



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



DETECCIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PATÓGENAS ABORTIVAS EN BOVINOS

TESIS

Que para obtener el grado profesional de
Maestro en Producción Agropecuaria
Opción Terminal Área Pecuaria

Presenta

MVZ Edgar Iván González Jiménez

Director de tesis: Dr. José Herrera Camacho
Codirector: Dra. Lily Xóchitl Zelaya Molina

COMITÉ TUTORAL

**Dr. Aureliano Juárez Caratachea
MC Naida Luz Bravo Hernández
Dr. Benjamín Gómez Ramos**

Tarímbaro, Michoacán. Mayo 2019

LISTA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	9
2. ABSTRACT	9
3. INTRODUCCION.....	10
4. JUSTIFICACIÓN	12
5. HIPÓTESIS	16
6. OBJETIVOS.....	17
6.1 Objetivo general.....	17
6.2 Objetivos específicos	17
7. REVISIÓN DE LITERATURA.....	17
7.1 Antecedentes.....	17
7.2 Biotecnologías en la reproducción bovina.....	20
Recoleccion de material espermático	21
Método de la Vagina artificial	21
Método del Electroeyaculador	23
7.2.1 Criopreservación de semen.....	25
7.2.2 Inseminacion Artificial.....	27
7.2.3 Transferencia de embriones	28
7.3 Agentes infecciosos	29
7.3.1 Brucelosis bovina (<i>Brucella abortus</i>).....	29
Agente etiológico	29
Epidemiologia	30
Prevalencia	31
Transmisión.....	31
Patogénesis	32
Cuadro clínico	32
Diagnóstico.....	33
Prevención y control	35
7.3.2 Tuberculosis bovina (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>).....	35

Agente etiológico	35
Epidemiología	36
Prevalencia	37
Transmisión	37
Patogénesis	38
Cuadro Clínico	39
Diagnóstico	39
Prevención y control	40
7.3.3 Campilobacteriosis bovina (<i>Campylobacter fetus</i>).....	41
Agente etiológico	41
Epidemiología	41
Prevalencia	42
Transmisión	42
Patogénesis	43
Cuadro Clínico	43
Diagnóstico	44
Prevención y Control	44
7.4 Principales métodos de diagnóstico bacteriano.....	45
7.4.1 Métodos Indirectos	45
Pruebas de microaglutinación (MAT)	45
Pruebas bioquímicas	45
Prueba de Ensayos por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)	46
7.4.2 Métodos directos	46
Cultivo bacteriológico	47
Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR).....	48
Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real (qPCR)	49
8. MATERIAL Y MÉTODOS	53
8.1 Área de estudio y trabajo experimental	53
8.2 Procesamiento y suministro de semen bovino	53
8.3 Diseño de iniciadores (Primers).....	57
8.4 Cultivo de bacterias	60
8.5 Extracción de DNA bovino	62
8.6 Cuantificación de DNA	64

8.7 Desarrollo y optimización de las reacciones de PCR	64
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS	76
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
10.1 Extracción de DNA	77
10.2 DISEÑO Y EVALUACIÓN DE INICIADORES (Primers)	79
10.3 PCR Punto final	87
10.4 PCR tiempo real	91
11. CONCLUSIONES	95
12. LITERATURA CITADA	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aborto bovino.	18
Figura 2. Proceso molecular de identificación bacteriana	20
Figura 3. Vagina artificial	22
Figura 4. Recolección de semen con vagina artificial.	22
Figura 5. Electroeyaculador.....	24
Figura 6. Esquematización de la IA en bovinos	27
Figura 7. Embriones bovinos	29
Figura 8. Brucella abortus	30
Figura 9. Signos clínicos de Brucella abortus	33
Figura 10. Mycobacterium bovis (color naranja)	36
Figura 11. Bovino positivó a la prueba de tuberculina	40
Figura 12. Campylobacter fetus.....	41
Figura 13. Fetos abortados a causa de C. fetus.	43
Figura 14. Material para cultivo microbiano	47
Figura 15. Reacción en cadena de la polimerasa	48
Figura 16. Producto de amplificación de qPCR.	51
Figura 17. Centro Nacional de Recursos Genéticos	53
Figura 18. Recolección de semen en tubos falcón.	54
Figura 19. Electroeyaculador (Pulsator IV auto adjust).....	54
Figura 20. Identificación de gobelets.	55
Figura 21. Sistema CASA SCA®.....	56
Figura 22. Incubación de placas en microaerofilia.	61
Figura 23. Cultivo de Brucella.	62
Figura 24. Diseños de secuencias de nucleótidos de iniciadores del gen virb3 para Brucella.....	81
Figura 25. Diseño de secuencias de nucleótidos de iniciadores del gen wbkA para Brucella.....	82
Figura 26. Diseño de secuencias de nucleótidos de iniciadores del gen kasB para Mycobacterium tuberculosis.....	82
Figura 27. Diseño de secuencias de nucleótidos de iniciadores del gen 16S rRNA para Mycobacterium tuberculosis.....	83
Figura 28. Diseño de secuencias de nucleótidos de iniciadores del gen gltX1 rRNA para Capylobacter foetus	83

Figura 29. Perfil electroforético de amplificación de PCR de <i>Brucella abortus</i> en gel de agarosa.	88
Figura 30. Perfil electroforético de amplificación de PCR con DNA diluido de <i>Brucella abortus</i> en un gel de agarosa.	89
Figura 31. Perfil electroforético de amplificación de PCR especie específico de <i>C. fetus</i> en agarosa.	90
Figura 32. Perfil electroforético de amplificación de PCR especie específicos de <i>M. tuberculosis</i> en gel de agarosa.....	90
Figura 33. Perfil electroforético de amplificación de PCR especie específico de <i>M. tuberculosis</i> en gel de agarosa.	91
Figura 34. Curva de amplificación de <i>Brucella abortus</i> , en reacciones dúplex con los genes <i>wbkA</i> y <i>virB3</i> reacciones triplex adicionando actina bovina.	92
Figura 35. Curva de amplificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , en reacciones dúplex con los genes 16S rRNA y <i>kasB</i> y reacciones triplex adicionando actina bovina.	93
Figura 36. Curva de amplificación de <i>Campylobacter fetus</i> , en reacciones dúplex con los genes 16S rRNA y <i>gltx1</i> y reacciones triplex adicionando actina bovina.	94

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características de un iniciador	52
Cuadro 2. Secuencias seleccionadas.....	57
Cuadro 3. Descripción de primers utilizados para las reacciones de PCR.	59
Cuadro 4. Ingrediente para medio de cultivo tioglicolato.	60
Cuadro 5. Ingredientes para medio de cultivo de <i>Campylobacter</i>	61
Cuadro 6. Medio <i>Brucella</i> agar base B0219605	61
Cuadro 7. Condiciones para PCR del gen 16S rRNA.	65
Cuadro 8. Ciclos de amplificación gen 16S rRNA.	65
Cuadro 9. Condiciones de PCR para el gen <i>kasB</i>	66
Cuadro 10. Ciclos de amplificación para el gen <i>kasB</i>	66
Cuadro 11. Condiciones de PCR para <i>Campylobacter fetus</i>	67
Cuadro 12. Ciclos de amplificación.....	67
Cuadro 13. Condiciones de PCR para el gen <i>virB3</i> y <i>wbkA</i>	68
Cuadro 14. Ciclos de amplificación de <i>Brucella abortus</i>	69
Cuadro 15. Mezcla de reacción para el gen 16S rRNA de <i>C. fetus</i>	71
Cuadro 16. Mezcla de reacción para el gen <i>gltx1</i> de <i>C. fetus</i>	71
Cuadro 17. Condiciones de amplificación del gen <i>gltx1</i> de <i>C. fetus</i>	71
Cuadro 18. Condiciones de amplificación del gen 16S rRNA de <i>C. fetus</i>	72
Cuadro 19. Mezcla de reacción para el gen <i>wbkA</i> de <i>B. abortus</i>	73
Cuadro 20. Condiciones de amplificación del gen <i>wbkA</i> de <i>B. abortus</i>	73
Cuadro 21. Mezcla de reacción para el gen <i>virB3</i> de <i>B. abortus</i>	73
Cuadro 22. Condiciones de amplificación del gen <i>virB3</i> de <i>B. abortus</i>	74
Cuadro 23. Mezcla de reacción para el gen <i>kasB</i> y 16S rRNA de <i>B. abortus</i>	75
Cuadro 24. Condiciones de amplificación del gen <i>kasB</i> de <i>B. abortus</i>	75
Cuadro 25. Concentración utilizada de Actina bovina.....	76
Cuadro 26. Resultados de criterios evaluados de los diferentes diluyentes utilizados para la extracción de DNA	77
Cuadro 27. Extracción de DNA bacteriano	79
Cuadro 28. Bacterias, genes y primers	80
Cuadro 29. Evaluación in silico de primers.....	84

1. RESUMEN

La brucelosis, compylobacteriosis y tuberculosis, son enfermedades infecciosas zoonóticas, limitantes de la producción ganadera bovina en México, los principales signos clínicos de estas enfermedades son infertilidad en machos, repetición de celo y abortos en distintas etapas de la gestación de las hembras. México es una zona de alta prevalencia y en la actualidad las técnicas de diagnóstico utilizadas para estas enfermedades son Rosa de Bengala, fijación de complemento, cultivos bacterianos y ELISA. El objetivo del presente estudio fue diseñar y validar el funcionamiento de iniciadores o primers específicos para las especies *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus* y *Mycobacterium tuberculosis*, que puedan ser utilizados en metodologías de diagnóstico moleculares como la PCR, seleccionando blancos moleculares de referencia para cada bacteria y que no intercedan en las especies vacúnales de esta bacteria. Los iniciadores diseñados amplifican fragmentos cortos de entre 120 y 150 pares de bases (bp); por lo que las condiciones de amplificación fueron estandarizadas considerando el tamaño del fragmento, con estos resultados se validó la funcionalidad de los primers en los ensayos de PCR tiempo real (qPCR) y PCR punto final para la detección de *B. abortus*, *Campylobacter fetus* y *Mycobacterium tuberculosis*.

Palabras clave: Bacterias, Bovinos, PCR, Primers, Estandarización.

2. ABSTRACT

Brucellosis, compylobacteriosis and tuberculosis are infectious zoonotic diseases, limiting cattle production in Mexico, the main clinical signs of these diseases are infertility in males, recurrence of estrus and abortions in different stages of the pregnancy of females. Mexico is an area of high prevalence and currently the diagnostic techniques used for these diseases are Rose Bengal, complement fixation, bacterial cultures and ELISA. The objective of the present study was to design and validate the functioning of specific primers or primers for the *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus* and *Mycobacterium tuberculosis* species, which can be used in molecular diagnostic methodologies such as

PCR, selected molecular reference targets for each bacterium and that do not intercede in the vaccine species of this bacterium. The designed primers amplify short fragments between 120 and 150 base pairs (bp); for which the amplification conditions were standardized considering the size of the fragment, with these results the functionality of the primers in the real-time PCR assays (qPCR) and endpoint PCR for the detection of *B. abortus*, *Campylobacter fetus* and *Mycobacterium tuberculosis*.

3. INTRODUCCION

La actividad ganadera de México, ha evolucionado con el paso de los años, en la actualidad se encuentra en una etapa de transición, con cambios de estructura, manejo y gestión. El ganado bovino es la principal actividad económica del país con una diversificación y relevancia amplia, utilizando más del 60% del territorio nacional para esta actividad; las zonas rurales con climas tropicales son marcados por la producción de ganado de carne principalmente, aprovechando el extenso cultivo de distintos pastos y forrajes, la producción de leche se encuentra principalmente en las zonas con climas templados. La producción de ganado en México es estacional, manejada en función por la disponibilidad de forrajes y deficiente conexión con los mercados potenciales para la distribución de carne y leche; a pesar de esto se mantiene el mejor aprovechamiento de los recursos y la adaptación del ganado, aunque esta actividad se caracteriza por una baja productividad, asociado a diferentes factores, como el control sanitario el de mayor importancia (García-Martínez *et al.*, 2015).

En la ganadería bovina existen diversos agentes patógenos que pueden ser transmitidos de forma directa o a través del semen bovino por monta directa o inseminación artificial, estos patógenos son considerados un factor limitante en el desarrollo del ganado bovino en todo el mundo, ya que son causantes de enfermedades que provocan aborto en diferentes etapas de la gestación (Rivera, 2001).

Diversas investigaciones sobre la comunidad microbiana del material espermático de sementales bovinos han detectado bacterias patógenas de varias especies. Por lo que la presencia de microorganismos del tracto reproductor masculino, debe considerarse de importancia, debido a su influencia en la fertilidad del semen y potencialidad infecciosa adquirida. Las instituciones encargadas de conservar material espermático, como los centros de procesamiento de semen (CEPROSEM), toman estándares muy altos de higiene para la manipulación y preparación del material, en las muestras recolectadas de semen pueden encontrarse distintas especies bacterianas no patógenas y patógenas, sobre todo en las muestras que se recolectan de los sementales que no llevan una prevención sanitaria adecuada (Morales *et al.* 2013).

Es por esto que en la actualidad se requiere de diagnósticos precisos con los que se puedan enfrentar los planes de prevención y control de enfermedades bacterianas emergentes y reemergentes, altamente contagiosas, que pueden afectar la reproducción y producción ganadera mundial en los últimos años. Ante esta amenaza, el diagnóstico debe encaminarse a la detección e identificación correcta de los agentes patógenos que prevalecen en los ranchos ganaderos y la tendencia mundial está encaminada a introducir metodologías avanzadas como las pruebas moleculares de detección de DNA y RNA. La ventaja de estos nuevos métodos radica en que presentan mayor sensibilidad, y una vez que las pruebas quedan estandarizadas se realizan en un menor tiempo que los métodos tradicionales (Pérez *et al.*, 2009).

Estas herramientas moleculares se basan en el análisis de genes específicos, sobre todo aquellos asociados a factores de virulencia de las bacteria del complejo abortivo de los bovinos como especies de los géneros *Brucella*, *Leptospira*, *Campylobacter* y *Mycobacterium*, estas bacterias son causantes de enfermedades infecciosas que atacan de manera importante a los bovinos, presentan diversas manifestaciones clínicas como el aborto, la infertilidad y la baja producción tanto de carne como de leche (Xolapa *et al.*, 2010).

Considerando que la improductividad y los abortos de los bovinos son causados en un 40-60% por bacterias patógenas, se debe considerar implementar una metodología de

identificación bacteriana, que sea más sensible y específica, que garantice la calidad sanitaria de los animales bovinos.

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad son utilizados métodos convencionales en la detección bacteriana, basados en las características fenotípicas de cada bacteria, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo bacteriano sigue siendo el método de detección de elección, para esto es esencial elegir correctamente el medio de crecimiento y las condiciones de incubación. Durante el proceso de identificación bacteriana se requiere de la amplia experiencia del microbiólogo para la elección correcta de una prueba cuyo propósito final sea la identificación del microorganismo a nivel género y especie. Dentro de la práctica de rutina diaria de los laboratorios de microbiología se aplican técnicas fenotípicas para lograr la detección de microorganismos causantes de enfermedades; sin embargo, estas pruebas muestran ciertas limitantes con los microorganismos de difícil crecimiento en medios de cultivos específicos (Buo *et al.*, 2011).

Las enfermedades bacterianas asociadas a abortos e infertilidad en los bovinos como la brucelosis, tuberculosis y campylobacteriosis, siguen estando presentes dentro de la ganadería bovina del país y presentan un problema de salud pública al ser zoonóticas. Estas enfermedades son adquiridas de forma directa con animales infectados o por el consumo de alimentos contaminados por cualquiera de estas bacterias. La contaminación animal se da por contacto directo, durante la monta natural o asistida cuando se utiliza material espermático contaminado (Padilla *et al.*, 2003).

En México la tuberculosis bovina (TB) es un grave problema de salud animal y un gran riesgo en la salud pública, el agente causal *Mycobacterium bovis*, está ampliamente distribuido en México. Existe en la actualidad una Campaña Nacional para la Erradicación de la TB (CANETB) la cual considera a los estados del norte, con excepción de Baja California, Quintana Roo y Yucatán en etapas de erradicación, estando el resto de los

estados como zonas de control. El diagnóstico de rutina que utiliza la campaña, es la prueba intradérmica con derivado proteico purificado (PPD) o tuberculina. En zonas de mayor prevalencia se requiere una mayor sensibilidad de la prueba y se aplica en el pliegue caudal, para los casos que requieren una mayor especificidad en zonas de baja prevalencia, se utiliza la doble comparativa que se aplica en la tabla del cuello. Para un diagnóstico definitivo se envían muestras de lesiones al laboratorio de bacteriología, sin embargo, mediante el cultivo de *M. bovis* el diagnóstico representa una verdadera barrera de tiempo, dinero y esfuerzo (Estrada-Chávez *et al.*, 2004).

No obstante, la prueba de tuberculina tiene sus fallas, como todas las pruebas utilizadas en la detección y diagnóstico de patógenos. La simple caudal tiene una sensibilidad de 72% y especificidad del 78%, generando resultados de diagnóstico falsos positivos, siendo estos resultados un problema económico y social, ya que conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, los animales reactores positivos a la prueba se deben sacrificar. Debido a los problemas que se asocian al aislamiento de este microorganismo, se ha considerado confirmar el diagnóstico mediante pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de DNA en el genoma de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Estrada-Chávez *et al.*, 2004).

En México desde el año 1997, se emplea la vacunación de bovinos contra la brucelosis, utilizando la cepa RB51, su uso ha sido autorizado por la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales, y se ha desplazado a partir de esta fecha el uso de la cepa 19. La vacuna RB51, por ser una cepa rugosa no induce anticuerpos, que se detecten mediante las pruebas diagnósticas convencionales. En los países en vías de desarrollo, donde las posibilidades de pagar una indemnización por eliminar los bovinos reactores a brucelosis son nulas, se presentan con alta frecuencia hatos lecheros que muestran tasas de prevalencia superiores al 20%, estos valores aparecen aún cuando se cumple estrictamente las normas de vacunación, lo anterior obliga a buscar métodos alternos de protección como la revacunación. Sin embargo, la revacunación presenta ciertas dificultades de carácter diagnóstico, ya que una segunda vacunación implica también un aumento en los títulos

de anticuerpos, lo que provocaría una baja especificidad de las pruebas serológicas rutinarias utilizadas en el diagnóstico de la brucelosis bovina (Bustamante *et al.*, 2000).

La principal ruta de dispersión de la bacteria son los animales enfermos, pueden fácilmente diseminar la enfermedad entre los animales sanos o incluso en rebaños cercanos. La infección cruzada puede también generar otra problemática, debido a que se han reportado casos que el ganado bovino se puede infectar con *B. melitensis*, en este sentido el manejo del ganado contaminado requiere un cuidado especial. La problemática de la brucelosis bovina se agudiza principalmente porque todo animal diagnosticado enfermo debe sacrificarse, y en países en vías de desarrollo como México, es una medida difícil de llevar a cabo, debido a que los pequeños productores dependen económicamente de la producción de esos animales, por lo que se oponen al sacrificio (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016).

El diagnóstico en México de la brucelosis bovina se basa principalmente en medios de cultivo, el cual tiene la desventaja de que este microorganismo es de lento crecimiento y se opta mejor por las pruebas serológicas como la Rosa de Bengala, prueba de tamizaje, aglutinación del suero con antígeno y como prueba confirmatoria el SAT (por sus siglas en inglés *serum agglutination test*), se utiliza un antígeno para estas pruebas de una suspensión de un cultivo de *B. abortus* cepa 1119, inactivada con fenol. En estas pruebas se detectan principalmente anticuerpos IgM, IgG e IgA aglutinantes por lo que la sensibilidad de la prueba y la especificidad queda en un 80% debido que la prueba puede detectar anticuerpos generados por la cepa vacunal y no por el agente causal de la enfermedad, dando como resultados falsos positivos (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016).

En México, se tiene una enfermedad que, aunque no existe una norma que rija su detección, control o erradicación, es causante de problemas que afectan la reproducción y producción de bovinos similares o los que causan la brucelosis y la tuberculosis, esta enfermedad es causada por la bacteria *Campylobacter fetus*, teniendo también alta importancia en la salud pública debido a que ha sido reportado como patógeno oportunista del ser humano (Tovar, 2017).

Campylobacter fetus es la causante de la Campylobacteriosis genital bovina, esta enfermedad puede permanecer de manera subclínica por lo cual no suele ser detectada,

a menos que se empleen métodos de diagnóstico eficaces, debido a esto se han establecido diferentes métodos para la identificación de este género, el más utilizado es el de Inmunofluorescencia directa, este método logra identificar la bacteria a nivel de especie, pero no a niveles de subespecie. También los Ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA), este se realiza para la detección de anticuerpos IgA, específicos del antígeno del mucus cervicovaginal después de sufrir un aborto causado por *C. fetus* (Tovar, 2017).

En conjunto estas bacterias patógenas en los bovinos son causantes de enfermedades de salud pública y pérdidas económicas por el déficit de productos de origen animal. En 2015, México contaba con un inventario ganadero de 33,503,623 cabezas de ganado bovino (SIAP-SAGARPA, 2015), si bien el inventario ganadero se incrementa anualmente por la adquisición de animales y no por mejoramiento en la eficiencia reproductiva de los hatos ganaderos a nivel nacional (Campero, 2000).

En las regiones tropicales y subtropicales del país continúan siendo intangibles las pérdidas económicas del sector pecuario debido a problemas de infecciones bacterianas; a pesar de esta realidad, la detección de los agentes patógenos, se sigue basando en criterios clínicos y métodos clásicos de diagnóstico, cuyas deficiencias dificultan el desarrollo de un diagnóstico preciso, ocasionando un déficit en el desarrollo de nuevas políticas públicas que aborden metodologías de vanguardia para un diagnóstico más preciso de mayor sensibilidad y especificidad. El diagnóstico de las enfermedades reproductivas en bovinos, especialmente las causantes de infertilidad y abortos, son de los mayores problemas que enfrenta la medicina veterinaria (Conigliario, 2003; Bolívar, 2013)

En diversas investigaciones se ha demostrado que la eficiencia de las pruebas diagnósticas existentes no es del todo confiables y que las pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrolladas para la detección bacteriana son una herramienta confiable al tener una alta precisión, siendo más sensibles 95-98% y específicas 99% en la detección de patógenos bacterianos, además que se pueden utilizar diferentes tipos de muestras como sangre, tejido o semen de los animales contaminados para desarrollar un diagnóstico, con respecto a esto se ha visto que la

mayoría de bacterias con alto grado de patogenicidad en bovinos se secretan en las vesículas seminales, y también tiene la capacidad de alojarse en la mucosa prepucial y peneana, por lo que la toma de muestras para un diagnóstico más certero debería de tomarse en cuenta también el material espermático destinado a los programas de reproducción asistida, ya que en la actualidad la mayoría del material espermático criopreservado viene de campo y no pasa por un centro de procesamiento de semen certificado, tomando en cuenta solo características fenotípicas de los sementales dejando de lado las condiciones sanitarias de los donadores de semen con fines de criopreservación (De Ruight *et al.*, 2006; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Finalmente, la estandarización de esta metodología molecular basada en PCR y desarrollada para la detección de patógenos bacterianos, redundará en beneficios para los planes de prevención y erradicación trazados por las autoridades gubernamentales, trayendo consigo beneficios para ganaderos de todo el país, pues se permitirá cumplir con los requisitos exigidos para la exportación de ganado bovino a los países que lo demanden y de esta manera se obtendrán mayores ingresos económicos y a la vez se puede reducir el número de pérdidas durante el proceso productivo de ganado detectando eficazmente el ganado improductivo y focos de infección.

5. HIPÓTESIS

La estandarización de una metodología molecular para la detección de *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Campylobacter fetus*, enfocada a blancos moleculares asociados al factor de virulencia de las bacterias permitirá una mayor sensibilidad y especificidad en las técnicas de detección de los agentes causales de enfermedades reproductivas en ganado bovino.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Estandarizar una alternativa metodológica molecular basada en PCR, utilizando iniciadores especie-específicos para la detección de *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Campylobacter fetus*.

6.2 Objetivos específicos

- Estandarización de una alternativa tecnológica para la extracción de DNA bovino (semen) y bacteriano.
- Diseñar iniciadores específicos para la detección molecular de las bacterias patógenas *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Campylobacter fetus*.
- Optimización de las condiciones de PCR punto final para la amplificación y detección de *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus* y *Mycobacterium tuberculosis*.
- Estandarización de las condiciones de PCR tiempo real triplex (qPCR) para la amplificación y detección de *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus* y *Mycobacterium tuberculosis*.
- Optimización de las condiciones de PCR tiempo real dúplex para la amplificación y detección de *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus* y *Mycobacterium tuberculosis*.

7. REVISIÓN DE LITERATURA

7.1 Antecedentes

Se pronóstica que a nivel mundial durante los primeros 25 años de este siglo la demanda de productos de origen animal aumentará considerablemente, como resultado del aumento de la población, la urbanización y la globalización económica; esta situación no

es distinta para los países de América Latina, donde está situado México, lo cual conllevará interacciones complejas entre la población, los recursos biológicos, geofísicos y los objetivos económicos. Durante este periodo, se esperan incrementos anuales en la demanda mundial de carne y leche del 2.8% y 3.3%, respectivamente. En zonas urbanas de América Latina estos consumos de carne y leche significarán un incremento del 70 y 90% con respecto a lo consumido en el año 2000 (Monforte *et al.*, 2006).

En la actualidad, uno de los principales problemas que afronta el productor pecuario es la baja producción del ganado bovino tanto en carne como en leche, esto en gran medida se debe a trastornos relacionados con la reproducción, como lo son las reabsorciones embrionarias, los abortos tempranos o tardíos, (Figura 1), metritis, nacimientos de crías débiles o muertas, que en primera instancia afecta la fertilidad del hato, reduciendo de manera considerable la producción bovina (González *et al.*, 2007).



Figura 1. Aborto bovino.

Las limitantes de la eficiencia de los ranchos ganaderos productores de carne y leche bovina, han sido representadas por la incidencia de las enfermedades infecciosas de la reproducción. Los agentes patógenos bacterianos siguen siendo un problema para la ganadería bovina; no obstante, los esfuerzos realizados por las autoridades competentes para tratar de prevenir y evitar su difusión han sido poco exitosos. Existen estudios donde demuestran que más del 50% de las fallas reproductivas en bovinos son debidas a

causas infecciosas, existiendo para algunas de ellas, vacunas disponibles para su prevención (González *et al.*, 2007), sin obtener una eficacia completa.

Si bien se han realizado esfuerzos para el control de las enfermedades infecciosas bacterianas, y sobre todo las que afectan la reproducción normal en los bovinos, las pérdidas son cuantiosas en los ranchos ganaderos. Dichas bajas económicas oscilan entre \$588.000 USD y \$2,205.000 en producción lechera pudiendo llegar hasta los \$2,412.000 USD anuales por animal tan solo con infecciones relacionadas a la patología causada por la bacteria *Brucella abortus* (Arenas y Moreno, 2016).

Diversos estudios declaran de suma importancia la erradicación o control de los agentes patógenos causantes de múltiples enfermedades, tales como la infertilidad y los abortos del ganado bovino, debido a las grandes pérdidas económicas que ocasionan. En América en la parte sur del continente se reportan pérdidas económicas a causa de enfermedades reproductivas infecciosas de hasta 60 millones de dólares americanos (USD) y en el caso de centro América se han reportado pérdidas de 25 millones de dólares (USD) (Campos *et al.*, 2010).

El semen fresco o criopreservado está considerado como un potencial factor de riesgo en la difusión y transmisión de agentes patógenos, causantes de diferentes enfermedades entre las que destacan las que afectan la fertilidad de los bovinos, ocasionando infertilidad en machos y abortos en hembras gestantes, para evitar dichas transmisiones, la mayoría de los centros de inseminación artificial establecen reglas y normas estrictas las cuales deben adaptarse para comercializar el semen; el problema del semen radica cuando sus fundamentos técnicos son violados, debido a que en la actualidad en diversas unidades de producción bovina, para la recolección de germoplasma con fines de criopreservación y comercialización, los técnicos encargados de este proceso, no garantizan el correcto estado sanitario del semental donante, por lo tanto se corre el riesgo de transmitir enfermedades patógenas a través del semen criopreservado (Jorge *et al.*, 1998).

Para tener un mejor control sanitario en el ganado bovino, la medicina veterinaria está utilizando métodos modernos de identificación de agentes patógenos, las técnicas moleculares basadas en PCR han sido utilizadas para la identificación de virus, bacterias,

hongos, protozoarios, entre otros (Figura 2), estas técnicas se deben de estandarizar para poder identificar bacterias que se puedan transmitir por distintas vías entre ellas el semen fresco o criopreservado de los bovinos. La precisión y reproducibilidad de los ensayos de PCR dependen de la calidad técnica y la experiencia del analista, mientras que la especificidad de la prueba puede ser afectada por la contaminación de la muestra durante su procesamiento, si los iniciadores no son específicos o si las condiciones de la PCR no son óptimas, se corre el riesgo de amplificar productos no específicos y tener falsos negativos (Rodríguez-Herrera *et al.*, 2009).

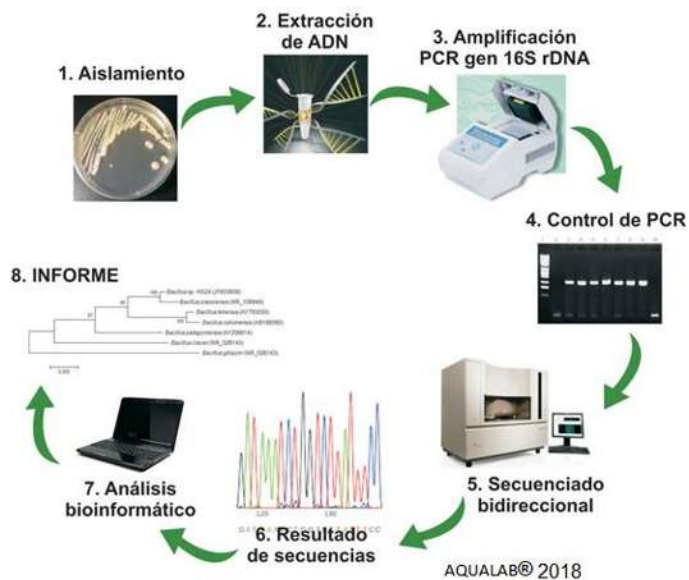


Figura 2. Proceso molecular de identificación bacteriana

7.2 Biotecnologías en la reproducción bovina

Uno de los campos de mayor actividad científica se desarrolla en la reproducción animal, a través de los años, los científicos han avanzado las técnicas de manipulación de la actividad, funciones y aplicación de los logros en la mejora reproductiva en las diversas especies domésticas, desarrollando tecnologías como la criopreservación de semen,

inseminación artificial y la transferencia de embriones. En las décadas más recientes, han aparecido nuevas tecnologías como la producción de embriones *in vitro* (PIVE), la criopreservación y la selección del sexo de embriones y de espermatozoides e incluso, un novedoso microprocedimiento de manipulación de los embriones, la clonación y la transgénesis. Estas tecnologías han aportado a la Reproducción Asistida, herramientas que permiten manipular la actividad reproductiva con el propósito de propagar con rapidez a los animales superiores y a sus genes, modificándolos genéticamente con el fin de mejorar la calidad de sus productos. Además, estas nuevas tecnologías facilitan la posibilidad de producir fármacos con usos terapéuticos en determinadas enfermedades en los humanos o producir animales con modificaciones genéticas, cuyas producciones permitan ofrecer resistencia a ciertas enfermedades (Madrid-Bury, 2014).

Recolección de material espermático

Existen diferentes métodos para la extracción de semen de machos bovinos, cada uno tiene sus ventajas y desventajas, pero al final lo más importante es realizar esta práctica de la manera más adecuada posible cuidando siempre la integridad del animal donante y la del técnico encargado de la práctica; las metodologías más utilizadas en la actualidad se listan a continuación.

Método de la Vagina artificial

Este método consiste en un tubo cilíndrico de plástico resistente, con un diámetro de 7 centímetros y de 35-40 centímetros de largo, este tubo es recubierto por una camisa de goma elástica (liner), esta se dobla sobre los extremos del tubo, formando una especie de cámara sellada, sirviendo para guardar la temperatura (45-60°C) y aire, con el fin de obtener las condiciones más similares a las de una vagina bovina, para lograr la eyaculación del semental (Figura 3).



Figura 3. Vagina artificial

Para el proceso de recolección de semen por este método, consiste en utilizar para la monta un señuelo, que bien puede ser una vaca, un maniquí, incluso un bovino macho, es necesario un proceso de entrenamiento de los sementales donantes, para recolectar semen de mayor calidad. Es importante cuidar aspectos de higiene y estímulo del semental para la correcta recolección, en este sentido se apoya con el método más efectivo para la estimulación del semental, para que este monte y desviar el pene tomando con la palma de la mano la piel del prepucio son tocar la mucosa del pene, colocando la vagina artificial sobre el pene siguiendo los movimientos del animal esperando el golpe de riñón para la eyaculación del semental (Figura 4).



Figura 4. Recolección de semen con vagina artificial.

El semen se colecta en tubos graduados falcón preferentemente, midiendo directamente el volumen total y el color del eyaculado, debe protegerse de los rayos directos de sol, para cuidar la integridad de los espermatozoides y analizar inmediatamente después, motilidad, vitalidad, morfología y concentración para ser diluido y criopreservado si fuera el caso (Arieta-Román *et al.*, 2014).

Ventajas y desventajas de la vagina artificial

La principal desventaja es que este método requiere de animales dóciles y entrenados para una recolecta de calidad.

La ventaja radica en que esta técnica responde al hecho de obtener eyaculados muy limpios y con baja contaminación cuando es realizada de manera correcta.

El bajo costo del equipo es otra de las ventajas que ofrece este método.

Se pueden hacer observaciones de libido sexual y excitación de los sementales seleccionados como donantes bajo esta metodología.

Método del Electroeyaculador

La técnica de electroeyaculación permite la obtención de semen de toros sanos que no aceptan la utilización de la vagina artificial como método de colección, debido a que para esto es necesario una capacitación previa del semental y de aquellos en se es imposible la realización de la monta, por problemas en las patas de los animales.

En este método de colecta de material espermático se utiliza un electroeyaculador, siendo este un electrodo en forma de bala que va conectado a una batería (Figura 5), la cual genera pulsaciones rítmicas de energía con carga no mayor a los 20 voltios y entre 0 y 1000 miliamperios (Brito y Reinoso, 2017).



Figura 5. Electroeyaculador

El electrodo es introducido por el recto, colocado sobre la ampolla y las glandulas visuales. El electrodo debe ajustarse contra el ano, para que de esta manera se aplique el estímulo eléctrico sobre los centros nerviosos que producen la erección y la eyaculación. Al inicio del estímulo la intensidad de los estímulos debe ser mínima, aumentando paulatinamente hasta que se produzca la eyaculación, cada onda de energía utilizada en el estímulo debe durar dos segundos, aplicando entre 5 y 10 estímulos por cada grado de intensidad (Galina y Valencia, 2009).

Es importante preparar al animal previo a la estimulación eléctrica, limpiando la zona peneana, recortando el vello prepucial y realizando un lavado prepucial con solución salina y antibiótico (gentamicina), para evitar contaminación del material espermático.

Ventajas

- No se necesita de vacas en celo o maniquí para que el animal monte.
- No es necesaria la voluntad del animal en el momento de la colecta seminal.
- Es muy útil en sementales que padecen de enfermedades que les impida la monta.

Desventajas

- Es considerado un método doloroso. Aplicado sin anestesia ha sido prohibido en el Reino Unido y varios países europeos.
- Es necesario que el técnico encargado de la práctica cuente con experiencia manejando y recolectando material espermático bajo esta metodología.
- El equipo necesario es más costoso que la vagina artificial.

7.2.1 Criopreservación de semen

La criopreservación de semen bovino es una de las biotecnologías de mayor importancia en el área de la reproducción bovina, buscando promover la conservación de germoplasma de machos con alto nivel genético, por tiempo indeterminado. Esta biotecnología se asocia principalmente a la inseminación artificial, representando un mecanismo eficiente para la promoción de material genético de alta calidad y el proceso se desarrolla bajo los siguientes pasos: colecta, evaluación del semen, cálculo del número de pajillas posibles, dilución del semen al volumen requerido y finalmente el proceso de criopreservación (Ribeiro-Peres *et al.*, 2014).

La función y la fertilidad espermática han sido estudiadas y descritas sobre los efectos de la criopreservación particularmente en bovinos. Bajo estos estándares de estudios se han desarrollado un gran número de protocolos de congelación, debido principalmente a las diferencias observadas entre especies, como respuesta a las tasas empleadas de congelación y descongelación. Por estas circunstancias, las técnicas y procedimientos actuales deben ser validados empleando el semen de las especies de interés, para de esta forma lograr su conservación a largo plazo sin afectar significativamente su capacidad fecundante (Medina-Robles *et al.*, 2007).

La colecta de semen puede ser mediante vagina artificial (VA), utilizada con animales que han sido adiestrados previamente para poder ser utilizada, o bien por Electroeyaculador, el cual se utiliza con animales sin adiestramiento y consiste en introducir un electrodo vía

rectal, para estimular las glándulas accesorias de aparato reproductor y de esta manera recolectar el semen eyaculado.

La evaluación del semen incluye la determinación del volumen, color, la motilidad (masal e individual progresiva) y la morfología. Con esta información se calcula el número de espermatozoides viables en la muestra. Después se divide este número por el número deseado por pajilla (generalmente de 20 millones) y se calculan el total de pajillas posibles con el semen obtenido. También se calcula el volumen de diluyente que se requiere para ese número de pajillas. El diluyente que se añade para congelación generalmente es del tipo TRIS (buffer), y debe contener sustancias iónicas o no iónicas que mantengan la osmolaridad del medio (TRIS), una fuente de lipoproteína de alto peso molecular (yema de huevo, leche descremada, lecitina de soya), una fuente de energía como fructosa o glucosa, y un crioprotector. Existen varios tipos de crioprotectores: Los que penetran la membrana como son el 1,2-Propanodiol (PROH), el Dimetilsulfóxido (DMSO), el Etilén-Glicol (EG) y el Glicerol; los que no penetran la membrana como, Sacarosa, Glucosa, Dextrosa, Polivinil-pirrolidona (PVP), Dextran, Polietilen-glicol (PEG). de estos el más utilizado para la criopreservación de semen bovino es el glicerol a una concentración final en el diluyente del 7% (Palmer *et al.*, 2005).

El semen diluido debe iniciar una curva de frío lenta para que éste llegue a 5 °C en un lapso no mayor de 4 h, durante este tiempo el crioprotector penetra las membranas del espermatozoide para protegerlo de los daños que se generan durante la criopreservación y la descongelación. Después de alcanzado el equilibrio, se congela el semen en vapores de nitrógeno líquido (-120°C) por un lapso de 20-30 minutos y luego se sumergen las pajillas en el nitrógeno para ser almacenadas (Palmer *et al.*, 2005).

La sobrevivencia espermática después de la crioconservación está ligada a la tasa de congelación y descongelación, y especialmente de la temperatura a la cual las células son enfriadas antes de ser sumergidas en nitrógeno líquido. Estudios previos (Medina-Robles *et al.*, 2007) han reportado que uno de los factores críticos para la sobrevivencia de las células después de la congelación, es evitar la formación de cristales de hielo intracelular, por medio de una deshidratación adecuada antes de su sumergimiento en

nitrógeno líquido, lo cual también está estrechamente relacionado con bajas tasas de enfriamiento que permite un mayor flujo de agua intracelular (Medina-Robles *et al.*, 2007).

7.2.2 Inseminación Artificial

La inseminación artificial (IA) puede definirse como la biotecnología para la aplicación de semen en el tracto genital de una hembra en el momento efectivo para la fecundación (Figura 6). Respecto al origen de la IA, existen historias indocumentadas de la obtención por los árabes de esperma a partir de yeguas servidas pertenecientes a grupos rivales, y su uso en la inseminación de sus propias yeguas. Un crecimiento fenomenal de la IA en bovinos lecheros, ocurrió en los años 40's en los Estados Unidos, cuyos procedimientos desarrollados fueron establecidos mundialmente. Desde entonces, la IA ha sido utilizada como el principal vehículo para dispersar rápidamente genes de valor dentro de la población, con el fin de mejorar la calidad genética de los hatos. El constante nivel de progreso genético en el ganado lechero en países desarrollados ha estado determinado, además de la selección, por el avance en la tecnología de la IA y su rápida aceptación para establecer genes de interés productivo en las poblaciones lecheras (Giraldo, 2007).

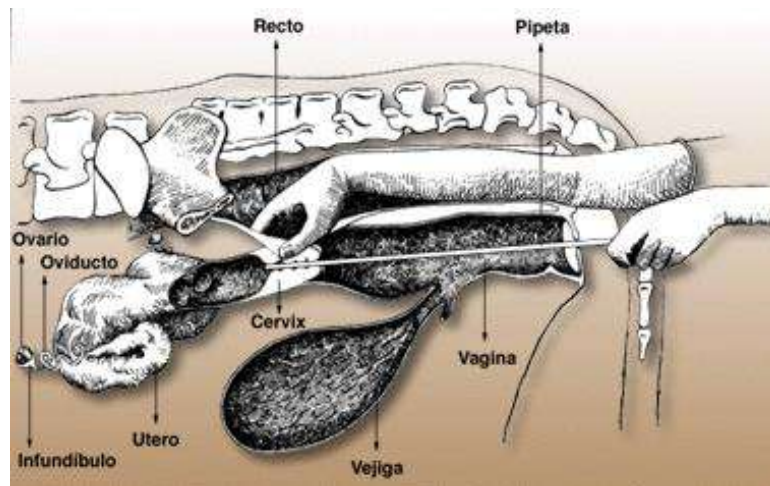


Figura 6. Esquematización de la IA en bovinos

7.2.3 Transferencia de embriones

Los productores de ganado en el mundo aprecian las ventajas de la IA, la implementación de esta tecnología en ranchos productores de leche es una opción de selección genética que ha resultado en un incremento en la producción de leche por animal. Aunque la IA es quizás la biotecnología más eficiente de acuerdo a su costo hasta el momento, la contribución genética materna permanece sin explotar. Por el contrario, cuando se aplica la transferencia de embriones, la parte materna tiene una considerable influencia sobre las tasas de respuesta genética. La implementación de esta tecnología permite acelerar la mejora genética con la contribución de ambos sexos. Además, los productores comerciales tanto de ganado productor de carne como de leche se pueden beneficiar con programas de transferencia de embriones bien diseñados, con criterios de selección apropiados a su medio ambiente y objetivos individuales (Colazo y Mapletoft, 2017).

La transferencia de embriones es una herramienta para el mejoramiento genético del ganado y tiene como objetivo incrementar la tasa reproductiva de las hembras de alto valor genético. La transferencia de embriones consiste en inducir un embrión (Figura 7) en etapa de preimplantación en el útero de la hembra denominada receptora, la cual se encargará de gestarlo y llevarlo al nacimiento, el embrión transferido puede ser fresco o congelado, esta técnica consiste en un tratamiento hormonal que se aplica a las hembras donadoras para inducir la maduración y ovulación de un gran número de óvulos (superovulación) (Palomino-Martorell, 2000).

La congelación de células embrionarias tiene por objeto interrumpir el metabolismo de forma reversible permitiendo de ese modo, su conservación durante un tiempo indefinido en estado sólido, manteniéndose la viabilidad del embrión después de la descongelación. La supervivencia depende esencialmente de las condiciones de cambio de fase del agua celular y de la eficacia de los crioprotectores. Con el uso de crioprotectores como el etilenglicol y el glicerol se podrán definir nuevas estrategias, tanto en la congelación de embriones como en el programa de transferencia de embriones en el ganado bovino (Colazo y Mapletoft, 2017).

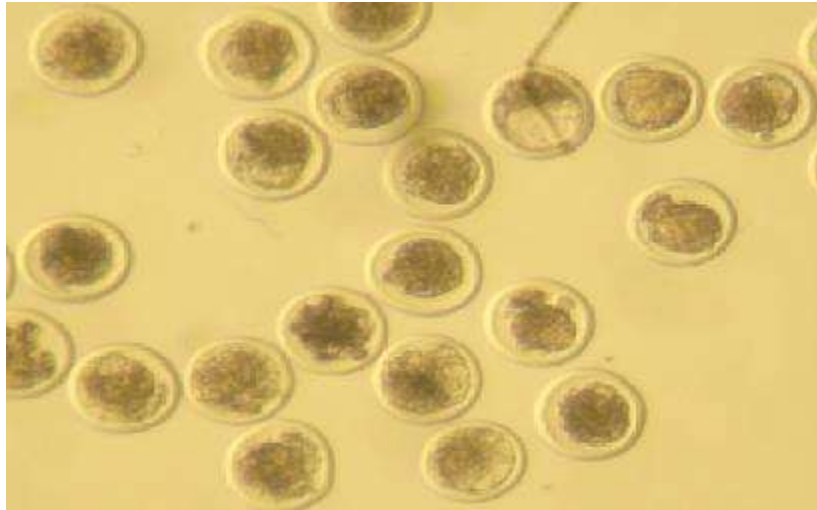


Figura 7. Embriones bovinos en diferente estadio de desarrollo.

7.3 Agentes infecciosos

7.3.1 Brucelosis bovina (*Brucella abortus*)

Agente etiológico

La brucelosis en bovinos es una enfermedad causada por *Brucella abortus*, (Figura 8) éste bacteria es un cocobacilo, aeróbico, Gram negativo, intracelular facultativo, no móviles, se conocen hasta 7 biovariedades de este microorganismo; en el área pecuaria las más importantes son *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*. El huésped de mayor importancia de *B. abortus* es el ganado bovino, con una distribución de carácter mundial, esta bacteria es una de las principales causas de abortos e infertilidad en ganado bovino durante la segunda mitad de la gestación, se suele transmitir por contacto con la placenta, el feto, los líquidos fetales, descargas vaginales, orina y semen de los animales infectados (Valera *et al.*, 2005).



Figura 8. *Brucella abortus*

En México, la brucelosis sigue siendo el principal problema zoonosario que aqueja la ganadería nacional, el problema de esta enfermedad es su identificación y la cuantificación de casos positivos. En la actualidad no existen datos disponibles sobre la prevalencia real en ganado bovino. La brucelosis está ampliamente distribuida teniendo mayor incidencia en la zona sureste y una menor proporción es reportada en la zona norte del país (Evangelista *et al.*, 2003).

Epidemiología

La brucelosis bovina es debida principalmente a la especie *Brucella abortus*, incluso otros animales mamíferos, entre ellos el hombre, corren el riesgo de ser susceptibles de contraer esta enfermedad e intervenir en la persistencia y la transmisión. *B. abortus* tiene 7 biovariedades reconocidas entre las cuales destacan 1, 2, 3, 4, y 9 siendo estas las más reportadas. La biovariedad 1 destaca con más frecuencia en América Latina. La brucelosis bovina se describe prácticamente en todos los países donde se explota el ganado bovino, pero algunos países del norte y del centro de Europa, Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda se consideran libres. En Europa, 12 países fueron declarados oficialmente libres de brucelosis bovina, ovina y caprina en el año 2012. Estados Unidos

tiene declarado a todos sus estados como libres de brucelosis bovina, persistiendo solamente en algunos casos de animales salvajes (Díaz-Aparicio, 2013).

Los rumiantes en general son susceptibles a *B. abortus*, lo cual tiene mayor relevancia donde se practican programas de erradicación como es el caso de México, la infección con esta bacteria se debe a la introducción de animales infectados, otro factor que influye en mayor medida en la diseminación de la enfermedad es el aborto de las vacas dentro de los establos o corrales (Díaz-Aparicio, 2013).

Prevalencia

La prevalencia como la incidencia de la brucelosis tiene distintas variaciones geográficas importantes. Las zonas de mayor prevalencia corresponden a la región del Mediterráneo, Asia occidental, algunas partes de África y América (México, Brasil, Perú, Argentina, Colombia y Estados Unidos), en donde la especie de mayor difusión es *B. melitensis*, seguida de *B. abortus*, siendo esta especie la que mayores problemas ocasiona en la ganadería bovina de México (Díaz-Aparicio, 2013).

Transmisión

La principal vía de entrada de la bacteria es la oral por la ingesta de alimentos o agua contaminada, por secreciones o restos de abortos de vacas infectadas, también se da contaminación a través de la monta natural o con la inseminación artificial, utilizando semen contaminado, adicionalmente se han reportado transmisiones a través de lamidos de las secreciones vaginales, los genitales, los fetos abortados e incluso los becerros recién nacidos de vacas infectadas. La leche es la vía natural de eliminación de *Brucella* en las vacas infectadas y es trascendental en la transmisión al becerro. De esta manera en los establos de la industria de la leche, como forma de contagio se debe tomar en cuenta el ordeño mecánico, debido a que se puede dar una contaminación a través del equipo utilizado para la ordeña (Díaz-Aparicio, 2013).

Patogénesis

Las especies de *Brucella* son patógenos intracelulares facultativas, propiedad que las mantiene protegidas de la acción de los antibióticos y de los mecanismos defensores provenientes de los anticuerpos, esto justifica la naturaleza crónica de la infección ya que son capaces de adherirse, penetrar y multiplicarse en distintas células eucariotas fagocíticas y no fagocíticas. Cuando estas bacterias penetran en el organismo pueden ser fagocitadas por los macrófagos y los polimorfonucleares (PMN) como parte de la inmunidad innata. Cuando no son eliminadas llegan directamente a los ganglios linfáticos invadiendo desde allí el torrente sanguíneo, donde son fagocitadas por los PMN y macrófagos circulantes, transportadas de esta manera a diferentes órganos donde pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de las vacuolas de los fagocitos. Los mecanismos de ingreso de la bacteria a las células no son lo suficientemente claros, pero se presume que las proteínas de membrana externa podrían participar en el proceso de ingreso, mediante receptores tipo manosa o integrinas. Las células placentarias son ricas en receptores de manosa y un factor de crecimiento conocido como eritrol, presente en tejidos placentarios animales, lo que explica la avidez de *Brucella* por estos sitios (Castro *et al.*, 2005).

Cuadro clínico

El cuadro clínico y la evolución de la infección varía en función de la especie animal afectada. En el caso específico de los mamíferos como los bovinos y en el ganado porcino la manifestación clínica es el aborto en hembras gestantes y la infertilidad de los machos (Figura 9). En el hombre presenta una gran tendencia a la cronicidad y se caracteriza por fiebre y localización de las bacterias en distintos tejidos como las articulaciones, sistema nervioso, endocardio incluso los huesos (Castro *et al.*, 2005).

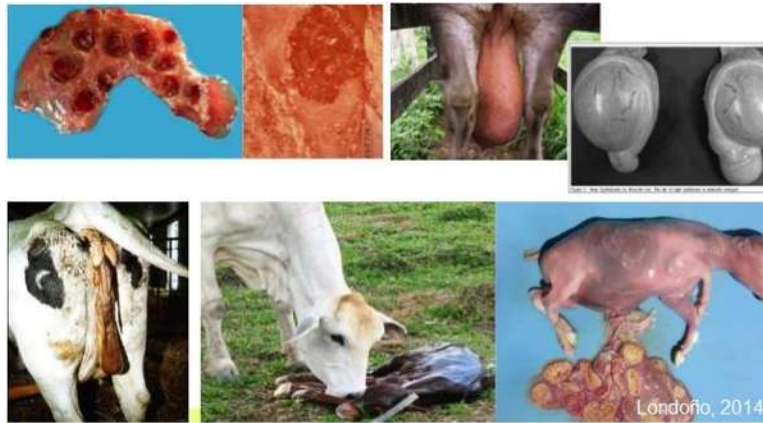


Figura 9. Signos clínicos de *Brucella abortus*

Diagnóstico

En la actualidad existen diferentes métodos de diagnóstico para la brucelosis bovina, el diagnóstico oficial se realiza por medio de pruebas serológicas, como la prueba de Rosa de Bengala al 8% como una prueba tamiz; la prueba de Rivanol y la prueba de fijación del complemento como pruebas confirmatorias, así como también la prueba de inmunodifusión radical (IDR), la cual permite distinguir entre animales infectados y los animales vacunados con la cepa lisa de *B. abortus* S 19; cabe mencionar que los animales vacunados con la cepa rugosa de *B. abortus* RB51 no son detectados por esta prueba. El aislamiento bacteriológico es la prueba confirmatoria; sin embargo, esta solo puede realizarse en laboratorios altamente especializados (Suarez *et al.*, 2012).

El diagnóstico de certeza es establecido aislando el microorganismo a partir de cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos. Los métodos serológicos solo aportan un diagnóstico presuntivo (Castro *et al.*, 2005).

Procedimiento de laboratorio

Métodos directos:

Se basan en la evidencia de la bacteria o de sus componentes propiamente en los tejidos de los animales, el diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de la bacteria,

frecuentemente a partir de hemocultivos. La técnica más utilizada es la de Ruiz de Castañeda (1961).

Para el estudio de presencia de antígenos de *Brucella* en distintos tejidos, se emplean métodos de ELISA, Inmunofluorescencia directa, hemaglutinación reversa y reacción en cadena de la polimerasa (Castro *et al.*, 2005).

Métodos indirectos:

Las dificultades mostradas en los distintos estudios sobre el aislamiento de *Brucella* a partir de los distintos tejidos hacen que los métodos de diagnóstico más utilizados sean los indirectos. Existen diferentes pruebas que están destinadas a detectar no solo a los individuos o animales infectados, sino que diferencian los infectados de los vacunados, así como también detectar las reacciones cruzadas. La mayoría de estas pruebas de laboratorio utilizan como antígenos suspensiones de *Brucella* en fase S o R, según la cepa bacteriana. Las células recomendadas en la elaboración de antígenos son *B. abortus* 1119-3 o 99S, estos antígenos permiten detectar anticuerpos anti *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*. Según Castro *et al.* (2005) las pruebas serológicas más utilizadas en el diagnóstico de *Brucella* son:

- Aglutinación lenta en tubos de Wright (SAT): es la más antigua y la más utilizada aún para el diagnóstico de brucelosis animal.
- Pruebas de aglutinación con y sin 2-mercaptoetanol (2-ME): es una variante de la anterior que emplea el tratamiento previo con 2-ME como agente reductor que inactiva los anticuerpos de clase IgM.
- Reacción de Huddleson: es una reacción rápida de aglutinación en placa.
- Prueba de Rosa de Bengala: es una prueba rápida en placa utilizada como tamiz.
- Antígeno Tamponado en Placa (BPA): es otra de las pruebas tamices que se realizan en placa.
- Prueba de Coombs: prueba de aglutinación en tubo que permite detectar tanto anticuerpos completos como incompletos.
- Fijación de complemento: prueba altamente específica y es la prueba de referencia internacional.

- Inmunofluorescencia indirecta: es una prueba de interacción primaria.
- ELISA: es una técnica muy sensible, específica y versátil, emplea pequeñas cantidades de suero, dando resultados buenos aun en presencia de hemólisis.
- Polarización de fluorescencia (FPA): técnica que puede realizarse en sangre entera y leche.
- Prueba de inmunodifusión en agar (IDAG): técnica de doble difusión en geles.
- Los métodos sugeridos por la Organización Mundial de la Salud Animal para el estudio de brucelosis en los bovinos son: BPA, Rosa de Bengala, Fijación de complemento, y ELISA (Castro *et al.*, 2005).

Prevención y control

La vacunación tiene que ser considerada como una herramienta importante para evitar la transmisión de la brucelosis entre los animales. En México la vacuna RB51 y la cepa 19 son consideradas en la norma para su uso en la prevención de la enfermedad en bovinos. Sin embargo, el uso solamente de vacunas no es suficiente para el control de la enfermedad, sobretodo en lugares donde la prevalencia a brucelosis es muy alta. El control de la brucelosis requiere de medidas de bioseguridad adicionales como son el monitoreo serológico continuo, con la finalidad de ser oportuno en la identificación de animales que comienzan con la enfermedad y evitar de esta manera que contagie a otros animales sanos. Es de suma importancia considerar el diagnóstico a los animales destinados al remplazo bovino antes de ser introducido a los establos o corrales y cuarentena a los mismos para desarrollar un control eficiente (Suarez *et al.*, 2012).

7.3.2 Tuberculosis bovina (*Mycobacterium tuberculosis*)

Agente etiológico

La tuberculosis en los bovinos es una enfermedad bacteriana infecciosa-contagiosa en rumiantes causada por *Mycobacterium bovis*, esta especie pertenece al género *Mycobacterium* y se caracteriza por ser un bacilo Gram positivo y ácido resistente (Figura

10). Uno de los grandes grupos de este género es el complejo *Mycobacterium tuberculosis* al cual pertenecen *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. microti* y *M. africanum*. Todas estas especies son patógenas y agentes etiológicos de tuberculosis en mamíferos. En general esta especie bacteriana afecta al pulmón, pero puede alojarse y afectar cualquier órgano del bovino (De Ward, 2005).

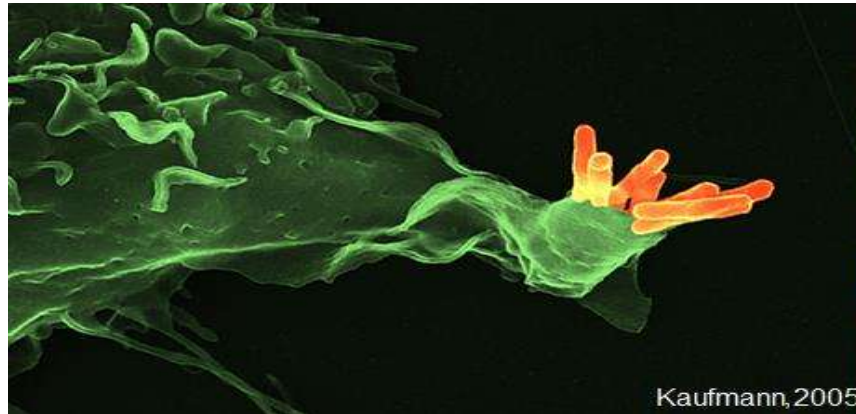


Figura 10. *Mycobacterium bovis* (color naranja)

Epidemiología

En América Latina y el Caribe existe una población bovina de alrededor de 300 millones de cabezas de ganado, 80 millones de estos animales se localizan en países donde la tasa de infección por *M. bovis* va de muy baja a nula. Los restantes 220 millones se encuentran en países con una moderada a alta prevalencia o simplemente no hay información reciente disponible. Argentina y Brasil, tienen poblaciones de ganado con prevalencias estimadas superiores al 1% y en conjunto llegan a albergar 3,500,000 bovinos infectados. Las infecciones tuberculosas en bovinos existen en la mayor parte de los países de América Latina y el Caribe, con variables importantes especialmente en el ganado dedicado a la industria lechera; cabe resaltar que en todos estos países existen campañas de control y vigilancia (Rivera y Giménez, 2010).

Mycobacterium bovis tienen un rango muy amplio de hospederos, tradicionalmente las investigaciones han estado centradas en las contaminaciones del ganado productivo

como los bovinos, ovinos y caprinos y el ser humano por ser una bacteria con características zoonóticas. La epidemiología de la infección por *M. bovis* es descrita por dos de sus hospederos: los de manutención y los incidentales. Siendo los primeros capaces de infectar, enfermar y diseminar la bacteria a otros individuos susceptibles, permitiendo de esta manera el arraigo de la infección en sus poblaciones. Los hospederos incidentales son capaces de infectarse y cursar con la enfermedad, pero la diseminación a otros individuos es infrecuente, estos requieren de una fuente externa de infección para mantener la enfermedad en la población, el ser humano se encuentra en este grupo. Del total de especies susceptibles a *M. bovis* solo unas cuantas corresponden a hospederos de manutención y la gran mayoría se clasifican como hospederos incidentales, en estos últimos su infección es probablemente una consecuencia de los sistemas de manejo y de la oportunidad que estos sistemas ofrecen para una transmisión más eficiente del patógeno. Los factores de riesgo con esta enfermedad están más asociados a las explotaciones lecheras que a los hatos productores de carne, debido a las condiciones intensivas de manejo y las mayores exigencias productivas sobre los animales (Abalos y Retamal, 2004).

Prevalencia

En México se cuenta con una campaña de control y erradicación y en el año 2012, el 82% del territorio nacional tenía una prevalencia menor de 0.5% de tuberculosis bovina. Existen mejoras en el control de esta enfermedad, en el año 2008 se tenía un 69.84% del territorio nacional reconocido con baja prevalencia y en el año 2011 se alcanzó el 83.12% del territorio nacional en fase de erradicación (SAGARPA, 2012).

Transmisión

La principal vía de ingreso de la infección con esta bacteria es mediante la introducción de animales en este caso bovinos enfermos o portadores de la enfermedad bacteriana. Debido a que el sistema respiratorio es la principal ruta por la cual ocurre y se disemina

la infección, el contacto directo de nariz con nariz y el uso compartido de bebederos y comederos son factores de gran riesgo que aumentan proporcionalmente con el tamaño del hato y la concentración de los animales. Todos los bovinos infectados son una potencial fuente de diseminación de la enfermedad; la importancia de la vía aérea en la transmisión se explica por la baja dosis infectiva que requiere *M. bovis* en el tejido pulmonar, con la posibilidad de que una sola bacteria sea la causante de una infección efectiva en el bovino a través de esta ruta (Abalos y Retamal, 2004).

Patogénesis

Dentro de la patogenia de la tuberculosis, se tiene que diferenciar si se trata de una primera infección, donde la bacteria toma contacto por primera vez con un organismo, o bien de un fenómeno postprimario, en la cual ha existido un contacto previo y por tanto el animal presenta inmunidad. En el proceso primario, la penetración se realiza de forma prioritaria por vía aérea, transportada por micropartículas o aerosoles. La vía oral, aunque es menos importante, también es una vía de entrada del microorganismo, queda restringida de forma casi exclusiva a terneros lactantes. Las micobacterias son fagocitadas por los macrófagos que se encuentran en la superficie de las mucosas respiratorias o digestivas, siendo incapaces de lisarlas en la mayoría de las ocasiones. En la zona de penetración del agente patógeno se producirá una lesión muy simple consistente en una pequeña zona necrótica, que alberga bacilos vivos y muertos, rodeada de una capa de macrófagos. A partir de esta localización primaria, las micobacterias son drenadas hasta los ganglios linfáticos regionales donde desarrollarán lesiones análogas, transcurridos entre 10-15 días desde el comienzo del proceso, se desarrollará un fenómeno de inmunidad mediada por células que desencadenan importantes transformaciones tanto morfológicas como funcionales en los macrófagos (Pérez *et al.*, 1992).

Cuadro Clínico

La tuberculosis bovina es un proceso con gran variabilidad de cuadros clínicos. En el 90% de los bovinos la infección comienza en los pulmones, donde se localiza el foco primario que pasará por distintos estadios, hasta invadir todos los órganos. De esta manera las lesiones por tuberculosis se observan en intestino, hígado, estómago, bazo, órganos genitales, sistema nervioso central, piel, huesos y músculo. La sintomatología varía según el órgano donde predomine la infección. De esta forma el cuadro clínico puede cambiar de un animal a otro, pero en general aparece una fiebre fluctuante, infarto ganglionar regional; sin dejar pasar el punto de vista médico y económico. La tuberculosis uterina y mamaria producen pérdidas por abortos, reabsorciones embrionarias, infertilidad y disminución de la secreción láctea (Galván *et al.*, 1992).

Diagnóstico

Clínico

La tuberculosis suele ser difícil de diagnosticar basándose solamente en los signos clínicos, en países desarrollados pocas infecciones presentan síntomas, la mayoría se diagnostica mediante análisis o se detecta en frigoríficos.

Diagnóstico diferencial

Este tipo de diagnóstico incluye pleuroneumonía contagiosa bovina, neumonía por *Pasteurella* o *Corynebacterium pyogenes*, neumonía por aspiración, pericarditis traumática, linfadenitis caseosa o melioidosis en rumiantes pequeños e infección crónica atípica por fasciola hepática (De Ward, 2005).

Análisis de laboratorio

En el ganado bovino vivo la tuberculosis se diagnostica generalmente con la prueba de campo de la tuberculina; esta se inyecta por vía intradérmica, siendo positiva cuando se

produce una reacción de hipersensibilidad retardada o inflamación (Figura 11). La prueba se puede realizar utilizando tuberculina bovina solamente, o como prueba comparativa para distinguir reacciones de *M. bovis*, de reacciones por mico bacterias ambientales (De Ward, 2005).



Figura 11. Bovino positivó a la prueba de tuberculina

Prevención y control

En general no se realiza en la actualidad ningún tratamiento en animales infectados por no ser redituable, la tuberculosis necesita un tratamiento con 3 o 4 drogas diferentes por un periodo de seis meses lo cual genera un costo considerable. Todavía no hay una vacuna eficiente para prevenir la tuberculosis bovina. La estrategia básica para el control y la eliminación de la tuberculina bovina es la tuberculización del ganado y el sacrificio de los animales positivos. Las medidas preventivas involucran un control efectivo de movimiento de los animales. Cuando se introducen animales nuevos en las unidades de producción, estos deben tener una prueba de tuberculina reciente para descartar que no esté infectado (De Ward, 2005).

7.3.3 Campilobacteriosis bovina (*Campylobacter fetus*)

Agente etiológico

La campilobacteriosis bovina es una de las enfermedades asociadas a la infertilidad, repetición de celos y abortos ocasionales. Es de transmisión venérea y afecta a todo tipo de ganado tanto productor de leche como de carne. El agente etiológico es *Campylobacter fetus* (Figura 12), siendo una bacteria móvil, bacilo Gram negativo en forma de S. Existen dos subespecies, *C. fetus* subsp *venerealis* y *C. fetus* subsp *fetus*, siendo esta última la de mayor importancia en el ganado bovino (Repiso *et al.*, 2005).



Figura 12. *Campylobacter fetus*.

Epidemiología

Esta bacteria es de distribución mundial, con afinidad para desarrollarse en el tracto entérico de los animales: mamíferos, aves, reptiles e incluso insectos, siendo estos últimos considerados como vectores mecánicos. Diversos estudios demuestran que la

campilobacteriosis se considera integrante de los microorganismos intestinales normales de los animales. Si bien existe un número variado de especies del género *Campylobacter* que habitan tanto el aparato digestivo como el genital, también se conocen enfermedades *específicas* relacionadas a esta bacteria con importancia en la producción animal (Chiaparrone *et al.*, 2016).

Prevalencia

En el estudio realizado por Tous *et al.* (2007) se describe que no existen investigaciones que determinen la prevalencia precisa de microorganismos como *Campylobacter* que tienen importancia como agentes asociados a las afecciones reproductivas en bovinos. El mismo autor determina con su investigación que aproximadamente el 15% de los hatos de zonas lecheras pueden considerarse afectados por *Campylobacter*, y lo corrobora en su investigación, el cual durante el estudio presentó una prevalencia del 1.8%; este último dato adquiere vital importancia teniendo en cuenta que *Campylobacter* produce pérdidas de 15 a 25% de las crías durante la gestación (Tous *et al.*, 2007).

Transmisión

El agente se transmite de forma venérea a través de la monta directa o el semen contaminado, esto debido a que el agente se encuentra en la mucosa del prepucio. En raros casos, pero con posibilidades altas suele transmitirse por la ingestión de material en contacto con fetos abortados, anexos y placenta. Otra vía de transmisión y no menos importante es la vía láctea, las hembras enfermas pueden excretar por esta vía la bacteria y ser una fuente de transmisión importante sobre todo en los hatos productores de leche, cuando no se tiene las medidas de higiene y prevención adecuada (Moreno *et al.*, 2014).

Patogénesis

El mecanismo principal de patogenicidad es la invasión de la mucosa intestinal, esta bacteria habita las criptas prepuciales del toro y en la hembra la mucosa del útero, cérvix y vagina; en las hembras la infertilidad está relacionada con la restricción de oxígeno que provoca el ingreso de *C. fetus* en el útero, la acción de las mucinas que despolimeriza el moco vaginal y por la endometritis mucopurulenta subaguda (Bove *et al.*, 2015).

Cuadro Clínico

La principal manifestación clínica de la campilobacteriosis bovina es la infertilidad, repetición de celos, ciclo estral largo, bajos porcentaje de gestación, mortalidad embrionaria y abortos en las hembras bovinas (Figura 13), caso muy diferente al semental bovino que se presenta como portador sano de esta enfermedad y su capacidad reproductiva no se ve afectada. *Campylobacter fetus* tiene preferencia por alojarse en las criptas prepuciales del toro; estas aumentan en número y medida con la edad del semental, por lo cual, los sementales más viejos tienen un rol importante en la transmisión de la enfermedad (Moreno *et al.*, 2014).



Figura 13. Fetos abortados a causa de *C. fetus*.

Diagnóstico

Se puede realizar en machos como en hembras, en los fetos y a través del semen fresco o congelado, para realizar el diagnóstico se utiliza la técnica de Inmunofluorescencia directa (IFD) como método de “screening”, también se utiliza el método de aislamiento por cultivo de *C. fetus*. Los materiales de elección para hacer el diagnóstico es el raspado prepucial, *mucus* vaginal, pulmón y cuajo de fetos, así como también es utilizado con frecuencia semen fresco o congelado. La desventaja de la técnica IFD es no diferenciar las subespecies de la campilobacteriosis (Repiso *et al.*, 2005).

Prevención y Control

La implementación adecuada de programas de inseminación artificial, con semen libre de patógenos, evita la entrada de la enfermedad y controla los brotes (Fort *et al.*, 2003). Es recomendable cuarentenar y muestrear a los toros que vayan a ser usados por primera vez para el servicio, así como a los animales recién llegados a la explotación. En el caso de las vacas, se recomienda la eliminación de las que presenten trastornos o anormalidades en el tracto genital y en el caso de aquellas expuestas, indicar reposo sexual durante tres meses. Es recomendable muestrear dos veces al año los toros usados para la monta y una vez al año el semen usado para inseminación (Rossanigo, 1998).

El uso de la bacterina es recomendado sobre todo en los casos donde no se use la inseminación artificial; la vacuna provee una inmunidad de un año aproximadamente.

En el caso de animales crónicamente afectados, la bacterina permite eliminar la colonización del tracto genital, en este caso se recomienda al mismo tiempo el uso de antibioterapia (Fort *et al.*, 2003).

Con el objetivo de mantener el rebaño libre de campilobacteriosis se recomendaba vacunar a las hembras entre tres y cuatro meses antes de la temporada de monta, pero estudios recientes muestran que, haciéndolo 10 días antes, se logra aumentar en un 95% la tasa de preñez. Algunos autores no recomiendan el uso de la vacuna en toros; sin

embargo, otros estudios sugieren que la vacuna provee protección de la colonización en machos, así como la recuperación rápida de toros infectados, por lo que se sugiere el uso de la vacuna (Fort *et al.*, 2003).

7.4 Principales métodos de diagnóstico bacteriano

7.4.1 Métodos Indirectos

En este tipo de métodos es necesario la demostración de la huella que el agente patógeno ha dejado en su contacto con el sistema inmune del animal afectado.

Pruebas de microaglutinación (MAT)

Esta técnica de aglutinación microscópica se fundamenta en la confrontación del antígeno con el suero problema. Inicia con una dilución del suero de 1/50, con sucesivas diluciones geométricas (1/100, 1/200, 1/400, etc.) se establece el grado de aglutinación mediante la observación con la ayuda de un microscopio de campo oscuro, luego de un periodo de incubación de dos horas a temperatura ambiente (OMS, 2008).

Pruebas bioquímicas

Estas son pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y con lectura inmediata como la catalasa y oxidasa; también existen otras pruebas rápidas, con lectura en menos de 6 h tal y como la hidrólisis del hipurato, la β -galactosidasa (ONPG), las aminopeptidasas, la ureasa y el indol; también existen pruebas basadas en caracteres de resistencia a ciertas sustancias tal y como optoquina, bacitracina, solubilidad en bilis y crecimiento en caldo hipersalino.

En el mercado existen numerosos sistemas o equipos multipuebas con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias, todas exigen condiciones muy precisas de concentración del inóculo, de inoculación, de incubación y de lectura, que si no son tomados en cuenta pueden dar lugar a importantes errores (Bou *et al.*, 2011).

Prueba de Ensayos por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costos del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra. Se usa en muchos laboratorios para determinar si un anticuerpo particular está presente en la muestra de sangre de un animal infectado. aunque el procedimiento es rutinario y sencillo, involucra a un gran número de variables, tales como selección de reactivo, temperatura, medición de volumen y tiempo, que, si no se ajustan correctamente, puede afectar los pasos sucesivos y el resultado de la prueba (Gottschalk y Taylor, 2006).

7.4.2 Métodos directos

Son aquellos que detectan al microorganismo por microscopia, o por cultivo y los ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa.

Cultivo bacteriológico

Este método continúa siendo el método de diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos.

Se denomina cultivo al proceso de propagar los microorganismos, proporcionándoles las condiciones ambientales adecuadas. Los microorganismos en fase de crecimiento realizan réplicas de sí mismos y requieren de los elementos que se encuentren en su composición química. Se les debe brindar los elementos nutritivos en forma accesible desde el punto de vista metabólico, además de que requieren los microorganismos que son cultivados requieren de energía metabólica con el objetivo de sintetizar macromoléculas y conservar los gradientes químicos esenciales a través de sus membranas. En este método es esencial la correcta elección del material y equipo necesario (Figura 14), así como del medio de crecimiento y las condiciones de incubación (atmósfera, temperatura y nutrición) (Junco y Rodríguez, 2001; Bou *et al.*, 2011).



Figura 14. Material para cultivo microbiano

Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanca es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima DNA polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una de las técnicas de la biología molecular cuyo fin es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de una pequeña parte de este (Figura 15); en teoría es necesario partir de una sola copia del fragmento de DNA original o molde, para obtener suficiente material genético que permita una identificación microbiológica certera (Herazo, 2013).

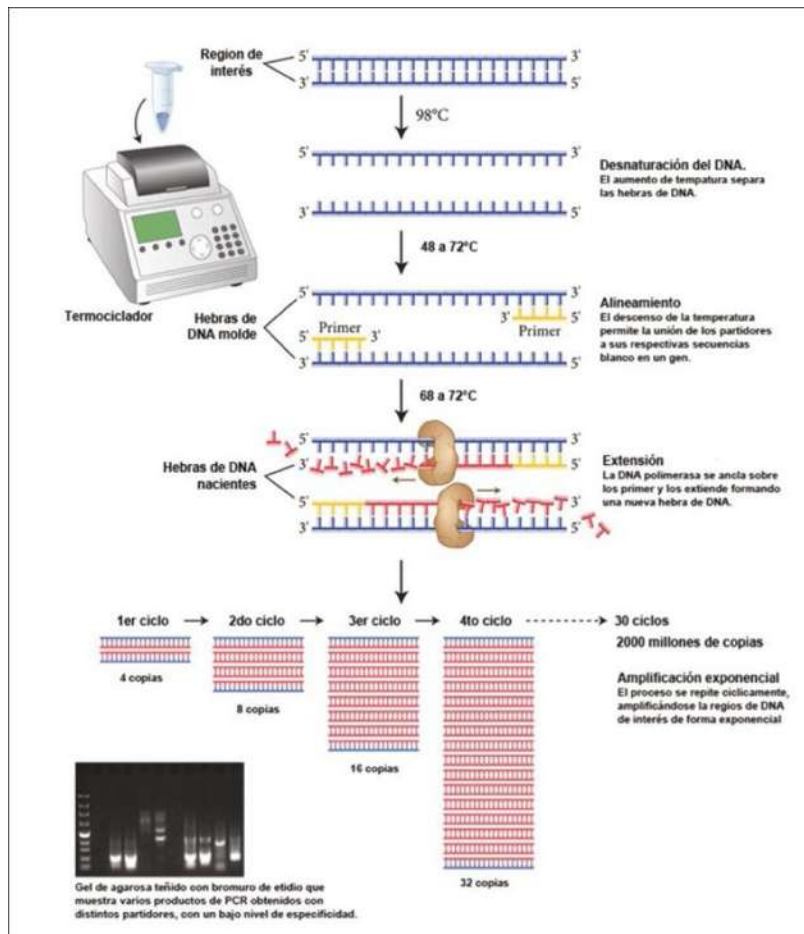


Figura 15. Reacción en cadena de la polimerasa

Esta técnica se fundamenta en la propiedad que tienen las DNA polimerasas para replicar las hebras de DNA, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternas para separar las hebras de ADN recién formadas, entre si, tras cada fase de replicación y a continuación, dejar que las polimerasas vuelvan a unirse a los segmentos de ADN para que vuelvan a duplicarse (Siquira y Roca, 2003).

En la actualidad todo el proceso es automatizado con el empleo de un equipo llamado termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción a la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción, basándose en la aplicación del efecto peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos de reacción simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos empleados en la técnica de PCR son de una capa muy delgada lo cual permite que exista una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico (Herazo, 2013).

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{+}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O . Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión; todo este último proceso se realiza en el termociclador. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real (qPCR)

En la actualidad esta técnica es la más sensible para la detección de ácidos nucleicos (DNA y RNA), La qPCR permite detectar DNA a partir de pequeñas cantidades, amplificadas hasta más de un billón de veces. Esta técnica combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes

como alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior.

Para la amplificación por PCR en tiempo real además de los reactivos que se emplean en la PCR punto final, es necesario emplear unas sondas o fluoróforos; este hace que aumente la fluorescencia conforme el producto se amplifica, se combinan los procesos de amplificación y detección en una sola etapa. Los equipos para llevar a cabo la PCR en tiempo real incluyen un termociclador y una unidad capaz de detectar señales fluorescentes (fluorómetro) para monitorear el progreso de la reacción de amplificación, así como un Hardware y un Software para la captura y el análisis de los datos respectivamente. El termociclador del equipo debe ser capaz de mantener una temperatura uniforme para todas las muestras y ser lo suficientemente rápido en la transición de temperaturas de una etapa a otra (desnaturalización del ADN molde, alineamiento de los oligonucleótidos y síntesis). El sistema fluorométrico consiste en una fuente de energía para excitar a los fluoróforos (a una determinada longitud de onda de excitación) y un sistema de detección, que permita monitorear la señal emitida a una longitud de onda de emisión (Aguilera *et al.*, 2014).

El monitoreo continuo de la acumulación del producto amplificado durante una qPCR, se basa en la detección y cuantificación de la fluorescencia de una molécula reportera (sonda), medida a lo largo de los ciclos (Figura 16).

Existen distintos tipos de sondas para la qPCR, estos pueden ser reversibles (se pueden unir al ADN más de una vez) o pueden ser irreversibles (una vez unidas al ADN son hidrolizadas). Las sondas más conocidas son:

Sonda SybrGreen

- Se une a cualquier DNA de doble hebra (dsDNA), por lo que es una sonda reversible.
- Su fluorescencia se incrementa unas 1000 veces cuando está unido al dsDNA.
- Ventajas: Simple, rápida optimización, bajo costo.
- Desventajas: Inespecificidad, mayor ruido, no se puede hacer una PCR multiplex en un mismo tubo de reacción.

Sonda TaqMan

- Específica para la secuencia target, tiene un reportero fluorescente en el extremo 5' y un quencher (apagador) en el extremo 3', cuando el reportero se libera exhibe fluorescencia, esta señal es proporcional a la cantidad de producto amplificado; para poder liberar al reportero es necesario la hidrólisis de la sonda, por lo que es del tipo irreversible
- Ventajas: Alta especificidad, se puede realizar PCR multiplex.
- Desventajas: costo y optimización.

La técnica de PCR en tiempo real usualmente se utiliza para cuantificación. Los tipos de cuantificación que se puede realizar con este método son los siguientes:

- Cuantificación absoluta: en base a estándares.
- Cuantificación relativa: en base a la cuantificación por estándares de un gen de referencia.

Una curva típica de PCR en tiempo real debe tener las siguientes partes:

- Línea base (Background): son los niveles de señal de fluorescencia durante los primeros ciclos (lo que se conoce como ruido, no pasa el umbral).
- Ct (threshold cycle): es el primer incremento significativo en la cantidad de producto de PCR, medido por el aumento de fluorescencia. No significa que no exista fluorescencia antes, solo que no es detectada por el termociclador.
- Fase logarítmica: incremento exponencial del producto de PCR.
- Meceta: Tope de la amplificación

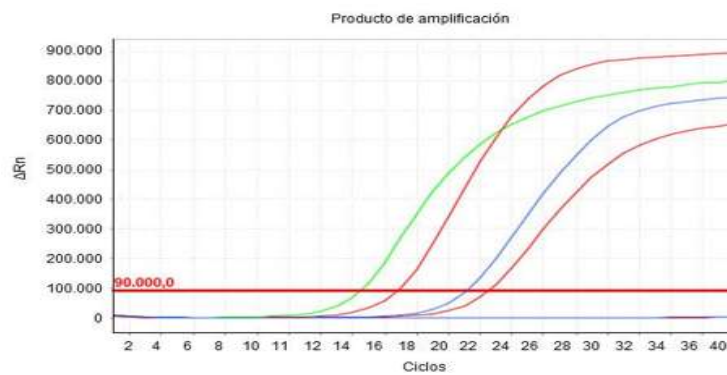


Figura 16. Producto de amplificación de qPCR.

La base del éxito de las técnicas moleculares de detección bacteriana (PCR punto final y qPCR), se basa en el desarrollo de los iniciadores (primers), estos delimitan la zona de DNA a amplificar y al reconocerlos, la enzima permite iniciar la reacción. Estos indicadores son secuencias cortas (18 a 30 nucleótidos) y contienen una Guanina (G) o Citosina (C) en el extremo 3', el contenido de G/C la composición base de los iniciadores debe ser entre 45 y 55% de G/C. La especificidad de los iniciadores depende en gran medida a su longitud, deben ser diseñados o elegidos de tal forma que tengan una secuencia única dentro del DNA que será amplificado, un iniciador diseñado con una secuencia altamente repetida dará lugar a productos no deseados (Cortazar *et al.*, 2004).

Altas concentraciones de iniciadores pueden provocar acumulación de productos no específicos y aumenta el riesgo de generar un dímero. Los dímeros son sustratos para PCR y compiten con el producto deseado por la enzima, dNTPs e iniciadores dando como resultado un bajo rendimiento del producto deseado (Cortazar *et al.*, 2004).

Los iniciadores deben tener todas las características mencionadas y una temperatura de fusión (Tm) similar (Cuadro 1), estos son diseñados para ser complementarios al molde de DNA, y es recomendable que los iniciadores carezcan de estructuras secundarias o dímeros y que no exista complementariedad entre sí (Rodríguez y Barrera, 2004).

Cuadro 1. Características de un iniciador

Tamaño	Ideal: 20-25 nucleótidos de longitud General: 18-30 nucleótidos de longitud
Base en el extremo 3'	Una G o una C
Temperatura de fusión TM	50-65°C
Contenido de GC	40-60%
Auto-complementariedad	Debe ser evitada para no correr el riesgo de formación de estructuras secundarias y los dímeros.
Similaridad	100% de apareamiento con el molde

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Área de estudio y trabajo experimental

El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos, del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG; Figura 17), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), la Ciudad de Tepatlán de Morelos, Jalisco, México.



Figura 17. Centro Nacional de Recursos Genéticos

8.2 Procesamiento y suministro de semen bovino

Se recolectaron muestras de semen bovino en la región Centro Occidente del Pacífico de México (Aguascalientes, Jalisco y Nayarit) de 100 sementales bovinos (*Bos taurus* X *Bos indicus*), sexualmente maduros. La colecta de semen se realizó en tubos falcón estériles graduados con capacidad de 15 ml (Figura 18), mediante estimulación con electroeyaculador, (The Pulsator IV auto adjust) (Figura 19), previamente, se realizó un lavado prepucial a base de solución salina fisiológica y gentamicina (200 µg/mL).



Figura 18. Recolección de semen en tubos falcón.



Figura 19. Electroeyaculador (Pulsator IV auto adjust).

El semen se analizó macroscópicamente, su apariencia (color) y el volumen total se midió directamente en el tubo graduado. La cantidad total del eyaculado se diluyó 1:1 (V:V) con

diferentes crioprotectores elaborados a base de una fuente lipoproteica no penetrante de membrana (lecitina de soya, leche, yema de huevo), glucosa como fuente energética, glicerol como crioprotector penetrante de membrana, TRIS (buffer) para mantener la osmolaridad, dejando también una parte control sin diluyente.

Previo al empajillado se realizó un análisis microscópico para evaluar la motilidad total y progresiva, morfología, vitalidad y concentración. Una vez tenidos estos datos se envasó el semen manualmente en pajillas francesas de 0.25 mL con el uso un peine de llenado con capacidad de 20 pajillas, ajustando la carga de espermatozoides a 20 millones por pajilla, para lo cual se usó la siguiente formula:

$$\frac{\text{Concentración X Volumen X Motilidad X Vitalidad X Morfologia}}{\text{Concentración final de la dosis}}$$

Cada pajilla se selló con calor (selladora de bolsa plástica PFS-300 Impulser Sealer) y se empaquetaron en los gobelets identificados con el nombre del semental y el tipo de diluyente (Figura 20).



Figura 20. Identificación de gobelets.

El proceso de congelación se inició con el enfriamiento de las pajillas sometiéndolas a 5 °C durante 4 h, posteriormente se preparó una hielera térmica de unicel con nitrógeno líquido y para continuar con el proceso de congelación, se colocó dentro de esta hielera una balsa de unicel de 5 cm de ancho y sobre esta se colocaron los gobelet con las pajillas, se tapó la caja y se comenzó con el proceso de congelación lenta con vapores de nitrógeno, dejandó pasar en este punto 30 min. Transcurrido el tiempo, los gobelets se introdujeron en la hielera con el nitrógeno líquido para terminar con el proceso de congelación.

Las muestras de semen congeladas fueron colocadas dentro de un termo criogénico utilizado exclusivamente para conservar material seminal a -196 °C utilizandó nitrógeno líquido, de esta manera se asegura una temperatura constante.

La evaluación poscongelación (Figura 21) se realizó por medio de un sistema CASA SCA® (Computer Assisted Semen Assay V SCA 5.4) se obtuvo el espermiograma básico (motilidad, concentración, vitalidad y morfología). La motilidad y concentración se evaluó en una cámara Makler® con el módulo de concentración y motilidad del equipo SCA. La vitalidad se realizó por medio de microscopia de fluorescencia, con los Fluorocromos Hoescht 33342 y yoduro de propidio, para vivos y muertos, respectivamente, en el módulo de vitalidad del equipo SCA. Se evaluó la morfología por la tinción SpermBlue® en el módulo de morfología en el SCA.

Se registraron las variables de respuesta bajo el esquema de concentración total, motilidad progresiva, vitalidad, anormalidades primarias y anormalidades secundarias.



Figura 21. Sistema CASA SCA®.

8.3 Diseño de iniciadores (Primers)

Con la finalidad de establecer los blancos moleculares más empleados en la detección de *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus* y *Mycobacterium tuberculosis* se realizó una revisión de literatura dentro de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

La selección de los blancos moleculares se realizó de acuerdo a funciones diversas en el metabolismo de cada uno de los géneros y especies que conforman el grupo patógeno de interés. Los blancos corresponden a un gen (housekeeping) el cual será la referencia de expresión genética basal del patógeno y el siguiente blanco será un gen reconocido como factor de virulencia o que esté asociado a una ruta biosintética de componentes celulares esenciales de los patógenos.

Se construyó una minería de secuencias de referencia en formato FASTA de los blancos moleculares para el diseño en los extremos de los genes a seleccionar con base a los datos de NCBI y GenBank.

Se tomaron las secuencias reportadas dentro de la base de datos de genes del NCBI para los genes seleccionados de *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus* y *Campylobacter fetus*, los números de acceso se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Secuencias seleccionadas

Bacteria	Gen	No. De acceso GenBank
<i>Brucella abortus</i>	<i>virB3</i>	CP023309, CP023214, CP007788, CP002932, CP000709, CP008756, CP019346, CP006897
	<i>wbkA</i>	CP008774, CP016981, CP001578, CP017012, CP000708, CP022875,

		CP023239, CP007743, CP023974, CP023213
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>gltx1</i>	CP006992, M650111, L146331, CP0068331
	16S rRNA	CP0068331, CP0109531, CP0145681, CP0069992, CP0004871, CP0088081, CP0155751, CP0155761, CP0155771
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>kasB</i>	JN0346091, LT708304, CP016402, CP016972, CP014566, CP010333, CP003234, F0203507, HE572590, CP010334
	16S rRNA	F0203507, HE572590, NR028879, AJ1311201, CP010333, NR0252341, AM412059, CP0120901, CP01577321, CP010334, FR878060, F0203510, CP0007171, CP014617, CP016401, CP022017, AP010918, GU142929, AF410479, CP000479

Se hizo un alineamiento de las secuencias en lo cual se utilizó la herramienta ClustalW (Chenna *et al.*, 2003) del software BioEdit®. De acuerdo con los reportes de Sharrocks y Shaw en 1991 se buscaron en las secuencias regiones consenso de 16 a 25 pb (Chenna *et al.*, 2003). Una vez localizada las regiones consenso, se realizó el diseño de iniciadores para la obtención de los genes seleccionados para cada bacteria patógenas (Cuadro3).

La eficiencia de los iniciadores fue analizada de forma virtual, para lo cual fue utilizado el Primer BLAST, el cual emplea el software Primer 3 para diseñar iniciadores y después

los analiza en BLAST para evitar la formación de dímeros de iniciadores, así como hibridaciones inespecíficas. Alternamente, los iniciadores fueron analizados mediante la herramienta bioinformática OLigoanalyzer 3.1, se verificó el contenido de G-C, formación de dímeros y la determinación de su T_m, esto con el fin de obtener iniciadores óptimos. Finalmente, los iniciadores se enviaron a sintetizar a la empresa comercial T4 Oligo® (Irapuato, México), cada oligo sintetizado corresponde a los iniciadores forward y reverse y la sonda para sistema TAQMAN en PCR tiempo real, los fluorocromos (FF) se eligieron con base a los canales de detección del sistema StepOne Plus™ (Thermo Fisher Sci. Inc. USA).

Cuadro 3. Descripción de primers utilizados para las reacciones de PCR.

Bacteria	Gen	Primers 5´-3´
<i>Brucella abortus</i>	>Ba_WbkA_fw	GCCACGGGTGCAGTTATCCT
	>Ba_WbkA_Rv	GGGCAGGTCCCCAGAAAACA
	>Ba_WbkA_Probe	TCAAGGGCCAGCGGGGCGGC
	>Ba_virB3_Fw	CGAGCAGGCGGAACATCTGA
	>Ba_virB3_Rv	GGCGGCAGCATCGTTCTCTT
	>Ba_virB3_Probe	TGCCGCATGACCAGCACGATTGG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	>Mb-16S_Fw	CTGCCCTGCACTTCGGGATAA
	>Mb-16S_Rev	GGCTCATCCCACACCGCTAA
	>Mb-16S_Probe	ACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGC
	>Mb-KasB_Fw	CGATTACGCGGGCGATTTCAG
	>Mb-KasB_Rv	GCCCAAGGCGTTGTTGATGG
	>Mb-KasB_Probe	GCCCAAGGCGTTGTTGATGG
<i>Campylobacter fetus</i>	>Cf-16S_Fw	CGAAGAACCTTACCTGGGCTTG
	>Cf-16S_Rv	GACAGCCGTGCAGCACCTGT
	>Cf-16S_Probe	ACTTTCTAGCAAGCTAGCACTCTCTTATCT
	>Cf-gltX1_Fw	GCCGCAAAAACAGCAGGTAAGC
	>Cf-gltX1_Rv	TTTCAAGCGAACGGCTGCTGG
	>Cf-gltX1_Probe	GTGATGACGATGTTTTAAGCAATCCCC

8.4 Cultivo de bacterias

Para estandarizar y evaluar la especificidad de los iniciadores o PRIMERS en PCR punto final y qPCR, es necesario contar con DNA de referencia de las bacterias a diagnosticar.

De la empresa ATCC® se adquirió DNA de *M. tuberculosis* identificado con el número ATCC: 25177DQ y número de lote 63721294, el DNA de las otras 2 especies bacterianas se obtuvo a partir del cultivo de cepas de referencia, la extracción de DNA se realizó con el Kit comercial Fecal/Soil Microbe Miniprep.

La Cepa *Campylobacter fetus* ATCC 27374 se adquirió directamente de la colección ATCC, para el desarrollo de esta cepa, se tomaron aproximadamente 2 mL con una pipeta Pasteur del vial original, se reactivó en tubos de vidrio que contenían 10 mL de caldo tioglicolato estéril (Cuadro 4), se incubó a 37 °C por 48 h.

Cuadro 4. Ingrediente para medio de cultivo tioglicolato.

Ingredientes	Cantidad
Agua destilada	250 mL
Agar bacteriológico	0.18 gr
Caldo tioglicolato medio	7.50 gr

Con el desarrollo de la cepa y con un asa estéril se recuperó biomasa y se resembró en medio sólido ATCC: 260 agar soya tripticasa con 5% de sangre de borrego desfibrinada a un pH de 7.3 (Cuadro 5), se incubó a 37° durante 48 h en microaerofilia (Figura 22).

La extracción de DNA del cultivo se realizó con Kit comercial Fecal/Soil Microbe Miniprep, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuadro 5. Ingredientes para medio de cultivo de *Campylobacter*.

Ingredientes	Cantidad
Agar soya tripticasa (TSA)	40.0 g
Sangre de cordero desfibrinada	50.0 mL (añadir después de esterilizar)
Agua destilada	950.0 mL



Figura 22. Incubación de placas en microaerofilia.

La cepa de *Brucella abortus* ATCC 99S, adquirida directamente de la colección de ATCC, se inoculó en medio sólido Brucella agar base B0219605 estéril (Cuadro 6), tomando del vial original con pipeta Pasteur 2 mL de la cepa se colocó en la placa de Petri con el medio de cultivo sólido y con asa estéril de forma estriada se sembró la cepa.

Cuadro 6. Medio Brucella agar base B0219605

Ingredientes	Cantidad
Agar soya tripticasa (TSA)	40.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Extracto de carne	2.0 g
Agua destilada	1000.0 mL

Las cajas de Petri fueron identificadas y selladas perfectamente (Figura 23), para colocarlas en incubación a 37 °C durante 36 h. La extracción de DNA del cultivo se realizó con kit comercial Fecal/Soil Microbe Miniprep, para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante.



Figura 23. Cultivo de *Brucella abortus*.

8.5 Extracción de DNA bovino

Protocolo 1

Para medir el efecto de los diluyentes utilizados en la criopreservación de semen durante la extracción de DNA, se utilizaron 3 pajillas por diluyente (Lecitina de soya, leche y yema de huevo), cada muestra fue colocada en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

La extracción de DNA bovino se realizó bajo el método tradicional de fenol cloroformo descrito por Wilson (1990) modificado. El cual consistió como primer paso en la separación de material orgánico e inorgánico, para esto se agregó a cada muestra 500 μ L de Tris-etilendiaminotetraacético (TE) 50:20, se mezclaron en vórtex y se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se eliminó y posteriormente se adicionaron 175 μ L de TE 50:20 y se mezcló en el vórtex,

para lograr una lisis celular y degradación de proteínas, se agregó 15 μL de proteínasa K (20 mg/mL) y 40 μL de dodecil sulfato de sodio al 10 % (SDS, por sus siglas en inglés), se dejó en incubación durante dos horas en baño metabólico a 56 °C.

Posteriormente se agregó 500 μL de TE 10:1 y 20 μL de NaCl (5M), y para precipitar los restos de proteína se agregó 500 μL de fenol frío, se agitó suavemente durante 10 minutos y se centrifugó a 4 °C a una velocidad de 12 000 rpm durante 5 minutos, recuperando el sobrenadante en un tubo nuevo, al sobrenadante se le agregó 500 μL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) se centrifugó a 4 °C durante 2 minutos a 12 000 rpm y se recuperó el sobrenadante en otro tubo nuevo, repitiendo este punto dos veces; al sobrenadante del último paso se le agregó 500 μL de isopropanol frío para precipitar los ácidos nucleicos la muestra se deja una noche a 20 °C.

Transcurrido este tiempo, las muestras se atemperan y centrifuga a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante de la muestra, se verifica en este punto la posible formación de un botón con el material genético en el fondo del tubo, dicho botón se lavó con 1mL de etanol frío al 70%, se centrifugó a 12 000 rpm durante 1 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante, para eliminar el resto de etanol los tubos se secaron en estufa de aire forzado a 65 °C durante 2 h , cada muestra seca se hidrató con 50 μL de agua libre de nucleasas y se guardó a -80 °C hasta su uso.

Protocolo 2

Para este método de extracción se utilizó el Kit comercial TRIzol™ (Reagent Invitrogen de Thermo Fisher), se siguieron los pasos recomendados por el fabricante para la extracción de DNA por este método (anexo 1). La muestra final de DNA fue hidratada en agua libre de nucleasas aforando a 50 μl y se almacenó a -80° C hasta su uso.

8.6 Cuantificación de DNA

La cuantificación de la concentración de DNA bovino y DNA de las bacterias de referencia bajo los distintos protocolos se realizó mediante el registro de absorbancia (260-280) de 1 μL de la preparación de DNA, se utilizó NanoDrop 2000 de Thermo Scientific, las variables medidas con el DNA fueron concentración ($\text{ng}/\mu\text{l}$) y pureza en rango de absorbancia de 260/280 (1.6-2.0), el cálculo final lo realiza el software incorporado al equipo.

8.7 Desarrollo y optimización de las reacciones de PCR

PCR Punto Final

La estandarización de las reacciones de PCR se realizó primero por el método convencional o punto final, para comprobar la correcta funcionalidad de los primers diseñados, para este método se utilizó el material genético de las bacterias de referencia (DNA).

Para el caso específico de *Mycobacterium tuberculosis*, se adquirió DNA estándar identificado con el número ATCC®: 25177DQ™, este DNA fue utilizado en la reacción de PCR punto final.

Las condiciones del ensayo de PCR para *M. tuberculosis* de los primers fueron distintos para cada gen, se estandarizó la reacción para el gen 16S rRNA bajo las condiciones que muestran en el Cuadro 7 en un volumen final de 25 μL .

Cuadro 7. Condiciones para PCR del gen 16S rRNA.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración Final	Vol. P/1Rxn (µL)
H ₂ O	-	-	12.7
Buffer	10X	1X	2.5
dNTP´S	20 µM	65 µM	3.25
MgCl ₂	50 µM	65 µM	1.25
Fw	10 µM	15 µM	1.5
Rv	10 µM	15 µM	1.5
Taq	5 U	1.5U	.3
DNA	100	200 ng	2

Los ciclos de la amplificación se marcaron con diferentes temperaturas y tiempos para cada una de las fases, las cuales se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Ciclos de amplificación gen 16S rRNA.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	180	1
Desnaturalización	94	30	25
Alineación	66	30	25
Extensión	72	30	25
Extensión final	72	300	1

Para estandarizar la amplificación de los primers diseñados para el gen *KasB* de *M. tuberculosis* se modificaron las cantidades de reactivos utilizadas y la concentración de DNA utilizado, las condiciones estandarizadas de PCR para este gen se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Condiciones de PCR para el gen *kasB*.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. μL P/1Rxn
H ₂ O	-	-	13.5
Buffer	10X	1X	2.5
dNTP'S	20 μM	250 nM	3.5
MgCl ₂	50 μM	200 nM	1.0
Fw	10 μM	1500 nm	1.5
Rv	10 μM	1500 nm	1.5
Taq	5 U	2.5	0.5
DNA	100	100	1.0

Fue necesario modificar las temperaturas y ciclos para la reacción de PCR del gen *KasB* en comparación con el 16S rRNA, estos se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Ciclos de amplificación para el gen *kasB*.

Fase	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	300	1
Desnaturalización	94	60	30
Alineación	69	30	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	300	1

Los primers diseñados para el diagnóstico de *Campylobacter fetus* se probaron después de la extracción de DNA resultado del cultivo de la cepa ATCC 27374. Las condiciones del ensayo de PCR para amplificación de los primers 16S rRNA y *gltX1* de *C. fetus* en PCR punto final se establecen en el Cuadro 11 en un volumen final de 25 μL .

Cuadro 11. Condiciones de PCR para *Campylobacter fetus*.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. P/1Rxn (µL)	Vol. P/4Rxn (µL)
H ₂ O	-	-	12.7	50.8
Buffer	10X	1X	2.5	10.0
dNTP'S	20 µM	50 µM	2.5	10.0
MgCl ₂	50 µM	50 µM	1.0	4.0
Primer Fw	10 µM	20 µM	2.0	8.0
Primers Rv	10 µM	20 µM	2.0	8.0
Taq	5 U	1.5 U	0.3	1.2
DNA	265 ng	100 ng	2.0	8.0

El DNA utilizado para cada reacción de PCR fue de 2 µL, correspondientes a una concentración final de 200 ng, fue necesario hacer la reacción de cada gen por duplicado se utilizó DNA directo y diluido 1:10 para los genes 16S rRNA y *gltx1*.

Las temperaturas de amplificación fueron diferentes para cada primer, fue necesario programar un gradiente en el termociclador para ofrecer las condiciones de temperatura adecuada para cada par de primers las cuales se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Ciclos de amplificación.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	300	1
Desnaturalización	94	60	30
Alineamiento	68-72	30	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	300	1

En la estandarización de la reacción de PCR punto final de la bacteria *Brucella abortus* fueron utilizados los primers diseñados para esta bacteria. Las condiciones del ensayo de PCR se estandarizaron para amplificar los primers de los genes *virb3* y *wbka*, las concentraciones se muestran en el Cuadro 13 a un volumen final de 25 μ L.

Cuadro 13. Condiciones de PCR para el gen *virB3* y *wbka*

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. P/1Rxn (μ L)
H ₂ O	-	-	12.7
Buffer	10X	1X	2.5
dNTP'S	20 μ M	50 μ M	2.5
MgCl ₂	50 μ M	50 μ M	1.0
Fw	10 μ M	20 μ M	2.0
Rv	10 μ M	20 μ M	2.0
Taq	5 U	1.5 U	0.3
DNA	193 ng	100 ng	2.0

Para la reacción de PCR se estableció en el termociclador un gradiente de temperaturas adecuada para una correcta amplificación, estas se muestran en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Ciclos de amplificación de *Brucella abortus*

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	300	1
Desnaturalización	94	60	30
Alineación	62-71	60	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	300	1

Cada uno de los primers utilizados en esta investigación, fueron diseñados para amplificar fragmentos cortos, en promedio amplifican a 150 pares de bases (bp).

En la estandarización de las reacciones de PCR en tiempo final se utilizó un termociclador SelectCycler-Bioproducts, USA, en el cual se puede programar gradientes de temperaturas para las distintas condiciones de amplificación demandadas por cada primer. Cada uno de los productos de ensayo se analizó en una electroforesis a 90V por 45 minutos, para esto fue necesario realizar un gel de agarosa al 1.5% con SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen™), en buffer TE 1X. Se cargó en cada poso del gel 3 µL del producto de reacción de PCR junto con 1 µL de regulador de carga (60% glicerol, 0.05% azul bromofenol), se utilizaron marcadores moleculares de 50 y 100 pares de bases (Invitrogen™). Las bandas fueron visualizadas en un fotodocumentador (Gel Logic 112, Bruker BioSpin).

PCR tiempo real

En el ensayo de estandarización de la amplificación de curvas estándar de PCR tiempo real se utilizaron reactivos y condiciones de amplificación específicos para esta prueba, se utilizó un termociclador para tiempo real de StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher, USA), se programaron diferentes condiciones de temperatura bajo distintos ciclos para obtener la amplificación de la curva estándar de los diferentes genes seleccionados de cada una de las bacterias patógenas.

Se utilizaron los reactivos TaqMan Fast Advance Master Mix (Thermo Fisher), sondas y los primers utilizados en PCR convencional, se incluyó el DNA de referencia obtenido de cada bacteria, se utilizó también agua grado molecular.

Cada ensayo se realizó de forma simplex, estableciendo las mejores condiciones de reacción en cuanto a concentración de cada reactivo y ciclos necesarios para la amplificación. Establecidas las condiciones de cada una de las reacciones se realizaron ensayos de forma triplex, se utilizaron los dos genes de cada bacteria más la adición de actina bovina, para probar la especificidad de cada uno de los diseños.

La estandarización de las condiciones de amplificación del fragmento de los blancos moleculares 16S rRNA Y *gltx1* es para el diagnóstico de *Campylobacter fetus*. En el ensayo se incluyó el DNA de referencia que se extrajo del cultivo de *Campylobacter fetus*, cada ensayo se realizó por triplicado, se incluyó un control negativo de DNA de la bacteria *E. coli* que se encuentra a 10 ng/ μ L este control sirvió para evitar falsos positivos, también se incluyó un control sin templado el cual contiene, en lugar de DNA agua grado molecular.

La mezcla de los reactivos utilizados en la estandarización de forma simplex, para *gltx1* se muestra en el Cuadro 15, mientras que las condiciones de amplificación se muestran en el Cuadro 16. La mezcla del ensayo de qPCR estandarizado para el gen 16S rRNA se muestra en el Cuadro 17, y las condiciones de amplificación para este gen en el Cuadro 18, cada reacción se ajustó a un volumen final de 20 μ L.

Cuadro 15. Mezcla de reacción para el gen 16S rRNA de *C. fetus*.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. P/1Rxn (µL)	Vol. P/5Rxn (µL)
H ₂ O	-	-	5.5	27.5
TaqMan M.M	2X	1X	10.0	50.0
Primer Fw	10.0 µM	300.0 nM	0.6	3.0
Primer Rv	10.0 µM	300.0 nM	0.6	3.0
Sonda (HEX)	10.0 µM	150.0 nM	0.3	1.5
DNA	265.0 ngL	30.0 ng	3.0	15.0

Cuadro 16. Mezcla de reacción para el gen *gltx1* de *C. fetus*.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Vol. P/1Rxn (µL)	Vol. P/5Rxn (µL)
H ₂ O	-	-	6.4	32.0
TaqMan M.M.	2X	1X	10.0	50.0
Primer Fw	10.0 µM	500.0 nM	1.0	5.0
Primer Rv	10.0 µM	500.0 nM	1.0	5.0
Sonda (Rox)	10.0 µM	300.0 nM	0.6	3.0
DNA	265.0 ng/µL	10.0 ng/µL	1.0	5.0

Cuadro 17. Condiciones de amplificación del gen *gltx1* de *C. fetus*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	300	1
Desnaturalización	94	40	45
Alineamiento	64	30	
Extensión	72	30	

Cuadro 18. Condiciones de amplificación del gen 16S rRNA de *C. fetus*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	300	1
Desnaturalización	94	40	45
Alineamiento	65	30	
Extensión	72	30	

Para la amplificación de los genes *virB3* y *wbkA* de *Brucella abortus* mediante PCR en tiempo real, en el ensayo de la estandarización se incluyó DNA de referencia de *B. abortus* de la cepa ATCC 99S, el ensayo se realizó por triplicado, incluyendo un control negativo con DNA de *E. coli*, control utilizado para evitar falsos positivos, se incluyó un control sin templado el cual contiene en lugar de DNA agua grado molecular.

La mezcla de reacción se preparó por separado para cada gen, para *wbkA* la estandarización de las condiciones de reacción se muestra en el Cuadro 19, mientras que las del gel *virB3* se muestran en el Cuadro 20, el volumen final para cada una de las reacciones fue de 20 μ L. Las condiciones de amplificación programadas en el termociclador se muestran en el Cuadro 21 para el gen *wbkA*, y en el Cuadro 22 se especifican las del gen *virB3*.

Cuadro 19. Mezcla de reacción para el gen *wbkA* de *B. abortus*.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. P/1Rxn (µL)	Vol. P/5Rxn (µL)
H ₂ O	-	-	5.4	27.0
TaqMan M.M	2X	1X	10.0	50.0
Primer Fw	10.0 µM	600.0 nM	1.0	5.0
Primer Rv	10.0 µM	600.0 nM	1.0	5.0
Sonda (Rox)	10.0 µM	400.0 nM	0.6	3.0
DNA	193.0 ng/µL	20.0 ng/µL	2.0	10.0

Cuadro 20. Condiciones de amplificación del gen *wbkA* de *B. abortus*

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (S)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	300	1
Desnaturalización	94	40	45
Alineamiento	64	30	
Extensión	72	30	

Cuadro 21. Mezcla de reacción para el gen *virB3* de *B. abortus*

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Vol. P/1Rxn (µL)	Vol. P/5Rxn (µL)
H ₂ O	-	-	6.5	32.5
TaqMan M.M	2X	1X	10.0	50.0
Primer Fw	10.0 µM	500.0 nM	0.6	3.0
Primer Rv	10.0 µM	500.0 nM	0.6	3.0
Sonda (HEX)	10.0 µM	300.0 nM	0.3	1.5
DNA	265.0 ng/µL	20.0 ng/µL	2.0	10.0

Cuadro 22. Condiciones de amplificación del gen *virB3* de *B. abortus*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (S)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	300	1
Desnaturalización	94	40	45
Alineamiento	64	30	
Extensión	72	30	

Con las condiciones de amplificación y la estandarización de los reactivos utilizados se realizaron las reacciones de PCR en tiempo real de forma triplex, se utilizaron los dos genes para esta bacteria adicionando actina bovina.

En la estandarización de las condiciones de amplificación del fragmento de los blancos moleculares 16S rRNA y *kasB* utilizados para el diagnóstico de *M. tuberculosis*, se incluyó DNA estándar de *M. tuberculosis* ATCC 25177DQ.

El DNA se encuentra a una concentración de 100 ng/ μ L, este DNA se utilizó en la reacción de qPCR, realizándose por triplicado, incluyendo un control negativo con DNA de *E. coli* para evitar los falsos positivos y un control sin templado el cual contiene agua grado molecular.

La mezcla de reacción se preparó para cada gen, la estandarización se realizó bajo las mismas condiciones de reacción para los dos genes el *kasB* y el 16S rRNA la cual se muestra en el Cuadro 23, mientras que los ciclos de amplificación de los mismos genes se marcan en el Cuadro 24.

Cuadro 23. Mezcla de reacción para el gen *kasB* y 16S rRNA de *B. abortus*

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. P/1Rxn (µL)	Vol. P/5Rxn (µL)
H ₂ O	-	-	5.4	27.0
TaqMan M.M.	2X	1x	10.0	50.0
Primer Fw	10.0 µM	500.0 nM	1.0	5.0
Primer Rv	10.0 µM	500.0 nM	1.0	5.0
Sonda (ROX)	10.0 µM	300.0 nM	0.6	3.0
DNA	100.0 ng	10.0 ng	2.0	10.0

Cuadro 24. Condiciones de amplificación del gen *kasB* de *B. abortus*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (S)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	300	1
Desnaturalización	94	40	45
Alineamiento	64	30	
Extensión	72	30	

Para realizar las reacciones de PCR tiempo real de manera triplex con los dos genes seleccionados para cada bacteria fue necesario agregar en cada reacción primer y sonda de actina bovina, las condiciones de concentración utilizada en todos los ensayos de las 3 bacterias fueron las mismas y estos se establecen en el Cuadro 25.

Cuadro 25. Concentración utilizada de Actina bovina

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. P/1Rxn (µL)	Vol. P/5Rxn (µL)
Primer Actina bovina Fw	10.0 µM	300.0 nM	0.6	3.6
Primer Actina bovina Rv	10.0 µM	300.0 nM	0.6	3.6
Sonda Actina bovina (Tamra)	10.0 µM	150 nM	0.3	1.8

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para verificar la asociación de los dos métodos de extracción de DNA bovino sobre la concentración y pureza con los métodos de criopreservación se aplicó la prueba de Chi-cuadrado, con un valor de significancia de $P < 0.05$.

En los resultados de las reacciones de PCR tiempo real, se analizaron los valores de Ct (ciclos de amplificación) obtenidos mediante el software StepOnePlus Real-Time PCR System. La eficiencia de la amplificación promedio fue determinada a partir de la pendiente obtenida de las concentraciones producidas por triplicado.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Extracción de DNA

DNA bovino

Para evaluar los protocolos de extracción de DNA mediante muestras de semen bovino criopreservado y diluido se utilizaron 15 muestras del material espermático recolectado en este estudio. Se analizó el efecto de los crioprotectores durante la extracción de DNA, en el Cuadro 27 se muestran los parámetros más importantes que se deben tomar en cuenta de los resultados de extracción de DNA que son la concentración y pureza.

Cuadro 26. Resultados de criterios evaluados de los diferentes diluyentes utilizados para la extracción de DNA

Diluyente	Concentración		Pureza	
	Método fenol-cloroformo	Método TRIzol™	Método fenol-cloroformo	Método TRIzol™
Control	84.6	15.4	69.2	46.1
Lecitina	46.6	26.7	80.0	46.6
Leche	66.6	0.0	66.7	28.5
Yema de Huevo	21.4	0.0	57.1	26.7

Respecto a la concentración de DNA marcada en el cuadro 28 la mayor proporción de muestras (84.6%) que cumplieron con los criterios establecidos (Nieto *et al.*, 2005; Amaru *et al.*, 2006) para esta variable, se observan en el medio de extracción fenol-cloroformo y sin la adición de diluyentes (control)

En referencia a la pureza se observó que más del 50% de las muestras extraídas con el método fenol-cloroformo, cumplieron con el criterio establecido establecidos (Nieto *et al.*, 2005; Amaru *et al.*, 2006), sin embargo, la proporción de muestras que obtuvieron resultados dentro del rango de absorbancia fue mayor cuando se utilizó lecitina como

diluyente, respecto a los demás crioprotectores. Mientras que la proporción de muestras útiles cuando se empleó el TRIzol™, fue menor del 50% independientemente del diluyente.

El uso de 3 pajillas con semen criopreservado de 200 µL cada una por diluyente para el método de extracción fenol-cloroformo mostró resultados favorables en los criterios evaluados, existe nula información sobre el uso de los crioprotectores utilizados para la extracción de DNA, pero Durviz, (2008) y Ruiz *et al.* (2010), mencionan que la baja o nula cantidad de DNA obtenida de algún protocolo, se debe al exceso de muestra utilizada, por lo que se recomienda utilizar menor cantidad, con fenol-cloroformo la cual debe ser de 0.25 a 0.50 mL de contenido espermático, es decir una cantidad similar a la utilizada en esta investigación, ya que con una mayor cantidad de muestra se obtuvieron resultados negativos, o en su caso prolongar el tiempo de incubación en el paso que corresponde a la degradación o lisis celular.

Bajo estos mismos criterios, para obtener mejores resultados con el protocolo de extracción del kit comercial TRIzol™, la cantidad de muestra de semen a utilizar debe ser menor para la obtención de los mejores estándares establecidos para calidad y pureza de DNA. De la misma manera Del Valle *et al.* (2004) mencionan en su estudio que la causa probable entre la diferencia de pureza y cantidad de DNA que observó durante la extracción podría deberse, a la presencia de RNA en los mismos.

El extraer el DNA con un método o protocolo adecuado para cada muestra minimiza los problemas de contaminación puesto que no se requiere extraer todo el DNA presente sino obtenerlo en cantidad y calidad suficiente cuando este va a ser utilizado para pruebas moleculares. La eliminación total de los contaminantes durante la extracción de DNA es usualmente una tarea complicada que con mucha frecuencia lleva a la inhibición o errores en la amplificación (Buttler, 2001).

DNA bacteriano

Las extracciones de DNA con el kit comercial utilizado para las bacterias cultivadas en esta investigación se muestran en Cuadro 28.

Cuadro 27. Extracción de DNA bacteriano

Bacteria	Concentración ng/μL	Pureza (Absorbancia 260/280)
<i>Campylobacter fetus</i>	265 ng	1.9
<i>Brucella Abortus</i>	193 ng	1.9

Los resultados obtenidos de la extracción de DNA de bacterias de referencia son aceptables encontrándose dentro de los estándares antes mencionados y con seguridad puede ser utilizado el DNA en las pruebas de estandarización durante los ensayos de PCR punto final y PCR tiempo real.

10.2 DISEÑO Y EVALUACIÓN DE INICIADORES (Primers)

El diseño cuidadoso de primers es uno de los aspectos más importantes de la PCR, primers mal diseñados pueden amplificar otros fragmentos de DNA distintos a los buscados. Al realizar la búsqueda de secuencias reportadas en la base de dato del Genbank para los genes seleccionados en este estudio se diseñaron primers específicos un forward y un reverse, para cada uno de los genes seleccionados de cada una de las bacterias de esta investigación, también se diseñó una sonda útil para desarrollar los ensayos de reacción de PCR tiempo real, con diferentes fluoróforos (FF) marcados en el Cuadro 29.

Cuadro 28. Bacterias, genes y primers

Bacteria	Gen	FF	Primers 5´-3´	Prod
<i>Brucella abortus</i>	WbkA_fw		GCCACGGGTGCAGTTATCCT	Proteína de biosíntesis de la cadena lateral del lipopolisacárido O
	WbkA_Rv		GGGCAGGTCCCCAGAAAACA	
	WbkA_Probe	ROX	TCAAGGGCCAGCGGGGCGGC	
	virB3_Fw		CGAGCAGGCGGAACATCTGA	Sistema de secreción tipo IV
	virB3_Rv		GGCGGCAGCATCGTTCTCTT	
	virB3_Probe	HEX	TGCCGCATGACCAGCACGATTGG	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16S_Fw		CTGCCCTGCACTTCGGGATAA	(Gen constitutivo) Polirribonucleotido
	16S_Rev		GGCTCATCCACACCGCTAA	
	16S_Probe	HEX	ACGGGATGCATGTCTTGTGGTGG AAAGCGC	
	KasB_Fw		CGATTACGCGGGCGATTGAG	β-cetoacil-ACP sintasa (Actividad transferasa)
	KasB_Rv		GCCCAAGGCGTTGTTGATGG	
	KasB_Probe	ROX	GCCCAAGGCGTTGTTGATGG	
<i>Campylobacter fetus</i>	16S_Fw		CGAAGAACCTTACCTGGGCTTG	(Gen constitutivo) Polirribonucleotido
	16S_Rv		GACAGCCGTGCAGCACCTGT	
	16S_Probe	HEX	ACTTTCTAGCAAGCTAGCACTCT CTTATCT	
	gltX1_Fw		GCCGCAAAAACAGCAGGTAAGC	Glutamil-tRNA sintetasa (Cataliza la unión del glutamato al ARNt)
	gltX1_Rv		TTTCAAGCGAACGGCTGCTGG	
	gltX1_Probe	ROX	GTGATGACGATGTTTTAAGCAAT CCCC	

Cada par de primers es específico de un gen de interés de cada bacteria seleccionada en este estudio, los genes corresponden a uno de mayor expresión como el 16S rRNA (Housekeeping), este gen se caracteriza por tener niveles de expresión constante en todas las células y condiciones de un mismo organismo y este fue utilizado como control positivo en los ensayos de biología molecular con PCR; el otro gen fue uno asociado al factor de expresión de virulencia de cada una de las bacterias a diagnosticar.

Cada primer se diseñó de manera que este tenga una región dentro de la secuencia que se amplificará. Para verificar el correcto diseño de los primers fue necesario localizarlos dentro de las secuencias generadas en formato FASTA para cada gen o blanco seleccionado (Figuras 24, 25, 26, 27, 28).

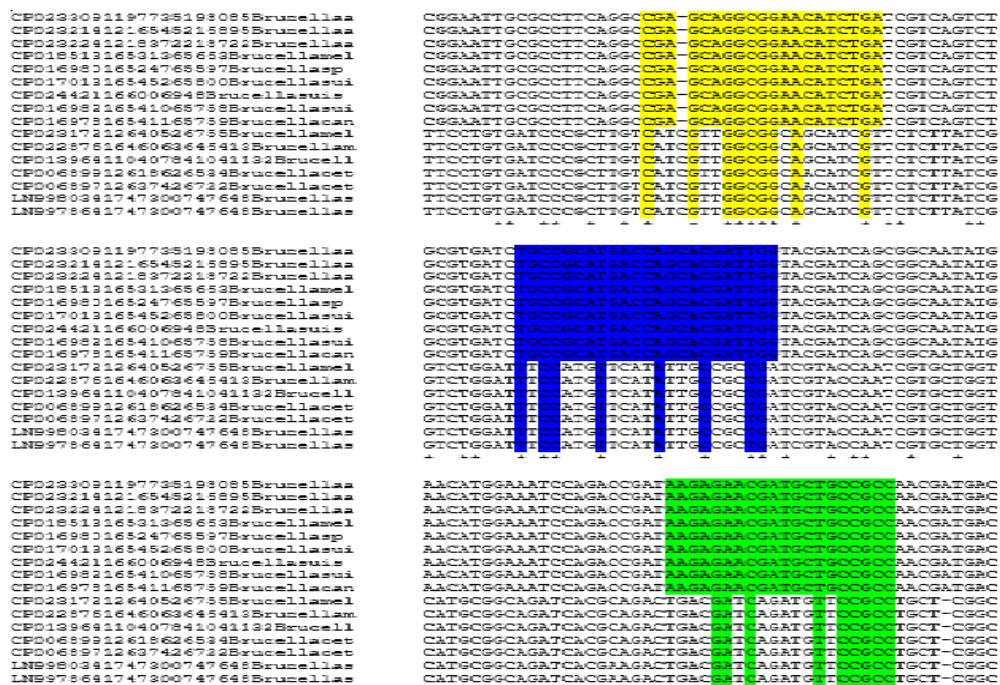


Figura 24. Diseños de secuencias de nucleótidos de iniciadores del gen *virb3* para *Brucella*


```

FO203507114723391473879Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
HE57259011494859149639Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
NR0288791MycobacteriumspaeqM AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
A1311201Mycobacteriumspaeq AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
CP010333114794891481029Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
NR0252341MycobacteriumserotIA AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
AM412059214713191472859Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
CP012090112509051252445Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
CP01577321474791476249Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
CP01034114751081474648Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
FR87806011474814746348Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
FO20351011539416153959Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
CP000717114756151477155Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
CP014617115693181570859Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
CP016401114918781493418Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
CP02201411469581471122Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
AF010918114712581472798Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
GT142829121488Mycobacteriumvi AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
AF4104791115348Mycobacteriumvi AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
CP000479114875321489073Mycobae AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
*****
FO203507114723391473879Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
HE57259011494859149639Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
NR0288791MycobacteriumspaeqM GCGGGCCATCCAGCTTGGT
A1311201Mycobacteriumspaeq AACGGGTGAGTAAACAGTGGGTGATCGCCGTCGACTTGGGATAGCCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAGGAAACGATCTCTTGGG
CP010333114794891481029Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
NR0252341MycobacteriumserotIA GCGGGCCATCCAGCTTGGT
AM412059214713191472859Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
CP012090112509051252445Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
CP01577321474791476249Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
CP01034114751081474648Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
FR87806011474814746348Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
FO20351011539416153959Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
CP000717114756151477155Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
CP014617115693181570859Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
CP016401114918781493418Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
CP02201411469581471122Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
AF010918114712581472798Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
GT142829121488Mycobacteriumvi GCGGGCCATCCAGCTTGGT
AF4104791115348Mycobacteriumvi GCGGGCCATCCAGCTTGGT
CP000479114875321489073Mycobae GCGGGCCATCCAGCTTGGT
*****

```

Figura 27. Diseño de secuencias de nucleótidos de iniciadores del gen 16S rRNA para *Mycobacterium tuberculosis*

CP0068331Capylobacterfetussub	CTAGAAACTAAAAAGAA	GCCGCAAAAG	CAGCAGGT	GAGC	CGTATAGATA								
CP0109531Capylobacterfetussub	CTAGAAACTAAAAAGAA	GCCGCAAAAG	CAGCAGGT	GAGC	CGTATAGATA								
CP0145681Capylobacterfetussub	TTAGAACTAAAAAGAA	GCCGCAAAAG	CAGCAGGT	TAAGC	CGTACAGATA								
CP0069992Capylobacterfetussub	TTAGAACTAAAAAGAA	GCCGCAAAAG	CAGCAGGT	TAAGC	CGTACAGATA								
CP0004871Capylobacterfetussub	TTAGAACTAAAAAGAA	GCCGCAAAAG	CAGCAGGT	TAAGC	CGTACAGATA								
CP0088081Capylobacterfetussub	TTAGAACTAAAAAGAA	GCCGCAAAAG	CAGCAGGT	TAAGC	CGTATAGATA								
CP0155751Capylobacterhyointes	TTAGAACTAAAAAGAA	GCCGCAAAAG	CAGCAGGT	TAAGC	CGTATAGATA								
CP0155761Capylobacterhyointes	TTAGAACTAAAAAGAA	GCCGCAAAAG	CAGCAGGT	TAAGC	CGTATAGATA								
CP0155771Capylobacteriguanior	CTTAGGCTAAAAAGAA	GCCGCAAAAG	CAGCAGGT	GAGC	CTTACCGGTA								
	***	*****	*****	*****	*****								
CP0068331Capylobacterfetussub	TGATGGA	ACTTGTGAGA	ATTTAA	GC	BAT	BAT	BAG	GTTT	TA	AA	CAAT	CCCC	
CP0109531Capylobacterfetussub	TGATGGA	ACTTGTGAGA	ATTTAA	GC	BAT	BAT	BAG	GTTT	TA	AA	CAAT	CCCC	
CP0145681Capylobacterfetussub	TGATGGA	ACTTGTGAGA	ATTTAA	GC	BAT	BAT	BAG	GTTT	TA	AA	CAAT	CCCC	
CP0069992Capylobacterfetussub	TGATGGA	ACTTGTGAGA	ATTTAA	GC	BAT	BAT	BAG	GTTT	TA	AA	CAAT	CCCC	
CP0004871Capylobacterfetussub	TGATGGA	ACTTGTGAGA	ATTTAA	GC	BAT	BAT	BAG	GTTT	TA	AA	CAAT	CCCC	
CP0088081Capylobacterfetussub	TGATGGA	ACTTGTGAGA	ATTTAA	GC	BAT	BAT	BAG	GTTT	TA	AA	CAAT	CCCC	
CP0155751Capylobacterhyointes	TGATG	GTGCTTGTGAG	CATTTAA	GC	BAT	BAT	BAG	GTTT	TA	AA	CAAT	CCCC	
CP0155761Capylobacterhyointes	TGATG	GTGCTTGTGAG	CATTTAA	GC	BAT	BAT	BAG	GTTT	TA	AA	CAAT	CCCC	
CP0155771Capylobacteriguanior	TGAC	GGCACTTGTGAG	CATTTAA	GC	BAT	BAT	BAG	GTTT	TA	AA	CAAT	CCCC	
	***	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
CP0068331Capylobacterfetussub	AT	CCAGCAGC	AGTTCGC	TTGAA	AT	CAAAA	ACGAC	CCG	C	AAAG	TTTT	TAT	
CP0109531Capylobacterfetussub	AT	CCAGCAGC	AGTTCGC	TTGAA	AT	CAAAA	ACGAC	CCG	C	AAAG	TTTT	TAT	
CP0145681Capylobacterfetussub	GT	CCAGCAGC	CGTTCGC	TTGAA	AT	CAAAA	ACGAC	CCG	C	AAAG	TTTT	TAT	
CP0069992Capylobacterfetussub	GT	CCAGCAGC	CGTTCGC	TTGAA	AT	CAAAA	ACGAC	CCG	C	AAAG	TTTT	TAT	
CP0004871Capylobacterfetussub	GT	CCAGCAGC	CGTTCGC	TTGAA	AT	CAAAA	ACGAC	CCG	C	AAAG	TTTT	TAT	
CP0088081Capylobacterfetussub	GT	CCAGCAGC	CGTTCGC	TTGAA	AT	CAAAA	ACGAC	CCG	C	AAAG	TTTT	TAT	
CP0155751Capylobacterhyointes	AT	CCAGCAGC	AGTTCGC	TTGAA	AT	CAAAA	ACGAC	CCG	C	AAAG	TTTT	TAT	
CP0155761Capylobacterhyointes	AT	CCAGCAGC	AGTTCGC	TTGAA	AT	CAAAA	ACGAC	CCG	C	AAAG	TTTT	TAT	
CP0155771Capylobacteriguanior	GCC	T	GCAGC	AGTTCGC	TTGAA	AT	CAAAA	ACGAC	CCG	C	AAAG	TTTT	TAT

Figura 28. Diseño de secuencias de nucleótidos de iniciadores del gen *gltX1* rRNA para *Capylobacter foetus*

Con cada primer generado se realizó un análisis *in silico* en la plataforma OligoEvaluator™, se determinó la proporción de G+C, la temperatura de fusión,

formación de estructuras secundarias y la formación de dímeros, los resultados se muestran en el Cuadro 30.

Cuadro 29. Evaluación *in silico* de primers

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>			>Mb-16S_Fw			CTGCCCTGCACTTCGGGATAA	
Recuento de bases	Peso molecular	Longitud (bp)	Tm (° C)	GC	GC Clamp	Estructuras secundarias	Dímeros
A = 4, U = 0, G = 5, C = 7, T = 5, I = 0, Total = 21	6382.2	21	70.2	57.1	1	<pre> /ACGTCCCCTGC 5' \CTTCGGGATAA 3' /CCGTC 5' C \TGCACTTCGGGATAA 3' </pre>	N/A
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>			>Mb-16S_Rev			GGCTCATCCCACACCGCTAA	
Recuento de bases	Peso molecular	Longitud (bp)	Tm (° C)	GC	GC Clamp	Estructuras secundarias	Dímeros
A = 5, U = 0, G = 3, C = 9, T = 3, I = 0, Total = 20	6007.0	20	69.4	60	2	N/A	N/A
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>			>Mb-16S_Probe			ACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGC	
Recuento de bases	Peso molecular	Longitud (bp)	Tm (° C)	GC	GC Clamp	Estructuras secundarias	Dímeros
A = 6, U = 0, G = 12, C = 5, T = 7, I = 0, Total = 30	9343.1	30	82.6	56.7	4	<pre> /GGTGTCTGTACGTAGGGCA 5' \TGAAAGCGC 3' /GTAGGGCA 5' \CATGTCTTGTGGTGGAAAGCGC 3' </pre>	<pre> 5' ACGGATGCATGTCTT 3' CGCGAAAGGT 5' A 3' CGCGAAAGGT 5' ACGGATGCAT 3' </pre>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>			>Mb-KasB_Fw			CGATTACGCGGGCGATTACAG	
Recuento de bases	Peso molecular	Longitud (bp)	Tm (° C)	GC	GC Clamp	Estructuras secundarias	Dímeros
A = 4, U = 0, G = 7, C = 5, T = 4, I = 0, Total = 20	6158.1	20	71.6	60.0	1	N/A	N/A
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>			>Mb-KasB_Rv			GCCCAAGGCGTTGTTGATGG	

Recuento de bases	Peso molecular	Longitud (bp)	Tm (° C)	GC	GC Clamp	Estructuras secundarias	Dímeros
A = 3, U = 0, G = 8, C = 4, T = 5, I = 0, Total = 20	6189.1	20	71.8	60.0	3	<pre> /CCCC 5' A \AGCGTTGTTGATGG 3' /TGCGGAACCCG 5' \TGTTGATGG 3' </pre>	N/A
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>			>Mb-KasB_Probe		GCCCAAGCGTTGTTGATGG		
Recuento de bases	Peso molecular	Longitud (bp)	Tm (° C)	GC	GC Clamp	Estructuras secundarias	Dímeros
A = 3, U = 0, G = 8, C = 4, T = 5, I = 0, Total = 20	6189.1	20	71.8	60.0	2	<pre> /CCCC 5' A \AGCGTTGTTGATGG 3' /TGCGGAACCCG 5' \TGTTGATGG 3' </pre>	N/A
<i>Campylobacter fetus</i>			>Cf-16S_Fw		CGAAGAACCTTACCTGGGCTTG		
Recuento de bases	Peso molecular	Longitud (bp)	Tm (° C)	GC	GC Clamp	Estructuras secundarias	Dímeros
A = 5, U = 0, G = 6, C = 6, T = 5, I = 0, Total = 22	6735.5	22	67.7	54.5	2	<pre> /AGAAGC 5' A \CCTTACCTGGGCTTG 3' </pre>	N/A
<i>Campylobacter fetus</i>			>Cf-16S_Rv		GACAGCCGTGCAGCACCTGT		
Recuento de bases	Peso molecular	Longitud (bp)	Tm (° C)	GC	GC Clamp	Estructuras secundarias	Dímeros
A = 4, U = 0, G = 6, C = 7, T = 3, I = 0, Total = 20	6103.1	20	71.3	65.0	2	<pre> /CGTGCCGACAG 5' A \GCACCTGT 3' /GTGCCGACAG 5' C \AGCACCTGT 3' /CGTGCCGACAG 5' A \GCACCTGT 3' /GTGCCGACAG 5' C \AGCACCTGT 3' /CGTGCCGACAG 5' A \GCACCTGT 3' /GTGCCGACAG 5' C \AGCACCTGT 3' </pre>	N/A
<i>Campylobacter fetus</i>			>Cf-16S_Probe		ACTTTCTAGCAAGCTAGCACTCTCTTATCT		
Recuento de bases	Peso molecular	Longitud (bp)	Tm (° C)	GC	GC Clamp	Estructuras secundarias	Dímeros

A = 7, U = 0, G = 3, C = 9, T = 11, I = 0, Total = 30	9067.0	30	64.9	40	1	<pre> /ACGATCTTTCA 5' \AGCTAGCACTCTCTTATCT 3' ----- /ACGATCTTTCA 5' \AGCTAGCACTCTCTTATCT 3' ----- /TCGAACGATCTTTCA 5' \AGCACTCTCTTATCT 3' ----- /ACGATCTTTCA 5' \AGCTAGCACTCTCTTATCT 3' ----- /ACGATCTTTCA 5' \AGCTAGCACTCTCTTATCT 3' ----- /TCTTTCA 5' \AGCAAGCTAGCACTCTCTTATCT 3' ----- /ACGATCTTTCA 5' \AGCTAGCACTCTCTTATCT 3' ----- /CGATCGAACGATCTTTCA 5' \ACTCTCTTATCT 3' </pre>	N/A
<i>Campylobacter fetus</i>					>Cf-gltX1_Fw	GCCGCAAAAACAGCAGGTAAGC	
Recuento de bases	Peso molecular	Longitud (bp)	Tm (°C)	GC	GC Clamp	Estructuras secundarias	Dímeros
A = 9, U = 0, G = 6, C = 6, T = 1, I = 0, Total = 22	6771.5	22	70.5	54.5	2	N/A	N/A
<i>Campylobacter fetus</i>					>Cf-gltX1_Rv	TTTCAAGCGAACGGCTGCTGG	
Recuento de bases	Peso molecular	Longitud (bp)	Tm (°C)	GC	GC Clamp	Estructuras secundarias	Dímeros
A = 4, U = 0, G = 7, C = 5, T = 5, I = 0, Total = 21	6462.3	21	73.4	57.	2	<pre> /AGCGAACTTT 5' A \CGGCTGCTGG 3' ----- /AACTTT 5' \GCGAACGGCTGCTGG 3' </pre>	N/A
<i>Campylobacter fetus</i>					>Cf-gltX1_Probe	GTGATGACGATGTTTTAAGCAATCCCC	
Recuento de bases	Peso molecular	Longitud (bp)	Tm (°C)	GC	GC Clamp	Estructuras secundarias	Dímeros
A = 7, U = 0, G = 6, C = 6, T = 8, I = 0, Total = 27	8274.5	27	71.2	44.4	4	<pre> /TGTAGCAGTAGTG 5' \TTTAAGCAATCCCC 3' </pre>	N/A

Todos los primers cumplen con la longitud deseada de nucleótidos, entre más corto sea el primer, este tiene una alta probabilidad de encontrar su complemento en el genoma

por más de una vez, sin embargo a medida que el primer crece en número de bases, la probabilidad de encontrar una secuencia complementaria en el DNA se vuelve más compleja, de aquí parte la importancia de considerar en el diseño de primers que estén dentro de los estándares de 17 a 30 nucleótidos. La composición de G y C (%) también se encuentra dentro de los rangos establecidos, esta debe estar entre 40 y 60%. La Temperatura de fusión (T_m) es proporcional al número de bases de cada primers en este sentido para este análisis se ve rebasada el T_m recomendado en cada uno de los diseños de los primer, factor que se consideró en los ensayos realizados de PCR y qPCR a la hora de programar las temperaturas del termociclador para las reacciones moleculares. Parte importante de este análisis también implica la búsqueda de formación de dímeros dentro de los primers, solo el primer probe del gen 16S rRNA de *Mycobacterium* presentó un dímero del total evaluado. En general los primers generados cumplen con las especificaciones necesarias para ser utilizados en reacciones de PCR punto final y qPCR.

10.3 PCR Punto final

En el ensayo realizado para *Brucella abortus* la cantidad de DNA extraído proveyó una concentración de 193 ng/ μ L y una pureza de 1.9 a una relación de absorbancias 260/280, resultados aceptables para poder ser utilizado el DNA en las pruebas de PCR.

Con la estandarización de la metodología para los ensayos de PCR punto final, se observaron las bandas amplificadas de los pares de bases establecidos de los fragmentos de los genes seleccionados de *Brucella abortus*: *wbkA* y *virB3*. En la Figura 29, se observa que las bandas tuvieron la talla esperada de 146 y 121 bp, y tuvieron mayor intensidad cuando la temperatura de alineamiento fue de 64°C.

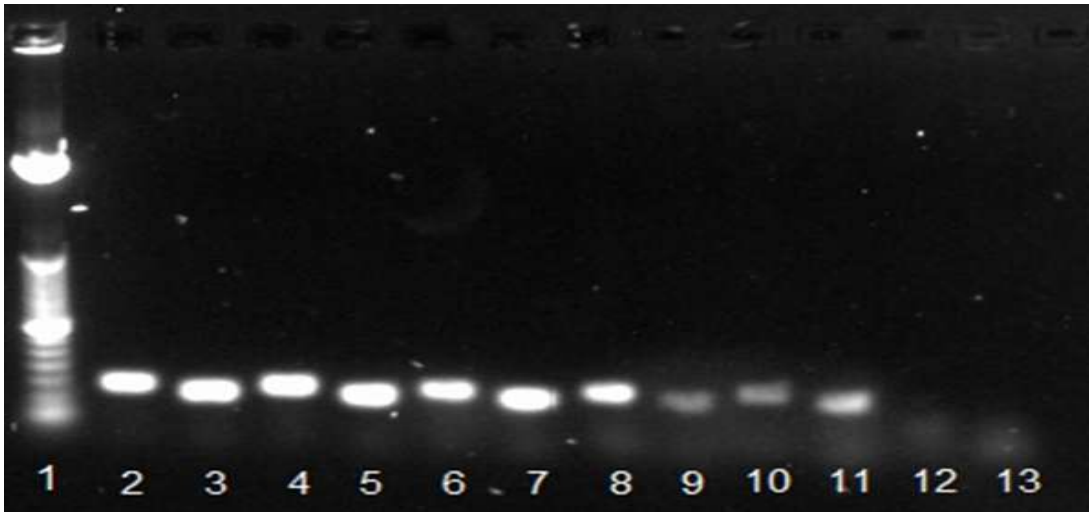


Figura 29. Perfil electroforético de amplificación de PCR de *Brucella abortus* en gel de agarosa al 1.5%, carril 1: marcador molecular de 50 bp, carril 2: gen *wbkA*, carril 3: gen *virB3*, Carril 4: gen *wbkA*, carril 5: *virB3*, Carril 6: gen *wbkA*, carril 7: *virB3*, Carril 8: gen *wbkA*, carril 9: *virb3*, carril 10: gen *wbkA*, carril 11: *virB3*, carril 12: gen *wbkA*, carril 13: *virB3*.

En la estandarización de esta reacción se analizaron los límites de detección de DNA para *Brucella abortus* de esta prueba los cuales se muestran en la Figura 30, en esta figura se observa la amplificación de DNA siendo la cantidad mínima de DNA detectada durante la PCR de 3.86 ng. Se realizaron diferentes diluciones para esta reacción siendo la 1:50 la que se colocó en los carriles 10 y 11 y fue posible observar la amplificación de bandas a 146 y 121 bp, correspondientes al fragmento seleccionado del gen *wbkA* y *virB3*, respectivamente. No obstante, en los carriles 12 y 13 ya no se logró detectar la visualización de bandas, debido a que la cantidad de DNA utilizado no fue suficiente.

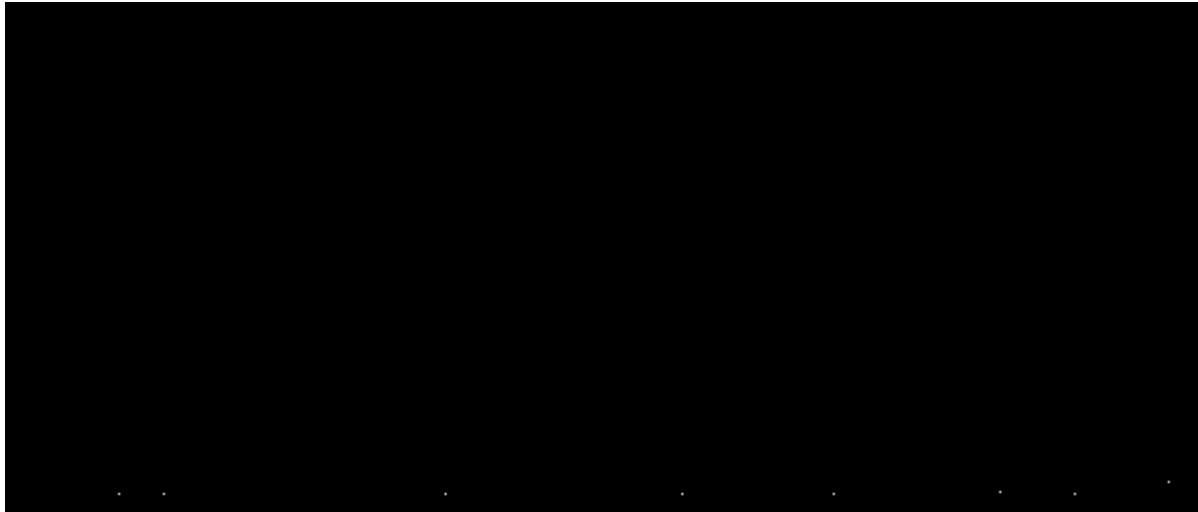


Figura 30. Perfil electroforético de amplificación de PCR con DNA diluido de *Brucella abortus* en un gel de agarosa al 1.5%. carril 1: marcador molecular de 50 bp, carril 2: gen *wbkA* DNA directo, carril 3: gen *virB3* DNA directo, carril 4: gen *wbkA* DNA 1:10, carril 5: gen *virB3* DNA 1:10, carril 6: gen *wbkA* DNA 1:15, carril 7: gen *virB3* DNA 1:15, carril 8: gen *wbkA* DNA 1:20, carril 9: gen *virB3* DNA 1:20, carril 10: gen *wbkA* DNA 1:25, carril 11: gen *virB3* DNA 1:25, carril 12: gen *wbkA* DNA 1:30, carril 13: gen *virB3* DNA 1:30, carril 14: gen *wbkA* DNA 1:35, carril 15: gen *virB3* DNA 1:35, carril 16: gen *wbkA* DNA 1:40, carril 17: gen *virB3* DNA 1:40, carril 18: gen *wbkA* DNA 1:50, carril 19: gen *virB3* DNA 1:50, carril 20: gen *wbkA* DNA 1:60, carril 21: gen *virB3* DNA 1:60.

En la estandarización de los distintos ensayos se obtuvieron resultados satisfactorios con visualización de bandas amplificadas a los pares de bases específicos para cada fragmento del gen seleccionado. En la Figura 31 se observa la amplificación de bandas a 110 bp correspondientes a los genes seleccionados para la bacteria *C. fetus*. En la Figura 32 se observa la amplificación de bandas a 120 bp correspondiente al gen 16S rRNA de *M. tuberculosis*, mientras en la Figura 33 se observa la amplificación de bandas a 130 bp del gen *KasB* de *M. tuberculosis*. En la actualidad no existe en México una prueba molecular estandarizada para trabajar a partir de semen, para detección de agentes patógenos como *M. tuberculosis*, *C. fetus* y *B. abortus*, por lo que la estandarización de esta metodología ofrece una oportunidad de diagnóstico importante para trabajar con muestras a partir de material espermático proveniente de futuros sementales o sementales en función reproductiva.

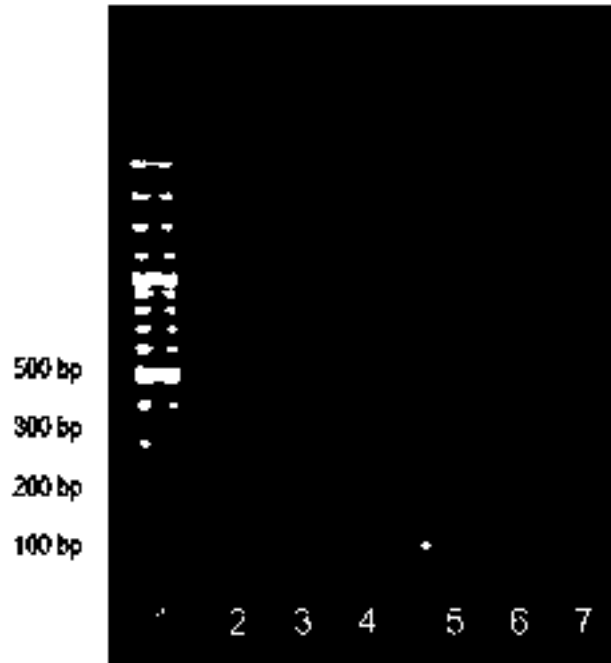


Figura 31. Perfil electroforético de amplificación de PCR especie específico de *C. fetus* en agarosa (1.5%). Carril 1: marcador molecular de 100 bp, Carril 2: gen 16S rRNA con DNA integro, Carril 3: gen 16S rRNA con DNA 1:10, Carril 4: control, Carril 5 gen *gltx1* con DNA integro, Carril 6: gen *gltx1* con DNA 1:10, Carril 7: control.

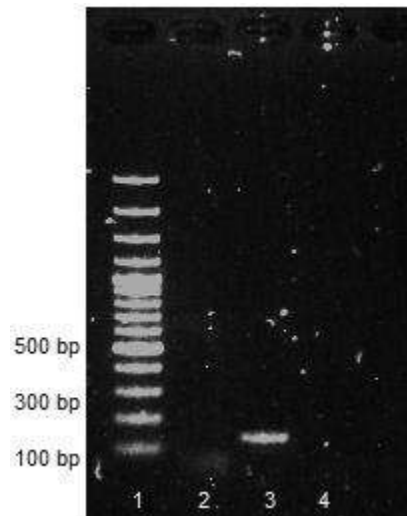


Figura 32. Perfil electroforético de amplificación de PCR de *M. tuberculosis* en gel de agarosa (1.5%). Carril 1: marcador molecular 100 bp, Carril 2: gen 16S rRNA con DNA 1:10, Carril 3: gen 16S rRNA con DNA integro, Carril 4: control..

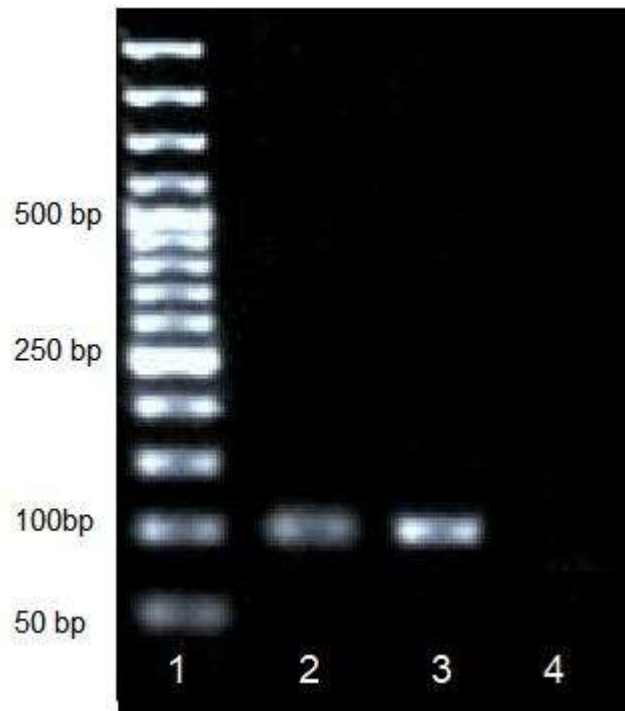


Figura 33. Perfil electroforético de amplificación de PCR especie específico de *M. tuberculosis* en gel de agarosa (1.5). Carril 1: marcador molecular 50 bp. Carril 2: gen *kasB* con DNA integro, Carril 3: gen *kasB* con DNA 1:10, Carril 4: control.

10.4 PCR tiempo real

A continuación, se observan los resultados de los ensayos de la estandarización de la PCR tiempo real, utilizando DNA de referencia de cada bacteria para cada gen seleccionado, en las Figuras 34, 35 y 36 se puede observar las curvas de amplificación para cada gen, estas curvas evidencian el funcionamiento del diseño de los primers y del protocolo realizado para cada reacción.

En las imágenes de cada reacción de PCR tiempo real se puede observar el número de ciclos en los cuales la fluorescencia se hace constante, los ciclos de amplificación son directamente proporcionales a la concentración de DNA, la visualización permanente de

la curva estándar de amplificación indica una correcta reacción, en este caso el correcto diagnóstico bajo esta metodología de las bacterias estudiadas.

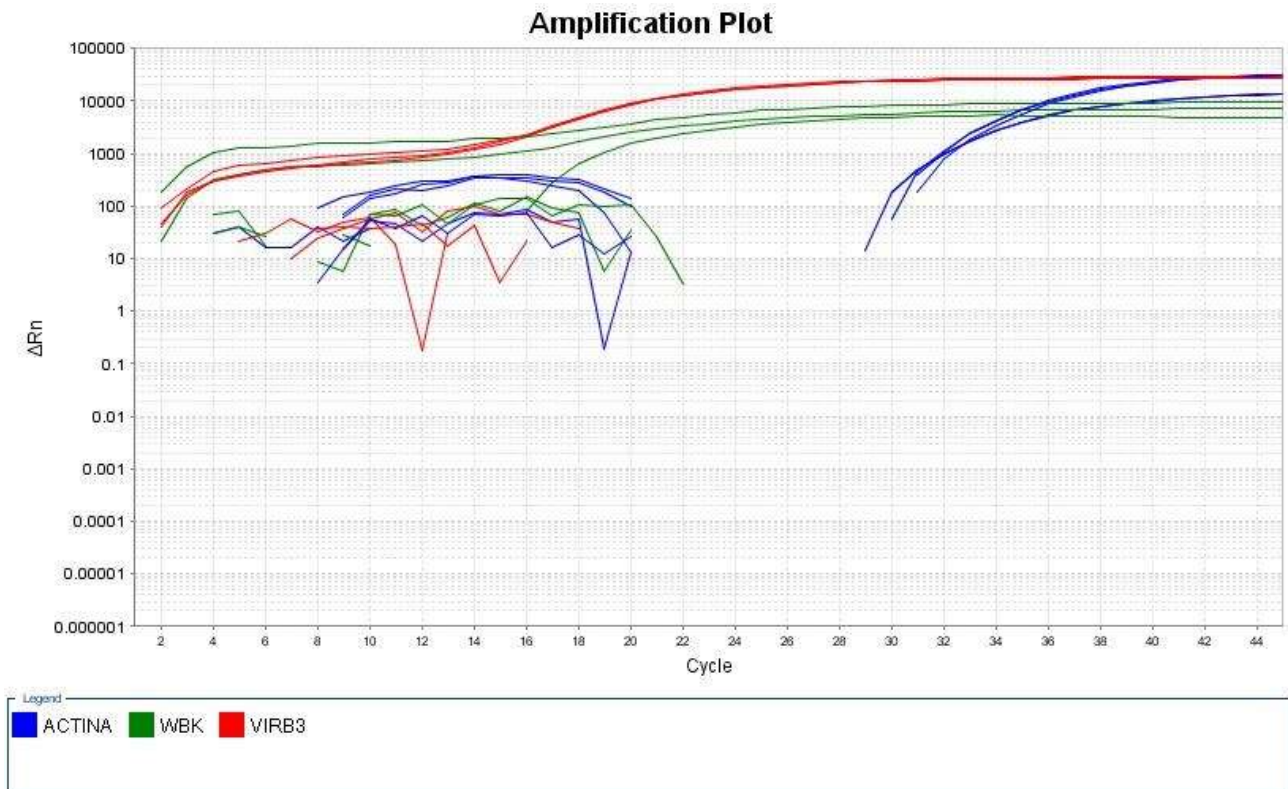


Figura 34. Curva de amplificación de *Brucella abortus*, en reacciones dúplex con los genes *wbkA* y *virB3* reacciones triplex adicionando actina bovina.

En la Figura 34 se observa la amplificación de los 3 genes en las 3 repeticiones de los controles positivos se utilizaron los genes *wbkA*, *virb3* y actina bovina, en las muestras donde se agregó el NTC o blanco no se mostró amplificación alguna, en los controles negativos solo amplifica la actina bovina, resultando con esto una correcta amplificación de todos los controles utilizados.

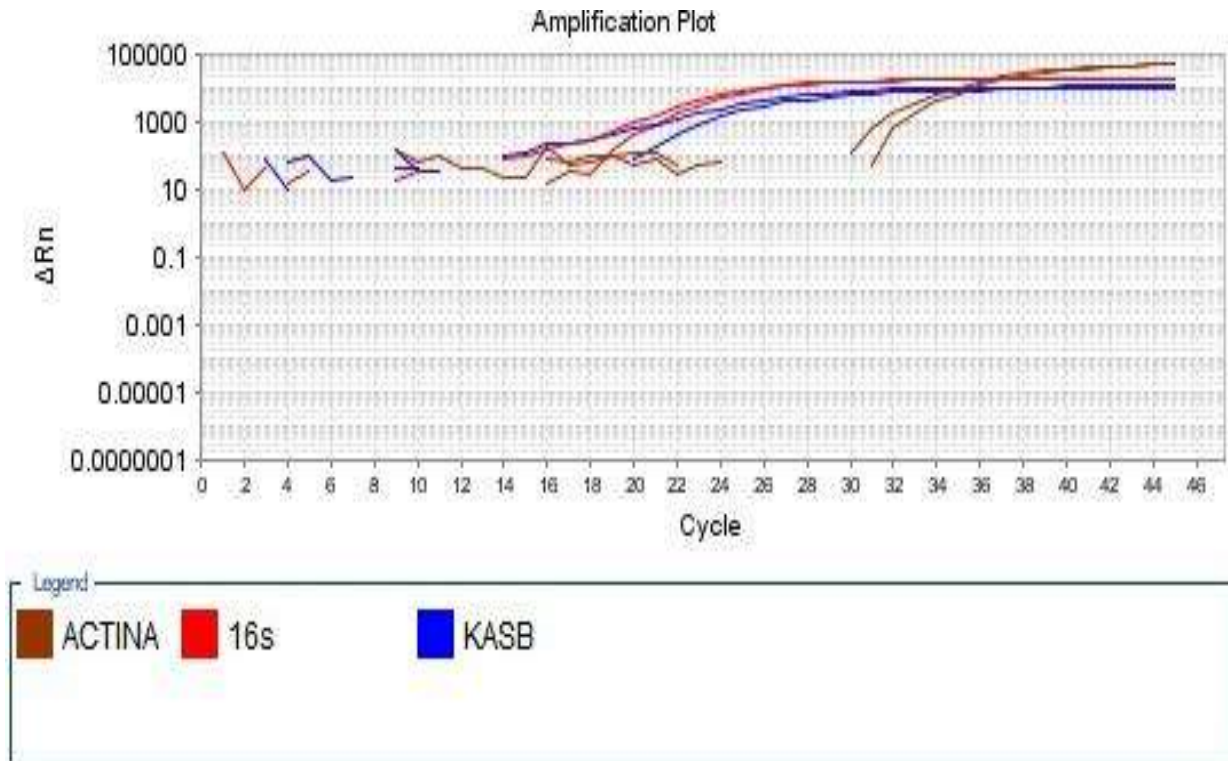


Figura 35. Curva de amplificación de *Mycobacterium tuberculosis*, en reacciones dúplex con los genes 16S rRNA y *kasB* y reacciones triplex adicionando actina bovina.

En los resultados de la estandarización de qPCR en la Figura 35 se puede observar la amplificación de los 3 genes seleccionados para *M. tuberculosis* en las tres muestras analizadas, en el control blanco o NTC se tiene un control correcto al no amplificar nada en las tres muestras agregadas al ensayo, en los controles negativos solo amplifica correctamente actina bovina.

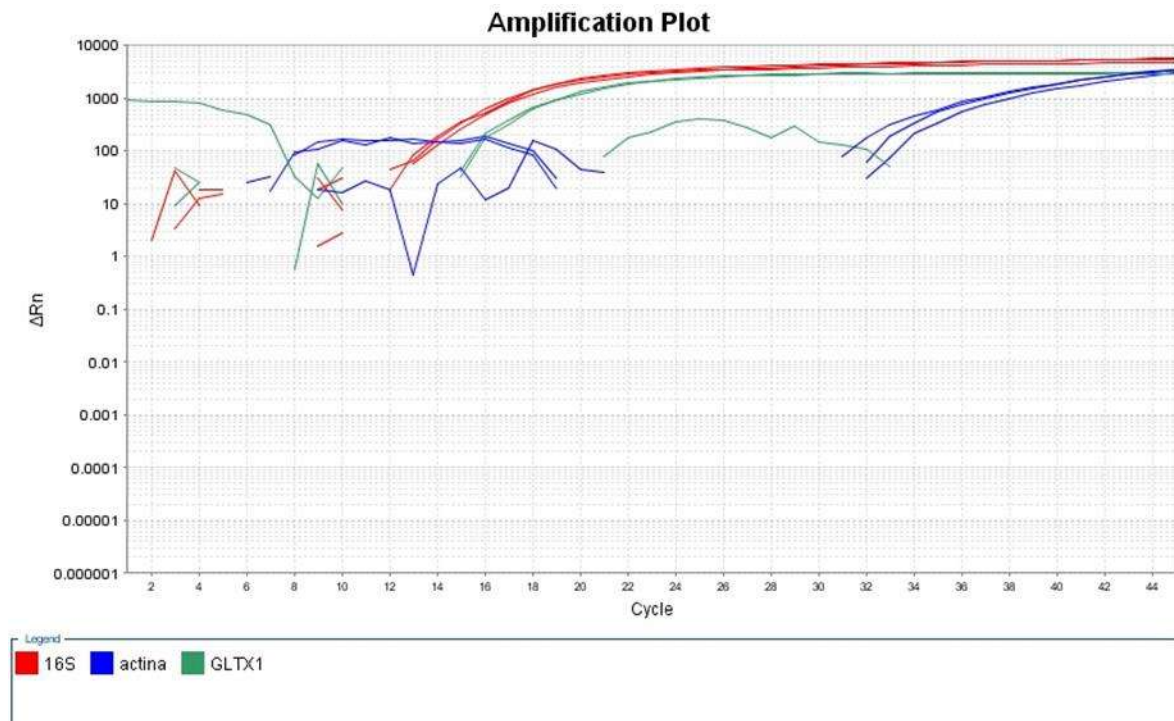


Figura 36. Curva de amplificación de *Campylobacter fetus*, en reacciones dúplex con los genes 16S rRNA y *gltx1* y reacciones triplex adicionando actina bovina.

En la Figura 36 correspondiente al ensayo estandarizado de qPCR para *C. fetus* se observa que en las 3 muestras de los controles positivos se tiene la amplificación de los 3 genes seleccionados, en las 3 muestras control no se tiene amplificación y en las 3 muestras de los controles negativos amplifica correctamente solo actina bovina.

En este trabajo ha sido desarrollado una técnica basada en PCR bajo dos modalidades distintas PCR punto final y qPCR, que puede ser útil en la detección de *B. abortus*, *C. fetus* y *M. tuberculosis*. Una vez estandarizada la técnica se puede observar que podría resultar de manera favorable en el diagnóstico rutinario de las enfermedades causantes por las bacterias seleccionadas en este estudio.

La metodología basada en PCR tiempo real ha conseguido mayor aceptación en este trabajo que la PCR punto final, porque además de ser más sensible y rápida, minimiza el riesgo de contaminación al realizar la qPCR en un solo paso

En nuestro país las enfermedades que afectan a los bovinos causadas por las bacterias *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus* y *Mycobacterium tuberculosis* sigue siendo un grave problema de salud animal y pública por la zoonosis que esta causa, su diagnóstico se ha vuelto difícil, por ello es importante contar con una prueba que apoye el diagnóstico rápido rutinario, el cual presenta muy baja sensibilidad y especificidad. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una metodología moderna utilizada en la detección del material genético de bacterias bajo distintas muestras clínicas, estando ampliamente difundida su utilidad en el diagnóstico de enfermedades infecciosas (Padilla y Ventura 2003).

11. CONCLUSIONES

En este trabajo se diseñó un método eficaz, capaz de detectar de forma rápida, directa y con mayor sensibilidad y especificidad los genes asociados a factores de patogenicidad de las bacterias *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus* y *Mycobacterium tuberculosis*, lo cual puede servir como una herramienta de control para las enfermedades que causan estas bacterias patógenas en el ganado bovino.

Los diseños de los primers y sondas realizados a partir de las secuencias de los genes seleccionados en esta investigación, resultaron ser eficaces para su uso mediante la PCR punto final como la PCR tiempo real (qPCR).

Las pruebas de PCR tiempo real (qPCR) resultaron ser hasta 10 veces más sensible al identificar muestras de 10 ng de DNA respecto a las pruebas mediante PCR punto final, en la cual se utilizaron 100 ng de DNA.

Es necesario seguir con la evaluación del diseño de primers bajo otras condiciones y sistema de trabajo, para seguir garantizando su correcto funcionamiento.

12. LITERATURA CITADA

Abalos, P., Retamal, P. (2004). Tuberculosis: ¿una zoonosis reemergente? *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 23(2):583-594

Alberto, O. (2002). Epidemiología y diagnóstico de la *Leptospira* bovina. *Revista ICA*. 29: 171-180.

Aguilar, R. F. (2015). Estudio de patógenos potencialmente transmitidas por vía seminal, en ovino manchego negro (*Ovis aries*), en relación con los baños de semen (tesis de posgrado) Universidad de Castilla-La Mancha.

Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Munive, M. G. R., Olvera, B. P., Cárdenas, M. E. C. (2014). PCR en tiempo real. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Ciudad de México: Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Vol. 4:35-45.

Amaru, R., Miguez, H., Peñaloza, R., Torres, G., Silvestre, J., Cuevas, H. (2006). DNA-UMSAgen, extracción de DNA genómico para diagnóstico molecular: método rápido y económico. *Cuadernos Hospital de Clínicas*, 11-51.

Arenas, N., Moreno, V. (2016). Estudio económico de la infección por *Brucella abortus* en ganado bovino en la región del Sumapaz, Cundinamarca. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 63(3).

Arieta-Román, R. D. J., Fernández-Figueroa, J., Menchaca-Peña, J. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 15 (5):1-8.

Ayulo, V., Dammert, O. (2001). Incidencia de la infestación con *Leptospira hardjo* en las ratas grises. *Revista de Medicina Veterinaria*, Vol. 6:93-100.

Bermúdez, V. (2006). Importancia del control de *Leptospira borg perteseni* serovar *hardjo* tipo *hardjo bovis* en el rebaño bovino. *Revista Venezuela Bovina* 22 (71):37-40

Bolívar, A. M. (2013). Metodología diagnóstica para hemoparásitos dentro de la ganadería bovina con énfasis en la reacción en cadena de la polimerasa y su variante

múltiple. *Revista de Salud Animal*, 35 (1):1-9.

Bove, R., López, F., Perera, C. (2015). Diagnóstico y control de campylobacteriosis genital bovina. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria de Uruguay. Vol. 1:1-28.

Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8):601-608.

Brito, T. D. M., Reinoso, C. N. Y. (2017). *Evaluación cuali-cuantitativa de semen colectado con electroeyaculador (EE) de toros tratados con y sin tranquilizante* (Tesis de licenciatura) Universidad de Cuenca, Ecuador.

Bustamante Sánchez, J., Salazar Hernández, F., Díaz Aparicio, E., Manzano Cañas, C., Pérez González, R., Hernández Andrade, L. (2000). Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de brucella abortus. *Técnica Pecuaria en México*, 38 (1):35-42.

Buttler, J.M. (2001). Forensic DNA Typing. Biology & Technology behind STR Markers. San Diego: Academic Press.

Campero, C. M. (2000). Las enfermedades reproductivas en los bovinos: ayer y hoy. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Argentina. Vol. (54):86-114.

Campos, V., Pérez, M., Córdova, A. (2010). Evaluation of the economic losses of events associated with reproductive failure. *Revista Científica FCV*, XX:190–195.

Castillo, L. O., Ramírez, J. M. (2011). Detección de *Leptospira santarosai* y *Leptospira kirschneri* en bovinos. *Revista Electrónica de Veterinaria*. Vol. (7).

Castro, H. A., González, S. R., Prat, M. I. (2005). Brucelosis: una revisión práctica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(2): 203-216.

Chenna, R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T.J., Higgins D.G., Thompson J.D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*. 31:3497-3500

Chiapparrone, M. L., Soto, P., Catena, M. (2016). Characterization of the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* adhesion to bovine sperm cells. *International Journal of Morphology*, 34(4):1419-1423.

Colazo, M. G., Mapletoft, R. J. (2017). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria*, 9(1):20-37.

Conigliaro, A. S. (2003). Enfermedades de la reproducción bovina. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Tomo LVII.

Coromoto, A., Valle, A. (2007). Epidemiología de leptospirosis bovina en sistemas ganaderos de doble propósito. *Revista Zootecnia Tropical*. (3):193-196.

Cortazar, M. A., Silva, R. E. P. (2004). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (2):1-40.

Del Valle, C., Rodríguez, A., Espinoza, M. 2004. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. *Revista de Biología Tropical*, 52(3):717-725.

De Ruigh, L., Bosch, J.C., Brus, M.C., Landman, B., Merton, J.S. (2006). Ways to improve the biosecurity of bovine semen. *Reproductions in Domestic Animals*. 41:268-274.

De Ward, J. (2005). Tuberculosis bovina. *Manual del Ganadería Doble Propósito. Ediciones Astro Data, SA Maracaibo, Venezuela*, 364-369.

Díaz-Aparicio, E. (2013). Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Revista Científica y Tecnológica Organización Mundial de Salud Animal*, 32(1):43-51.

Durviz, S.L. (2008). Kit extracción DNA SSS. REAI. RBME1L/ RBMEq2.5 pp.

Eaglesome, M. D., Sampath, M. I., García, M. M. (1995). A detection assay for *Campylobacter foetus* in bovine semen by restriction analysis of PCR amplified DNA. *Veterinary Research Communications*; 19:253-263.

Ellis, W. A., Songer, J. G., Montgomery, J., Cassells, J. A. (2006). Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *Veterinary Record*. 118:11-13.

Estrada-Chávez, C., Otero, F. D., Díaz, C. A., Villegas-Sepúlveda, N., González, R. P., Salazar, D. G. (2004). Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Veterinaria México*, 35(3):225-236.

Etcheverry, M. (2012). Situación y evolución del mercado de la genética bovina en la Argentina y el mercado internacional. *Cámara Argentina de Biotecnología de la Reproducción e Inseminación Artificial. Jornada CABIA*, 40.

Evangelista, T., Nielsen, K., Licea Navarro, A., Montañó Gómez, M., Moreno Rosales, J. (2003). Evaluación de un programa de control de la brucelosis bovina en hatos lecheros de Baja California. *Técnica Pecuaria en México*, 41 (3):275-282.

Fort, M.C., Esaín, F. H., Pérez, L. R. (2003). El control de la Campylobacteriosis genital bovina en cinco departamentos de la provincia de La Pampa durante el período 2000-2003. EEA INTA. Publicación Técnica N° 58 5.

Galina, C., Valencia, J., (2009). Inseminación artificial en el bovino. México D.F. 2 ed. Limusa 12 (2):217-219.

Galván, J. C., Pérez, J. R., Rodríguez, J. M. A. (1992). Tuberculosis bovina. Clínica y lesiones. *Bovis*, (47):43-54.

García-Martínez, A., Albarrán-Portillo, B., Avilés-Nova, F. (2015). Dinámicas y tendencias de la ganadería doble propósito en el sur del Estado de México. *Agrociencia*, 49(2):125-139.

Giraldo, J. J. (2007). Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Revista Lasallista de Investigación* (12):51-57.

González Altamiranda, E. A., Kaiser, G. G., Odeón, A. C. (2015). EL rol de las biotécnicas de reproducción asistida en la transmisión del virus de la diarrea viral bovina. *Investigación Veterinaria*, 17(1):35-45.

González, M. T., Ríos, R. R., Mattar, V. S. (2007). Prevalence of bacteria associated with infectious infertility in bovines of Montería, Colombia. Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia de Córdoba*, 12(2):1028-1035.

Gottschalk, M., Taylor, D. J. (2006). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Diseases of swine*, 9(33):563-576.

Guzmán-Hernández, Rosa Lilia, Contreras-Rodríguez, Araceli, Ávila-Calderón, Eric Daniel, & Morales-García, M. Rosario. (2016). Brucellosis: a zoonosis of importance in Mexico. *Revista Chilena de Infectología*, 33(6):656-662.

Heinemann, M. B., García, J. F., Nunes, C. M., Gregori, F., Higa, Z. M., Vasconcellos, S. A., Richtzenhain, L. J. (2000). Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Microbiology* 73:261-267

Herazo, Y. C. R. (2013). Métodos de identificación bacteriana y sus aplicaciones en la investigación odontológica. *Duazary: Revista Internacional de Ciencias de la Salud*, 7(2):247-256.

Herthnek, D., Englund, S., Willemsen, P. T. J., Bölske, G. (2006). Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 100:1095-1102.

INEGI Encuesta Nacional Agropecuaria 2015.

<http://www.inwgi.org.mx/est/contenidos/proyectos/encuestas/agropecuarias/ena/ena201>

4/

Jorge, M. C., Catena, M., Cabodevila, J., Soto, P. (1998). Micobacterias en semen bovino criopreservado. *Veterinaria Argentina*, 145:337-340.

Junco, D. R., Rodríguez, P. C. (2001). Cultivo y crecimiento de los microorganismos. Microbiología y parasitología médica. Edit. 1. Cap. 7.

Loffler, S. G., Rago, V., Martínez, M., Uhart, M. (2015). Isolation of a Seawater Tolerant *Leptospira* spp . From a Southern Right Whale (*Eubalaena australis*). *PloS One* 10 (12):1–10.

Luna Álvarez, M. Á., Moles y Cervantes, L. P., Gavaldón Rosas, D., Nava Vasquez, C., Salazar García, F. (2005). Estudio retrospectivo de seroprevalencia de leptospirosis bovina en México considerando las regiones ecológicas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 57(1):28-31.

Madrid-Bury, D. (2014). Reproducción asistida en los animales domésticos. *Revista Científica*, XXIV (1):7-9.

Maia, T. C., Gomez M. R. (2014). Estudio de mecanismos de la inmunidad innata en la patogénesis de la *Leptospira* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata.

Mark, A. (2005). Diagnóstico de causas infecciosas de aborto bovino. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 54: 24-27.

Martínez-Vázquez, I. O., Becerril-Montes, P., Flores-Brioned, M., Morales-Loredo, A. (2000). Diagnóstico simultáneo de brucelosis y tuberculosis mediante PCR-Multiplex. *Bioquímica*, 25(2).

Medina-Robles, V., M., Sanchez-Carvajal, E., Velasco-Santamaría, Y., M., Cruz-Casallas, P., E. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelacion por medio un sistema de análisis espermático asistido por computadora (CASA). *Revista ORINOQUIA*, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Meta, Colombia. Volumen 1- N^o 1.

Monforte, J. M., Arjona, G. R., González, J. M. (2006). Los sistemas de doble propósito y los desafíos en los climas tropicales de México. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal*, 14(3): 105-114.

Morales, S. C., Cabrera, V. P., Pantoja, A. C., García, I. D., Solís, Ch. N. (2013). Evaluación de la carga bacteriana en pajillas de semen congelado de toros del banco nacional de semen. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú. 10 (1).

Moreno, L., Pimentel, S., Mederos, A., Carracelas, B., Galarraga, D., Lopez, F., Bove, R. (20014). Capylobacteriosis genital bovina: importancia del monitoreo previo al entore. Programa Nacional de Produccion de Carne y Lana. Revista INIA-No 38: 1-5.

Morillo, M., Salazar, S., Castillo, E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas*, :30-44.

Nieto, R. J., Ramos, G. L., Motte, D. E. (2005). Extracción y purificación de ADN de *tectona grandis* L. para su empleo en la técnica RAPD. *Forestal Veracruzana*, 7 (2): 1-6.

Ochoa, J. E., Sánchez, A., Ruiz, I. (2000). Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 7: 325-331.

Olivera, M., Giraldo, C. A., Di-Lorenzo, C. (2011). Identificación por PCR de *Brucella canis* en sangre y leche canina: Reporte de un caso. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43(3):, 295-298.

OMS. (2008). Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Retrieved from <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/guia-esp.pdf>

Padilla, R. C., Montoya, P. Y., Carrillo P. C. (2003). Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella* sp.. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 20(2): 102-104.

Padilla, R. C., Ventura, E. G. (2003). Diseño y estandarización de una prueba de PCR para el diagnóstico de la Bartonelosis causada por *Bartonella bacilliformis*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 20(1): 5-8.

Palmer, C. W., Brito, L. F., Arteaga, A. A., Soderquist, L., Persson, L., Barth. A. D. (2005). Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Animal Reproduction Science* 87:25-31.

Palomino-Martorell, H. (2000). *Biotecnología del trasplante y micromamipulación de embriones de bovinos y camélidos de los Andes*. 10: 35.

Pérez, J. R., de Mendoza Salcedo, J. H., Galván, J. C. (1992). Tuberculosis bovina. Patogenia. *Bovis*, (47): 35-42.

Pérez, L. L., Dahbi, G., Álvarez, M. B., Álvarez, J. E. B., Álvarez, J. B., Blanco, F. L. (2009). Application of molecular techniques in the characterization of escherichia coli isolates from pigs with diarrhoeic syndrome in Villa Clara. *Revista de Salud Animal*, 31(2): 93–104.

Prado, E. A. S., Pérez, R. M. (2005). Flora bacteriana del semen de toro antes e después de la congelación. *Rev. Electrónica. Veterinaria*, 6: 1-8.

Ramirez, W., Montañez, J. (2001). Manual de enfermedades infecciosas. 1: 139-187.

Repiso, M. V., Gil, A., Bañales, P., D'Anatro, N., Fernández, L., Guarino, H., Herrera, B., Nuñez, A., Olivera, M., Osawa, T. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria Montevideo*, 40(157): 5-28.

Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M. I., Ferreira De Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1): 31–38.

Rivera, H. (2001). Causas frecuentes de aborto bovino. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2): 117-122.

Rivera, P., Gimenez, F. J. (2010). La Tuberculosis Bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. *Revista Electrónica De Veterinaria*, 11(9).

Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C. N., Ayala-Labarríos, L. A., Rocha-Revilla, J. C., Padilla-García, V., Espinoza-Hernández, T. C. (2009). Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. Publicaciones de la coordinación de estudios de posgrado e investigaciones de la facultad de ciencias químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. 1 (1)

Rodríguez, I., Barrera H., (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL, 7:323-35.

Rossanigo, C. (1998). Las enfermedades venéreas en los rodeos de cría; prevalencia, diagnóstico y control. Medicina Veterinaria 1(2): 22-24.

Ruiz de Castañeda, M. (1961) Laboratory diagnosis of brucellosis in man. Bull WHO; 24: 73.

Ruiz, S. B., Rojas, M. R., Mendoza, N. P. 2010. Extracción de ADN de semen bovino congelado. Chiapas, México. (1): 19.

SAGARPA. (2012). Plan estratégico de la campaña nacional contra la tuberculosis bovina 2008-2012.

SAGARPA (2015). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/poblacion-ganadera>.

Samartino, L. E. (2008). Epidemiología de leptospirosis humana y animal. Buenos Aires, Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 71: 290-294.

Sharrocks, A. D., Shaw P. E. (1991). Improved primer design for PCR-based, site directed mutagenesis. Nucleic Acids Research. 19: 4558.

Siqueira, J. F., Rocas, I. N. (2003) Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 96(2): 215-22.

Speciale, J. (2006). Prevalencia de varias entidades patológicas en ganado lechero. Revista ICA. 14(2):73-79

Suarez, G. F., Arellano, R. B., Díaz, A. E. (2012). Brucelosis: importancia en la salud pública y el ámbito pecuario, su control y diagnóstico. UNAM, CENID-Microbiología, INIFAP SAGARPA. (1).

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Tecnología de la Salud, 2 (2): 70-78

Tous, M. G., Ríos, R., Mattar, S. (2007). Prevalencia de bacterias asociadas a la infertilidad infecciosa en bovinos de Montería, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 12(2): 1028-1035.

Tovar Arias, C. C. (2017). *Estandarización de un protocolo para la detección molecular de campylobacter fetus en toros reproductores* (Tesis de licenciatura) Universidad de las Américas, Quito, Ecuador.

Valera, Y. R., Sánchez, W. R., Sánchez, G. A., Pérez, F. (2005). Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 6(9): 1-9.

Wilson, K., (1990). Preparation of genomic DNA from bacteria. In: *Current protocols in molecular biology* (Ausubel FM and Brent R, Eds.). Greene Publ. Assoc. and Wiley Interscience, New York. : 241-245.

Xolapa, C. V. M., Pérez, R. M., Córdova, I. A. (2010). Evaluation of the Economic Losses of Events Associated With Reproductive Failure in female bovine brucellosis and dairy farms of Tizatuca, Hidalgo, Mexico. Departamente de Produccion Agricola y Animal. Universidad Autonoma Metropolitana. *Revista Científica FCV*, (20): 190–195.