	371	54%	4e-46	95.24%	CP007710.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 9 str. C68 chromosome 2, complete sequence	196	371	54%	4e-46	95.24%	CP007706.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain NCTC 10505 chromosome 2 sequence	196	371	54%	4e-46	95.24%	CP007701.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BDW chromosome 2, complete sequence	196	371	54%	4e-46	95.24%	CP007680.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus A13334 chromosome 2, complete sequence	196	371	54%	4e-46	95.24%	CP003177.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus S19 chromosome 2, complete sequence	196	371	54%	4e-46	95.24%	CP000888.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 chromosome II, complete sequence	196	371	54%	4e-46	95.24%	AE017224.1

Figura 15. Alineamiento de la muestra "M6"

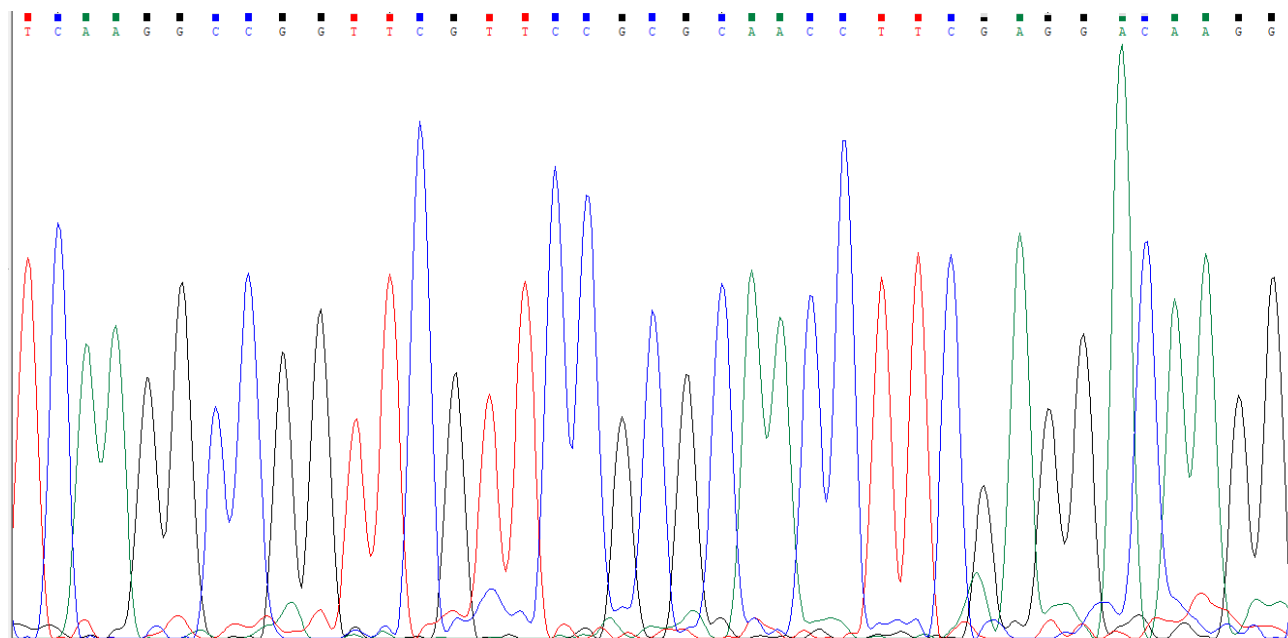


Figura 16. Electroferograma de la muestra "M6"

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BJ1 chromosome 2, complete sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	CP033080.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain IVRI/95 chromosome II, complete sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	CP034696.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain A19 chromosome 2, complete sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	CP030752.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain Wisconsin genome assembly, chromosome: 2	220	393	71%	2e-53	96.97%	LT671513.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 3196 chromosome 2, complete sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	CP007708.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 2 str. 86/8/59 chromosome 2, complete sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	CP007764.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 63 75 chromosome 2, complete sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	CP007662.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 6 str. 870 chromosome 2, complete sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	CP007710.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 9 str. C68 chromosome 2, complete sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	CP007706.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain NCTC 10505 chromosome 2 sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	CP007701.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BDW chromosome 2, complete sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	CP007680.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus A13334 chromosome 2, complete sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	CP003177.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus S19 chromosome 2, complete sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	CP000888.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 chromosome II, complete sequence	220	393	71%	2e-53	96.97%	AE017224.1

Figura 17. Alineamiento de la muestra "M9"

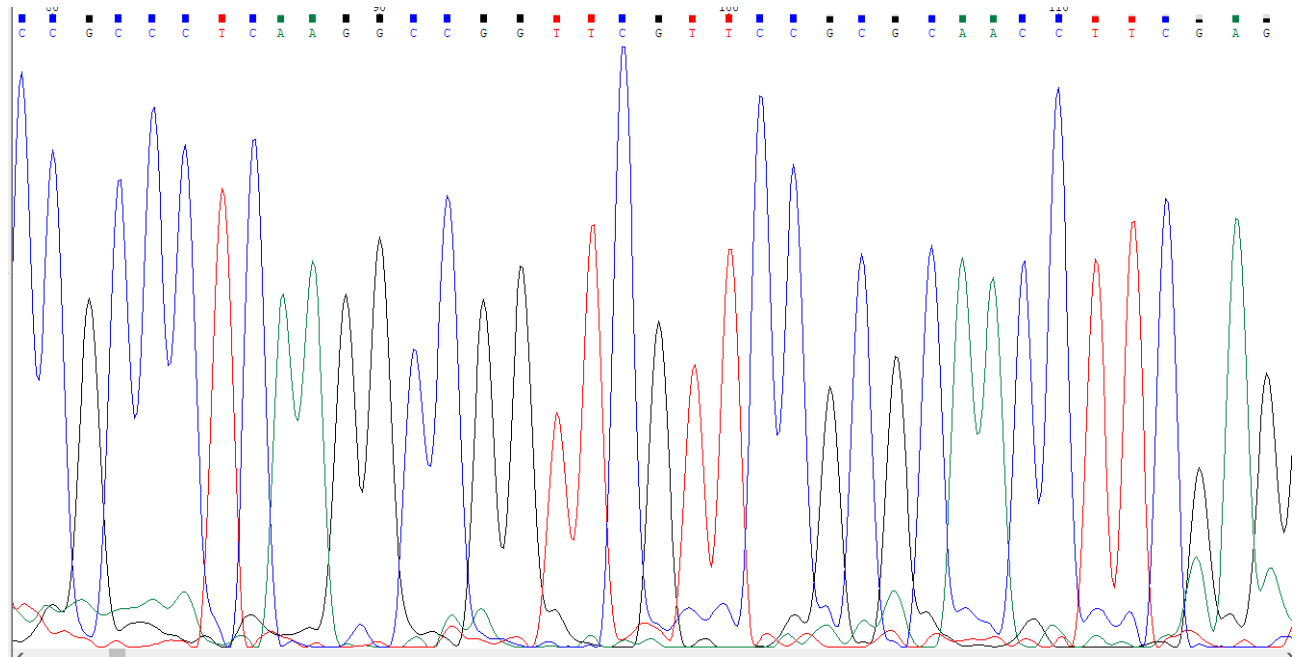


Figura 18. Electroferograma de la muestra "M9"

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BJ1 chromosome 2, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP033080.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain IVRI/95 chromosome II, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP034696.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus 104M chromosome 2, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP009626.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BAB8416 chromosome 2, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP008775.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 3196 chromosome 2, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP007708.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 2 str. 86/8/59 chromosome 2, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP007764.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 63 75 chromosome 2, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP007662.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 6 str. 870 chromosome 2, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP007710.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 9 str. C68 chromosome 2, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP007706.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain NCTC 10505 chromosome 2 sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP007701.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BDW chromosome 2, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP007680.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus A13334 chromosome 2, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP003177.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus S19 chromosome 2, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	CP000888.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 chromosome II, complete sequence	196	362	52%	4e-46	96.64%	AE017224.1

Figura 19. Alineamiento de la muestra "M10"

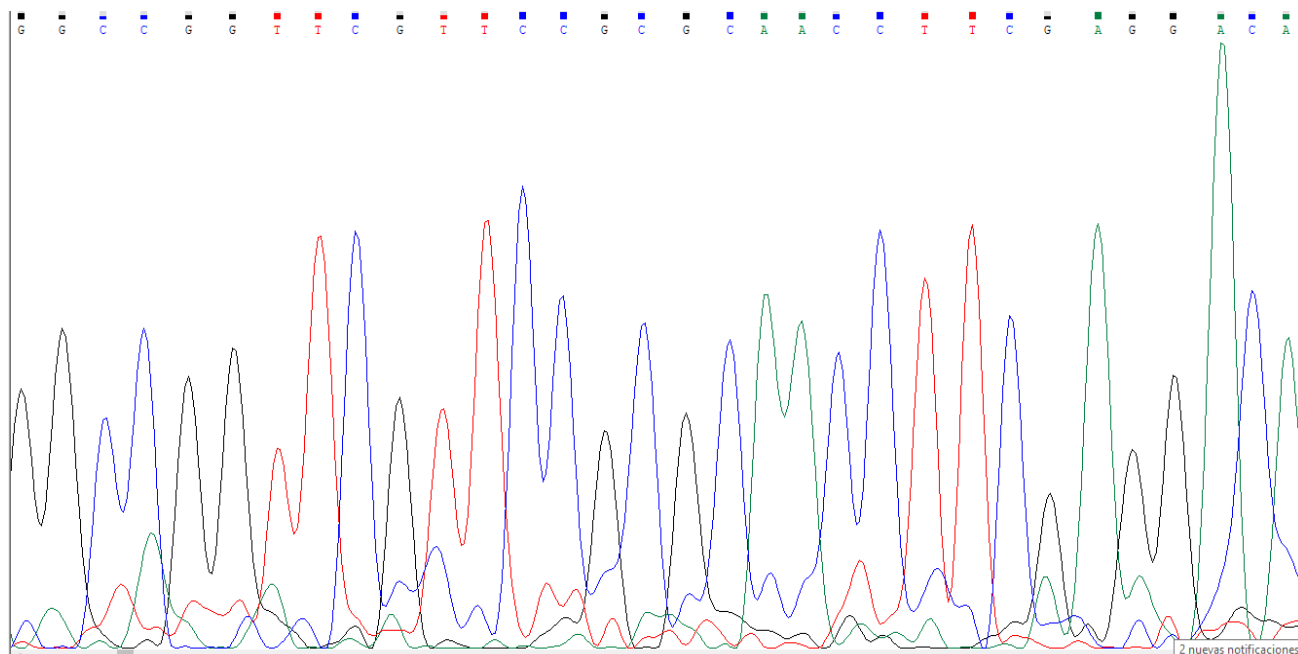


Figura 20. Electroferograma de la muestra "M10"

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BJ1 chromosome 2, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP033080.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain IVRI/95 chromosome II, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP034696.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain A19 chromosome 2, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP030752.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain Wisconsin genome assembly, chromosome: 2	215	377	94%	1e-51	98.37%	LT671513.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus 104M chromosome 2, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP009626.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BAB8416 chromosome 2, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP008775.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 3196 chromosome 2, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP007708.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 2 str. 86/8/59 chromosome 2, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP007764.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 63 75 chromosome 2, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP007662.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 6 str. 870 chromosome 2, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP007710.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus bv. 9 str. C68 chromosome 2, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP007706.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain NCTC 10505 chromosome 2 sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP007701.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BDW chromosome 2, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP007680.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus A13334 chromosome 2, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP003177.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus S19 chromosome 2, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	CP000888.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 chromosome II, complete sequence	215	377	94%	1e-51	98.37%	AE017224.1

Figura 21. Alineamiento de la muestra "M12"

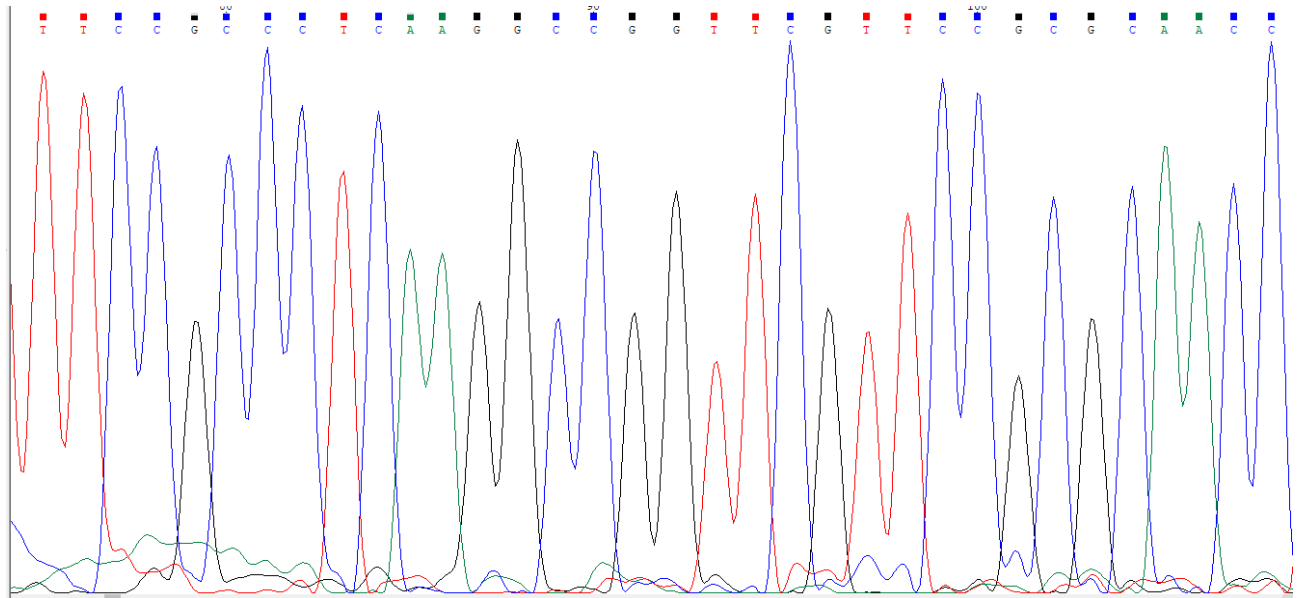


Figura 22. Electroferograma de la muestra "M12"

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain BJ1 chromosome 2, complete sequence	215	390	71%	1e-51	98.37%	CP033080.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain IVRI/95 chromosome II, complete sequence	215	390	71%	1e-51	98.37%	CP034696.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain A19 chromosome 2, complete sequence	215	390	71%	1e-51	98.37%	CP030752.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain Wisconsin genome assembly, chromosome: 2	215	390	71%	1e-51	98.37%	LT671513.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain CIIMS-NV-4 chromosome II, complete sequence	215	390	71%	1e-51	98.37%	CP025744.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 9510 chromosome 2	215	390	71%	1e-51	98.37%	CP023309.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 33295 chromosome 2	215	390	71%	1e-51	98.37%	CP023214.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 14330 chromosome 2	215	390	71%	1e-51	98.37%	CP023244.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 84573 chromosome 2	215	390	71%	1e-51	98.37%	CP023242.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 21630 chromosome 2	215	390	71%	1e-51	98.37%	CP023236.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus strain 15500 chromosome 2	215	390	71%	1e-51	98.37%	CP023232.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus A13334 chromosome 2, complete sequence	215	390	71%	1e-51	98.37%	CP003177.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus S19 chromosome 2, complete sequence	215	390	71%	1e-51	98.37%	CP000888.1
<input type="checkbox"/>	Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 chromosome II, complete sequence	215	390	71%	1e-51	98.37%	AE017224.1

Figura 23. Alineamiento de la muestra "M13"

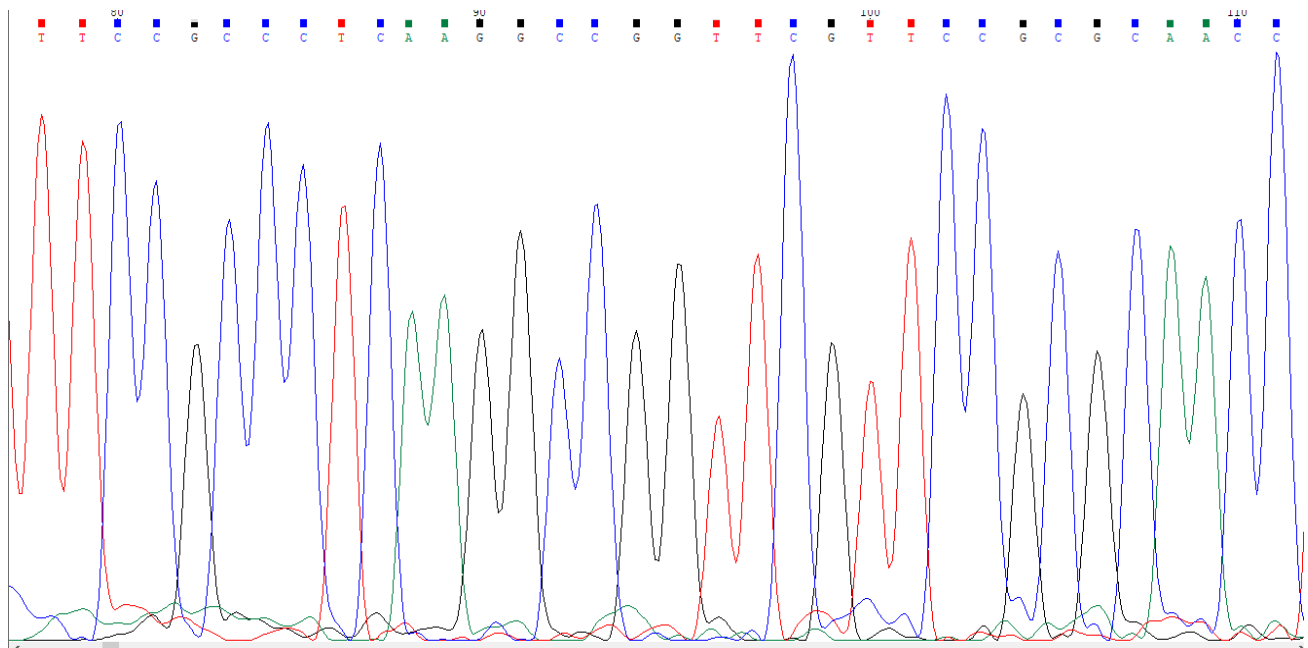


Figura 24. Electroferograma de la muestra "M13"

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis strain BmWS93 chromosome 2, complete sequence	100	100	32%	3e-17	89.13%	CP034104.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis strain CIT31 chromosome 2, complete sequence	100	100	32%	3e-17	89.13%	CP025822.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis strain CIT43 chromosome, complete genome	100	100	32%	3e-17	89.13%	CP026337.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis strain CIT21 chromosome 2, complete sequence	100	100	32%	3e-17	89.13%	CP025820.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis strain B9 chromosome 2, complete sequence	100	100	32%	3e-17	89.13%	CP035798.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis strain B29 chromosome 2, complete sequence	100	100	32%	3e-17	89.13%	CP035794.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis strain B15 chromosome 2, complete sequence	100	100	32%	3e-17	89.13%	CP035796.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis strain CIIMS-NV-1 chromosome II, complete sequence	100	100	32%	3e-17	89.13%	CP029757.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis strain Rev.1 (passage 101) chromosome II, complete sequence	100	100	32%	3e-17	89.13%	CP024716.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis strain CIIMS-BH-2 chromosome II, complete sequence	100	100	32%	3e-17	89.13%	CP025681.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis strain CIIMS-PH-3 chromosome 2, complete sequence	100	100	32%	3e-17	89.13%	CP026006.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 2	100	100	32%	3e-17	89.13%	LT963351.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 2	100	100	32%	3e-17	89.13%	LT963349.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 2	100	100	32%	3e-17	89.13%	LT962954.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 2	100	100	32%	3e-17	89.13%	LT962952.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 2	100	100	32%	3e-17	89.13%	LT962950.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 2	100	100	32%	3e-17	89.13%	LT962948.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 2	100	100	32%	3e-17	89.13%	LT962946.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 2	100	100	32%	3e-17	89.13%	LT962944.1
<input type="checkbox"/> Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 2	100	100	32%	3e-17	89.13%	LT962941.1

Figura 25. Alineamiento de la muestra "M5"

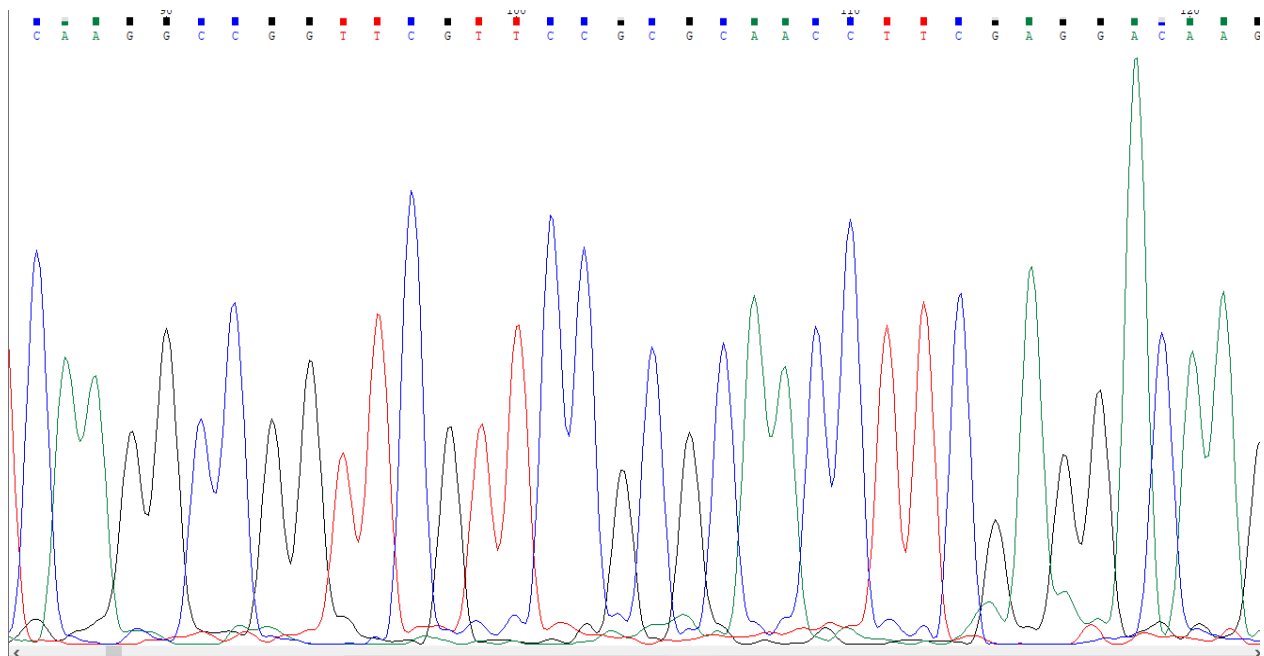


Figura 26. Electroferograma de la muestra "M5"

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Lateolabrax maculatus chromosome Lm2	49.1	49.1	9%	0.24	91.18%	CP027263.1
<input type="checkbox"/> Scophthalmus maximus chromosome 17	47.3	47.3	9%	0.82	90.91%	CP026259.1
<input type="checkbox"/> Anabas testudineus genome assembly, chromosome: 18	46.4	46.4	21%	0.82	73.33%	LR132042.1
<input type="checkbox"/> Phaeobacter inhibens strain P72 chromosome, complete genome	46.4	46.4	8%	0.82	93.33%	CP010735.1
<input type="checkbox"/> Coregonus sp. 'balchen' genome assembly, chromosome: 29	45.5	45.5	9%	2.9	88.89%	LR664372.1
<input type="checkbox"/> Gadus morhua genome assembly, chromosome: 10	45.5	45.5	9%	2.9	90.62%	LR633952.1
<input type="checkbox"/> Cottoperca gobio genome assembly, chromosome: 2	45.5	45.5	14%	2.9	80.00%	LR131927.1
<input type="checkbox"/> Fasciola hepatica genome assembly, scaffold: scaffold2665_oid	45.5	45.5	10%	2.9	86.49%	LM668214.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Drosophila hydei broad-complex core protein isoforms 1/2/3/4/5 (LOC111602832), transcript variant X4, mRNA	44.6	44.6	12%	2.9	81.82%	XM_023320145.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Drosophila hydei broad-complex core protein isoforms 1/2/3/4/5 (LOC111602832), transcript variant X3, mRNA	44.6	44.6	12%	2.9	81.82%	XM_023320144.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Drosophila hydei broad-complex core protein isoforms 1/2/3/4/5 (LOC111602832), transcript variant X2, mRNA	44.6	44.6	12%	2.9	81.82%	XM_023320142.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Drosophila hydei broad-complex core protein isoforms 1/2/3/4/5 (LOC111602832), transcript variant X1, mRNA	44.6	44.6	12%	2.9	81.82%	XM_023320143.2
<input type="checkbox"/> Sparus aurata genome assembly, chromosome: 16	44.6	44.6	9%	2.9	88.24%	LR537136.1
<input type="checkbox"/> Aquila chrysaetos chrysaetos genome assembly, chromosome: 8	44.6	44.6	7%	2.9	100.00%	LR606188.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Diaphorina citri DNA topoisomerase 1-like (LOC113472182), partial mRNA	44.6	44.6	12%	2.9	81.82%	XM_026831822.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Fukomys damarensis thyroid hormone receptor interactor 4 (Trip4), transcript variant X3, mRNA	44.6	44.6	7%	2.9	100.00%	XM_010641172.2
<input type="checkbox"/> Pseudomonas citronellolis strain SJTE-3, complete genome	44.6	44.6	7%	2.9	100.00%	CP015878.1
<input type="checkbox"/> Apteryx australis mantelli genome assembly AptMant0, scaffold scaffold2	44.6	44.6	8%	2.9	93.10%	LK054626.1

Figura 27. Alineamiento de la muestra "M14"

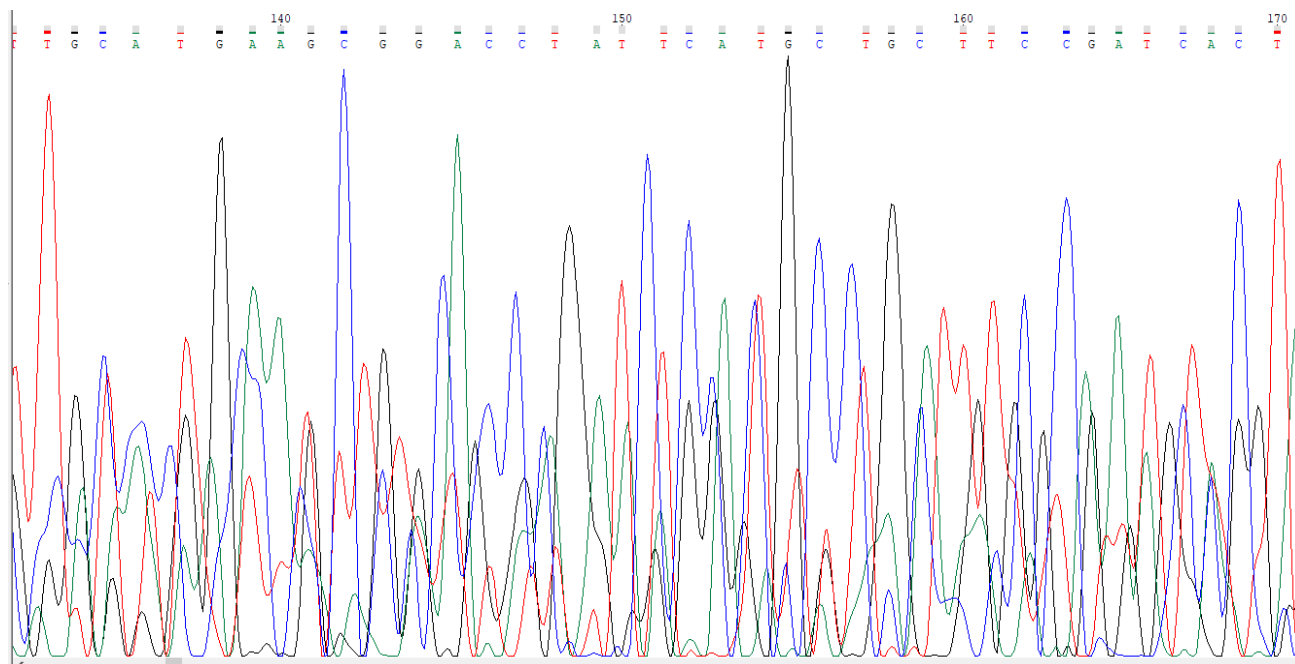


Figura 28. Electroferograma de la muestra "M14"