



**UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**UNIDAD DE ESTUDIOS A DISTANCIA**  
**MODALIDAD SEMIPRESENCIAL**  
**CARRERA INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**TESIS DE GRADO**

**INGENIERO AGROPECUARIO**

**Determinación de la brucelosis en humanos mediante la técnica  
de LAMP en camales municipales de la provincia de Los Ríos**

**AUTOR:**

**PABLO RAMON CEDEÑO JIMENEZ**

**DIRECTOR**

**ING. ORLY CEVALLOS FALQUEZ**

**QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**UNIDAD DE ESTUDIOS A DISTANCIA**  
**MODALIDAD SEMIPRESENCIAL**  
**CARRERA INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**Determinación de la brucelosis en humanos mediante la técnica  
de LAMP en camales municipales de la provincia de Los Ríos**  
**TESIS DE GRADO**

Presentada al Honorable Comité Técnico, Académico, Administrativo de la  
Unidad de Estudios a Distancia como requisito previo a la obtención del título de:  
**INGENIERO AGROPECUARIO**

**Aprobado:**

**MIEMBROS DEL TRIBUNAL**

---

**Ing. Geovanny Suarez Fernández. MSc**  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE TESIS**

---

**Dr. José Tuarez Cobeña. MSc**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE TESIS**

---

**Dr. José Romero Romero. MSc**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE TESIS**

**QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR**

**2013**

## CERTIFICACIÓN

Ing. Orly Fernando Cevallos Falquez, docente tutor de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Certifico: que el señor **PABLO RAMON CEDEÑO JIMENEZ** realizó la tesis de grado titulada: **Determinación de la brucelosis en humanos mediante la técnica de LAMP en camales municipales de la provincia de Los Ríos**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con la disposición reglamentaria establecida para el efecto.

---

**Ing. Orly Fernando Cevallos Falquez**

**DIRECTOR DE TESIS**

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS**

Yo, **PABLO RAMON CEDEÑO JIMENEZ** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

---

**PABLO RAMON CEDEÑO JIMENEZ**

## **DEDICATORIA.**

### **A DIOS TODOPODEROSO:**

Agradezco de manera incondicional a Dios, a la Virgen María, madre de Jesucristo y reina del cielo, por haber llegado a este momento tan especial, ya que son los que me han conducido toda mi vida.

### **A MIS PADRES:**

Pablo y Francisca quienes han sido los que fundaron las primeras bases para mi educación.

### **A MI ADORADA ESPOSA:**

Gabriela por permanecer siempre, conmigo y convirtiéndose en la mujer más hermosa de mi vida, ya que con sus consejos he llegado al final de mi carrera.

### **A MIS HIJOS**

A quienes adoro con todo mi corazón y pretendo darles un buen ejemplo para que el día de mañana sean personas de bien.

### **A MIS QUERIDOS HERMANOS**

Por sus maravillosos consejos

### **A MIS FAMILIARES Y AMIGOS:**

Quienes de una manera u otra han colaborado y motivado para llegar a esta etapa de mi vida.

**Pablo Cedeño**

## **AGRADECIMIENTO**

Dejo constancia de mi agradecimiento a:

Ing. Roque Vivas Moreira, Rector de La Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Ing. Guadalupe Murillo de Luna, Vicerrectora Administrativa.

Ing. Laudén Rizzo, Coordinador del Programa Carrera Agropecuaria.

Ing. Orly Cevallos Falquez, Director de Tesis

Ing. Mercedes Carranza Patiño, Investigadora Laboratorio de Biotecnología.

Blgo. Ariel Escobar Troya, Docente Investigador Laboratorio de Biotecnología.

Ing. Tania Ximena Chancay, Investigador Laboratorio de Biotecnología.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a la presente investigación.

# ÍNDICE

ÍNDICE	Pág
CERTIFICACIÓN .....	iii
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
ÍNDICE .....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN EJECUTIVO.....	xi
SUMMARY.....	xii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN .....	1
1.1 Introducción .....	2
1.2. Objetivos .....	4
1.2.1. General .....	4
1.2.2. Específicos .....	4
1.3. Hipótesis .....	4
CAPÍTULO II.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Generalidades.....	6
2.1.1. Brucelosis en Humano.....	6
2.1.2. Breve Reseña Historica.....	6
2.1.3.Importancia de la Brucelosis.....	6
2.1.4. Agente Etiológico .....	6
2.1.4.1. Características del Genero Especies y Biotipos.....	7
2.1.4.2.Características Epizootiológicas de la Brucelosis.....	8
2.1.5. Epidemiologia.....	9
2.1.5.1. Ingestión .....	10
2.1.5.2. Contacto.....	10

2.1.5.3. Inhalación .....	10
2.1.5.4. Inoculación .....	10
2.1.6. Taxonomía y Filogenia.....	11
2.1.7. Patogenia.....	12
2.1.7.1. Patogenia Asociada.....	14
2.1.8. Hábitat.....	15
2.1.9. Manifestaciones Clínicas.....	15
2.1.9.1. Formas focalizadas o complicaciones.....	16
2.1.10. Diagnóstico.....	18
2.1.10.1. Diagnóstico Indirecto.....	19
2.1.10.2. Diagnóstico directo.....	20
CAPÍTULO III.....	22
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	22
3.1. Localización y duración del experimento.....	23
3.2. Materiales y equipos.....	23
3.3. Metodología .....	265
3.3.1. Extracción del ADN genómico bacteriano.....	25
3.3.2. Cuantificación del ADN .....	286
3.4. Variables a evaluar .....	29
3.5. Manejo del experimento.....	29
CAPÍTULO IV.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
CAPÍTULO V.....	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	42
CAPÍTULO VI.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	45
CAPÍTULO VII.....	51
ANEXOS.....	51

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Juegos de oligonucleótidos LAMP que se utilizó en la amplificación de ADN	26
2	Número de casos positivos y negativos, en la Determinación de la brucelosis en humanos mediante la técnica de LAMP en camales municipales de la provincia de Los Ríos. UTEQ, 2013	33
3	Costo de las pruebas para el diagnóstico de brucelosis en humanos. Laboratorio de biotecnología. UTEQ. Quevedo, 2013	38

## INDICES DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Diluciones seriadas del control positivo de ADN.	28
2	Resultados de la extracción de ADN genómico de muestras de sangre en humano. UTEQ. LABBIO. 2013	33
3	Resultados de la extracción de ADN genómico de muestras de sangre en humano. UTEQ. LABBIO. 2013	34
4	Detección Visual de la reacción LAMP usando fluorescente indicador metal. (a) Bajo la luz del día, (b) Bajo la luz UV; signo más indica reacción positiva (con ADN de cepas C-19), signo menos denota reacción negativo (sin ADN diana control negativo).	35
5	Electroforesis en gel de agarosa análisis de los productos de la reacción de la LAMP. Línea MPM: M: marcador de 100; Línea 1: productos de LAMP producto electroforesis en gel de agarosa resultados para los productos de reacción del control positivo; Carril 2: Los productos de LAMP producto de digestión después de la digestión con enzimas de restricción Alul.	36

## RESUMEN EJECUTIVO

Esta investigación se la realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. El objetivo general de esta investigación fue: Determinar la incidencia de brucelosis humana, en los camales mediante la técnica de LAMP en los municipios de la provincia de Los Ríos. En este estudio se hizo la comparación de la técnica de Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo (LAMP) versus la prueba serológica Rosa de Bengala (RB) en el diagnóstico de la brucelosis humana. Un total de 84 muestras de sangre fueron recolectadas de tres camales municipales de la provincia de Los Ríos con una alta tasa de prevalencia histórica de brucelosis en animales. Un promedio del 0.84% dio positivo para el análisis de RB, mientras tanto que con LAMP fué del 0%, y también se le realizó con PCR, lo que sugiere que la técnica molecular de LAMP versus la tradicional de RB es más sensible. Los resultados muestran que la detección de la muestra positiva mediante la técnica de LAMP fue más específica y sensible que la prueba serológica de Rosa de Bengala, por lo tanto en este trabajo se considera a la LAMP como una herramienta muy útil en el diagnóstico de brucelosis y su uso para futuros programas de prevención y erradicación de la enfermedad.

**Palabras clave:** LAMP, Rosa de bengala, *Brucella abortus*, y brucelosis.

## SUMMARY

This research was conducted in the Laboratory of Biotechnology Quevedo State Technical University. The overall objective of this research was to determine the incidence of human brucellosis in slaughterhouses by LAMP technique in the municipalities of the province of Los Rios. In this study a comparison was made of the technique of isothermal nucleic acid amplification type (LAMP) versus serology Rose Bengal (RB) in the diagnosis of human brucellosis. A total of 84 blood samples were collected from three municipal slaughterhouses in the province of Los Rios with high historical prevalence of brucellosis in animals. An average of 0.84% were positive for the analysis of RB, meanwhile that LAMP was 0%, and is also performed with PCR, suggesting that the molecular technique versus traditional LAMP is more sensitive RB. The results show that the positive sample detection by LAMP technique was more specific and sensitive than the serological test for Rose Bengal, therefore in this paper, we consider the LAMP as a useful tool in the diagnosis of brucellosis and their use for future programs of prevention and eradication of the disease.

Keywords: LAMP, Rose Bengal, *Brucella abortus*, and brucellosis

# **CAPÍTULO I.**

## **MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN**

## 1.1 Introducción

La brucelosis es uno de los principales problemas zoo-sanitarios para el hombre, una enfermedad bacteriana generalizada de comienzo agudo o traídor, caracterizado por fiebre continua, intermitente, o irregular, de duración variable, cefalalgia, debilidad, diaforesis, artralgia, mialgias, pérdida de peso y malestar general (Benenson, 1997).

La brucelosis es una enfermedad que puede afectar a cualquier órgano o sistema, y producir una clínica enormemente variada que en su inicio puede ser totalmente inespecífica, dificultando su diagnóstico precoz. El cuadro clínico en la brucelosis humana puede ser variado y los casos con predominio de manifestaciones gastrointestinales, respiratorias, dérmicas o neurológicas no son raros (Potasman *et al.*, 1991; Santini *et al.*, 1994; Young, 1995).

Existen factores socioeconómicos que favorecen la presencia de la enfermedad como son: el subdesarrollo tecnológico, el bajo nivel de conocimiento en la producción, la poca conciencia sanitaria y la apatía por parte de algunos productores. Cada año existen alrededor de medio millón de casos de brucelosis humana en el mundo (Martínez *et al.*, 2001). La transmisión en el hombre ocurre por contacto directo con las secreciones y excreciones de animales infectados y por ingestión de leche y productos lácteos sin pasteurizar provenientes de animales infectados (Rivera *et al.*, 2001). Se han reportado en laboratorios o en plantas procesadoras de carne la transmisión por aerosoles cuando el aire está contaminado (Navarro *et al.*, 1999). Siendo su huésped habitual el animal, la infección humana es un accidente en la cadena epidemiológica. La afinidad de cada especie de *Brucella* por distintos animales no es selectiva (Montilla y Zamorano 2011).

El íntimo contacto con los animales infectados y sus productos derivados (carnes y leche) por parte de granjeros, carniceros, trabajadores de frigoríficos y personal que manipula esos productos, ofrece mayor oportunidad para que el hombre se contagie, que con otras infecciones transmitidas por animales domésticos (Gotuzzo *et al.*, 1989).

El sacrificio de animales constituye una de las actividades de riesgo; tiene un significado importante en la transmisión de las especies de *Brucella* al hombre, principalmente en las operaciones que involucran el contacto directo con la fuente de infección, representada por las canales y vísceras de animales sacrificados y la formación de aerosoles consecuentes a las condiciones medioambientales reinantes en los lugares de sacrificio, situaciones muy comunes en los mataderos (Sánchez *et al.*, 1998).

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. General**

- Determinar la incidencia de brucelosis humana, en los camales mediante la técnica de LAMP en los municipios de la provincia de Los Ríos.

### **1.2.2. Específicos**

- Estandarizar los protocolos de extracción de ADN a partir de muestras de sangre.
- Determinar el porcentaje de brucelosis humana en el personal que labora en los camales municipales de la provincia de Los Ríos.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica LAMP.
- Establecer el costo del diagnóstico con la técnica LAMP

## **1.3. Hipótesis**

- Con la técnica LAMP se diagnosticará porcentualmente la brucelosis en humanos con mayor sensibilidad y especificidad que con la prueba Rosa de bengala.
- Con la técnica LAMP se bajara el costo para diagnóstico de la brucelosis en humanos.

## **CAPÍTULO II.**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

## **2.1. Generalidades**

### **2.1.1. Brucelosis en Humanos**

En Ecuador la brucelosis constituye un verdadero problema de salud pública al cual se le viene dando mayor importancia en los últimos años. La enfermedad es principalmente de tipo ocupacional, afectando al personal que trabaja en ganaderías, mataderos, granjas porcinas y laboratorios que pueden entrar en contacto con placentas, secreciones y fetos abortados de animales infectados, siendo observadas alteraciones osteoarticulares y cardíacas de tipo crónico en muchos pacientes afectados. Los principales biogrupos causantes de la enfermedad en humanos en Ecuador son, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis* los cuales están asociados a altos títulos de anticuerpos en pruebas serológicas realizadas en diferentes estados del país principalmente en personal ocupacionalmente expuesto. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para conocer el verdadero impacto que esta enfermedad ha tenido en la salud pública en Ecuador (Bayli, 1992 y Díaz 2001).

### **2.1.2. Breve Reseña Histórica**

La brucelosis humana fue conocida antiguamente como la fiebre de Malta, fiebre ondulante y fiebre mediterránea, su cuadro clínico fue descrito por primera vez por Marston en 1859. La historia de esta enfermedad se remonta a fines del siglo XIX en la isla de Conocida mundialmente como Fiebre de Malta, Fiebre de Gibraltar, Fiebre del Mediterráneo, Fiebre de Barcelona o Fiebre Ondulante, la brucelosis fue descrita en 1895 por el danés Bang el cual observó que el aborto contagioso en el ganado vacuno se debía a la infección con *Brucella abortus*, por su parte Zammit detectó la enfermedad en el hombre causada por la bebida de la leche de cabra fresca. Malta, donde las tropas inglesas allí apostadas, sufrían el embate de una afección que ocasionaba la muerte de un regular número de soldados. Ante esta situación el Gobierno Inglés en 1904 envió una comisión investigadora llamada “Mediterranean Fever Commission” presidida por el médico anatómo-patólogo militar David Bruce quien ya en 1887, había

descubierto unos microbios pequeños en bazos hipertrofiados de soldados fallecidos en Malta. Al cabo de un año consiguió el aislamiento y cultivo de la bacteria a la que llamó *Micrococcus Melites*. En 1905 el médico maltés Themistokles Zammit determinó el papel de las cabras y el consumo humano de sus sub-productos (queso, leche, etc.) en la enfermedad. (Abeledo, 1981).

En 1970 se iniciaron los ensayos con las pruebas de 2-Mercaptoetanol (2-ME), Rivanol en placa, Inactivación por el calor, prueba de Coombs, Inmunofluorescencia Indirecta (I.I.) y la Rosa de Bengala (R.B.), pero de forma limitada con el objetivo de esclarecer casos de interpretación compleja (Argote 1989 y Fernández 1982).

### **2.1.3. Importancia de la Brucelosis**

Por otro lado, constituye un importante problema para la salud pública ya que la mayoría de las bacterias del género son patógenas para el hombre quien adquiere la infección por el consumo de leche no pasteurizada y sus derivados, o por el contacto con material infeccioso (Roca, 1990).

### **2.1.4. Agente Etiológico**

#### **2.1.4.1. Características del Genero, Especies y Biotipos**

Las *Brucellas* son parásitos intracelulares del hombre y los animales, poseen las siguientes características: Morfológica de cocos y bacilos cortos, de 0.5-0.7 micras por 0.6-1.5 micras, aislados o más raramente en cadenas cortas, carecen de cápsula, son inmóviles, no forman endosporas, son gramnegativos, no toman la coloración bipolar, presentan un contenido de guanina más citosina en el ADN de 56-58 moles %. Los miembros del grupo se parecen mucho en su comportamiento cultural, en agar forman colonias pequeñas y traslúcidas con moderada turbidez, su crecimiento es lento y se estimula por la adición de proteína animal, especialmente extracto de hígado y la concentración de glucosa al 25% en el medio de cultivo favorece el crecimiento. (Wilson y Miles 1975).

Las características bioquímicas más importantes son: catalasa positiva, oxidasa generalmente positiva, (excepto *Brucella neotomae* y *ovis* que son oxidasa negativa), hidrolizan la urea en grado variable, reducen los nitratos a nitritos (excepto *Brucella ovis*), no utilizan el citrato, no producen indol y son negativas a las pruebas del rojo de metilo y Vogues-Proskaur. Son gérmenes aeróbicos estrictos, la *Brucella abortus* necesita que se le añada de 5 a 10% de anhídrido carbónico, la temperatura óptima es de 37° C y su pH es de 6.7-7.4, (Boffil et al., 1989).

El género comprende actualmente 6 especies; *Brucella melitensis*, *abortus*, *suis*, *neotomae*, *ovis* y *canis*. Las tres primeras especies denominadas como *Brucellas* clásicas, se han subdividido a la vez en biotipos que se distinguen por diferentes características bioquímicas y/o comportamiento frente a sueros mono-específicos. A (*abortus*) y M (*melitensis*). De esta manera la *Brucella melitensis* se subdivide en tres biotipos (1-3), *Brucella abortus* en 8 (1-9) ya que se suprimió el biotipo (8) y *Brucella suis* en 4 (1-4). En esta última especie se ha propuesto un nuevo biotipo para cepas aisladas de roedores en la antigua URSS, con características que difieren de los cuatro biotipos mencionados. Hasta ahora en América Latina sólo se ha podido comprobar el biotipo 1 de *Brucella suis* que predomina en la mayor parte del mundo y en los E.U.A. el biotipo (Abeledo, 1981 y Akakpo, 1991).

En América se ha comprobado la infección de *Brucella abortus* solo por el biotipo 1 y en los Estados Unidos por los biotipos 1 y 3. El biotipo 2 desempeña un papel importante en Europa. En los países de América Latina la enfermedad adquiere una forma enzoótica y se considera la zona de más alta prevalencia en el mundo según, (Akakpo, 1991).

#### **2.1.4.2. Características Epizootiológicas de la Brucelosis**

La especie porcina es el reservorio natural de la *Brucella suis*, esta infección se propaga (biotipo 1 y 3) directa e indirectamente de cerdo a cerdo, en cambio el biotipo 2 es transmitido muchas veces al cerdo por la liebre europea. También puede ser afectado por la *Brucella abortus*, pero esta es menos patógena,

aparentemente no se trasmite de uno a otro animal y la infección es por lo general asintomática, limitándose a los ganglios de la cabeza y el cuello. Cuando la brucelosis se introduce en un órgano y es indemne se adquiere en forma de una enfermedad aguda, hay abortos, orquitis, epididimitis, infertilidad, nacimiento de lechones débiles y artritis (Rhaway, 1993).

La fase septicémica es muy fugaz, los gérmenes se sitúan en los tejidos existiendo un bacteriotropismo acusado en las cavidades serosas e intersticiales, por ofrecer condiciones de hematosis precaria, contienen un nivel carbónico elevado, como ocurre en vainas subcutáneas sinoviales tendinosas, articulaciones, etcétera (Boffil et al., 1989).

El crecimiento y multiplicación de la *Brucella* ocurre en la placenta en dos fases:

- Inicial: En la que difícilmente hay multiplicación nociva.
- Sucesiva: En la que se desarrollan bruscamente atacando a la placenta, produciendo septicemia fetal.

El Lipopolisacaridos (LPS) es el antígeno responsable de la reacción antígeno-anticuerpo utilizada como base de las pruebas diagnósticas serológicas habituales en la clínica. Así mismo, se ha descrito la existencia de reacción cruzada con otros gérmenes gramnegativos debido a determinantes antigénicos comunes presentes en la cadena O del LPS. Gérmenes gramnegativos que muestran reacción cruzada con *Brucella* spp.

*E. coli* O: 116 y O: 157; *F. tularensi*; *Salmonella* del grupo N O: 30; *Pseudomonas maltophilia*; *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica* O: 9.

### **2.1.5. Epidemiología.**

La brucelosis es una zoonosis que afecta a animales domésticos y produce aborto contagioso en el ganado bovino, cabras, cerdos, perros y ovejas. El germen, además, infecta las glándulas mamarias del animal y se elimina por la leche especialmente en el ganado bovino y ovino. Existen cuatro especies de

*Brucella* que son patógenas para el hombre y cada una tiene un número limitado de huéspedes naturales (Young, 1995)

La brucelosis se transmite al hombre a partir del animal infectado, quien constituye el auténtico reservorio de la enfermedad. El germen puede penetrar en el organismo por múltiples vías (Young, 1994).

#### **2.1.5.1. Ingestión**

Los vehículos son la leche, el queso y los derivados lácteos sin pasteurizar. La infección puede producirse a través del tubo gastrointestinal, pero es mucho más frecuente su paso por la orofaringe, ya que el pH ácido del estómago puede destruir la *Brucella spp.* excepto en los casos de inóculo masivo (Young, 1994).

#### **2.1.5.2. Contacto**

El contacto con animales infectados o con sus productos es otra de las vías principales de transmisión de la enfermedad. El germen puede penetrar en el organismo a través de la piel traumatizada, de la mucosa nasal y de la conjuntiva. Este mecanismo es el más frecuente en el medio rural y se produce en pastores, veterinarios, trabajadores de camales, ganaderos y labradores. Puede llegar a ser el responsable del 60%-70% de todos los casos registrados (Young, 1994).

#### **2.1.5.3. Inhalación**

Es otro mecanismo, que se ha descrito en trabajadores de la lana y de laboratorio clínico; consiste en la penetración a través de la mucosa nasal, del aparato respiratorio o de la conjuntiva ocular, mediante la inhalación de polvo procedente de excretas secas o de lana de animales infectados (Young, 1994).

#### **2.3.5.4. Inoculación**

La inoculación de material infectado es otro mecanismo importante en la infección por *Brucella* spp., que afecta fundamentalmente a veterinarios, trabajadores de camales y personal de laboratorio. Los mecanismos de adquisición de la enfermedad por vía conjuntival, respiratoria o cutánea son fundamentales cuando existe una relación directa con el ganado enfermo, mientras que la vía digestiva está implicada en la ingesta de productos lácteos no higienizados (Boffil et al., 1989).

La brucelosis tiene una distribución universal y afecta aproximadamente a 500.000 personas anualmente, especialmente en el área Mediterránea, la península de Arabia, el subcontinente Indio, México y América Central y Sudamérica. La pasteurización de los productos lácteos y los programas de erradicación de la brucelosis en el ganado bovino y ovino ha hecho que esta enfermedad sea infrecuente en países industrializados como Estados Unidos o Gran Bretaña, teniendo un carácter casi exclusivamente profesional y producida generalmente por *B. abortus* y *B. suis*, aunque recientemente se observa un aumento de la incidencia de casos importados o relacionados con la ingesta de productos lácteos sin pasteurizar. Sin embargo, en países menos desarrollados y en el área mediterránea, *B. mellitensis* es el agente causal y, aunque una parte de los casos corresponde a la población general que adquiere la infección a través de la ingesta de productos lácteos sin higienizar, como el queso fresco, es fundamentalmente una enfermedad de distribución rural, asociada al contacto directo con el ganado ovino o sus productos (Boffil et al., 1989).

Los profesionales más afectados son los trabajadores del campo, ganaderos, pastores, matarifes y veterinarios. Las vías de transmisión se asocian, en el medio urbano a la ingesta de productos lácteos sin higienizar, y en el medio rural al contacto con ganado enfermo (Boffil et al., 1989).

#### **2.1.6. Taxonomía y Filogenia**

El análisis del ácido nucleico de 16S del ribosoma (16S ARNr), la composición lipídica y ciertos aspectos de su fisiología y biología general sitúan a la *Brucella* dentro de la subdivisión 2 de la Clase *Proteobacteria*, en la que están también otros patógenos intracelulares animales (riquetsias), así como destacados patógenos y endosimbiontes de vegetales (*Agrobacterium* y *Rhizobium*), las propias mitocondrias y ciertas bacterias de la tierra. Por tanto, parece que la asociación intracelular con eucariotas es una tendencia evolutiva compartida con otros miembros de la subdivisión 2. Esto es coherente con ciertas hipótesis sobre la patogenicidad y explica las reacciones cruzadas con otros miembros de esta subdivisión en pruebas serológicas y moleculares (Alton, 1988)

### **2.1.7. Patogenia**

*Brucella* spp. es un bacilo intracelular facultativo, que frecuentemente escapa a un gran número de los mecanismos de defensa que pone en marcha el huésped y puede sobrevivir en el interior de los fagocitos durante largos períodos de tiempo. *B. mellitensis* es la más virulenta seguida por *B. suis* y *B. abortus* (Ariza *et al.*, 1992).

*Brucella* spp. puede penetrar en el organismo por distintas vías; una vez dentro, en la submucosa, es fagocitada por los leucocitos polimorfonucleares (PMN), y los macrófagos tisulares, donde no solo no es destruida sino que puede multiplicarse en su interior, localizándose, finalmente, en los órganos del sistema mononuclear fagocítico. Allí puede sobrevivir y proliferar en el interior de estos fagocitos especialmente en el bazo, hasta que finalmente los destruyen, liberándose gran cantidad de gérmenes a la circulación e iniciando de nuevo un proceso similar al anterior. *B. abortus* y *B. mellitensis* pueden ser opsonizadas por el suero humano, proceso facilitado por la presencia de anticuerpos específicos, promoviendo su fagocitosis por los PMN. Estas células son capaces de destruir a *B. abortus*, pero tienen muy poca capacidad frente a *B. mellitensis*, debido probablemente a la presencia de algún componente de su pared celular, como el 5'-guanosin monofosfato y la adenina que podrían inhibir la degranulación de los gránulos peroxidasa positivos de los PMN, y el sistema antibacteriano mieloperoxidasa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta característica de *B. mellitensis*

explicaría su mayor virulencia. Por otra parte, la infección por *Brucella* spp. con la consiguiente exposición del sistema inmune del huésped a sus antígenos provoca su activación y genera la producción de una respuesta inmune efectora cuya magnitud y duración viene modulada por distintos factores como el tamaño del inoculó, la edad, el sexo y el estado inmunitario previo del huésped e incluye a sus elementos estructurales linfocitos B, T, células *natural killer* (NK) y células accesorias. La respuesta de los linfocitos B con la consiguiente producción de inmunoglobulinas es importante en cuanto a su magnitud, pero al ser un germen intracelular tiene una capacidad defensiva limitada, aunque desempeña un papel importante en el diagnóstico serológico. No obstante, en el animal de experimentación la presencia de anticuerpos específicos promueve una fagocitosis rápida del germen y produce una disminución del número de gérmenes viables en el hígado y bazo (Ariza *et al.*, 1992). La primera inmunoglobulina que se produce es la IgM y sus niveles comienzan a disminuir alrededor de los tres meses del inicio de la enfermedad.

A partir de la segunda semana se elevan la IgG y la IgA, que pueden permanecer aumentadas durante un largo período de tiempo independientemente de la evolución clínica de la enfermedad (Ariza *et al.*, 1992). Se ha descrito la presencia de IgE específica asociada a fenómenos de hipersensibilidad cutánea.

El mecanismo defensivo fundamental y necesario para la erradicación del germen depende, sin embargo, de la adquisición de una adecuada respuesta de otras poblaciones celulares del sistema inmune, caracterizada, fundamentalmente, por la activación de los linfocitos T, que a su vez modulan la respuesta de las células efectoras del sistema inmune, de forma que capacitan a los linfocitos B para la síntesis de Ig específicas, potencian la actividad lítica de los linfocitos T y determinan la consiguiente activación de los macrófagos y células NK, aumentando su capacidad para destruir estos microorganismos (Baldwin, 1994).

En este proceso es crítico el papel desempeñado por diversas citocinas (IL-2, IL-12, IL-10, interferón gamma [INF-g], factor de necrosis tumoral alfa [TNF-a], GM-CSF, etc.) (Zhan, 1995).

### 2.1.7.1. Patogenia Asociada

La brucelosis puede afectar a distintos órganos y sistemas:

- a. **Osteomielitis:** con dorsalgia o lumbalgia, por la afectación muy frecuente de la columna lumbosacra. A veces presenta complicaciones con supuración al exterior de una colección de material purulento proveniente de la articulación afectada; apareciendo en ocasiones abscesos para-vertebrales.
- b. **Artritis.** Más frecuente en rodillas.
- c. **Abscesos esplénicos.** Que generalmente se calcifican.
- d. **Afectación genitourinaria.** Tampoco es frecuente, en algunas ocasiones puede manifestarse como una orquiepididimitis unilateral que no suele dejar secuelas. Rara vez produce prostatitis brucelar o nefritis intersticial aguda, produciendo granulomas no caseosos y calcificaciones, similares a los observados en la tuberculosis.
- e. **Alteraciones neurológicas.** Muy raras (2-5%), pueden presentarse mielitis, meningoencefalitis, radiculitis y neuropatía periférica, presentan un mal pronóstico. En el líquido cefalorraquídeo podemos encontrar pleocitosis linfocitaria, aumento de las proteínas y glucosa normal, en ocasiones encontramos cultivos positivos para brucela.
- f. **Endocarditis.** (1-2%) Es la causa más frecuente de mortalidad por este cuadro. Afecta principalmente a la válvula aórtica (81%), pudiendo presentar dicha válvula vegetaciones voluminosas y ulceradas. Tiene un comienzo insidioso y predomina en varones. Como complicación pueden aparecer embolias arteriales; y su curación exige tratamiento antibiótico y además sustitución quirúrgica de la válvula afectada.
- g. **Alteraciones del sistema respiratorio.** Puede aparecer tos y expectoración, en raros casos presenta derrame o empiema pulmonar.

**h. Alteraciones en la piel.** Presentan erupciones transitorias, e incluso púrpura secundaria a trombocitopenia. Los veterinarios que extraen placentas de animales infectados pueden presentar una erupción papulo-pustulosa local, se cree que por una reacción de hipersensibilidad (Young, 1994).

#### **2.1.8. Hábitat**

Como están presentes en animales como vacas, cerdos y ovejas, frecuente es encontrarlas en mataderos y granjas (Wray, 1975).

Las Brucellas duran:

75 días en fetos de animales

10 días en la leche a 10°C

10 días en agua a 25°C

30 días en helados

142 días en la mantequilla

2 meses en los quesos

En garrapatas pueden encontrarse hasta 27 meses.

#### **2.1.9. Manifestaciones Clínicas**

La brucelosis es una infección que puede afectar a cualquier órgano o sistema, y por lo tanto cursar con un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Sin embargo, los síntomas y signos iniciales son, a menudo, inespecíficos y no existe ninguna asociación sindrómica que se pueda considerar patognomónica, aunque en zonas endémicas, con frecuencia, resultan fácilmente identificable (Young, 1991).

La severidad de la infección depende de la presencia de enfermedad subyacente, del estado inmunitario del huésped y de la especie de *Brucella* causante de la misma; así *B. mellitensis*, y en un menor grado *B. suis*, suele producir una enfermedad más severas que *B. abortus* y *B. canis* (Young, 1991).

El período de incubación es variable y habitualmente oscila entre una y tres semanas, pero puede prolongarse durante un período de tiempo superior. Los síntomas iniciales consisten en fiebre, astenia, sudación, cefalea y artromialgias, que se producen en el 90% de los casos. Otros síntomas como anorexia, pérdida de peso, malestar general, estreñimiento e insomnio aparecen con una frecuencia variable (20%-50%) (Young, 1991).

La evolución espontánea de la fiebre no sigue ningún patrón característico en la mayoría de los casos y aunque la enfermedad se conoció inicialmente como fiebre ondulante, este rasgo se observa en la clínica con muy poca frecuencia, ya que es habitual la presencia de fiebre mantenida durante varias semanas con ascensos febriles vespertinos, o bien la presencia de fiebre continua durante algunos días que posteriormente se autolimita. Los signos físicos más habituales son la presencia de adenopatías en un 12%-20% de los casos, que suelen afectar a las cadenas cervicales e inguinales, y se observa esplenomegalia en un 30%-50% de los casos, frecuentemente acompañada de hepatomegalia (Young, 1991).

#### **2.1.9.1. Formas focalizadas o complicaciones**

La brucelosis puede afectar a cualquier órgano o sistema, produciendo manifestaciones focalizadas de la enfermedad, que se deben considerar como verdaderas complicaciones (Colmenero *et al.*, 1996).

Éstas se presentan en un porcentaje variable entre el 1%-30% de los enfermos, siendo más frecuentes en aquellos en los que el diagnóstico y el tratamiento se retrasa (Colmero *et al.*, 1996). La afectación osteoarticular es la más frecuente, pues oscila entre el 20% y el 85%, siendo siempre más común en la infección por *B. mellitensis*. Las más habituales son sacroileítis, artritis periféricas y espondilitis (Colmenero *et al.*, 1996).

La sacroileítis es habitualmente unilateral y sigue un curso generalmente agudo o subagudo. Se caracteriza por dolor de localización lumbosacra o glútea, que puede llegar a ser invalidante. La imagen radiológica suele ser inespecífica y la gammagrafía con tecnecio o galio se considera la técnica más sensible para su

diagnóstico. La artritis brucelar suele tener un comienzo insidioso y afecto con más frecuencia a la rodilla, tobillo y cadera, aunque puede localizarse en cualquier articulación periférica. El líquido sinovial suele tener una celularidad que oscila entre 200 - 19.000 cel/mcL de predominio linfocitario y se puede aislar el germen hasta en un 50% de los casos. La localización más destructiva suele ser la cadera. La espondilitis puede afectar a cualquier segmento vertebral, aunque la localización más frecuente es lumbosacra y puede ser múltiple (Colmenero *et al.*, 1996).

El 20% se acompañan de absceso epidural y paravertebral que puede requerir drenaje quirúrgico. Desde el punto de vista del diagnóstico por imagen, la radiografía convencional, la tomografía axial computarizada (TAC) y la gammagrafía son inferiores a la resonancia magnética nuclear (RMN) (Colmenero *et al.*, 1996).

Las complicaciones genitourinarias se producen en el 2%-10% de los pacientes en series recientes. La manifestación más frecuente es la orqui-epididimitis unilateral, habiéndose descrito la presencia asociada de absceso testicular (Young, 1991).

La afectación del sistema nervioso central SNC ocurre en 2%-5% de los pacientes y habitualmente se presenta como meningitis aguda o meningoencefalitis. En la mayoría de los casos, el examen del líquido cefalorraquídeo (LCR) muestra un líquido claro, con aumento de los linfocitos y una concentración de proteínas elevada, con una glucorraquia normal o disminuida. El aislamiento del germen en LCR es infrecuente, aunque en la mayoría de los pacientes existen anticuerpos específicos (Colmenero *et al.*, 1996).

La endocarditis es la mayor causa de muerte en pacientes con brucelosis, aunque afortunadamente es un hecho infrecuente (2% de los casos). Se afecta más frecuentemente la válvula aórtica que la mitral y puede afectar válvulas sanas o previamente dañadas, con formación de micro abscesos y destrucción progresiva de la misma. Es usual la elevación de las enzimas hepáticas en los primeros estadios de la enfermedad, que se produce en el 30%-60% de los

pacientes, y el desarrollo de hepatomegalia en un porcentaje inferior. Menos frecuentemente se pueden observar auténticas complicaciones focales hepáticas como hepatitis granulomatosa, absceso hepático o hepatitis difusa sin la presencia de granulomas (Colmenero *et al.*, 1996).

#### **2.1.10. Diagnóstico**

El diagnóstico definitivo y confirmativo se basa en pruebas de laboratorio. Se considera que el método más confiable para el diagnóstico de una enfermedad infecciosa es el aislamiento e identificación del agente etiológico. En el caso de *Brucella*, el aislamiento e identificación del microorganismos se debe hacer siempre mediante hemocultivo, estos procedimientos son lentos (de una a cuatro semanas), tediosos, poco exitosos, y por su contagiosidad, de gran riesgo para la salud de la presencia de un cuadro clínico sugerente, aunque inespecífico, unido al antecedente epidemiológico de exposición al germen, debe hacer sospechar el diagnóstico de brucelosis. Las pruebas de laboratorio habituales son inespecíficas y ayudan poco a establecer el diagnóstico que se basa en el aislamiento del germen y la demostración de anticuerpos específicos en el suero de los pacientes (Ariza *et al.*, 1992).

El diagnóstico de la brucelosis se realiza mediante la utilización de distintos métodos, los que de acuerdo con las características de la enfermedad, permiten determinar la situación de la misma en el hombre, los animales y en el medio ambiente (Ariza *et al.*, 1992).

##### **2.1.10.1. Diagnóstico Indirecto**

El diagnóstico serológico se basa en la demostración de la presencia de anticuerpos dirigidos frente a antígenos de la pared de la *Brucella*. Entre la segunda y la tercera semana después del inóculo aparecen anticuerpos aglutinantes dirigidos frente al antígeno lipolisacárido, que son detectados mediante las pruebas de seroaglutinación y Rosa de Bengala. Posteriormente, aparecen anticuerpos con poca o nula capacidad aglutinante que son detectados por la prueba de Coombs antibrucela. Su principal limitación es la incapacidad para diferenciar con la suficiente sensibilidad y especificidad entre infección

activa y curada, ya que los anticuerpos suelen persistir durante un periodo prolongado tras la recuperación clínica.

**a. Rosa de Bengala.** Prueba rápida de aglutinación en placa, que se considera ideal como técnica para el diagnóstico inicial de la brucelosis y como prueba de cribaje por su rapidez y bajo coste (Young, 1991). Muestra una correlación absoluta con la seroaglutinación. Sus falsos negativos se limitan a enfermos con procesos de pocos días de evolución y a algunos casos de enfermedad de curso muy prolongado. Según Alton et al, (1976) la Rosa de Bengala es en realidad una modificación de la prueba de la tarjeta empleada en E.U.A. y las variaciones en cuanto a su sensibilidad se deben a modificaciones introducidas por diversos laboratorios. Una de las dificultades que se ha señalado a la prueba es la falta de estandarización internacional del antígeno lo que impide que los resultados obtenidos en diferentes países sean comparables (Argorte, 1984).

Varios investigadores han señalado la alta sensibilidad y especificidad de la Rosa de Bengala lo que unido a su fácil manipulación y rápida lectura hacen que la misma sea de gran utilidad en el diagnóstico masivo de la brucelosis. De este modo (Plommet, 1972 y Priadi, 1992) recomendaron su utilización en el programa de control y erradicación de la brucelosis por ser simple, fiel y económica. Samartino *et al.* (1997) aplicaron la técnica del antígeno buferado en placa (BPA) como prueba tamiz en el diagnóstico de la brucelosis y obtuvieron mayor sensibilidad al compararla con la Rosa de Bengala aunque las dos fueron determinante para la condición de animal reaccionante. Samartino *et al.* (1997).

En los programas de lucha contra la brucelosis porcina tiene gran importancia el empleo de los métodos serológicos, siendo los más utilizados la Seroaglutinación Lenta (S.A.L.) la Reacción de Fijación del Complemento (R.F.C.), la prueba de Coombs (P.C.) y el 2 Mercaptoetanol (2-ME). Todas estas pruebas tienen efectividad cuando se utilizan de manera simultánea, donde se requieran valoraciones más complejas, en las que juegan un importante papel la epizootiología, los exámenes clínicos, la bacteriología y el estudio serológico (Benatcour *et al.*, 1991).

### **2.1.10.1. Diagnóstico directo**

#### **a. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (P.C.R.)**

Es un método in vitro para sintetizar secuencias definidas de enzimas de ADN, la reacción usa dos oligonucleótidos primarios que forma híbridos en cada terminal opuesta y en cada flanco de la secuencia de ADN que es el objetivo de la amplificación. La prolongación de los primarios es catalizada por la polimerasa TaqADN, una polimerasa ADN termoestable que puede ser aislada de la Eubacteria termofílica (*Thermus aquatiar*). Una serie repetitiva de los ciclos incluyendo el patrón de la desnaturalización, la reacción primaria y la extensión de la reacción primaria por la polimerasa TaqADN resulta en una combinación exponencial de un fragmento específico del DNA. Las partes finales del fragmento son definido por 5 terminaciones de los primarios 2,3, porque el producto sintetizado de la extensión primaria en un ciclo dado puede servir como un patrón en el próximo ciclo: pues 20 ciclos de P.C.R. dan lugar a un millón de copias ( $2^{20}$ ) de DNA objetivo. (Boehringer, 1995).

#### **b. Investigación realizada con la técnica de PCR en Humano.**

**Rodríguez y Mariscal, (2010)**, determinaron y compararon la presencia de Brucelosis del personal que labora en los camales de los cantones, Buena Fé, Quevedo, El Empalme y Pichincha, utilizando la prueba serológica Rosa de Bengala (RB) y la técnica molecular (PCR), donde tomaron un total de 115 muestras de sangre recolectadas al personal que labora en estos camales antes mencionados como faenadores y operadores, donde 54 (47%) y 15 (13%) fueron positivas con RB y PCR respectivamente, dando 61(53%) y 100 (87%) negativas para las dos pruebas correspondientemente. El promedio de casos positivos para las tres poblaciones excepto Pichincha por PCR fue de 3,4% y para RB 39,4%. En el cantón Pichincha debido a que 19 (70,3%) de las muestras salieron positivas con RB de las cuales 12 (44,4%) al ser analizadas con PCR fueron negativas, teniendo una correlación de 52,6%, lo que indica una alta incidencia de la enfermedad. Mientras tanto que de las 8 muestras negativas con RB, 2 fueron positivas con PCR dando una correlación entre negativos del 75%.

Las muestras positivas amplificaron un fragmento de 725pb. Con este trabajo se sugiere que la técnica de PCR es una herramienta altamente eficiente y muy útil para el diagnóstico de la brucelosis en humanos.

#### **b. LAMP: Loop-Mediated Isothermal Amplification Method.**

Recientemente, se desarrolló una nueva variante de la técnica de PCR llamada Amplificación Isotérmica Mediada por Lazo (LAMP: Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. Esta metodología utiliza múltiples iniciadores ("*primers*") y condiciones isotérmicas (60-65 °C) para la amplificación de la secuencia blanco, en un tiempo relativamente corto (30 min-1h), utilizando la *Bst*-DNA polimerasa (*Bst*-DNA *pol*). LAMP no requiere termociclador para garantizar los ciclos de desnaturalización -reasociación para la hibridación de los primers y la actividad de la polimerasa, como ocurre en la PCR. Similar a una reacción de PCR anidada ("*nested PCR*"), LAMP requiere de varios *primers*, 4 a 6, que reconocen y se unen por homología a distintas regiones del blanco; estos *primers* pueden generarse a través del software Primer Explorer v3 (Notomi *et al.*, 2000)

## **CAPÍTULO III.**

# **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **3.1 Localización y duración del experimento.**

El material biológico se lo recolectó en los camales municipales de Quevedo, Buena Fe y Mocache. Luego los análisis y tratamientos de las muestras se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), ubicado en el Km. 1,5 vía Quevedo – Santo Domingo de Los Tsáchilas, en la provincia de Los Ríos.

### **3.2. Materiales y equipos.**

#### **3.2.1. Material**

Como material biológico se utilizó sangre de humanos que laboran en los tres camales municipales de los cantones (Quevedo, Mocache y Buena Fé) de la provincia de Los Ríos

#### **3.2.2. Equipos de Laboratorio**

- Balanza 0,001g
- Cámara fotográfica
- Bañomaría
- Uv transiluminador 20x20
- Microcentrífuga
- Vortex
- Potenciómetro
- Caja electroforética
- Microondas
- Termociclador
- Congelador vertical – 20°C
- Refrigeradora

### **3.2.3. Materiales de Laboratorio**

- Vasos de precipitación
- Matraces
- Tubos Falcón 15 mL
- Tubos Falcón 50 mL
- Frascos
- Microtubos 1.5 mL
- Puntas transparentes 200 – 1000uL
- Puntas Transparentes 5 – 200 uL
- Micropipetas
- Microtubos PCR individuales 0.2 mL
- Portaobjetos

### **3.2.4. Materiales de Campo**

- Caja térmica
- Algodón
- Jeringas de 10 cm<sup>3</sup>
- Tubo vacutainer
- Alcohol
- Antígeno de tuberculina

### **3.2.5. Reactivos para el Protocolo 1 y 2**

#### **PROCOLO 1: SALTING OUT:**

- Buffer de lisis de glóbulos rojos (RCLB por su siglas en ingles) [NH<sub>4</sub>Cl y NaHCO<sub>3</sub>]
- Buffer de lisis nuclear NLB (por sus siglas en inglés) [NaCl, 1M tris HCl pH 8.2 y 0,5 M EDTA pH 8.0]
- Solución de Cloruro de Sodio 6M
- Cloroformo - Alcohol Isoamílico CIA
- Alcohol 95%

- Alcohol 70%
- Proteinasa K
- Buffer T.E. (Tris EDTA)
- Antígeno (Rosa de Bengala)

## **PROTOCOLO 2: TENS**

- Buffer de TENS [Tris, EDTA, NaOH, y SDS]
- Solución de Cloruro de Sodio 0,9%
- Cloroformo - Alcohol Isoamílico CIA
- Alcohol 95%
- Alcohol 70%
- Proteinasa K
- Buffer T.E. (Tris EDTA)

## **3.3. Metodología**

### **3.3.1. Extracción de ADN genómico bacteriano**

A partir del crecimiento sobre agar, se realizó las extracciones de ADN de cepas de *Brucella spp.* usando el método fenol – cloroformo modificado (Martínez *et al.*, 2001). Para la extracción de ADN de sangre de humano se evaluaron dos protocolos usados para muestras de sangre periférica de vertebrados, con la finalidad de obtener ADN de buena calidad. Se probaron dos protocolos de extracción, el primero consistió de una modificación de Miller (1988) denominado SALTING-OUT debido al comportamiento fisicoquímico que experimentan las proteínas cuando son sometidas a modificaciones en la concentración salina del medio. Así, en presencia de bajas concentraciones de sales, se verifica un ligero aumento en la solubilidad de las proteínas (salting-in) por aumento de la fuerza iónica del medio respecto de soluciones acuosas. (Ver anexo 1). Un segundo protocolo rutinario utilizado en el laboratorio de Biología Molecular de la UTEQ denominado TENS debido al uso de su principal reactivo: tris-EDTA sódico. (Ver anexo 2).

### 3.3.2. Cuantificación del ADN.

La concentración y pureza del ADN se determinó por espectrofotometría a 260 nm, comparado con un blanco, usando como cocientes respectivos de pureza 1.8 y 2.0; A la vez que se comprobará mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en tampón TAE 1X. La electroforesis se realizará a 90 voltios por 30 min. Para especies con pesos moleculares bajos, como es el caso de la sangre, se usarán concentraciones de agarosa al 1,2%.

### 3.3.3. Oligonucleótidos

Se probó ocho oligonucleótidos en lo que respecta al diagnóstico de brucelosis al personal que labora en los tres camales municipales de los cantones (Quevedo, Mocache y Buena Fe) de la provincia de Los Ríos (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Juegos de oligonucleótidos LAMP que se utilizó en la amplificación de ADN**

Nombre	Secuencia 5' → 3'
F3	GAGGATGATCAGCCCACTG
B3	TGCTGGCACGAAGTTAGC
FIP	GGCTTGCGCCCATTGTCCAATA- GACTGAGACACGGCCTAGA
BIP	GCGTGAGTGATGAAGGCCCT- GGCTTCTTCTCGGGTTACC
F3-1	TTAGGCTGGACCGGAGAC
B3-1	CACCATTGTAGCACGTGTGT
FIP-1	AACTAAGGGCGAGGGTTGCG- GTCAGCTCGTGTGCGTGAGA
BIP-1	CAGTTGGGCACTCTAAGGGGAC- GTAAGGGCCATGAGGACTTG

### 3.3.4. Reactivos preparados para la mezcla de la LAMP - PCR

En cada tubo de reacción de PCR se colocó una alícuota con los siguientes reactivos (Tabla 1).

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen inicial
ADN	(5 ng/ $\mu$ L)	0,1 ng/ $\mu$ L	3 $\mu$ L
Buffer	10X	1X	5 $\mu$ L
MgSO <sub>4</sub>	30mM	0,6 mM	0.4 $\mu$ L
Cebador	(25,pmol)	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ L
dNTPs	100 a 400 mM	4 $\mu$ M	4 $\mu$ L
Betaina	0.2 a 0.8 M	1M	1 $\mu$ L
Bst Taq polimerasa	5U/ $\mu$ L	1U/ $\mu$ L	0,25 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O ultra pura			35,35 $\mu$ L
volumen final:			50 $\mu$ L

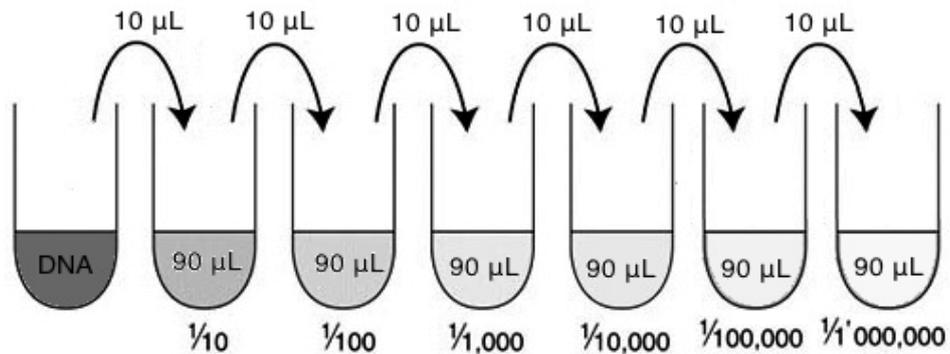
### 3.3.5. Amplificación mediante la técnica de LAMP

Las muestras de ADN, fueron amplificadas utilizando los segmentos respectivos de la PCR, utilizando el Termociclador (Tabla 2).

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1 Paso inicial	58	25 min
2	60	25 min
3 Paso hibridación	62	25 min
4	64	25 min
5 Elongación final	80	4 min

#### 3.3.5.1. Determinación de la sensibilidad analítica

Para conocer el límite de detección de la LAPM, se procedió a realizar diluciones seriadas del control positivo de ADN (Figura.1).



**Figura.1** Diluciones seriadas del control positivo de ADN.

### 3.3.5.2. Procesamiento de las muestras

Después de optimizar el sistema de LAMP, se procesaron 105 muestras de sangre de humanos,. Las muestras fueron procesadas con un volumen de reacción de 50 µL, los programas para la amplificación fueron los mismos de la Tabla 1 y la Tabla 2.

### 3.3.6. Electroforesis

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 80 voltios durante tres horas. Finalmente, las bandas de ADN fueron visualizadas bajo luz ultravioleta y fotografiadas (Elham *et al.*, 2009).

## 3.4. Variable evaluadas

### 3.4. 1. Calidad de ADN genómico

La evaluación sobre la condición del ADN<sub>g</sub> fue a partir de pruebas de PCR dirigidas a la amplificación de un segmento del gen de  $\beta$ -actina, para lo cual se considera los resultados positivos o negativos.

#### **3.4.2. Temperatura de hibridación de los oligonucleótidos**

Para evaluar las temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos de la LAMP, se ejecutó a partir de ADN genómico de cepas puras, utilizando  $T_m \pm 5^\circ\text{C}$  de cada uno de los oligonucleótidos considerando resultados positivos o negativos.

#### **3.4.3. Sensibilidad y especificidad de los oligonucleótidos**

La sensibilidad y la especificidad se determinaron teniendo en cuenta el diagnóstico previo realizado por los centros de salud. Se incluyeron intervalos del 95% de confianza (IC 95%). El método empleado para dichos intervalos fue el Epi.Info versión 6.04.

#### **3.4.4. Costo del diagnóstico con la técnica de LAMP**

Dentro de los costos por análisis de muestras durante el diagnóstico que se realizó en los camales municipales al personal que labora en dichos establecimientos en los cantones, se determinó desde la toma de muestras hasta la amplificación de las mismas

### **3.5. Manejo del experimento**

#### **3.5.1. Recolección y transporte del material biológico**

Para la recolección de las muestras se elaboró un cronograma de visitas a cada camal de los cantones citados anteriormente. Se realizó un registro del total de faenadores y trabajadores de cada camal. Se tomó 5 mL sangre venosa de todos los pacientes en estudio y se los colocó en tubos con citrato de sodio al 10% y almacenados a  $-20^\circ\text{C}$ , hasta su extracción. Estas muestras sirvieron como fuente de ADN para el análisis con la técnica LAMP.

#### **3.6. Prueba de aglutinación en placa o Rosa de Bengala.**

Es una prueba de aglutinación rápida muy eficaz para detectar IgG, no para detectar IgM. Esta prueba se basa en la aglutinación de las IgG en inhibición de IgM por el pH ácido. Se empleó un antígeno corpuscular de 8% de concentración celular en una solución tope con pH. 3.65.

La prueba de Rosa de Bengala, permite una aproximación diagnóstica en pocos minutos. El medio ácido en que se efectúa esta prueba favorece considerablemente la expresión del componente aglutinante de los anticuerpos; su sensibilidad y especialidad para identificar anticuerpos aglutinantes anti-brucella es muy elevada, de tal forma que solo excepcionalmente da resultados negativos en la fase aguda de la infección y con muy poca frecuencia en las fases crónicas de la enfermedad.

## **CAPÍTULO IV.**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Este trabajo fué realizado en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en el marco de un proyecto de investigación dirigido a ejecutar un estudio base sobre la epidemiología de Brucelosis en tres camales de la Provincia de Los Ríos, el cual fue llevado a cabo a partir de la determinación de la brucelosis en humanos mediante la técnica de LAMP en camales municipales de la Provincia de Los Ríos. Los resultados moleculares fueron comparados con los datos obtenidos con las pruebas serológica de Brucelosis

La brucelosis es una zoonosis no tan conocida por la población que trabaja a nivel de camal, casi, el 88 % no sabe que es la brucelosis, ni como son los síntomas; mientras que el 12 % tienen conocimiento en parte de la brucelosis, estos se incluyen a los técnicos Veterinarios y profesionales que trabajan.

El presente trabajo de investigación sobre la “Determinación de la brucelosis en humanos mediante la técnica de LAMP en camales municipales de la Provincia de Los Ríos” presenta los siguientes resultados. El desarrollo de este trabajo dirigido al diagnóstico de brucelosis humana en el personal que labora en los camales municipales de los cantones (Buena Fé, Quevedo y Mocache); se evaluó y se optimizó en dos protocolos de extracción de ADN en sangre periférica y el análisis de LAMP. Además, se confirmó la eficiencia de la técnica de LAMP contra la de Rosa de Bengala. Las elevadas seroprevalencias momentáneas con tendencia ascendente, es característico para los períodos epizooticos naturales y espontáneos; es decir, aquellos en los que no existe control sobre las fuentes y vías de transmisión de la brucelosis.

La prueba Rosa de Bengala es una prueba de aglutinación rápida muy eficaz para detectar IgG e IgM. Esta prueba se basa en la aglutinación de las IgG en inhibición por el pH ácido.

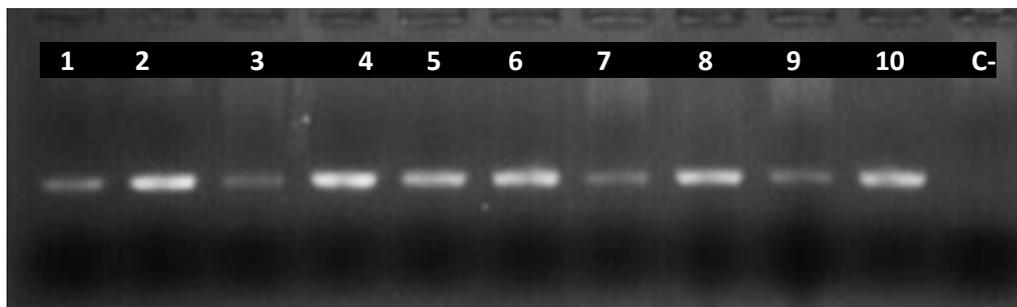
De los 11 camales Municipales de la Provincia de Los Ríos se muestreo, en tres Cantones (Buena Fe, Quevedo y Mocache), de los resultados en esta prueba existió una prevalencia positiva de 0.84 % con 1 caso; y el 99.16 % en relación con las 83 muestras negativas.

**Cuadro 2. Número de casos positivos y negativos, en la Determinación de la brucelosis en humanos mediante la técnica de LAMP en camales municipales de la provincia de Los Ríos. UTEQ, 2013**

Número de Casos			
Muestras	Positivos	Negativos	Prevalencia
84	1	83	0.84

#### 4.1. Extracción de ADN del protocolo de Salting Out en sangre de Humano

Para establecer el mejor método de extracción de ADN de sangre de humano se evaluó el protocolo de Salting Out en la que se puede observar los resultados en cuanto a la cantidad y calidad de ADN, la que fue de 8.38 ug/mL y 93.84 %, respectivamente (Figura 2).

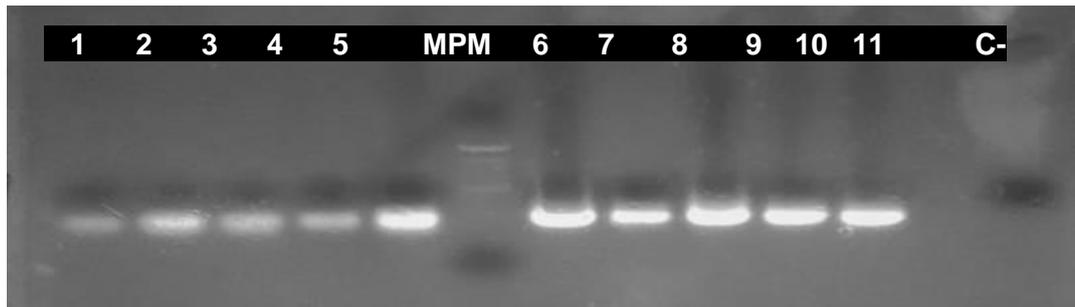


**Figura 2. Resultados de la extracción de ADN genómico de muestras de sangre en humano. UTEQ. LABBIO. 2013**

La figura dos indica las muestras extraídas con el protocolo de Salting Out en sangre humana. Las líneas de 1 -10 muestras de ADNg de sangre humana analizados, línea C= indica el control de reactivos utilizados para la extracción. Se estimó este ADN competente para realizar la técnica de LAMP.

#### 4.2. Extracción de ADN del protocolo de Lisis de TENs en sangre de Humano

Para la extracción de ADN de sangre de humano se evaluó el protocolo de TENs en la que se puede observar los resultados en cuanto a la cantidad y calidad de ADN, la que fue de 8.82 ug/mL y 77.92 %, respectivamente (Figura 3).



**Figura 3. Resultados de la extracción de ADN genómico de muestras de sangre en humano. UTEQ. LABBIO. 2013**

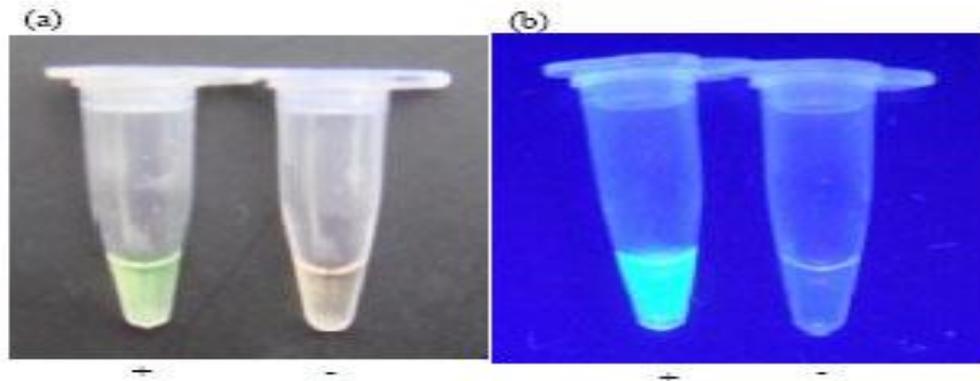
La figura tres indica las muestras extraídas con el protocolo de TENs en sangre humana. Línea MPM= Marcador de peso molecular 1kbp, líneas 1-6 y líneas de 7 -11 = Muestras de ADNg de sangre humana analizados, línea C= indica el control de reactivos utilizados para la extracción. Se estimó este ADN competente para realizar la técnica de LAMP.

#### **4.3. Factores de riesgo**

La seroprevalencia global obtenida en el estudio fué de 0.84% (1/84), siendo un reactor masculino. Este valor se considera bajo debido al hecho de haber incluido en el estudio a personas que están encargadas de varias actividades que concierne al faenamamiento. El ciudadano positivo con el método de Rosa de Bengala fué el que está encargada de limpiar las vísceras, pero al hacerle la prueba de comprobación con PCR y LAMP, salió negativo.

#### **4.4. Evaluación de los iniciadores de la LAMP.**

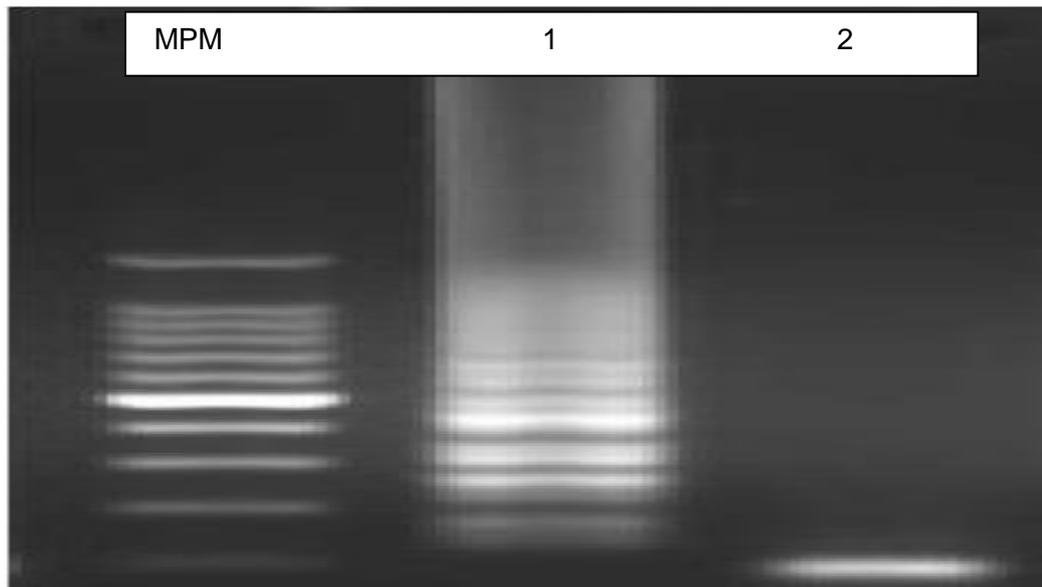
Para los iniciadores F3, B3, FIP, BIP F3-1, B3 -1, FIP-1 y BIP -1 se probaron Tm de 58 y 62 °C, utilizando como fuente de ADN positivo las cepas bacterianas C19 y C119, además se evaluaron las amplificaciones utilizando volúmenes (1,3,5 µL) del ADN stock. Los resultados arrojados con los tres volúmenes de ADN y las Tm 58 y 62 °C condujeron a productos específicos. Ver figura 4.



**Figura 4. Detección Visual de la reacción LAMP usando fluorescente indicador metal. (a) Bajo la luz del día, (b) Bajo la luz UV; signo más indica reacción positiva (con ADN de cepas C-19), signo menos denota reacción negativa (sin ADN diana control negativo). UTEQ. LABBIO. 2013**

La nueva técnica de diagnóstica LAMP reacción visual podría ser simplemente observado por el ojo desnudo bajo la luz del día o la luz UV (Fig. 4). Bajo la luz del día, la reacción positiva (con ADN diana) se puso en verde, mientras que la reacción negativo (sin ADN diana) se mantuvo naranja, la luz ultravioleta, la reacción positiva emitida fuerte fluorescencia verde, mientras que la reacción negativa no emite ninguna fluorescencia.

El patrón característico de tipo escalera de bandas se confirmó por electroforesis en gel de agarosa (Fig. 5). Los productos por se analizaron por electroforesis en gel y generan una sola banda de 218 pb de acuerdo con el tamaño esperado.



**Figura 5:** Electroforesis en gel de agarosa análisis de los productos de la reacción de la LAMP. Línea MPM: M: marcador de 100; Línea 1: productos de LAMP producto electroforesis en gel de agarosa resultados para los productos de reacción del control positivo; Carril 2: Los productos de LAMP producto de digestión después de la digestión con enzimas de restricción AluI. UTEQ. LABBIO. 2013

En este estudio se ha desarrollado con éxito un nuevo ensayo LAMP para la detección rápida de *Brucella spp.* Los resultados demostraron que hubo amplificaciones a partir del control positivo, no así en la muestras tomada al personal que labora en los tres camales las cuales salieron negativas.

#### **4.5 Estudio comparativo de Rosa de Bengala vs LAMP**

Se analizaron 84 muestras en total, de los cuales dos (1.68%) fueron mujeres. 82 (98.32%) fueron hombres, tuvieron entre 20 a 72 años de edad. Este trabajo fue desarrollado con muestras en tres camales municipales (Buena Fé, Quevedo y Mocache), a todo el personal que labora en dichas instituciones cuyo historial de la población presentaba un alto grado de incidencia a la enfermedad en lo que respecta a las especies domesticas que vienen de diferentes lugares del Ecuador. En cuanto a la sensibilidad de la prueba Rosa de Bengala fue de 1.20 % y 0.00% para la técnica de LAMP, respectivamente y una especificidad de 98.80% para la prueba Rosa de Bengala y 100% para la técnica de LAMP.

#### **4.6. La especificidad y sensibilidad de la LAMP.**

La especificidad de los indicadores de la técnica de LAMP, atribuye principalmente a cuatro oligonucleótidos especialmente que reconocen seis regiones distintas de la secuencia del gen omp25 que fue altamente conservada en las especies de *Brucella*, biovares y cepas. El ensayo identifica con éxito *Brucella spp.* cepas, pero otras 8 especies bacterianas no podían ser detectados. Los tamaños de los fragmentos generados a partir de la reacción LAMP demuestran que los productos amplificados eran únicos y específico para la bacteria *Brucella*.

#### **4.3 Costos por diagnóstico**

Dentro de los costos por análisis de muestras durante el diagnóstico que se realizó en los tres camales municipales al personal que labora en dichos establecimientos en los cantones de (Buena Fe; Quevedo, y Mocache) dados a conocer en el cuadro tres, podemos determinar que el precio promedio de un análisis por reacción de (LAMP) es de USD 2.91 y para la prueba Rosa de Bengala de USD 1.65.

**CUADRO 3. Costo de las pruebas para el diagnóstico de brucelosis en humanos. Laboratorio de biotecnología. UTEQ. Quevedo, 2013.**

Pruebas	Costos		Total costos	Numero muestras	Costos por muestras (\$)
	Fijos	Variables			
<b>LAMP</b>					
Equipos	200.00	0.208	41.60	84	0.50
Materiales	500.00	0.180	90.00	84	1.07
Reactivos	550.00	0.205	112.75	84	1.34
<b>TOTAL DE LA REACCION</b>					2.91
<b>Rosa de Bengala</b>					
Equipos	150	0.073	10.95	84	0.13
Materiales	150	0.79	118.50	84	1.41
Reactivos	100	0.089	8.90	84	0.11
<b>TOTAL DE LA PRUEBA</b>					1.65
<b>Suma Total de los costos</b>	1650	1.48	382.70	84	4.56

## V. DISCUSIÓN

En comparación con el ensayo de LAMP y Rosa de Bengala, la técnica de LAMP es más práctica, sin necesidad de termociclador; la proporción de Betaina y la concentración de iones de manganeso es la clave de los resultados en el sistema de detección de la técnica de LAMP. Si la concentración de Betaina es demasiado alta, los resultados se interfirieron con la fluorescencia que no puede ser completamente protegido por los iones de manganeso bajo la luz UV. Si la concentración de Betaina es demasiado baja, un gran número de iones de manganeso no se puede formar completamente una sal insoluble con el pirofosfato generado medida que avanza la reacción y la fluorescencia siendo protegido por el resto de los iones de manganeso después de la reacción que dan como resultado en un tiempo de reacción más largo y la solución se mantuvo naranja. La concentración óptica de la betaina y el ion manganeso fueron 25 mM y 0,5 mM en 25 uL mezcla de reacción a través de la detección. La sencillez y la claridad del sistema de detección de resultado deben hacerla aplicable incluso para laboratorios con recursos limitados en las zonas rurales de los países en desarrollo.

En este estudio, el límite de detección de la técnica de LAMP fué de 10 pg de ADN genómico por tubo con similares a los de la PCR. El diseño de los oligonucleótidos adecuados para la técnica fué uno de los puntos clave más importantes en la optimización de la reacción LAMP; diferentes conjuntos de oligonucleótidos indican diferentes niveles de sensibilidad (Sakuma et al, 2009.). Por lo tanto, el examen y el perfeccionamiento de los oligonucleótidos pueden mejorar la sensibilidad de la detección de la LAMP en el futuro. La Técnica de LAMP ensayo visual también se aplicó con éxito para la detección de *Brucella spp.*

En consideración de la extensa aplicación de la técnica de LAMP ensayo visual en esta investigación de ADN genómico a partir de células cultivadas, se extrajo usando el protocolo modificado (Murray, M.G. y Thompon, W. F. 1980) que es relativamente barato y también podría ser utilizado en laboratorios con recursos limitados en los países en desarrollo. Inicialmente se analizaron todas las

muestras con la prueba serológica Rosa de Bengala, la cual según datos mostrados tuvo una sola detección de casos falsos negativos respecto a la LAMP y PCR. Esto se debe posiblemente a que cuando la *Brucella* penetra en el organismo es fagocitada por los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos tisulares, donde puede multiplicarse en su interior, localizándose, finalmente, en los órganos del sistema retículo endotelial y el nivel de bacterias sea no detectada; existen varias posibles explicaciones para este hecho. En primer lugar, la presencia de factores transmembranales de otras bacterias gramnegativas (*E. coli*; *Vibrio cholera*; etc), que pueden ser reconocida por el antígeno RB, hacen que se obtengan resultado positivo con RB y que con la PCR y LAMP estas muestras sean negativas. Estos resultados concuerdan con los reportados en otros estudios de inmunopueba en la detección de *Brucella* spp. (Al – Attas et al. 2000 y Bustamante et al. 2000). También estos resultados están por debajo de los obtenidos por Rodríguez y Mariscal (2010); quienes determino y comparo la presencia de Brucelosis del personal que labora en los camales de los cantones, Buena Fé, Quevedo, El Empalme y Pichincha, utilizando la prueba serológica Rosa de Bengala (RB) y la técnica molecular (PCR), el promedio de casos positivos para las tres poblaciones excepto Pichincha por PCR fue de 3,4% y para RB 39,4%. En el cantón Pichincha debido a que 19 (70,3%) de las muestras salieron positivas con RB de las cuales 12 (44,4%) al ser analizadas con PCR fueron negativas, teniendo una correlación de 52,6%, lo que indica una alta incidencia de la enfermedad

En este trabajo, se probó la especificidad de los juegos de oligonucleótidos que se detallan en materiales y métodos que amplifican fragmentos de 500 y 1500 pb respectivamente, específicos del genoma de *Brucella* y que permiten la identificación y la diferenciación de *B. abortus* del resto de especies (Leal – Klevezas et al. 1995b).

El protocolo empleado para la extracción de ADN de *Brucella* fue totalmente eficiente lo que concuerda con; Leal – Klevezas et al. 1995b, quienes han demostrado que el empleo de una solución de lisis con altas concentraciones de Tris - EDTA y NaCl (solución tamponada eritrocito) y de altas concentraciones de SDS y proteinasa K que ayuda a extraer eficientemente el ADN de *Brucella*.

Actualmente la creación de nuevas herramientas que permitan efectivizar el diagnóstico para la *Brucella ssp* en humanos y la detección de la bacteria en el animal por la relación zoonótica que presenta la bacteria y además por las pérdidas provocadas por eventos relacionados con la enfermedad a más de constituir en la actualidad alrededor del 17% de abortos en los hatos ganaderos en Ecuador, aún no se ha llegado a concienciar sobre los altos riesgos que provoca esta bacteria, por lo tanto los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran que la técnica de LAMP puede ser una herramienta específica y sensible para el diagnóstico seguro y confiable de *Brucella spp.* en sangre infectados con dicho patógenos. Por lo tanto se aprueba las hipótesis planteadas en esta investigación.

- Con la técnica LAMP se diagnosticará porcentualmente la brucelosis en humanos con mayor sensibilidad y especificidad que con la prueba Rosa de bengala.
- Con la técnica LAMP se bajara el costo para diagnóstico de la brucelosis en humanos.

## **CAPÍTULO V.**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1. CONCLUSIONES**

De acuerdo a los resultados en el presente ensayo, se llegó a las siguientes conclusiones

- Es indudable que aún queda un gran camino que recorrer antes de poder controlar la brucelosis en los animales, en consecuencia se deben hacer grandes esfuerzos para evitar contagios en la población humana, tanto de zonas rurales como urbanas, que está en riesgo permanente de adquirir esta enfermedad.
- Se pudo otorgar el protocolo de extracción de ADN a partir de sangre periférica total en humano.
- En el estudio, de la técnica de LAMP ensayo visual tiene una ventaja sobre la bioquímica convencional, PCR y los métodos convencionales debido a su reacción rápida, operación simple, económica y práctico, sistema de detección de punto final visual con la mínima contaminación.
- La técnica de LAMP puede ser una herramienta de diagnóstico molecular conveniente para la detección rápida de *Brucella spp.* de las muestras y la vigilancia de la brucelosis en alimentos y estudios clínicos.
- Se determinó que, debido a los bajos valores de sensibilidad epidemiológica, la técnica de Rosa de Bengala no es recomendable para su uso rutinario en el diagnóstico de la brucelosis humana.
- La comparación de los resultados de la LAMP y la serología en muestras de humanos permite concluir que en las condiciones ensayadas de la LAMP, sustituye a las pruebas actuales y sugiere que podría emplearse como instrumento de diagnóstico adicional y rápido para a aquellas situaciones dudosas.
- Finalmente, la mejor forma de abordar el problema y darle solución es conjuntando esfuerzos por parte de las instituciones involucradas, de Salud, ganadería, propietarios y de educación en acciones determinadas que permitan avanzar en la prevención de este padecimiento que ha cumplido más de un siglo de existir en el país

## 5.2. Recomendaciones

Analizadas las conclusiones, se recomienda:

- La técnica de LAMP es una buena alternativa ya que es económica, rápida y segura, por lo que puede ser utilizada para diagnosticar brucelosis en sangre total.
- Aplicar esta técnica en laboratorios públicos o privados para el diagnóstico de brucelosis en humanos.
- Utilizar esta herramienta para diagnóstico de enfermedades zoonóticas como (*Brucella*, *Lectoporiasis*, *Tuberculosis*, etc.).

## **CAPÍTULO VI.**

### **BIBLIOGRAFIA**

#### **6.1. Bibliografía consultada**

**Abeledo, M. A.** 1981. "Prueba de Rosa de Bengala en el Diagnóstico de la brucelosis bovina en Cuba". Tesis de Candidatura. CENSA.

- Akakpo, A. J.** 1991. "Brucellosis animales en Afrique tropical. Particularités, epidemiologique, clinique e bacteriologique. Rev. Eler Med. Pays Trop. 40:307.
- Al – Attas R.A., Al –Khalifa M., Al- Qurashi A.R., Badawy M. Y Al- Gualy.** 2000. Evalution of PCR culture and seroly for the diagnosis of acute human brucellosis. Ann. Saudi. Med. 20 (3): 224 – 228.
- Alton, G. G., L. M. Jones, R.D. Angus and J. M. Verger.** 1988. Te chniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
- Argorte, E.** 1984. "brucelosis bovina; valoración de diferentes pruebas complementarias para el diagnóstico serológico en Cuba". Tesis de Candidatura. CENSA.
- Argorte, E.** 1989. "Aplicación de la técnica ELISA en el diagnóstico de la brucelosis bovina en Cuba". Rev Cub. Ciencias Vet. 20:180.
- Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F.** 1992. Specific antibody profile in human brucellosis. Clin Infect Dis; 14: 131-140.
- Baily GC, Kraahn JB, Drasar S and Stokeer N.** 1992. Deteccion of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification. J Trop Med Hyg.; 95: 271-275
- Baldwin CL, Winter A.J.** 1994. Macrophages and Brucella. Immunol Ser; 60: 363-380.
- Benenson, A.** 1997. Manual para el control de enfermedades transmisibles, 1997; 26a edición OPS-OMS, pg 26.
- Betancourt, Xiomara.; Sánchez, Iris.:** 1991. "Valoración de los métodos serológicos y bacteriológicos en la brucelosis Porcina". Programa-Resumén IV Congreso Asociación Latina de Veterinarios Especialistas en Cerdos (ALVEC). I Congreso de la Asociación Cubana de Veterinaria Porcina. p.p. 60.

- Boffil, P.; Rivas, A.; Ramirez, W.; Montañez, J.; Martinez, A.; Quincoses, T.; González, L. R.; Fustes, E.** 1989. "Manual de Enfermedades Infecciosas". Tomo I. Ed. I.S.A.C.H.
- Boehringer, M.** 1995. PCR Applications Manual. Boehringer Mannheim, GmbH, Biochemice. Germany.
- Bustamante S.J., Salazar H.F., Diaz A.E., Manzano C.C., Perez G.R. y Hernández A.L.** 2000. Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa C19 de *Brucella abortus*. Tec. Pecuaria. Mex. 38(1): 35- 42
- Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, Sánchez de Mora D, Delgado M, Causse M, et al.** 1996. Complications associated with *Brucella mellitensis* infection: A study of 530 cases. *Medicine*; 75: 195-211.
- Díaz, C.** 2001. Proyecto de investigación de enfermedades infecciosas en el Ganado Bovino de la Zona Central del Litoral Ecuatoriano INIAP. PRPMSA; SESA; ASOGAN: Quevedo, Ecuador.
- Elham, M; Mohammad, H; Gholamreza, J; Kazem, P; Taher, N.** 2009. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of HBV in Iran
- Fernández, A.** 1982. "Algunos aspectos epizootiológicos de la brucelosis bovina en las condiciones de la República de Cuba". Tesis para optar por el grado de Candidato a Doctor en Ciencias Veterinarias. I.S.C.A.H. San José de Las Lajas.
- Gotuzzo, E; Carrillo, C; Seas, Y; Álvarez, O.** 1989. Epidemiological and Clinical Features of Brucellosis in Family Groups, *Enf. Infec. Microbiol. Clin.*, 7 (10): 519-24.
- Leal-Klevezas D. S; Martínez-Vásquez I. O; López-Merino A, et al.** 1995b. Single step PCR for the detection of *Brucella* spp. From blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3087-3090.
- Martínez, D; Abeledo, M; Rodríguez, M; Jacome, J; Martínez, E; Vásquez, P; Montes, M.** 2001. Diagnóstico Simultáneo de brucelosis y tuberculosis mediante PCR múltiples. Vol.25 No. 2 Pág.53-57

- Montilla, A y Zamorano, M.** 2011. Brucelosis: normas preventivas, disponible en: [www.medmicro.wisc.edu](http://www.medmicro.wisc.edu) 1999. (Consulta: 15 de febrero de 2011).
- Mori, Y; Notomi, T.** 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy* 15: 62–69.
- Murray, M.G. y Thompon, W. F.** 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 8, 4321 – 4325
- Notomi, T; Okayama, H; Masubuchi, H; Yonekawa, T; Watanabe, K.** 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: E63
- Navarro, F; Martín, V; Alcoba, A; Trotti, J; Herrera, P; Chesta, J; Gianello, Y; Mchardy:** 1999. Relevamiento de la situación sanitaria de *Brucella* en humanos y animales en barrios periféricos de Río Cuarto- Córdoba, *Revista de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina*, XIX (1-2): 57-61.
- Plommet, M.** 1972. "Survie the *Brucella abortus* dans le lisier the bovins. Desinfection par le xylene". *Ann. Rech. Vet.* 1972.
- Potasman, I; Even, M; Banai, E; Cohen, D; Ángel, Y; Jaffe, M :** 1991. Brucelosis: and Unusual Diagnosis for a Seronegative Patient with Abscesses, Osteomyelitis and Ulcerative Colitis, *Rev. Clin. Dis.*, 13: 1039-42.
- Priadi, U. N.; Hirst, R. G.; Soeroso, M.; Koesharyono, C.** 1992. "Infección de *Brucella suis* como Zoonosis en Java". *Balai Penelitian Veteriner. Bogor. Indonesia*. 24 (44):110-112.
- Rhaway, N.** 1993. "Manual Merck de Veterinaria". España.
- Rivera, J; Vallecito, A; R; Romero, E; Acosta, A; Luna, Y.** 2001. Prevalencia de la Brucelosis caprina y su relación con la humana en Tenextepec, Municipio de Perote, Veracruz, México, *Publicación seriada del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria de la República de Cuba*, 23 (3): 160-164.
- Roca B.** 1990. Brucelosis. *Medicina Integral*; 15 (8); 37-49.

- Rodríguez. A y Mariscal. J.** 2010. Diagnóstico de brucelosis en el personal que labora en los camales de Buena fe, Quevedo, El Empalme y Pichincha. Tesis Ing. Agrop. Quevedo, Ecuador. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. 84 p
- Sakuma,T., Kurosaki. Y, Fujinami, T, Takizawa and Yasuda. J.** 2009, Rapid and simple detection of *Clostridium botulinum* types A and B by loop – mediated isothermal simplification. *J. Applied Microbiol.*, 106: 1252 – 1259.
- Samartino, L.; Navarro, F.; Gregoret, R.** 1997. La Aplicación de la Técnica Antígeno Buferado en Placa (BPA) como prueba tamiz en el diagnóstico de la brucelosis. IV Jornada Científica-Técnica. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Cordoba. Argentina. 20 y 21 de Agosto de 1997
- Sánchez, L; Cepeda, R; Morano, Y.** 1998. Análisis de un brote epidemiológico de brucelosis en trabajadores de un matadero, *Rev Esp. Salud Pública*, 72: 137-46.
- Santini, C; Baiocchi, P; Berardelli, A; Venditti, Y; Serra, P.** 1994. A Case of Brain Abscess due to *Brucella melitensis*, *Clin. Infect. Dis.*, 19: 977-8,
- Wilson, G.; Miles, A.** 1975. "Topley and Welsons. Principles of bacteriology, virology and inmunity". Quinta Edición. Vol. 1. Cap. 33. Ed. Revolucionaria. Instituto Cubano del Libro. La Habana.
- Wray C,** 1975. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. *Veterinary Bulletin*, 45:Abstract 546.
- Young E.J.** 1991. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases of agglutination test and review of the literature. *Rev Infect Dis*; 13:359-72.
- Young, E. J.** 1995. An Overview of Human Brucellosis, *Clin Infect. Dis.*, 21: 283-290.
- Zhan Y, Cheers C.** 1995. Endogenous Interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun*; 63(4): 387-9.



## **CAPÍTULO VII.**

### **ANEXOS**

#### **ANEXO 1. PROTOCOO SALTING OUT**

- Se trabajó con 1 000  $\mu$ L de las muestras sanguíneas y con muestras de garrapatas previamente maceradas.
- Se añadieron 200  $\mu$ L de NaCl (0,9%), se dio toque de vortex y se centrifugó durante 1 minuto a 13 000 rpm para luego eliminar cuidadosamente el sobrenadante.

- Posteriormente se procedió a repetir estos último pasos por dos ocasiones más.
- Se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de TENS y 5  $\mu\text{L}$  de proteinasa K. Se agitó con vortex suave hasta que se re suspendió bien el *pellet*.
- Las muestras fueron incubadas durante 1 hora a 56°C.
- Luego de la incubación, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de solución de cloruro de sodio 6M y se agitaron fuertemente por inversión.
- Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (CIA) y se agitaron por vortex.
- Se centrifugó durante 5 minutos a 10 000 rpm a temperatura ambiente y se trasvasaron cuidadosamente 350  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un tubo de 1,5 mL, cuidando de no remover la interface.
- Seguidamente se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de etanol al 95% frío y se agitó por inversión fuerte para luego centrifugar por 10 minutos a 10 000 rpm.
- Se procedió a la eliminación del sobrenadante por inversión del tubo, vigilando que el pellet de ADN no se desprendiera de la pared del tubo.
- Posteriormente se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% frío y se dio vortex hasta la re suspensión del *pellet* de ADN. Se centrifugó por 10 minutos a 10 000 rpm y se eliminó el sobrenadante por inversión, vigilando que no se desprenda el pellet de ADN.
- Se procedió al secado de las muestras de ADN durante 15 minutos para posteriormente añadir 50  $\mu\text{L}$  de T.E. y se agitó en vortex ligero para re suspender el pellet e incubar a 56°C por 20 minutos.
- Finalmente las muestras fueron conservadas en refrigeración a -4°C.

## **ANEXO 2. PROTOCOLO TENS**

- Se trabajó con 1 000  $\mu\text{L}$  de las muestras sanguíneas y con muestras de garrapatas previamente maceradas.
- Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de NaCl (0,9%), se dio toque de vortex y se centrifugó durante 1 minuto a 13 000 rpm para luego eliminar cuidadosamente el sobrenadante.

- Posteriormente se procedió a repetir estos último pasos por dos ocasiones más.
- Se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de TENS y 5  $\mu\text{L}$  de proteinasa K. Se agitó con vortex suave hasta que se re suspendió bien el *pellet*.
- Las muestras fueron incubadas durante 1 hora a 56°C.
- Luego de la incubación, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de solución de cloruro de sodio 6M y se agitaron fuertemente por inversión.
- Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (CIA) y se agitaron por vortex.
- Se centrifugó durante 5 minutos a 10 000 rpm a temperatura ambiente y se trasvasaron cuidadosamente 350  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un tubo de 1,5 mL, cuidando de no remover la interface.
- Seguidamente se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de etanol al 95% frío y se agitó por inversión fuerte para luego centrifugar por 10 minutos a 10 000 rpm.
- Se procedió a la eliminación del sobrenadante por inversión del tubo, vigilando que el pellet de ADN no se desprendiera de la pared del tubo.
- Posteriormente se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% frío y se dio vortex hasta la re suspensión del *pellet* de ADN. Se centrifugó por 10 minutos a 10 000 rpm y se eliminó el sobrenadante por inversión, vigilando que no se desprenda el pellet de ADN.
- Se procedió al secado de las muestras de ADN durante 15 minutos para posteriormente añadir 50  $\mu\text{L}$  de T.E. y se agitó en vortex ligero para re suspender el pellet e incubar a 56°C por 20 minutos.
- Finalmente las muestras fueron conservadas en refrigeración a -4°C.

### Anexo 3. Cronograma de actividades

ACTIVIDADES	2012 - 2013																	
	Meses																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6
Revisión Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Elaboración del perfil de proyecto.	X	X																
Visita a camales					X	X	X											
Recolección de muestras.								X	X	X								
Análisis de las muestras en laboratorio											X	X	X					
Extracción de ADN y aplicación de la LAMP													X	X	X			
Análisis e Interpretación de los resultados.														X	X	X		
Sustentación de tesis																		X
Publicación de resultados																		X

## Anexo 4. Fotografías de la investigación

### Material para tomar las muestras

Fotografía N.- 1



Fotografía N.- 2



### Tomas de las muestras de sangre

Fotografía N.- 3



Fotografía N.- 4



Fotografía N.- 5



Fotografía N.- 6



Microcentrifugación y Preparación del Mix de LAMP

Fotografía N.- 7



Fotografía N.- 8



