



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Interna

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PCR EN
TIEMPO REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE
COPIAS DE ADN DE *Brucella melitensis* EN SANGRE DE
PACIENTES CON BRUCELOSIS**

TESIS DOCTORAL

María Elena Navarro García

MADRID 2009



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Interna

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PCR EN
TIEMPO REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE
COPIAS DE ADN DE *Brucella melitensis* EN SANGRE DE
PACIENTES CON BRUCELOSIS**

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Francisco Arnalich Fernández

Dr. Javier Solera Santos

DOCTORANDO:

María Elena Navarro García

MADRID 2009



D. Francisco Arnalich Fernández, Catedrático de Medicina Interna de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Sección de Medicina Interna del Hospital Universitario La Paz, y **D. Javier Solera Santos**, Jefe de Servicio de Medicina Interna del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete y Profesor Asociado de Medicina de la Universidad de Castilla La-Mancha,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado: “**Desarrollo de un sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación del número de copias de ADN de *Brucella melitensis* en sangre de pacientes con brucelosis**”, ha sido realizado bajo nuestra dirección por D^a **María Elena Navarro García** en la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete y consideramos que reúne los requisitos necesarios de calidad y rigor científico para que pueda ser defendido en la Universidad Autónoma de Madrid y optar al grado de Doctor por dicha Universidad.

Madrid, a 1 de Junio de 2009

Fdo.: Francisco Arnalich Fernández

Fdo.: Javier Solera Santos

***A Juan Carlos y a mis hijos Marta y Jesús,
por su paciencia, ayuda y estímulo.
Ellos lo son todo para mí.***

A mi familia.

***«Una teoría puede probarse mediante experimentos;
pero no hay ningún camino que conduzca
de los experimentos a la teoría.»***

Albert Einstein

Agradecimientos

... he aquí la parte de la tesis que más trabajo me ha costado escribir. Por varios motivos, porque será la parte más leída y porque seguro que me olvidaré de alguien y lo lamentaré. Agradezco,

Al Dr. Javier Solera Santos y al Dr. Francisco Arnalich, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis y por haber confiado en mí.

Al Dr. Julio Escribano, quien me introdujo en el mundo de la investigación y del que aprendí que en el laboratorio hay que ser riguroso, ordenado y constante.

A todos los clínicos, ATS y auxiliares de las Consultas Externas de Medicina Interna del Hospital General Universitario de Albacete (CHUA) y del Hospital de Hellín (Albacete), así como a los de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del CHUA, que durante estos años han recogido las muestras y han hecho el seguimiento de los pacientes con brucelosis.

A todos los voluntarios que participaron en los estudios, sin cuya generosa participación no hubiéramos podido ni empezar.

A la Dra. Beatriz Cabot, Especialista de Aplicaciones de Biología Molecular de la empresa Applied Biosystems, su ayuda y consejos técnicos sobre PCR cuantitativa en tiempo real han sido esenciales para iniciar este trabajo.

A la Dra. Lourdes Gómez, por su ayuda y consejos técnicos cuando lo he necesitado.

A la Dra. Dolores García Olmo, Lola, porque durante muchos años fue mi compañera de tertulia y juntas hemos compartido los momentos de euforia y decepción que conlleva el trabajo del laboratorio. Gracias, por enseñarme a lidiar con los proyectos de investigación y con la burocracia de los papeles.

Al Dr. Carlos de Cabo por ayudarme en esas tediosas traducciones.

A María Jesús, compañera anhelada durante años. Juntas hemos afrontado buenos y malos momentos en el laboratorio y hemos charlado durante muchas horas. Gracias por tu continuo apoyo y por leer de forma exhaustiva esta memoria.

A Ana Isabel Prieto, ese torbellino salmantino, que me ha demostrado su apoyo y amistad a lo largo de estos años.

A Jose, un Cartagenero, al que agradezco de corazón su ánimo y apoyo en uno de los peores momentos de los últimos años. Espero que te vaya bien en tu nueva aventura en Barcelona.

A Trini, gracias a su capacidad de trabajo, todo va viento en popa. Gracias por tener siempre una sonrisa, aun en los peores días.

A todos los compañer@s de la Unidad de Investigación, a los de ayer, Esperanza, Jesús, Cristina, Rocío, Vanesa, Julia, Ana, Carmencita y Antonio, y a los de hoy María, Gelu y Pedro con quienes encontré el apoyo para seguir la travesía emprendida y por haber hecho más agradable el trabajo cotidiano, gracias.

He dejado para el final a la persona más importante de mi vida, Juan Carlos. Gracias por tu apoyo y comprensión en esos momentos tan difíciles que hemos vivido juntos. Gracias por animarme a redactar esta Tesis Doctoral. Como dijo Groucho Marx: "El mejor banquete del mundo no merece la pena ser comido a menos que se tenga a alguien con quien compartirlo". Gracias por compartir tu vida conmigo y por hacerme feliz.

Dedicatorias

A mis padres, Chari y Felipe, gracias de todo corazón por vuestro cariño, comprensión y apoyo incondicional. Por la educación que me habéis dado, no sólo en el ámbito académico, sino también en el personal. Gran parte de lo que soy os lo debo a vosotros. Estoy segura que él intentará leer este trabajo.

A mi hermana, Charo, por su amistad y momentos vividos, aún en la distancia. Espero que pronto vuelvas a ser tu misma.

A M^a Carmen, mi segunda madre, Paco, Bea, Fran y Toñin por ser como son.

A Mari, Segura (Q.E.P.D.), Lola, Inés y Paco, por hacerme sentir como en casa.

A Petra, que pronto vuelva a ser la de siempre. Con el paso del tiempo verás como no te acuerdas de los malos momentos.

A Consuelo Ocaña, por ser una segunda madre para mis hijos.

A Ángela, Raquel, Lourdes y Julia, las chicas de VITAB Laboratorios, cada una aporta a su modo una pieza del puzzle.

A mis amigas de “toda la vida”. Gracias por estar siempre a mi lado. A pesar de vernos poco, cuando nos reunimos nos seguimos riendo como siempre.

A los pequeños de la familia Felipe, Marta, Carmen, Jesús y Paula espero que en un futuro valoréis este trabajo.

Gracias a todos.

El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en la Unidad de Investigación del Hospital General Universitario de Albacete, bajo la dirección del Dr. Francisco Arnalich Fernández y del Dr. Javier Solera Santos, gracias a una beca de la Consejería de Sanidad de la Junta de Comunidades de Castilla La-Mancha (JCCM) para Investigadores Expertos (IE03/003), y a los proyectos de investigación PI-01/069 de la JCCM y a la Red Temática: “Red para la investigación de la Brucelosis”(G03/204) financiado por el Fondo de investigación Sanitaria.

ÍNDICE

A. <u>RESUMEN</u>	1
B. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
1. Historia de la enfermedad.....	4
2. Taxonomía.....	7
3. Etiología.....	8
4. Características genéticas.....	11
5. Epidemiología.....	12
6. Patogenia.....	14
7. Respuesta inmune.....	16
8. Diagnóstico.....	19
8.1. Diagnóstico bacteriológico o microbiológico.....	19
8.2. Diagnóstico serológico.....	20
8.2.1. Rosa de Bengala.....	21
8.2.2. Seroaglutinación en tubo o placa con pocillos (SAT).....	22
8.2.3. Prueba de Coombs anti- <i>Brucella</i>	23
8.2.4. Aglutinación con 2-mercaptoetanol o ditiotreitól	23
8.2.5. Fijación del complemento.....	24
8.2.6. Enzimoimmunoensayo (ELISA).....	24
8.2.7. Inmunofluorescencia.....	25
8.2.8. Dipstick.....	26
8.2.9. Brucellacapt.....	26
8.2.10. Pruebas de precipitación en gel.....	27
8.2.11. Ensayo de flujo para la detección de anticuerpos IgM e IgG.....	28
8.3. Diagnóstico molecular.....	30
8.3.1. Antecedentes.....	31
8.3.2. PCR en tiempo real.....	32
8.3.2.1. Definición.....	32
8.3.2.2. Ventajas de la PCR en tiempo real.....	32

8.3.2.3. Mecanismos de detección.....	35
8.3.2.3.1. No específicos.....	38
8.3.2.3.2. Específicos.....	41
8.3.2.3.2.1. Sondas de hidrólisis.....	41
8.3.2.3.2.2. Sondas de hibridación.....	42
8.3.2.3.2.2.1. Sondas adyacentes.....	42
8.3.2.3.2.2.2. Sondas/Cebadores Horquillas.....	44
8.3.2.3.2.2.2.1. Sondas Molecular Beacon.....	44
8.3.2.3.2.2.2.2. Sondas “Scorpions”.....	45
8.3.2.3.2.2.2.3. “Sunrise™ Primers”.....	46
8.3.2.3.2.2.2.4. LUX™ fluorogenic primers.....	47
8.3.2.3.2.2.3. Sondas con MGB.....	48
8.3.2.3.2.2.4. Análogos de ácidos nucleicos	52
8.3.2.3.2.2.4.1. PNAs.....	52
8.3.2.3.2.2.4.2. LNAs.....	53
8.3.2.4. Instrumentación.....	55
8.3.2.5. Análisis de los datos.....	58
8.3.2.5.1. Amplificación/detección de ADN/ARN diana	58
8.3.2.5.1.1. Curvas de amplificación.....	58
8.3.2.5.1.2. Ciclo umbral (Ct).....	59
8.3.2.5.2. Multiplex o PCR múltiple.....	61
8.3.2.5.3. Cuantificación del ADN o ARN diana	61
8.3.2.5.3.1. Cuantificación absoluta.....	61
8.3.2.5.3.2. Cuantificación relativa.....	63
8.3.2.5.4. Análisis de curvas de disociación.....	65
8.3.2.6. Aplicaciones de la PCR en tiempo real.....	67
8.3.2.6.1. PCRtr en microbiología clínica.....	68
C. <u>OBJETIVOS</u>	71

D. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	73
1. MATERIAL	
1.1. Especies y cepas bacterianas.....	74
1.2. Pacientes y muestras clínicas.....	76
1.2.1. Pacientes y muestras clínicas.....	76
1.2.2. Grupo control.....	76
1.3. Material utilizado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	77
1.3.1. Material para la extracción y cuantificación de ADN.....	77
1.3.2. Material para la amplificación de ADN.....	78
1.3.3. Material para clonar el fragmento de 251 pb de <i>Brucella</i> <i>melitensis</i>	79
1.3.4. Material para electroforesis.....	80
1.3.5. Material general de laboratorio.....	80
2. MÉTODOS	
2.1. Hemocultivos y métodos serológicos.....	81
2.2. Extracción del ADN a partir de cepas bacterianas.....	81
2.3. Extracción del ADN a partir de muestras clínicas.....	81
2.3.1. QIAamp® DNA Blood Midi Kit (QIAGEN).....	82
2.3.2. UltraClean™ DNA BloodSpin™ Kit (MoBio).....	82
2.4. Clonaje y secuenciación del producto amplificado.....	83
2.4.1. Extracción del fragmento amplificado del gel de agarosa TBE.....	83
2.4.2. Construcción del plásmido recombinante con el vector pGEM-T® Easy.....	84
2.4.3. Transformación en células competentes <i>E. coli</i> JM109 Hight Efficiency.....	84
2.4.4. Selección de colonias transformantes: Colony-PCR.....	85
2.4.5. Extracción del plásmido recombinante.....	86
2.4.6. Secuenciación.....	87
2.5. Construcción de la curva estándar.....	87
2.5.1. Cálculos moleculares.....	87
2.5.2. Curva estándar.....	88
2.5.3. Cálculo del número de copias.....	88

2.6. Ensayos de PCRs.....	89
2.6.1. PCR estándar.....	89
2.6.2. PCR en tiempo real cuantitativo.....	89
2.6.2.1. Ttr-ABI Prism®.....	89
2.6.2.2. Ttr-LightCycler®.....	90
2.6.3. Controles positivos y negativos.....	90
2.6.4. Medidas para evitar y controlar las contaminaciones en la PCR...	90
2.7. Análisis estadístico.....	91
E. <u>RESULTADOS</u>	92
1. Diseño de cebadores y sonda	94
2. Optimización de la PCRQ	95
2.1. Ttr-ABI Prism®.....	95
2.2. Ttr-LightCycler®.....	97
3. Especificidad de los cebadores y sonda.....	100
3.1. Ttr-ABI Prism®.....	101
3.2. Ttr-LightCycler®.....	103
4. Sensibilidad.....	103
4.1. Ttr-ABI Prism®.....	103
4.2. Ttr-LightCycler®.....	104
5. Clonación del fragmento de 251pb de <i>B. melitensis</i> en pGEM-T® Easy.	105
6. Construcción de la curva estándar.....	106
6.1. Ttr-ABI Prism®.....	106
6.2. Ttr-LightCycler®.....	108
7. Reproducibilidad en el Ttr-LightCycler®.....	110
8. Grupo control.....	111
8.1. ABI Prism 7000®.....	111
8.2. LightCycler®.....	111

9. Valoración de la PCRtrQ en el diagnóstico.....	112
9.1. Características de los pacientes.....	112
9.2. Cuantificación del número de copias de ADN de <i>B.melitensis</i> en sangre	114
9.2.1. Grupo de pacientes que no recidivó.....	115
9.2.1.1. Ttr-ABI Prism®.....	116
9.2.1.2. Ttr-LightCycler®.....	116
9.2.2. Grupo de pacientes que recidivó.....	117
9.2.2.1. Ttr-ABI Prism®.....	118
9.2.2.2. Ttr-LightCycler®.....	119
9.3. Sensibilidad de la PCRQ, hemocultivos y métodos serológicos.....	119
F. <u>DISCUSIÓN</u>	122
1. Cebadores y sonda TaqMan	123
2. Extracción de ADN de muestras clínicas.....	124
3. Condiciones de la PCR en tiempo real para la amplificación del ADN de <i>B. melitensis</i>	126
4. Sensibilidad analítica y especificidad de la PCR en tiempo real.....	127
5. Curva estándar, eficiencia y reproducibilidad.....	131
6. Grupo control.....	133
7. Cuantificación del número de copias de ADN de <i>B. melitensis</i> en sangre mediante PCRtrQ	135
8. Diferencia en la sensibilidad clínica de los dos métodos de PCRtrQ.....	138
9. Comparación de la PCRtrQ con los métodos serológicos y el hemocultivo....	138
G. <u>CONCLUSIONES</u>	141
H. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	143
I. <u>ANEXOS</u>	168
i. Abreviaturas.....	169
ii. Índice de figuras.....	172
iii. Índice de tablas	174
iv. GenBank, nº acceso AE009555.....	175
v. BLAST.....	181
vi. Publicaciones.....	192

A. RESUMEN

La brucelosis humana es una zoonosis causada por bacterias gram-negativas, intracelulares facultativas, del género *Brucella*. Actualmente, el diagnóstico de la brucelosis se realiza mediante hemocultivos y pruebas serológicas. El hemocultivo es considerado el “*gold standard*”, para el diagnóstico de la brucelosis, aunque su sensibilidad varía desde un 30% al 90%, en casos de brucelosis con focalidad y en casos agudos, respectivamente. Su manipulación supone un riesgo de infección para el personal de laboratorio. En cuanto a las pruebas serológicas la dificultad estriba en la interpretación de los resultados en casos crónicos y en las recidivas. Desde que se publicó, a principios de la década de los noventa, el primer estudio sobre la detección de *Brucella* mediante PCR estándar, se ha producido un gran desarrollo en el diagnóstico molecular, pero no existe un procedimiento estandarizado para el diagnóstico de la brucelosis mediante PCR. En los últimos años, se ha desarrollado la PCR en tiempo real (PCRtr) que ofrece numerosas ventajas pues permite cuantificar la carga bacteriana, reduce el tiempo de ejecución del ensayo y aumenta la sensibilidad y especificidad con respecto a la PCR estándar. Además, no requiere la manipulación de los productos de PCR reduciendo, por ello, el riesgo de contaminación y la aparición de falsos positivos. El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar una técnica de PCRtr que nos permita detectar y cuantificar ADN de *Brucella melitensis* en sangre de pacientes con brucelosis, y valorar esta técnica como método diagnóstico, tanto, en el momento del diagnóstico como en la recidiva. Se ha puesto a punto esta metodología en dos termocicladores en tiempo real (Ttr), ABI Prism® y LightCycler®. La especificidad clínica en el Ttr-ABI Prism® y en el Ttr-LightCycler® ha sido de 96.7% y 97.8%, respectivamente. La sensibilidad clínica en el Ttr-ABI Prism® ha sido del 43.3%, y, se ha desestimado este ensayo como método de diagnóstico. En el Ttr-LightCycler® la sensibilidad clínica ha sido del 100%. Este método detecta y cuantifica el ADN de *Brucella melitensis* en muestras de sangre de pacientes con brucelosis en el momento del diagnóstico, del tratamiento y de la recidiva, tanto clínica como microbiológica. La metodología desarrollada en este trabajo utilizando el Ttr-LightCycler® es una técnica rápida, sensible y específica, con un gran potencial en el diagnóstico de la brucelosis. No obstante, hay que hacer hincapié en que esta potente metodología sólo será útil si, después de validar un método de PCRtrQ, los laboratorios de microbiología clínica participan en programas de control de calidad coordinados por laboratorios de referencias nacionales o internacionales.

Descriptores: PCR en tiempo real, diagnóstico, brucelosis, *Brucella melitensis*, sangre.

B. INTRODUCCIÓN

1. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad fue descrita, en 1860, por un cirujano de la armada británica llamado Martson, pero fue David Bruce, médico de 28 años de la base naval de la isla de Malta, quien cultivó en 1887 un micrococo del bazo de cuatro soldados fallecidos al que denominó *Micrococcus melitensis*, en honor a Melita nombre con el que los romanos habían bautizado a la isla de Malta, nombrando a la enfermedad por primera vez con el nombre de fiebre mediterránea. En 1897, M.L. Hughes, miembro del servicio médico de dicha armada, hizo una posterior descripción clínica de la enfermedad, y la catalogó de fiebre ondulante. A finales del siglo XIX la brucelosis fue una infección devastadora para las fuerzas británicas en el Mediterráneo, el número de muertos por enfermedad ascendió a 75.000 por año.

En 1904 se constituyó la Comisión de la fiebre mediterránea. Un médico maltés, T. Zammit, encargado de transmitir la enfermedad experimentalmente a las cabras, descubrió que muchas de ellas tenían ya previamente positiva la prueba de la seroaglutinación para *Brucella*, descubierta por Almroth Wright en 1897. El posterior aislamiento del germen en la sangre de estos animales abrió el camino de las investigaciones que acabaron implicando a la leche de cabra como el principal vehículo de transmisión de la enfermedad al hombre. Cerca del 40% de las 20.000 cabras de la isla tuvieron la aglutinación positiva y en casi 2.000 se aislaron brucelas de la leche. La Comisión prohibió al personal militar de la isla la ingesta de leche de cabra, lo que conllevó una drástica reducción en la incidencia de la enfermedad; por otro lado, el número de casos seguía aumentando entre la población civil, que ingería libremente dicha leche. Con ello, se puso claramente de manifiesto la importancia epidemiológica de este mecanismo de transmisión. Destacaron en esos años los trabajos epidemiológicos realizados en el sur de Francia por Paul Cantaloube, que reflejó en su clásica monografía clínica y epidemiológica en 1909.

En diciembre de 1895, el profesor B. Bang, veterinario danés, aisló «*Bacillus abortus*» del útero de una vaca que había abortado y lo identificó como el agente etiológico del aborto epizoótico del ganado vacuno. A finales del siglo XIX, el Departamento de Agricultura de la oficina de Industria Animal Americana estudió la problemática de esta enfermedad bovina.

En 1914, Jacob Traum aisló por primera vez *Brucella suis* de un cerdo y cuatro años después, Alice Evans, bacterióloga americana, asoció la eliminación del *Bacillus abortus* en la leche del ganado vacuno y una enfermedad humana relacionada epidemiológicamente y se percató de la gran similitud que existía entre el *Bacillus abortus* y el *Micrococcus melitensis*, responsable de la fiebre mediterránea. En 1920, Meyer y Shaw agruparon estos dos microorganismos y los denominaron *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* en honor a Bruce. En 1924, Orpen, del Laboratorio de Salud Pública de Salisbury, aisló por primera vez *B. abortus* de la sangre de un paciente y, en 1925, Alice Evans hizo una descripción global de la enfermedad, incluyendo también la infección debida a *B. suis*.

En los años siguientes, la Organización Mundial de la Salud (OMS) organizó un congreso enfocado a estudiar la enfermedad en la Universidad de Montpellier en el que participaron los profesores L. Carrère y M. Janbon y numerosos autores de muy diversos países que contribuyeron a definir y perfilar las características de la enfermedad. Fueron, entre otros, nombres ilustres los de S. Signorelli, en Italia, W. Dalrymple-Champneys, en Inglaterra, H. Roger, M. Lisbonne, L. Rimbaud, H. Serre y G. Renoux, en Francia, T. Villefañe Lastra, en Argentina, y M. Ruis Castañeda en Méjico.

En nuestro país, tras los trabajos iniciales de Durán de Cottés en 1912, merece un reconocimiento especial la extraordinaria labor realizada por A.P. Pons, que contribuyó de forma decisiva, junto con algunos colaboradores como P. Farreras Valentí y J. Rotés-Querol, a una mejor definición clínica de la enfermedad. En el ámbito del diagnóstico destacaron G. Baquero, A. Foz, A. Rodríguez Torres y R. Díaz.

Los trabajos realizados en EE.UU. por W.W. Spink y sus colaboradores son de gran importancia, ya que establecieron las bases de conocimientos etiológicos, patogénicos, clínicos, inmunológicos, diagnósticos y terapéuticos de la brucelosis, que muchos de ellos siguen teniendo aún vigencia en nuestros días.

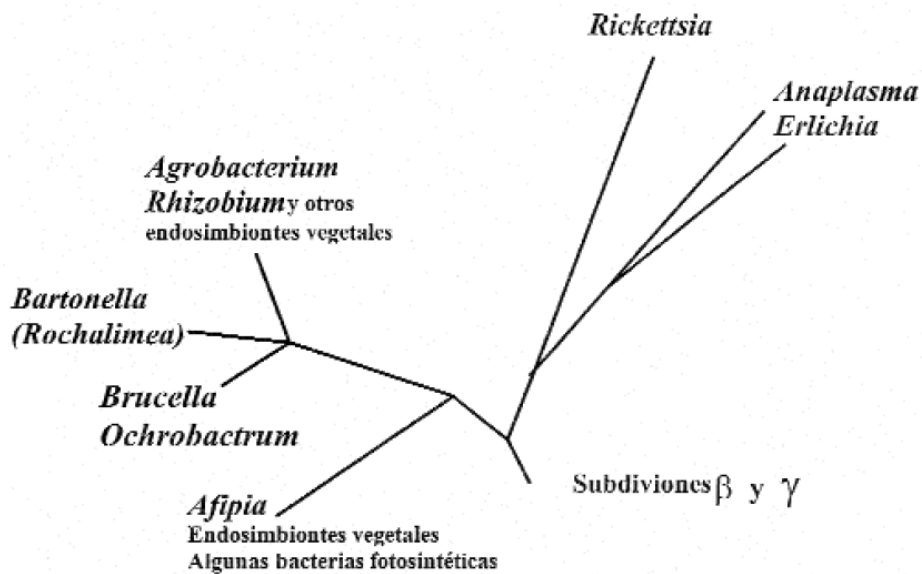
Las tres especies de *Brucella* restantes fueron descritas, más tarde, por Buddle en 1956 (*Brucella ovis*), Stonner y Lackman en 1957 (*Brucella neotomae*) y por Carmichael en 1968 (*Brucella canis*).

El diagnóstico serológico de la brucelosis comenzó en 1897 cuando A. Wright y colaboradores describieron una técnica de seroaglutinación en tubos capilares útil para el diagnóstico. Esta técnica constituye el antecedente del método actual de seroaglutinación en tubo denominado seroaglutinación de Wright en honor de su descubridor.

El extraordinario progreso experimentado durante los últimos años en la mayoría de enfermedades infecciosas ha sido menor en el ámbito de la brucelosis, debido al control epidemiológico de la enfermedad conseguido en los países de mayor desarrollo sanitario (Ariza, 1988).

2. TAXONOMÍA

El análisis de las secuencias del ARN ribosomal 16S (16S ARNr), la composición lipídica y características fisiológicas ha permitido ubicar a *Brucella* dentro de la subdivisión α -2 de la Clase Proteobacteria, en la que se incluyen bacterias patógenas de plantas y animales como: *Agrobacterium*, *Bartonella*; bacterias con capacidad de interactuar con células eucarióticas en forma intercelular o intracelular; habitantes del suelo como *Mycoplasma* y *Ochrobactrum anthropi* que es una bacteria del medio ambiente asociada a infecciones oportunistas en el hombre, figura 1 (<http://www.microbiología.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO-10/Capitulo10.pdf>). Parece que la asociación intracelular con eucariotas es una tendencia evolutiva compartida con otros miembros de la subdivisión α -2. Esto explica las reacciones cruzadas con otros miembros de esta subdivisión en pruebas serológicas y moleculares (Moriyón y cols., 2001).



Moriyón y cols. *Manual de brucelosis*. 2001: 21-30.

Figura 1. Relaciones (basadas en las secuencias del 16SARN ribosomal) entre *Brucella* y las bacterias más importantes de la subdivisión α -2 de la Clase Proteobacteria. Las ramas representan «distancias» evolutivas (entre los 16SARN ribosomales), pero no tiempos. Por otros procedimientos, la divergencia entre *Brucella* y sus parientes más próximos (*Agrobacterium-Rhizobium* y *Bartonella*) se ha estimado que puede haber ocurrido hace 250 millones de años.

3. ETIOLOGÍA

Desde el punto de vista epidemiológico la brucelosis se presenta como una zoonosis de extraordinaria complejidad debida a la variedad de especies de *Brucella* implicadas y a las características epidemiológicas que presenta cada una de ellas (Orduña y cols., 2001).

El género *Brucella* está constituido por bacilos Gram-negativos pequeños, inmóviles y aerobios, que con frecuencia requieren CO₂ para crecer, de crecimiento lento que no poseen cápsulas ni forman esporas. Tienen un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa y oxidasa positivos, no atacan la gelatina ni modifican la leche y en general no fermentan los azúcares (Wilfert, 1986). No son ácido-alcohol resistentes auténticos pero retienen la fucsina básica al decolorar con alcohol ligeramente ácido (Corbel y Morgan, 1984).

Hasta hace unos años, basandose en las propiedades bioquímicas y condiciones de cultivo, el género *Brucella* estaba compuesto por 6 especies subdivididas en 15 biovariedades: *Brucella melitensis* (3 biovariedades), *Brucella abortus* (7 biovariedades), *Brucella suis* (5 biovariedades), *Brucella neotomae*, *Brucella ovis* y *Brucella canis* (Corbel y Morgan, 1984). En 1985, los estudios de hibridación del genoma y de secuenciación de los genes 16SARNr de *Brucella* demostraron una homología superior al 95% entre las diferentes especies, sugiriendose que el género debería estar compuesto de una única especie *Brucella melitensis*, con seis biovariedades *melitensis*, *abortus*, *canis*, *neotomae*, *ovis* y *suis* (Verger y cols., 1985). Así, la nomenclatura propuesta para las antiguas especies y biovariedades de *Brucella* fue: *Brucella melitensis* biovar *melitensis* 1, *Brucella melitensis* biovar *melitensis* 2, *Brucella melitensis* biovar *melitensis* 3, *Brucella melitensis* biovar *abortus* 1..... Sin embargo, en la práctica esta nomenclatura no se adoptó y Corbel en 1997 sugirió conservar la nomenclatura existente (Alton y Jones, 1975; Corbel, 1997) con objeto de evitar confusiones. En 2003, el "International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP). Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*" (Osterman y Moriyón, 2006) acordó unánimemente volver a la taxonomía del género *Brucella* anterior a 1986, por lo que el género *Brucella* quedó reorganizado en seis especies con las conocidas biovariedades (Alton y Jones, 1975; Corbel, 1997).

A mediados de los 90, se aislaron nuevas cepas de *Brucella* procedentes de diferentes mamíferos marinos entre los que se encuentran delfines, marsopas, focas, entre otros, para las que inicialmente se sugiere la creación de una nueva especie: *Brucella maris* (Jahans y cols., 1997). En 2001, Cloeckert y cols. presentan un estudio del polimorfismo del ADN del locus *omp2* (PCR-RFLP), en el que demuestran que las cepas de *Brucella* de origen marino son diferentes a las especies clásicas terrestres y que se pueden clasificar en dos grupos, por lo que sugieren dos nuevas especies *B. pinnipediae* y *B. cetaceae* (Cloeckaert y cols., 2001). Pero es Foster y cols. los que proponen las dos especies *B. ceti* en marsopas, delfines y ballenas y *B. pinnipedialis* en focas (Foster y cols., 2007), de acuerdo con las recomendaciones del "Subcommittee" (Corbel y Morgan, 1975). La última especie propuesta, siguiendo el mismo criterio, ha sido *B. microti* aislada en el topillo campestre *Microtus arvalis* (Scholz y cols., 2008b), en el zorro rojo *Vulpes vulpes* (Scholz y cols., 2008d) y en muestras de tierra (Scholz y cols., 2008c).

En la tabla 1 se detallan las 6 especies clásicas de *Brucella*, sus hospedadores conocidos y las características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades.

Tabla 1. Especies que integran el género *Brucella*, hospedadores conocidos y características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades.

Especie	Hospedador	Biovariedad	Producción de H ₂ S	Necesidad de CO ₂	Sensibilidad a los colorantes		Aglutinación con sueros monoespecíficos		
					Tionina	Fucsina	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	Cabras, bovinos, ovino, cánidos, hombre	1	-	-	+	+	-	+	-
		2	-	-	+	+	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	Bovinos, cánidos, hombre	1	+	+	-	+	+	-	-
		2	+	+	-	-	+	-	-
		3	+	+	+	+	+	-	-
		4	+	+	-	+	-	+	-
		5	-	-	+	+	-	+	-
		6	-	-	+	+	+	-	-
		7	+	-	+	+	+	+	-
		8	-	+	+	+	+	+	-
		9	+	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	Cerdos, cánidos, hombre	1	-	-	+	-	+	-	-
		2	-	-	+	-	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	-	-
		4	-	-	+	-	+	+	-
		5	-	-	+	-	-	+	-
<i>B. canis</i>	Cánidos, hombre		-	-	+	-	-	-	+
<i>B. neotomae</i>	Roedores		+	-	-	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	Ovinos		-	+	+	-	-	-	+

A y M: configuraciones alternativas del PSO; **R:** LPS de las cepas rugosas.

4. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

El ADN de *Brucella* tiene un contenido de GC del 58-59% y el tamaño total del genoma se ha estimado en aproximadamente $3,2 \times 10^6$ pares de bases. Ese tamaño es menor que el de *E. coli* ($4,7 \times 10^6$ pares de bases). Por otro lado, dos características genéticas de *Brucella* llaman especialmente la atención. En primer lugar, la existencia de dos cromosomas circulares en la mayoría de las especies y biotipos. Por ejemplo: el genoma de *B. melitensis*, contiene dos cromosomas o replicones circulares independientes de 1.2 y 2.1 Mb, respectivamente, con un contenido de GC del 57% y presenta 3,197 fases de lectura abierta (ORFs). La secuencia completa del genoma de *B. melitensis* fue publicada en 2002 (DeVecchio y cols., 2002). En segundo lugar, la ausencia de plásmidos. Esta ausencia refleja, muy probablemente, la adaptación a un nicho ecológico (el ambiente intracelular) estable y sin competencia microbiana, en el que no es necesaria la plasticidad genética que se deriva de los plásmidos y que es propia de ambientes (intestino, tierra, etc.) de gran carga microbiana. Además la ausencia de plásmidos hace difícil la adquisición y transmisión de resistencias frente a los antibióticos, lo que podría explicar la ausencia de cepas resistentes frente a aquellos que habitualmente se emplean en el tratamiento. Por otro lado, la presencia de dos cromosomas posiblemente sea reflejo del origen evolutivo de *Brucella*, ya que varios de sus parientes próximos poseen megaplásmidos que, por adquisición de genes esenciales generarían cromosomas auténticos (Moriyón y cols., 2001).

Las distintas especies del género *Brucella* muestran más del 95% de homología en el ADN (Verger y cols., 1985). Este es el dato sobre el que, como ya se ha mencionado, se ha sugerido que el género *Brucella* contiene una única especie. Sin embargo, se ha encontrado polimorfismo en determinadas secuencias del ADN que coinciden con las especies clásicas e incluso con las biovariedades, lo que se ha empleado para desarrollar pruebas para la rápida identificación de las mismas (Moriyón y cols., 2001).

Se ha demostrado que la expresión genética de *Brucella* varía según ciertas condiciones que se piensa representan el ambiente hostil de los fagocitos y, también, que es diferente en los medios de cultivo normales y en los macrófagos. Esto supone la existencia de sistemas de sensores-reguladores y en *Brucella*, se han descrito al menos dos sistemas de regulación genética que dependen de estímulos ambientales. Uno de ellos regula genes esenciales para la virulencia, modula las propiedades de la

membrana externa y se relaciona con la habilidad de penetrar en células fagocíticas (Moriyón y cols., 2001).

5. EPIDEMIOLOGÍA

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

Esta enfermedad se transmite al hombre, a partir del animal infectado, quien constituye el auténtico reservorio de la enfermedad. El germen puede penetrar en el organismo por las siguientes vías: ingestión, contacto, inhalación e inoculación (tabla 2), (Rodríguez Zapata y cols., 2002).

Tabla 2. Mecanismos de transmisión de la brucelosis.

Mecanismos de transmisión de la brucelosis		
Mecanismo	Vía de penetración	Población de riesgo
Ingestión	Orofaringe Mucosa digestiva	Ingesta de productos lácteos
Contacto	Piel erosionada Conjuntiva Mucosa nasal	Pastores, veterinarios, matarifes
Inhalación	Mucosa nasal	Personal de laboratorio, trabajadores de la lana
Inoculación	Inoculación	Personal de laboratorio, veterinarios

Rodríguez Zapata y cols. Medicine 2002;8:3455-63.

La brucelosis tiene una distribución universal y afecta aproximadamente a 500.000 personas anualmente, especialmente en el área Mediterránea, la península de Arabia, el subcontinente Indio, México, América Central y Sudamérica (Anónimo 1, 1986).

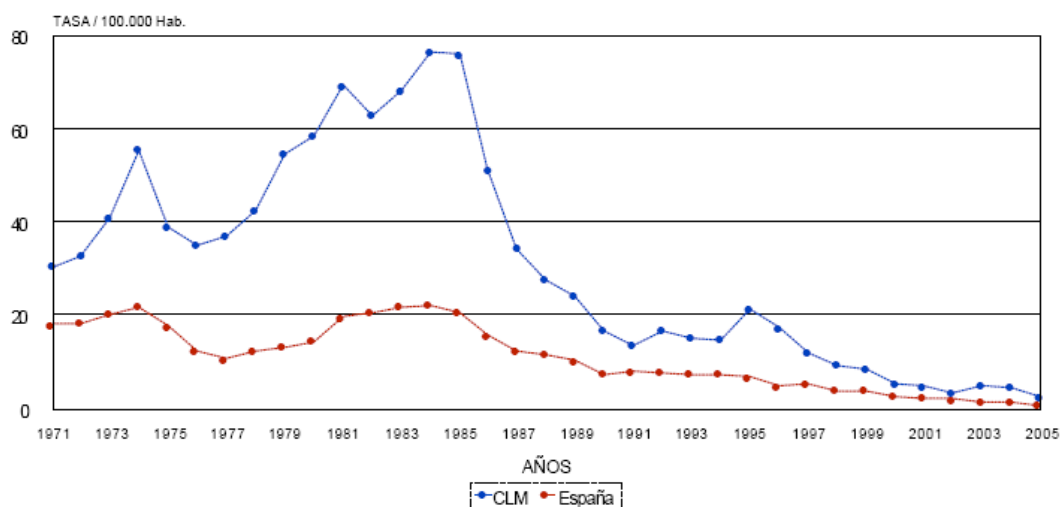
La brucelosis está incluida en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) desde 1943 y a partir de 1997 se declara también de forma individualizada. Es una enfermedad de declaración obligatoria en los animales (Ley de Epizootias 20/12/1952). La brucelosis alimentaria es una de las enfermedades incorporadas al Programa de Vigilancia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el Control de las Infecciones e

Intoxicaciones de origen alimentario en Europa, del cual España forma parte desde 1983, (Anónimo 2, 2006).

En los últimos años se ha reducido de forma notable el número de enfermos debido a la política de información y educación realizada y las actuaciones de control en el ganado ovino y caprino (campañas de vacunación). En 2005, se han comunicado a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica 353 casos de brucelosis (tasa de 0,89 por 100.000 habitantes). Esta cifra supone la reducción a la mitad de los casos declarados en 2004, (636 y tasa de 1,60 por 100.000 habitantes). El centro de la península sigue siendo la zona con mayor número de casos. Por Comunidades Autónomas, Extremadura es la que presenta tasas más altas (4,92 y 54 casos declarados), seguida por Castilla-La Mancha con una tasa de 2,28 y 40 casos. Castilla y León con una tasa de 1,96 por 100.000 habitantes, Aragón con 1,64 y Andalucía con 1,58 casos por 100.000 habitantes. Hay que destacar una importante reducción en el número de casos con respecto al año anterior en todas las Comunidades Autónomas (Anónimo 3, 2006).

En España, es considerada una enfermedad ocupacional y sigue siendo la zoonosis más importante, tanto por el número de casos como por sus repercusiones sanitarias y económicas (Anónimo 2, 2006). La enfermedad tiene una cierta tendencia estacional (desde el mes de marzo hasta el comienzo del verano) relacionada con la biología de los óvidos, y se asocia más frecuentemente al sexo masculino, siendo el riesgo de padecer la infección tres veces superior en el varón que en la mujer, y máximo entre los 31-40 años. Las vías de transmisión se asocian, en el medio urbano a la ingesta de productos lácteos sin higienizar y, en el medio rural, al contacto con ganado enfermo (Rodríguez Zapata y cols., 2002).

Desde 1971 las tasas de Castilla-La Mancha han sido siempre superiores a las de España, alcanzando en el año 1984 su valor más alto e iniciándose a partir de entonces un descenso hasta 1991 (Figura 2). En la década de los 90 las tasas anuales de España presentan un progresivo descenso hasta el año 2005. En Castilla-La Mancha, tras un pico de incidencia en 1995 la tendencia es también decreciente, salvo un ascenso en 2003 (Anónimo 2, 2006).



www.jccm.es/sanidad/salud/epidemiologia/4_806.pdf.

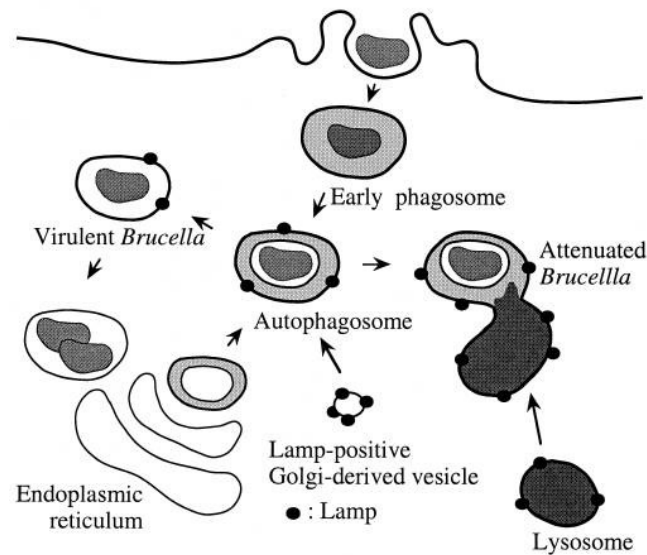
Figura 2. Evolución de las tasas anuales de brucelosis en Castilla-La Mancha y en España entre los años 1971-2005.

6. PATOGENIA

Las especies de *Brucella* son patógenas intracelulares facultativas, propiedad que las mantiene protegidas de la acción de los antibióticos, y de los mecanismos efectores dependientes de anticuerpos (Pappas y cols., 2005); esto justifica la naturaleza crónica de la infección ya que son capaces de adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células eucariotas tanto fagocíticas como no fagocíticas.

Cuando estas bacterias ingresan al organismo pueden ser fagocitadas por los polimorfonucleares (PMN) y macrófagos como parte de la inmunidad innata. Si no son eliminadas llegan por vía linfática a los ganglios regionales correspondientes pudiendo desde allí invadir el torrente sanguíneo, donde son fagocitadas por los PMN y macrófagos circulantes y transportadas, de esta manera, a los diversos órganos donde pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de las vacuolas de los fagocitos circulantes y tisulares (Pizarro-Cerda y cols, 1998), figura 3. Los mecanismos de ingreso de la bacteria a estas células no están suficientemente aclarados aunque se presume que el LPS y las proteínas de la membrana externa podrían participar en los mismos, mediante receptores tipo manosa o integrinas, respectivamente. Las células de la placenta son ricas en receptores de manosa (Pontow y cols, 1992) y eritriol, presente

en tejidos placentarios animales, lo que explica la avidez de *Brucella* por los mismos (Aréstequi y cols., 2001).



Pizarro-Cerdá J. *Infect Immun* 1998; 66 (12): 5711-24

Figura 3. Modelo propuesto por Pizarro-Cerdá y cols. del tráfico intracelular de *B. abortus* en células HeLa. Ambas cepas, la virulenta 2308 y la atenuada S19, se encuentran a los diez minutos de la infección en un compartimento temprano positivo para (i) EEA1 (Early endosome antigen 1) por lo que son capaces de fusionarse con los autophagosomas originarios del retículo endoplásmico, y (ii) moléculas LAMP (Lysosome-associated membrane proteins) posiblemente derivados a partir de la cara-trans del aparato de Golgi. A las 24 horas de inocular las bacterias en las células HeLa, la cepa atenuada S19, no es capaz de detener la maduración de su autophagosoma, el cual se fusiona con los lisosomas y se produce su degradación. Por otra parte, la cepa virulenta 2308 logra inhibir la maduración de los autophagosomas y gracias a un mecanismo de transporte retrógrado logra alcanzar el retículo endoplásmico (a partir del cual se originan los autophagosomas), donde se produce la replicación intracelular.

La supervivencia de *Brucella* dentro de las células se ha asociado con la síntesis de enzimas antioxidantes (Teixeira-Gomes y cols., 2000) y a la producción de guanosina 5' monofosfato (GMP) y adenina, que inhiben la fusión fagosoma-lisosoma, la desgranulación, la activación del sistema mieloperoxidasa-haluro y la producción del TNF- α (Canning y cols., 1986).

El cuadro clínico y la evolución de la infección varían en función de la especie animal afectada. En los mamíferos rumiantes y en el ganado porcino la manifestación clínica es el aborto. En el hombre presenta una gran tendencia a la cronicidad y se

caracteriza por fiebre y localización de las bacterias en distintos tejidos como las articulaciones, huesos, endocardio y sistema nervioso.

7. RESPUESTA INMUNE

El ingreso de *Brucella* en el organismo induce la activación de los mecanismos de defensa que se inician con la participación de algunos componentes de la inmunidad innata, como el complemento (C), los neutrófilos y los macrófagos.

La activación del C por la vía clásica y alterna juega un rol muy importante en la resistencia contra bacterias Gram-negativas. Existen controversias en cuanto a la capacidad que posee el LPS de *Brucella* de activar la vía alterna del C (Hoffmann y Houle, 1983; Corbeil y cols., 1988), sin embargo, la activación de la vía clásica puede iniciarse con la presencia de bajas concentraciones de IgM e IgG anti-LPS, lográndose de esta forma la lisis bacteriana (Hoffmann y Houle, 1995).

Los neutrófilos son las primeras células del huésped que se ponen en contacto con *Brucella*. La opsonización de las bacterias por anticuerpos y complemento facilita su fagocitosis. Como ya se ha mencionado, *Brucella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de los neutrófilos durante el curso de la infección y de esta forma ser transportada a los tejidos linfoides. Para que se produzca la muerte de las bacterias intracelulares es necesaria la desgranulación de los gránulos de los neutrófilos, con la consiguiente liberación de mieloperoxidasa. Se ha demostrado que *Brucella* posee mecanismos que inhiben esta desgranulación y evita así su destrucción (Teixeira-Gomes y cols., 2000). Los neutrófilos de las distintas especies animales reaccionan de forma diferente ante *Brucella*. Así, los neutrófilos de los cobayos no son capaces de destruir las cepas lisas, mientras que la actividad bactericida de los neutrófilos bovinos frente a estas cepas es mayor que la de los neutrófilos humanos, no registrándose diferencias entre los dos últimos frente a las cepas rugosas.

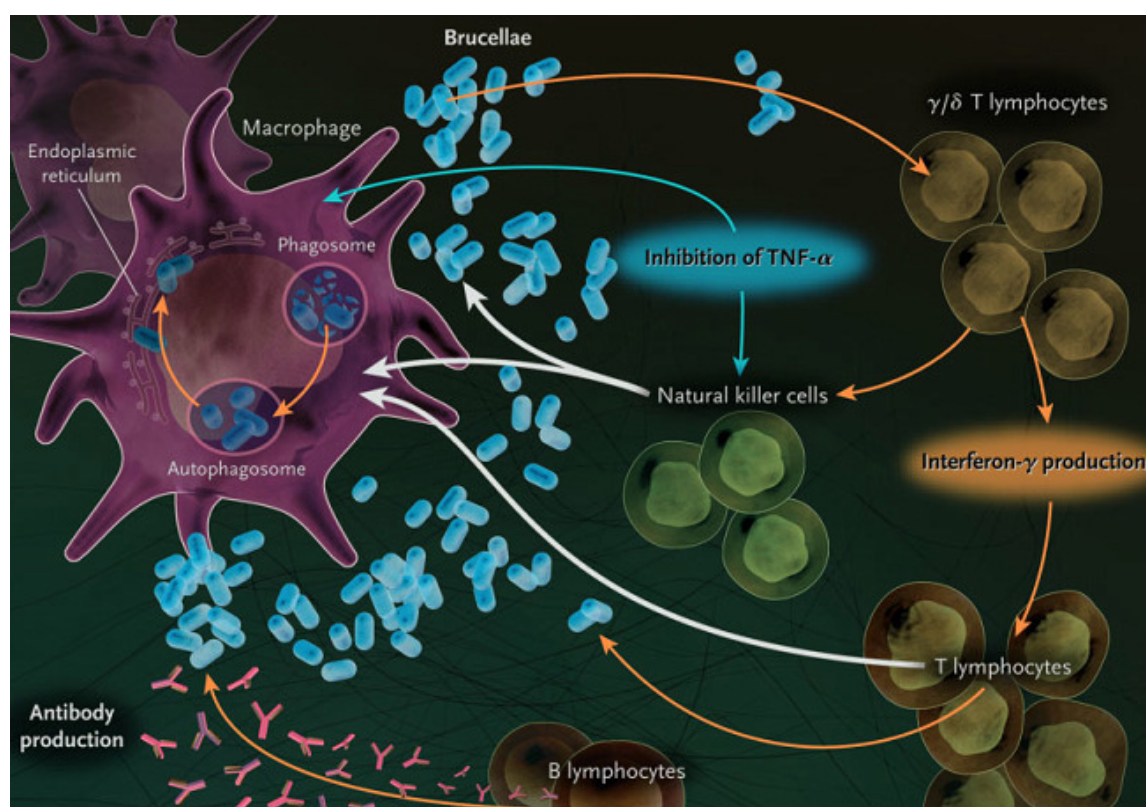
Otras células que reaccionan ante la presencia de *Brucella* son los macrófagos, figura 4. El ingreso de la bacteria en los macrófagos se produce a través de la interacción entre la molécula CD14 y el LPS. Esta interacción induce también la producción de IL-12 que estimula las células natural killer (NK) y los linfocitos T colaboradores o helper (LTH) CD4+, que secretan IFN- γ , favoreciendo el desarrollo de

una respuesta inmune predominantemente mediada por LTH-1 (Zhan y Cheers, 1995). Este subgrupo de linfocitos T estimula fundamentalmente la respuesta de tipo celular y participa de forma directa en la protección contra microorganismos intracelulares, ya que su amplio patrón de citoquinas que incluye IL 2, 3, 6, 12, TNF- α y sobre todo IFN- γ (Ahmed y cols., 1999), es esencial para la activación de macrófagos. Una vez fagocitada la bacteria, los macrófagos poseen la capacidad de destruirla inmediatamente, pero del mismo modo que ha sido descrito para los neutrófilos, *Brucella* es capaz de inhibir estos mecanismos de destrucción. El hierro presente en los macrófagos tiene un papel preponderante en la eliminación de los microorganismos ya que cataliza una reacción metabólica destinada a incrementar la producción de intermediarios reactivos del oxígeno, fundamentales en la eliminación de patógenos intracelulares (Jiang y Balwin, 1993).

Los linfocitos, de la inmunidad adaptativa, también son impactados por distintos antígenos de *Brucella*. Las proteínas de las bacterias son procesadas dentro de la célula presentadora de antígenos (APC) y sus péptidos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II son presentados a los LTH CD4+ y LT citotóxicos (LTC) CD8+. Estos últimos son capaces de lisar macrófagos y otras células infectadas con *Brucella*.

El LPS es considerado un antígeno T-independiente, capaz de activar a los linfocitos B (L-B) sin la participación de los LT-H. Los primeros anticuerpos que se generan en el curso de una infección son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA, dependiendo de la especie animal. Pueden aparecer, dentro de la clase IgG, anticuerpos bloqueantes o no aglutinantes, también llamados asimétricos (Parma y cols., 1984; Margni y Binaghi, 1988), en especial en infecciones crónicas, donde suelen alcanzar títulos elevados. Estos anticuerpos se diferencian de los anticuerpos completos por la incapacidad de activar el complemento por cualquiera de las vías o dar adecuadas reacciones de aglutinación (Margni y Binaghi, 1972; Margni y Hajos, 1973), entre otras cosas. Para clarificar el rol de los anticuerpos que se originan durante la infección se han realizado numerosos ensayos experimentales en ratones, demostrándose que anticuerpos anti-LPS inyectados en forma pasiva han logrado protegerlos contra infecciones posteriores (Ko y Splitter, 2003). Por su parte, estudios efectuados en bóvidos han demostrado que una elevada concentración de IgG durante una infección activa resulta perjudicial ya que inhibe la lisis complemento dependiente, promueve la fagocitosis de los microorganismos e incrementa la localización intracelular y la diseminación hacia los distintos tejidos (Hoffmann y Houle, 1995).

Se ha descrito la participación de distintas citoquinas en las etapas tempranas de la infección, como la IL-1, IL-12, y el TNF- α . El TNF- α parece contribuir a la formación de los granulomas que se observan en los tejidos infectados. Otra citoquina muy importante en la resistencia contra la infección es el IFN- γ . También se ha detectado un incremento en la producción de IL-6, aunque su rol no está completamente definido (Saunders y cols., 1993).



Pappas G. *N Engl J Med* 2005;352:2325-36.

Figura 4. Representación esquemática de los principales eventos en la patogénesis de la brucelosis y la respuesta inmune del hospedador. Brucellae entra en el macrófago, donde una minoría de las bacterias sobrevive en compartimentos especializados y se multiplica en el retículo endoplásmico. La inhibición del factor de necrosis tumoral α (TNF α) por la bacteria interrumpe el efecto bactericida de las células NK y los macrófagos. La producción de interferón- γ induce un efecto bactericida por las células NK y los linfocitos T directamente y a través de la inducción del macrófago. La producción de anticuerpos por los linfocitos B es también inducido pero juega un papel menor en la respuesta inmune. Los linfocitos T inducen a los helper y a los supresores, dependiendo del estado de la enfermedad. Las flechas azules indican efecto negativo, las flechas naranjas efecto positivo, y las flechas blancas efecto bactericida.

8. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico precoz es muy importante. La presencia de un cuadro clínico sugerente, unido al antecedente epidemiológico de exposición al germen, debe hacer sospechar la presencia de brucelosis (Rodríguez Zapata y cols, 2002). Se deben tomar muestras de sangre, antes de empezar cualquier tratamiento con antibióticos (Foz y Díaz, 1983), para realizar hemocultivos, pruebas serológicas e incluso, si se pudieran, moleculares.

8.1. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO O MICROBIOLÓGICO

El aislamiento e identificación, de la especie y biotipo, de *Brucella* spp. es el método que nos permite establecer un diagnóstico con certeza (Díaz y Moriyón, 1989). Mientras que el aislamiento es relativamente sencillo y puede realizarse en cualquier laboratorio de microbiología, la identificación es compleja y relativamente peligrosa, por lo que debe quedar reservada para centros especializados o de referencia (Foz y Díaz, 1983). Para llegar a la identificación a nivel de biotipo se necesita un análisis de aproximadamente 25 características fenotípicas, incluyendo requerimiento de CO₂, producción de H₂S, sensibilidad a tinciones y fagos, y otras propiedades metabólicas (Alton y cols., 1988). En los últimos años se han desarrollado varios ensayos de PCR estándar múltiple empleados para la tipificación molecular de la especies de *Brucella*. El más popular nos permite identificar cuatro especies de *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis* (AMOS-PCR) e incluso algunas biovariedades de estas especies (Bricker y Halling, 1994; Bricker y Halling, 1995; Bricker y cols., 2003). Unos años más tarde se ha publicado un estudio que identifica 8 especies de *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* y *B. ceti* e incluso algunas cepas vacunales, los investigadores lo han llamado “Bruce-ladder” (García-Yoldi y cols., 2006; López-Goñi y cols., 2008). Otro estudio, simultáneo al anterior, permite la rápida identificación de los aislados a nivel de especie mediante PCR en tiempo real basados en el análisis de SNP (Gopaul y cols., 2008). Algunas ventajas de estos ensayos son su velocidad y el reducido riesgo de la manipulación de la bacteria viva, pues la PCR se puede realizar directamente sobre colonias. Por lo tanto, el “Bruce-ladder” se puede utilizar para la rápida identificación de cepas de *Brucella* de origen animal o humano, no sólo en centros de referencia sino en cualquier laboratorio de microbiología (López-Goñi y cols., 2008).

La muestra biológica de elección es la sangre (Rodríguez-Zapata y cols., 2002) y en casos especiales puede recurrirse al cultivo de medula ósea, líquido cefalorraquídeo, pus de diferentes localizaciones y exudado articular (Foz y Díaz, 1983). El método bifásico de Ruiz Castañeda ha sido muy eficaz y el sistema estándar reconocido durante muchos años, consiste en la inoculación de sangre en frascos herméticamente cerrados que contienen, simultáneamente, un medio líquido (caldo triptosa) y un medio sólido (agar triptosa) (Ruiz Castañeda, 1961). Usualmente el crecimiento es lento y se detecta entre los 7 y los 21 días pero pueden necesitar hasta 35 días, recomendándose la práctica sistemática de los subcultivos ciegos antes de considerar los hemocultivos negativos. La bacteriemia se detecta en el 75-80% de las infecciones por *B. melitensis* y alrededor del 50% de las producidas por *B. abortus*. En las primeras semanas de la enfermedad por *B. melitensis* la positividad alcanza casi el 90% de los casos, disminuyendo esta frecuencia progresivamente al aumentar el tiempo de evolución (Ariza, 1999). Sin embargo, los medios bifásicos no se utilizan de rutina en los laboratorios de microbiología, y muchos laboratorios clínicos emplean métodos automatizados de aislamiento rápido como BACTEC, que son examinados al 5-7 día y no se realizan subcultivos de las botellas negativas. Por este motivo, si existe la sospecha de brucelosis, el clínico debe comunicarlo al laboratorio de microbiología para que se mantenga en proceso durante 6 semanas (Rodríguez-Zapata M y cols., 2002). El sistema BACTEC aumenta la rentabilidad del cultivo respecto a los cultivos convencionales en el aislamiento de *Brucella* en otras muestras como son médula ósea, pus procedente de abscesos, líquido cefalorraquídeo (LCR) u otras muestras tisulares (Yagupsky, 1999).

8.2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Las pruebas serológicas tienen una gran trascendencia en el diagnóstico de la brucelosis (Ariza, 2002). Podemos distinguir dos amplias categorías, aquellas que detectan anticuerpos contra el lipopolisacárido y aquellas que detectan anticuerpos contra otros antígenos bacterianos (Pappas y cols, 2005).

Su principal limitación es la incapacidad para diferenciar con la suficiente sensibilidad y especificidad entre infección activa y curada, ya que los anticuerpos suelen persistir durante un período prolongado tras la recuperación clínica (Ariza, 2002). Además a estas pruebas serológicas se les plantea otro problema, la

interpretación de un resultado positivo en pacientes con antecedentes de brucelosis o en aquellos que residen en un área endémica (Cooper, 1992) o que estén relacionados profesionalmente con *Brucella* debido a la prevalencia de anticuerpos (Araj y Azzam, 1996). Con el fin de superar estas limitaciones las técnicas serológicas han ido evolucionando para conseguir una mayor sensibilidad y especificidad, así como un menor tiempo de realización (Queipo-Ortuño, 1998).

En la tabla 3 se exponen algunas de las pruebas que se pueden emplear en el diagnóstico serológico de la brucelosis humana, así como los antígenos e isotipos de inmunoglobulinas que intervienen en las mismas. Tal cantidad de pruebas serológicas pone claramente de manifiesto la ausencia de una prueba que reúna el conjunto de requisitos exigibles para considerarla ideal; alta sensibilidad y especificidad, simplicidad y rapidez de ejecución, alta reproducibilidad y bajo coste (Queipo-Ortuño, 1998).

Tabla 3. Clases de Ig y antígenos de los principales tests serológicos para el diagnóstico de la brucelosis humana.

TEST	Ig DETECTADA	ANTÍGENO	COSTE
Rosa de Bengala	M,G,A	LPS-S	Bajo
SAT	M,G,A	LPS-S	Bajo
2-ME	G	LPS-S	Bajo
Coombs	G,A	LPS-S	Medio
FC	M,G	LPS-S	Medio
ELISA	M,G,A	LPS-S/Proteína	Alto
CIEF	G	Proteína citosólica	Medio
IDR	M,G	HN	Medio
Ouchterlony	M,G	LPS-S	
WB	M,G,A	LPS-S/Proteína	Alto

Díaz R y cols, Medicine 2002;8(61):3289-96.

FC: fijación de complemento; CIEF: contraelectroforesis; IDR: inmunodifusión radial; HN: hapteno nativo; WB: western blot.

Las pruebas serológicas que se pueden utilizar en el diagnóstico serológico de la brucelosis son las siguientes:

8.2.1. Rosa de Bengala (RB)

Fue introducida por B. Morgan en 1969 (Morgan y cols., 1969). Es una prueba rápida de aglutinación en placa y desde 1976, año en el que Díaz y cols. (Díaz y cols.,

1976) demostraran una estrecha correlación con los títulos de la seroaglutinación, se utiliza como prueba diagnóstica inmediata. Tiene especial utilidad en zonas no endémicas, en las que se realiza como método de cribado por su rapidez y bajo coste (Ariza, 1996). Utiliza como antígeno una suspensión bacteriana a la que se ha añadido el colorante rosa de Bengala, enfrentándola al suero sin diluir del enfermo. Debido a su pH ácido evita el fenómeno de prozona. Proporciona un resultado en pocos minutos con una sensibilidad y especificidad muy altas. No obstante, la experiencia práctica le ha concedido un protagonismo que va más allá del correspondiente a una simple prueba de cribado y algunos autores la han utilizado haciendo diluciones, con resultados muy satisfactorios (Díaz y Moriyón, 1992; Rubio y cols, 2001). A pesar de su alta sensibilidad, existen falsos negativos que se limitan a enfermos con procesos de pocos días de evolución y algunos casos de enfermedad de curso muy prolongado. Esto hace aconsejable confirmar el resultado con otras pruebas serológicas (Foz y cols., 1986; Colmenero y cols., 1989; Buchanan y cols., 1974).

8.2.2. Seroaglutinación en tubo o placa con pocillos (SAT)

Descrita en 1897 por Almroth Wright, es la más antigua y utilizada aún para el diagnóstico de la brucelosis (Foz y Díaz, 1983; Pappas y cols, 2005). Constituye una prueba muy valiosa por su sencillez, sensibilidad y especificidad (Young, 1995; Ariza, 1996). Enfrenta diluciones crecientes del suero problema a una cantidad constante de *B. abortus* observándose la presencia o ausencia de aglutinación tras un periodo de incubación. De esa forma, se determina el título como la máxima dilución aglutinante. Este antígeno reacciona tanto con anticuerpos IgM, IgG e IgA de esa especie como frente a los de *B. melitensis* y *B. suis*, que son las tres especies responsables en la práctica de la totalidad de enfermos con brucelosis. Tiene algunas limitaciones, como la presencia de reacción cruzada con otros gérmenes (Rodríguez-Zapata y cols., 2002) como *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O116 y O157, *Salmonella urbana*, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Xanthomonas maltophilia* y *Afipia clevelandensis* (Pappas G y cols, 2005). Por otra parte, el fenómeno de prozona descrito en la literatura para la mayoría de las pruebas serológicas, resulta un hecho ocasional (Foz y Garriga, 1954) y puede ser debido a: (i) un exceso de anticuerpos a bajas diluciones del suero; (ii) a la presencia de factores inespecíficos del suero que inhiben la aglutinación bacteriana; o (iii) a la presencia de anticuerpos específicos

bloqueantes y anticuerpos incompletos (Parma y cols., 1984; Daza y cols, 1981; Hall y Manion, 1953; Díaz y col., 1976; Wilkinson, 1966).

8.2.3. Prueba de Coombs anti-Brucella

La modificación del método introducida por Otero y cols. (Otero y cols., 1982), efectuando la prueba en placa en lugar de tubo, la simplifica notablemente. Detecta anticuerpos anti-*Brucella* no aglutinantes de tipo IgG e IgA (Dana y Serre, 1974; Zinneman y cols., 1964; Parratt y col., 1977; Diaz y col., 1976). El suero de Coombs (inmunoglobulina humana) se encarga de facilitar la aglutinación de los anticuerpos no aglutinantes del suero problema, fijados a la suspensión antigénica de *B. abortus*. El título obtenido es, por ello, como mínimo el de la aglutinación y generalmente aumenta de manera muy significativa cuanto mayor es el tiempo de evolución de la enfermedad (Foz y Díaz, 1983; Ariza y cols., 1992), y en pacientes con focalidad (Maravi-Poma y cols., 1982). Por esta razón, los datos de la prueba de Coombs, junto con los de la prueba de SAT, dan una información aproximada de la evolución de la enfermedad (Foz y Díaz, 1983).

8.2.4. Aglutinación con 2-mercaptoetanol (2-ME) o ditiotreitól (DTT)

Reddin y cols. (Reddin y cols., 1965) en el año 1965, teniendo en cuenta la capacidad que tienen los mercaptanos de reducir los enlaces disulfuro, propusieron realizar la prueba de aglutinación en presencia de 2-ME, para diferenciar los anticuerpos IgM (sensibles) de los IgG (resistentes) (Diaz y Dorronsoro, 2002), detectándose únicamente anticuerpos IgG, ya que los IgM son inactivados (Buchanan y Faber, 1980; Young, 1991). Otro agente reductor utilizado en esta prueba es el DTT.

No existe un acuerdo entre los distintos autores sobre la interpretación diagnóstica de la presencia de anticuerpos resistentes al tratamiento con un agente reductor: (i) unos autores afirman que su presencia es un indicio de infección reciente y que su persistencia indicaría la posibilidad de una mala evolución clínica (Reddin y cols, 1965); y (ii) otros autores creen que la presencia de dichos anticuerpos en pacientes asintomáticos no son indicativos para comenzar un tratamiento antibiótico, y que su utilidad se basa en saber si los pacientes que han pasado la brucelosis puedan presentar o no una brucelosis crónica (Buchanan y Faber, 1980; Ariza y cols., 1992).

Algunos autores sostienen que los resultados de la prueba de SAT antes y después del tratamiento con 2-ME en una serie de sueros tomados a lo largo de la evolución del enfermo, junto con los datos clínicos, pudieran diferenciar las formas activas e inactivas de la enfermedad (Young, 1991; Marrodán, 1998).

8.2.5. Fijación del complemento

Sasano y cols. fueron los primeros que utilizaron la reacción de la fijación del complemento (FC) para el diagnóstico de la brucelosis en 1931 (Sasano y cols., 1931). A pesar de ello, su empleo no se extendió hasta que fue revalorizada por Foz en la década de los cincuenta (Foz y Arcalís, 1953; Foz y Garriga, 1954) y está considerada de gran valor para el diagnóstico de la enfermedad (Foz y cols., 1954; Foz y Díaz, 1983). Sin embargo, es una prueba laboriosa y difícil de estandarizar, que está sujeta a una gran variabilidad en los resultados que se obtienen, dependiendo de pequeñas diferencias en la técnica (Kerr y cols., 1968). El resultado positivo o negativo de la prueba de SAT y FC coincide en la mayoría de los casos, aunque en ocasiones existen diferencias en el título de ambas reacciones. Estas diferencias se presentan en: (i) casos muy recientes de brucelosis con pocos días de evolución, donde la FC puede ser negativa y la prueba de SAT positiva; (ii) a partir de la cuarta o quinta semana de la enfermedad y en la fase inicial de las formas crónicas, donde la FC suele ser positiva y la prueba de SAT negativa o con título muy bajo; y (iii) en las formas crónicas el título de la FC suele ser más elevado (Foz y Díaz, 1983).

En el caso de la brucelosis humana, no hay acuerdo entre los distintos autores sobre el grado de participación de las distintas inmunoglobulinas en la reacción de fijación de complemento (Marrodán, 1998), sobre todo en lo que se refiere a la intervención de los anticuerpos de clase IgM (Wiedermann y cols., 1963; Kerr y cols., 1966; Edwards y cols., 1970; Heremans y cols., 1963).

8.2.6. Enzimoimmunoensayo (ELISA)

La técnica de ELISA (*“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”*, de la terminología inglesa) se ha utilizado para determinar y cuantificar por separado las diversas clases de inmunoglobulinas anti-*Brucella* y seguir su evolución a lo largo del

proceso infeccioso (Foz y Díaz. 1983; Gazapo y cols., 1989), mostrando una extraordinaria sensibilidad y especificidad (Ariza y cols., 1992).

Esta técnica detecta antígenos inmovilizados en una fase sólida, mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido en el espectrofotómetro. El antígeno utilizado ha sido muy diverso: células enteras (Magee, 1980; De Klerk y Anderson, 1985), LPS purificado (Pellicer y cols., 1988; Ariza y cols., 1992), proteínas de membrana externa (Araj y Kaufman, 1989) y proteínas citoplasmáticas (Goldbaum y cols., 1992).

Los estudios existentes sobre los ELISA IgG, IgM e IgA y su correlación con las pruebas serológicas clásicas nos han permitido conocer con detalle el curso evolutivo de las inmunoglobulinas específicas en las diferentes fases de la enfermedad y su diferente papel en los resultados de las pruebas de aglutinación y Coombs. La prueba de ELISA-IgM tiene una correlación muy alta con la seroaglutinación, especialmente en los primeros meses de evolución. Mientras que, la prueba ELISA-IgA, y especialmente la determinación ELISA-IgG, muestran una alta correlación con la prueba de Coombs. La detallada y fiable información que aportan los métodos de ELISA, junto con la posibilidad de ser introducido a gran escala sin grandes dificultades técnicas y por un coste aceptable, hizo pensar que el ELISA-IgM sustituiría a la prueba de aglutinación y el ELISA-IgG a la prueba de Coombs en el diagnóstico habitual de la brucelosis. Sin embargo, en estos años, el uso extendido y habitual de esta prueba ha tropezado con la inexistencia de una estandarización adecuada de los sistemas comerciales. De hecho, los laboratorios que utilizan este método proporcionan a menudo resultados confusos que son difíciles de interpretar. Así, su empleo generalizado no es aconsejable en tanto no se produzca una estandarización bien establecida (Ariza, 2002).

8.2.7. Inmunofluorescencia

Aplicada en brucelosis por Moody y cols. en 1961 (Moody y cols., 1961), tiene gran especificidad y sensibilidad, pero su empleo no se ha extendido, por su complejidad y porque no proporciona mayor información que la obtenida con la prueba de Coombs (Ariza, 1988).

8.2.8. *Dipstick*

Es una prueba colorimétrica de uso muy sencillo que identifica los anticuerpos IgM específicos de *Brucella* con una sensibilidad similar a la prueba de SAT, pero con la ventaja de una mayor facilidad y rapidez (Smits y cols., 1999). Las tiras de nitrocelulosa contienen dos bandas horizontales: la banda superior es un control interno que permite mostrar la presencia de IgM en el suero mientras que la inferior es una fracción del LPS de *B. abortus*. La muestra, suero o dangre, se incuba directamente con la tira y los anticuerpos anti-IgM humana coloreados. La aparición de color en la banda superior indica la presencia de IgM en la muestra, la presencia de IgM frente a *Brucella* se detecta en la banda inferior. La única dificultad reside en la interpretación de los resultados, pues se valora de 1+ a 4+ por comparación con una tira patrón (Marrodán, 1998), figura 5.A.. Esta prueba ha demostrado ser muy sensible y específica (Smits y cols., 1999; Marrodán y cols., 2001) y se considera especialmente apropiada para el diagnóstico en lugares con pocos recursos (Ariza, 2002; Segura, 2005). La sensibilidad de este ensayo en el momento del diagnóstico parece ser similar a la prueba de SAT, aunque empieza a ser rápidamente negativa después de comenzar el tratamiento antibiótico y se negativiza totalmente en los pacientes con brucelosis crónicas y en pacientes con complicaciones focales (Casao y cols, 2003).

8.2.9. *Brucellacapt*

Es una prueba de inmunocaptura-aglutinación para la detección de anticuerpos totales a *Brucella*. Esto permite la detección, en un solo paso, de anticuerpos no aglutinantes de las clases IgG e IgA, así como de anticuerpos aglutinantes. Basado en el principio del test de Coombs, usa anticuerpos IgG e IgA antihumanos para favorecer la aglutinación de los anticuerpos a *Brucella*. La prueba consta de tiras de pocillos de fondo en U que contienen inmunoglobulinas antihumanas. Se añade el antígeno a las diluciones seriadas del suero y se incuban 24 horas hasta que se produce la aglutinación.

Varios autores españoles han comprobado una especificidad similar a la prueba de Coombs, pero con una sensibilidad similar (Casao y cols., 2004; Alişkan y cols., 2007) o mayor (Gómez y cols., 1999; Velasco y cols., 1998; Orduña y cols.,

2000; Serra y cols., 2001), presentando los títulos de ambas pruebas una altísima correlación. Probablemente, una de las principales razones de la sensibilidad de esta prueba es el que se realiza a un pH ácido, lo que favorece en gran manera la aglutinación de los anticuerpos. Los títulos de 1/320 o superiores se consideran significativos. Estos resultados y la simplicidad y rapidez de su realización pueden hacer pensar que sustituirá a la prueba de Coombs en la práctica habitual, aunque su coste puede ser mayor (Segura, 2005).

8.2.10. Pruebas de precipitación en gel

En el caso de la brucelosis, las técnicas de precipitación en gel determinan anticuerpos frente al LPS-S, hapteno nativo (HN), polisacárido B y proteínas solubles de *Brucella* (Díaz y Dorronsoro, 1971; Díaz, 1974; Díaz y cols., 1976; Díaz y cols., 1982). Aunque estas pruebas han demostrado ser muy sensibles y específicas en el diagnóstico de la brucelosis su empleo no se ha generalizado (Ariza, 2002).

Glenchur y cols. (Glenchur y cols., 1962) fueron los primeros en aplicar métodos de precipitación en gel para el diagnóstico de la brucelosis humana. Estas pruebas requieren extractos antigénicos solubles y bien caracterizados para interpretar correctamente los resultados (Díaz y Moriyón, 1989).

El LPS y el NH (Aragón y cols., 1996) de *Brucella* los podemos detectar mediante inmunolectroforesis (Figura 5.B.A.) y doble difusión en gel (Figura 5.B.B.), aunque no es necesario utilizar este tipo de pruebas de manera rutinaria porque es más sencillo hacerlo utilizando la prueba de Rosa de Bengala o seroaglutinación (Díaz y Dorronsoro, 2002). La demostración de anticuerpos frente al NH mediante la inmunodifusión radial inversa (IDR) (Figura 5.B.C.) guarda correlación con los resultados de los hemocultivos, según han descrito Díaz y Dorronsoro (Díaz y Dorronsoro, 2002).

En 1971, Díaz y Dorronsoro (Díaz y Dorronsoro, 1971) describen la utilidad de estudiar la presencia de anticuerpos frente a proteínas citosólicas de *Brucella*, porque un resultado positivo indica que ha ocurrido o está ocurriendo un estímulo antigénico intenso. Esta prueba sólo ha demostrado reacción cruzada con *Bartonella hemselae*, bacteria que pertenece al subgrupo α -2 de la clase Proteobacteria como *Brucella* (Díaz

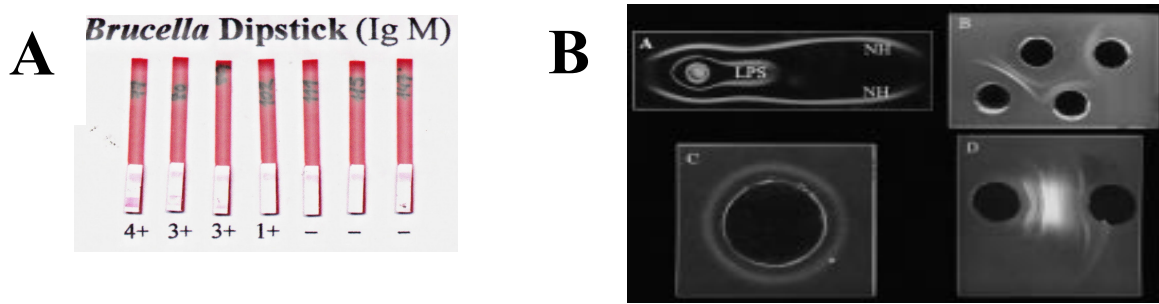
y Dorronsoro, 2002). Para detectar anticuerpos frente a proteínas citosólicas se utiliza la contraelectroforesis (CIEF) (Díaz y cols., 1976) (Figura 5.B.D.). Estos anticuerpos aparecen más tardíamente que los anti-LPS y su evolución se ve más interferida por el curso del tratamiento antibiótico. Por ello, se ha descrito que estos anticuerpos pueden ser un marcador de actividad más sensible que los anti-LPS (Baldi y cols., 1996).

8.2.11. Ensayo de flujo para la detección de anticuerpos IgM e IgG frente a *Brucella* (“*Brucella IgM/IgG Flow assay*”, de la terminología inglesa)

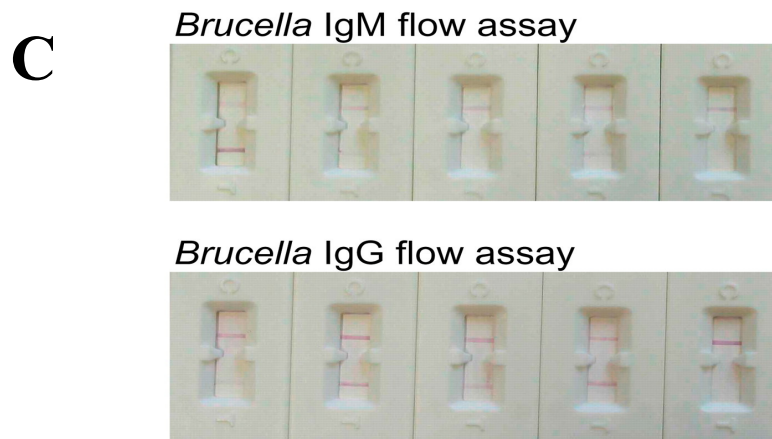
Descrita recientemente por Smits y cols., es un ensayo que no requiere personal especializado ni equipamiento, es muy fácil de realizar y de leer, y sus componentes son estables sin necesidad de refrigeración. Todas estas características hacen que sea un ensayo ideal para utilizarlo en áreas rurales y suburbanas en las cuales la brucelosis es endémica (Smits y cols., 2003).

Este ensayo es una versión simplificada del ELISA. El ensayo consiste en una inmuno-cromatografía que permite la detección de anticuerpos IgM/IgG frente a *Brucella*. Brevemente, la técnica consiste en aplicar una muestra de suero o sangre completa al antígeno LPS de *Brucella* que se encuentra inmovilizado en una membrana de nitrocelulosa, el revelado se hace añadiendo anticuerpos anti-humanos marcados con partículas de oro coloidales rojas. Los resultados (+) muestran una línea roja que indica la presencia de *Brucella* en la muestra (Smits y cols., 2003), figura 5.C.

Smits y cols. (Smits y cols., 2003), han descrito una sensibilidad y una especificidad, conjunta, del 96% y 99%, respectivamente, detectando anticuerpos en las diferentes fases de la enfermedad (Irmak H y cols., 2004; Zeytinoğlu A y cols., 2006; Maas y cols., 2007).



Díaz R, Dorronsoro I. *Medicine* 2002;8(61):3289-96.



Serum	1-0	50-0	76-0	90-0	8-0
SAT	1:2,560	1:640	1:320	1:2,560	≤1:20
IgM flow	4+	1+	0	2+	0
IgG flow	2+	4+	2+	4+	0

Irmak H y cols. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Jun;70(6):688-94

Figura 5. Algunas pruebas serológicas para el diagnóstico de la brucelosis humana. **(A)** Dipstick-*Brucella*, La aparición de color en la banda superior indica la presencia de IgM en la muestra, la presencia de IgM frente a *Brucella* se detecta en la banda inferior. Resultados de 4 pacientes con brucelosis y 3 individuos sin brucelosis. **(B)** Reacciones de precipitación en gel. [A] resultados del análisis inmunoelectroforético del lipopolisacárido (LPS) de *B. melitensis* biovar 1 utilizando sueros de conejos infectados con *B. melitensis* 16M (canal superior) y *B. abortus* 2308 (canal inferior); [B] resultados de la prueba de Ouchterlony; pocillo central: suero de paciente con brucelosis, pocillos periféricos: 100, 50 y 25 mg de LPS de *B. melitensis* 16M; [C] resultados de la prueba de IDR realizada con placas (Ingezim® *Brucella* IDR) preparadas por Ingenasa (Madrid); [D] resultados de una prueba de CIEF realizada con un suero de un paciente con endocarditis y proteínas citosólicas solubles en agua obtenidas de la cepa rugosa *B. melitensis* 115. **(C)** Resultados del ensayo de flujo para la detección de anticuerpos IgM e IgG frente a *Brucella* de pacientes con y sin brucelosis. Se muestran los resultados del ensayo de flujo, IgM e IgG y del SAT. Muestras nº 1-0 y 50-0, pacientes con brucelosis aguda con distinto tiempo de evolución; muestra nº 76-0, paciente con brucelosis crónica; muestra nº 90-0, paciente con recidiva; y muestra nº 8-0, paciente sin brucelosis.

8.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (de la terminología inglesa “*Polymerase Chain Reaction*”), es una de las herramientas más importantes en el diagnóstico molecular, proporcionando una exquisita sensibilidad y especificidad para la detección de ácidos nucleicos. La monitorización en tiempo real de la PCR ha simplificado y acelerado los procedimientos en el laboratorio y ha incrementado la información obtenida de las muestras incluyendo la cuantificación y diferenciación de los productos amplificados. En la última década, el uso y aplicación de la PCR en tiempo real (PCRtr) en el diagnóstico clínico ha crecido exponencialmente, la PCRtr está reemplazando a la PCR estándar, y seguro que en un futuro aparecerán nuevas aplicaciones en el diagnóstico clínico (Kaltenboeck y Wang, 2005). La figura 6 muestra el número de publicaciones que aparecen en la base de datos Medline que contienen la palabra “Real-Time PCR” en el título o en el resumen. Estos datos demuestran que la técnica de PCRtr se perfila como uno de los métodos de vanguardia en las ciencias biomédicas, fundamentalmente en el diagnóstico molecular y la fisiología (Valasek y Repa., 2005).

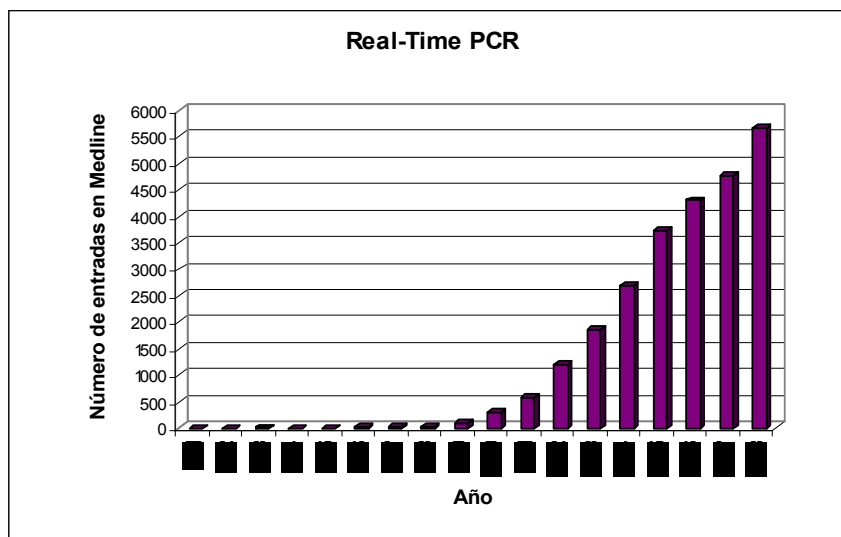


Figura 6. Número de publicaciones que aparecen en la base de datos MedLine que contienen la palabra “Real-Time PCR” en el título o en el resumen.

8.3.1. Antecedentes

En 1971, Kleppe y colaboradores (Kleppe y cols., 1971) exponen la idea de copiar o amplificar una molécula específica de ADN mediante un proceso cíclico utilizando una enzima la ADN polimerasa y oligonucleótidos que funcionaran como cebadores o “*primers*”. En ese momento la demostración práctica de esta teoría no fue posible debido a la dificultad y el costo de producción de los oligonucleótidos, el no contar con polimerasas termoestables y la ausencia de termocicladores automáticos.

La técnica de la PCR como método enzimático de amplificación de secuencias específicas de ADN fue concebido por Kary B. Mullis y sus colaboradores a principios de los años 80 (Saiki y cols., 1985; Saiki y cols., 1988; Mullis y Faloona, 1987; Mullis, 1990), razón por la que recibió el Premio Nobel una década después. La gran utilidad de esta técnica se difundió a principios de los ochenta por toda la comunidad científica. Los nuevos equipos y las avanzadas técnicas de secuenciación, así como los programas para la manipulación de datos que se fueron sucediendo, permitieron el desarrollo de mejores ensayos de PCR. La aparición de bases de datos como (i) GenBank (NCBI, Bethesda, MD, USA), (ii) EMBL Nucleotide Sequence Database (ABI, Hinxton, UK) y (iii) DDBJ (DNA Data Bank of Japan, Mishima, Japan) gestionadas por el International Nucleotide Sequence Database (INSD), permitieron la comparación de secuencias en todo el mundo. El uso de la *Taq* ADN polimerasa fue uno de los impulsos más importantes dados a la tecnología de la PCR (Saiki y cols., 1988). Esta enzima fue obtenida de forma recombinante, con lo que se eliminaron funciones no deseadas de la enzima original. En 1990, ya se contaba con tampones de PCR, dNTPs, $MgCl_2$ y *Taq* polimerasa de forma comercial.

La PCRtr fue introducida por Higuchi y cols. para detectar productos de PCR durante el proceso de su amplificación (Higuchi y cols., 1992; Higuchi y cols., 1993), y llevaron a cabo la primera demostración de una PCRtr en Roche Molecular Systems. Desarrollaron una PCR en la cual incluyeron el bromuro de etidio (EtBr) en el medio de reacción, la cual se llevó a cabo bajo luz ultravioleta (UV). En 1966, Le Pecq y Paoletti (Le Pecq y Paoletti, 1966) describen que este agente intercalante incrementa su fluorescencia, bajo la luz UV, cuando se une al ADN de doble cadena. Esta propiedad fue aprovechada, por Higuchi, para grabar la acumulación de ADN utilizando una videocámara. La grabación de esta sencilla reacción permitió el nacimiento de la PCRtr, la cual combina la enorme sensibilidad de la técnica de PCR con la precisión

que asegura el registro “in situ” de los productos generados en cada reacción de amplificación en cada uno de los ciclos de PCR.

La primera compañía que desarrolló la instrumentación necesaria para llevar a cabo la PCRtr fue Applied Biosystems en el año 1996, y desde entonces otras compañías como BioGene, Bioneer, Bio-Rad, Cepheid, Corbett Research, Idaho Technology, MJ Research, Roche Applied Science y Stratagene han desarrollado nuevos equipos (Valasek y Repa, 2005).

8.3.2. PCR en tiempo real

8.3.2.1. Definición

La PCRtr es, básicamente, una PCR estándar en la que los equipos de amplificación o termocicladores llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia o fluorímetro. Esto permite la visualización, en directo, de la amplificación del ADN por la adquisición de la señal de fluorescencia que se produce en cada reacción de amplificación de cada uno de los ciclos. Por lo tanto, esta técnica combina los pasos de amplificación de ADN y de la detección en un único ensayo y va a sustituir a la electroforesis y análisis de imagen de una PCR estándar. Su simplicidad, especificidad y sensibilidad junto con su potencial como técnica en investigación y en aplicaciones clínicas y diagnósticas, han hecho de la PCRtr una tecnología altamente competitiva para la detección de ADN y ARN.

8.3.2.2. Ventajas de la PCR en tiempo real

La gran ventaja de la PCRtr es que no se necesita análisis post-PCR, como sucede en la PCR estándar. Al no tener que hacer analizar el producto de la PCRtr disminuyen los problemas de contaminación, pues no se manipulan los amplificadores (Longo y cols., 1990), y se previenen los falsos positivos (Kaltenboeck y Wang, 2005). En cuanto a la rapidez en obtener los resultados, si el equipo empleado es el Light Cycler® o equivalente, esta ventaja todavía es más acusada, pudiéndose completar el proceso de amplificación y detección en 30-40 min. Además, gracias a su rapidez, estos equipos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos (Costa, 2004).

Los sistemas en tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácidos nucleicos presentes en las muestras de manera mucho más sencilla, más precisa y sobre todo en un rango mucho mayor (5-6 log) que en los procedimientos convencionales (2-4 log), (Costa, 2004). En la PCR estándar, la cuantificación, se hace en función del producto final y debido a que la propia PCR es una reacción enzimática, las variaciones que se pueden observar son muy significativas. Sin embargo, en la PCRtr dicha cuantificación se realiza en función del valor del denominado Ciclo Umbral (Ct), que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo. Este Ct se lee al principio de la fase de amplificación, por lo que no se ve afectado por todas las variaciones que se pueden producir a lo largo de la reacción de amplificación, con lo que los resultados son completamente reproducibles (Figura 7.A) y se pueden discriminar fácilmente entre valores diferentes de ADN diana (Figura 7.B). En la figura 7.A se muestran los resultados de 96 replicas de una muestra en una misma placa de PCR y en ella se pueden observar las enormes variaciones que se pueden obtener en los resultados del producto final frente a nula variación observable en el valor de Ct en todas las réplicas.

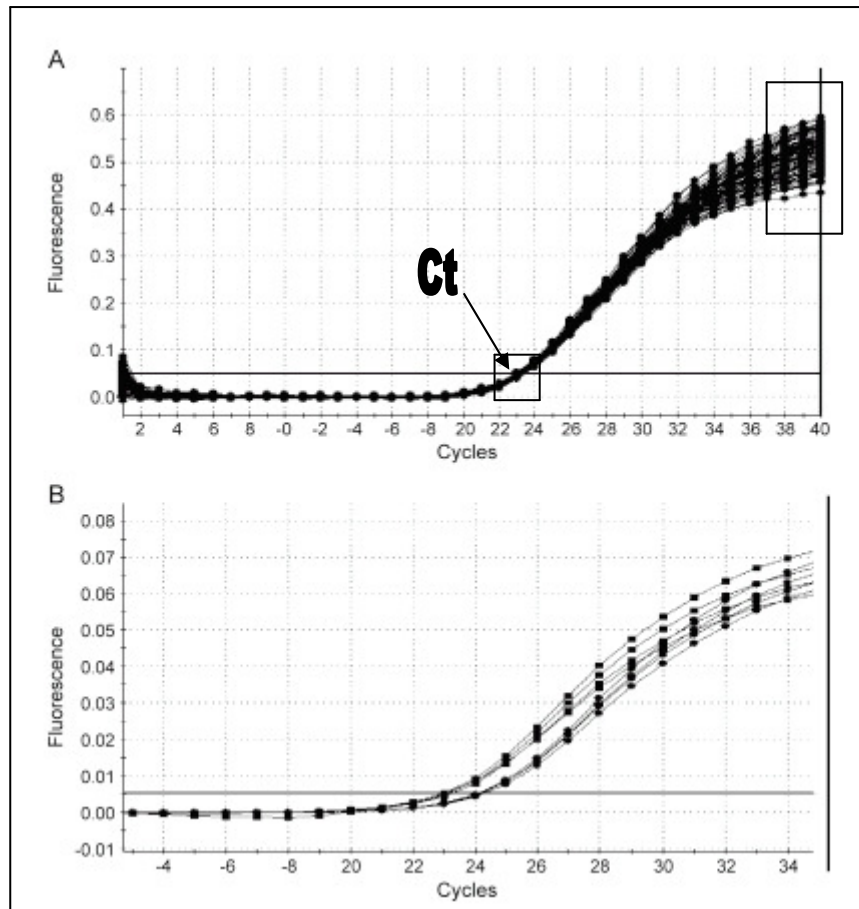


Figura 7. Reproducibilidad y precisión de la PCRtr. (A) Análisis de una placa de 96 pocillos que contiene réplicas de la misma muestra. El ensayo fue llevado a cabo en un termociclador Stratagene MX 4000 usando una sonda Taqman®. El promedio de Ct para las 96 reacciones es 23 ± 0.3 (media \pm DS). (B) Dos reacciones mezcladas, realizadas por triplicado. Una contiene 1×10^3 copias del ADN molde y marca un Ct de 23.1 ± 0.15 (media \pm DS), y la otra tiene 2×10^3 copias del ADN molde y marca un Ct de 24.1 ± 0.1 (media \pm DS). Esto corresponde exactamente al valor esperado de Δ Ct de 1.

Los equipos para PCRtr tienen numerosas aplicaciones, ya que se pueden llevar a cabo diversos ensayos: amplificación y detección simultáneas del ADN, cuantificación con estándares de concentraciones conocidas, determinación de mutaciones y reacciones en uniplex y en multiplex, entre otras, mientras que los procedimientos convencionales requieren múltiples equipos.

8.3.2.3. Mecanismos de detección

Es el proceso de detección el que distingue el ensayo de PCRtr del ensayo de PCR estándar (Mackay, 2004). Como se ha mencionado anteriormente, la tecnología de la PCRtr se basa en la utilización conjunta de termocicladores con un fluorímetro incorporado y fluoróforos.

Los fluoróforos son moléculas que poseen la propiedad de ser fluorescentes, es decir, tienen la capacidad de absorber energía de una radiación electromagnética (luz visible o ultravioleta) que las hace pasar a un estado electrónico excitado desde el cual vuelven al estado fundamental, liberando energía también en forma de luz. La luz emitida tiene una energía y frecuencia inferior a la absorbida y una longitud de onda superior. Cada fluoróforo posee espectros característicos de excitación y de emisión (Tabla 4). Si además es un colorante, es decir, absorbe luz visible se denomina fluorocromo (http://www2.uah.es/bioquimica/q-bp/11_contenidos.pdf).

Los fluoróforos pueden ser de dos tipos dependiendo de si emiten o aceptan energía. Así, un fluoróforo donador (f-donador) o “*reporter*” es una molécula que absorbe energía y pasa a un estado excitado; posteriormente, al volver al estado inicial emite el exceso de energía en forma de fluorescencia. Los fluoróforos aceptores (f-aceptor) o “*quencher*” son moléculas que aceptan la energía de un fluoróforo donador y la disipan en forma de calor o fluorescencia, figura 8.

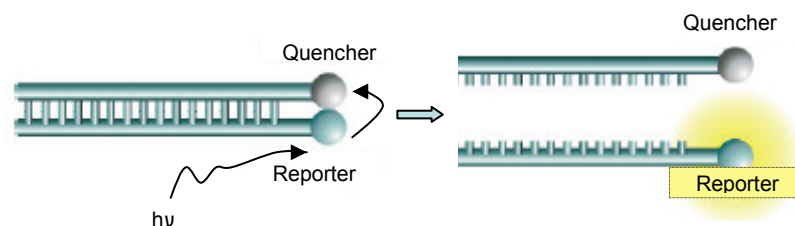


Figura 8. Mecanismo de acción de los fluoróforos. El “*reporter*” o donador es excitado, pero al estar junto a un “*quencher*” o aceptor éste apantalla la emisión de la energía. Al separarse el fluoróforo aceptor del donador éste emite la energía en forma de fluorescencia.

Tabla 4. Fluoróforos donadores y aceptores más utilizados.

Nombre	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Nombre	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Fluoróforos			Quenchers		
FAM	492	515	Methyl Red	410	No disponible
TET	521	536	ElleQuencher	650,600	No disponible
JOE	527	548	Dabcyl	453	No disponible
HEX	535	556	Dabsyl	466	No disponible
TAMRA	555	580	TAMRA	555	580
ROX	575	602			
Cy3	552	565			
Cy3.5	581	596			
Cy5	651	674			
Cy5.5	675	694			
Cy7	743	767			
R6G	518	543			
Texas Red	583	603			
VIC	528	546			

nm: longitud de onda

Si la energía que emite un f-donador tras ser excitado por una fuente de luz externa, es absorbida por un fluoróforo cercano, se produce una transferencia de energía por resonancia o FRET (de la terminología inglesa, “*Fluorescente Resonante Energy Transfer*”), este fenómeno fue descrito por Theodor Förster en 1948. Como consecuencia de esta transferencia de energía del fluoróforo donador al aceptor podemos definir dos mecanismos de actuación, dependiendo de cómo se produzca la disipación de la energía del fluoróforo aceptor. El primero, se produce cuando la molécula que actúa como aceptor de energía, decae a su estado basal en forma no radiactiva, se convierte en un apagador de la fluorescencia o “*quencher*”, el cual disipa la energía en forma de calor (Figura 9). La disminución de esta intensidad de fluorescencia se denomina “*quenching*” ([http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~19-3-2006/Fluoresc-teorica5\(quenching\).pdf](http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~19-3-2006/Fluoresc-teorica5(quenching).pdf)).

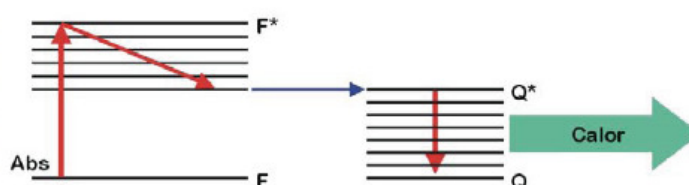


Figura 9. “*Quenching*”. El f-aceptor pasa a su estado basal disipando la energía transferida, por parte del f-donador, en forma de calor.

El segundo, se produce cuando la molécula que actúa como aceptor de la energía es a su vez fluorescente, ésta emitirá luz a una longitud de onda distinta del f-donador (Figura 10).

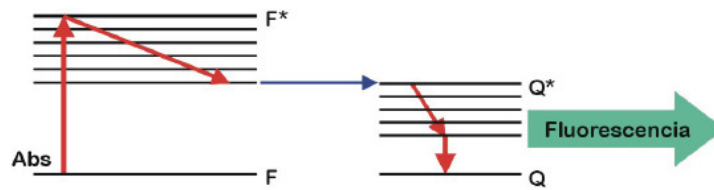
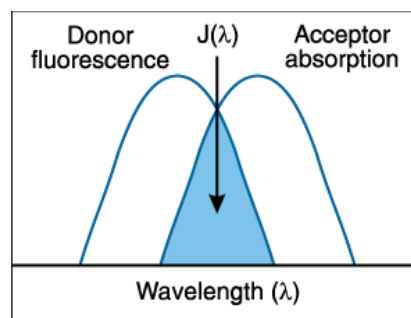


Figura 10. Fluorescencia. Tras ser excitado el f-donador transfiere su energía al f-aceptor que libera la energía en forma de fluorescencia, este fenómeno se produce debido a que la longitud de onda de emisión del f-donador coincide con la de excitación del f-aceptor.

Para que se produzcan ambos procesos, los dos fluoróforos deben estar muy próximos, $<2\text{\AA}$ y $10\text{-}100\text{\AA}$, respectivamente (<http://www.unizar.es/departamentos/bioquimicabiologia/docencia/Biofvirtual/Emi.pdf>) y el espectro de absorción del f-aceptor debe solapar con el espectro de emisión de fluorescencia del f-donador (Figura 11).



<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer-FRET.html>

Figura 11. El espectro de emisión y absorción de los dos fluoróforos deben solapar para que se de la transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia.

En la actualidad se dispone de una gran variedad de sondas y cebadores para trabajar en PCRtr, dependiendo del estudio que vayamos a realizar (tabla 5).

Tabla 5. Sistemas para monitorizar la fluorescencia del ADN amplificado mediante PCRtr.

Sistema de detección	Cebador /Sonda	PCRtr Múltiple	Discriminación alélica	Curvas disociación/ Productos inespecíficos
No específico				
SYBR Green I	2C	No	No	Si/Si
Específico				
Sondas de hidrólisis	2C/1S	Si	Si	No/No
Sondas de hibridación				
Sondas Adyacentes	2C /2S	Si	Si	Si/No
Oligosondas Horquillas				
S. Molecular Beacon	2C/1S	Si	Si	Si/No
Sondas Scorpions	1C/1C-S	Si	Si	Si/No
Sunrise Primers	2C	Si	Si	Si/No
LUX Primers	2C	Si	No	Si/No
Sondas con MGB	2C/1S	Si	Si	
Análogos de AN				
PNAs	2C/1S	Si	Si	Si/No
LNAs				Si/No

MGB: Minor Groove Binders; LUX: Light Upon Extension; PNAs: Peptide Nucleic Acid; LNAs: Locked Nucleic Acid; C: Cebador; S: sonda.

Existen dos tipos de sistemas de detección, dependiendo de si los fragmentos de ADN amplificados en la PCRtr son o no específicos:

8.3.2.3.1. No específicos. Detectan todos los ADN de doble cadena (dsADN) producidos durante la reacción de amplificación, ya sea producto específico, inespecífico o dímeros de cebadores. Es el método estándar y consiste en añadir un agente intercalante de la doble cadena o un fluoróforo que emite fluorescencia cuando se une a ésta; por ejemplo: bromuro de etidio (Higuchi y cols., 1992), YO-PRO-1 (Ishiguro y cols., 1995; Tseng y cols., 1997) y SYBR Green I (Morrison y cols., 1998). El más utilizado es el SYBR Green I que se excita a 497nm y emite a 520nm. Este fluoróforo se une con gran afinidad al surco menor del ADN bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces. La detección con SYBR-Green I es tan sensible que llega a identificar la producción de una única molécula, figura 12. Este formato de detección necesita una puesta a punto previa para que la PCR no amplifique productos inespecíficos que luego el fluorímetro detectaría, introduciendo errores en el posterior análisis de los resultados.



<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/pdf%20solu/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>

Figura 12. Mecanismos de acción del SYBR[®] Green I. Este colorante específico de ADN de doble cadena incrementa su fluorescencia cuando se une al producto amplificado, ya sea un producto específico, inespecífico o dímeros de cebadores.

Es común la formación de dímeros de cebadores (Chou y cols., 1992) junto con los productos específicos. Para discriminar si las muestras con curva de amplificación positivas corresponden a productos específicos, a dímeros de cebadores o a productos inespecíficos, se suele realizar una curva de disociación o de fusión (de la terminología inglesa “*melting curve*”) al final de la reacción ya que los productos de PCR inespecíficos se desnaturalizan a una temperatura muy inferior que los específicos (Ririe y cols., 1997). La reacción se calienta lentamente desde 50°C hasta 95°C monitorizando continuamente la fluorescencia; la temperatura a la cual el ADN se desnaturaliza se observa como una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del SYBR Green I. Los productos de PCR de diferente longitud y diferentes secuencias se desnaturalizan a diferentes temperaturas, observándose diferentes picos cuando se representa la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura ($-dT/dF$), figura 13.

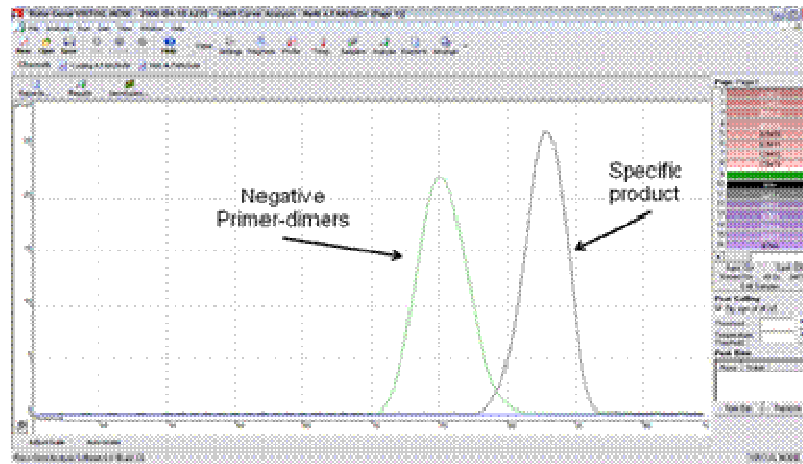


Figura 13. Análisis de la curva de disociación. Los picos de las curvas muestran que los productos específicos de la PCR en tiempo real tienen una temperatura de fusión mayor a la de productos inespecíficos.

En estas condiciones el SYBR Green I se puede utilizar para detectar y cuantificar mutaciones puntuales o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, de la terminología inglesa “*Single Nucleotide Polymorphism*”), ya que incluso los amplificados que difieren en un solo nucleótido, pueden desnaturalizarse a diferentes temperaturas y pueden detectarse por sus picos de desnaturalización, es posible distinguir muestras homocigotas -un solo pico- de muestras heterocigotas -dos picos- (Figura 14).

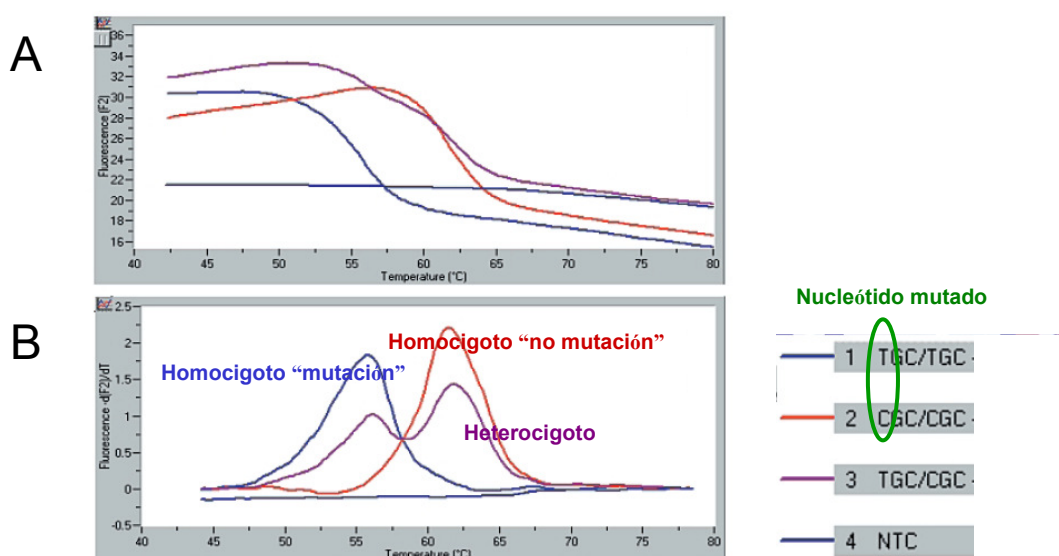


Figura 14. Detección de mutaciones puntuales (SNPs) mediante PCRtr. Podemos observar que la muestra heterocigota presenta dos picos.

8.3.2.3.2. Específicos. Estos sistemas de detección son capaces de distinguir la secuencia de interés entre los dímeros de cebadores y las amplificaciones inespecíficas. Todos ellos se basan en la utilización de sondas o cebadores marcados con un amplio rango de fluoróforos con diferentes espectros de excitación y emisión (Tabla 4). A continuación se describen algunas de las sondas y los cebadores más utilizados:

8.3.2.3.2.1. Sondas de hidrólisis

Las sondas de hidrólisis o sondas TaqMan son oligonucleótidos, de entre 15-30 pb, que están marcados con un f-donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y con un f-aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador (Gibson y cols., 1996). Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor debido a su proximidad (Clegg; 1992), figura 15. Durante la PCRtr, la sonda se une específicamente a su secuencia diana en una región interna del fragmento a amplificar. Cuando la ADN polimerasa comienza el proceso de amplificación y se encuentra con la sonda, gracias a su actividad exonucleasa 5'→3', libera el f-donador al medio separándolo del f-aceptor, lo que ocasiona un aumento irreversible de la fluorescencia detectada (Heid y cols., 1996; Gibson y cols., 1996). Como el donador y el aceptor están ahora espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el fluorímetro. Este proceso se repite en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto de PCR. El empleo simultáneo de sondas marcadas con diferentes "reporters" permite detectar la amplificación de dos o más secuencias diferentes en una misma reacción de PCR.

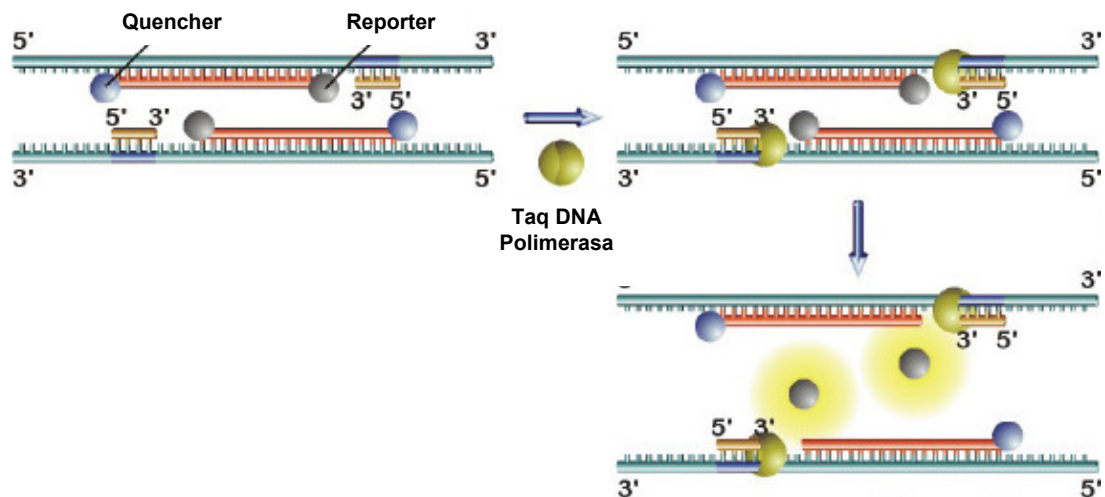


Figura 15. Sondas de hidrólisis. El sistema usa sondas con doble marcaje y depende de la actividad 5'-exonucleasa de la ADN-polimerasa para separar por hidrólisis el donante o *reporter* y el aceptor o *quencher*. El donante emite fluorescencia al ser hidrolizado del aceptor por la ADN-polimerasa.

8.3.2.3.2.2. Sondas de hibridación

8.3.2.3.2.2.1. Sondas adyacentes

También llamadas sondas FRET, consisten en un par de oligonucleótidos que se unen a secuencias adyacentes del fragmento de ADN amplificado, una de las sondas lleva un f-donador en su extremo 3' y la otra un f-aceptor en su extremo 5', bloqueando su extremo 3' con un grupo fosfato para que no haya amplificación, en la figura 16 se describe su mecanismo de acción.

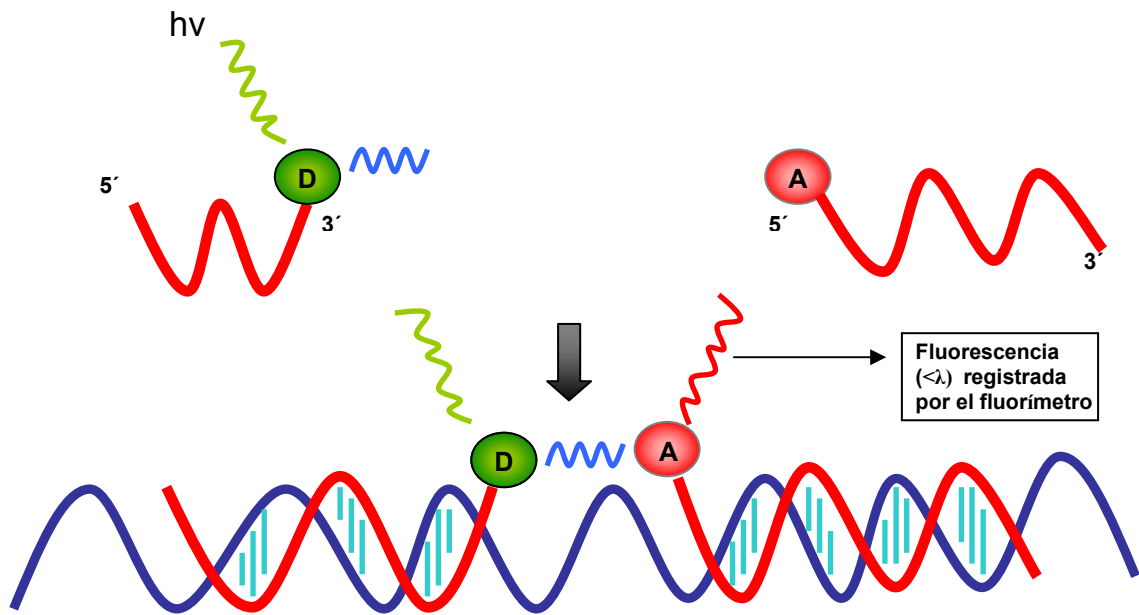


Figura 16. Sondas adyacentes. En la fase de desnaturalización de cada ciclo de la PCR, los f-donadores y los f-aceptores de cada una de las sondas están a una distancia demasiado grande como para que se produzca la transferencia de energía entre ellos. Durante la fase de hibridación, las sondas hibridan en el ADN diana y se produce la unión adyacente de las dos sondas produciéndose la transferencia de energía desde los f-donadores a los f-aceptores (Bernard y Wittwer, 2000), los cuales emiten la energía a una menor longitud de onda que es registrada, en cada ciclo, por el fluorímetro (la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado). Después de la fase de elongación, el producto de PCR se ha duplicado y las sondas están de nuevo demasiado lejos para que se produzca la transferencia de energía, mediante quenching FRET.

Con este tipo de sondas, además de cuantificar el ADN, podemos detectar mutaciones puntuales estudiando las curvas de disociación de los productos de la PCR. Para ello, una de las sondas debe cubrir la zona en la que se encuentra la mutación objeto del estudio. Si no existe mutación en el ADN diana, se producirá una hibridación perfecta. Si la mutación está presente, existirá una zona de mal apareamiento que producirá un descenso en la temperatura de fusión del híbrido formado, figura 34.

8.3.2.3.2.2. Sondas/Cebadores Horquillas

Son unos oligonucleótidos de cadena sencilla, donde reside la secuencia de unión específica con el ADN diana (Costa, 2004), que incorporan una extensión de 6 nucleótidos (hexámeros) en cada extremo cuyas secuencias son complementarias (CG) por lo que adopta la conformación de horquilla. Por último, pueden presentar uno o dos fluoróforos en los extremos, dependiendo del tipo de sonda o cebador que se necesite diseñar.

8.3.2.3.2.2.2.1. Sondas Molecular Beacon

Fueron descritas por Tyagi y Kramer, en 1996 (Tyagi y Kramer, 1996), se trata de unos oligonucleótidos donde además de la secuencia específica y el hexámero, antes mencionados, presentan un fluoróforo donador en el extremo 5' y un extintor de fluorescencia (“*quencher*”) en el extremo 3', figura 17.

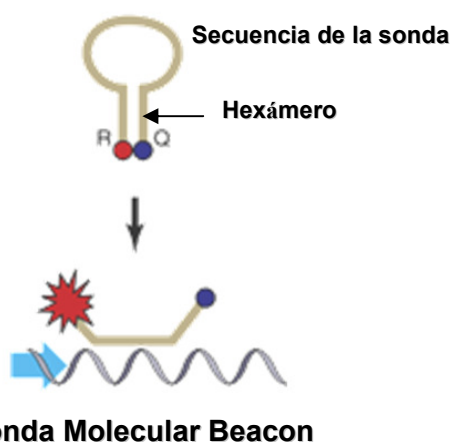


Figura 17. Estructura y mecanismo de acción de una sonda Molecular Beacon.

En solución, estas moléculas fluorescentes adoptan forma de horquilla manteniendo muy próximos el fluoróforo donador y el “*quencher*”, impidiendo la emisión de fluorescencia. Cuando la molécula encuentra una secuencia diana se despliega para hibridar con la misma, separándose ambos fluoróforos detectándose la fluorescencia (Figura 17). Si la secuencia diana de ADN no encaja perfectamente con la secuencia de la sonda, no se producirá hibridación y no habrá fluorescencia, ya que

si las secuencias no se unen perfectamente el plegamiento de estas moléculas en forma de horquilla predomina sobre la hibridación.

La principal desventaja de este tipo de sondas es que su diseño es bastante complicado ya que, además de hacer un estudio de secuencia hay que hacer un estudio termodinámico para que la energía de unión bucle-amplicón sea termodinámicamente más estable que la del brazo de la propia sonda Molecular Beacon (<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/pdf%20solu/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>).

8.3.2.3.2.2.2. Cebador-Sonda “Scorpions”

La horquilla está unida al extremo 5' de un cebador específico por medio de un “bloqueante de la PCR” (Whitcombe y cols., 1999), figura 18.

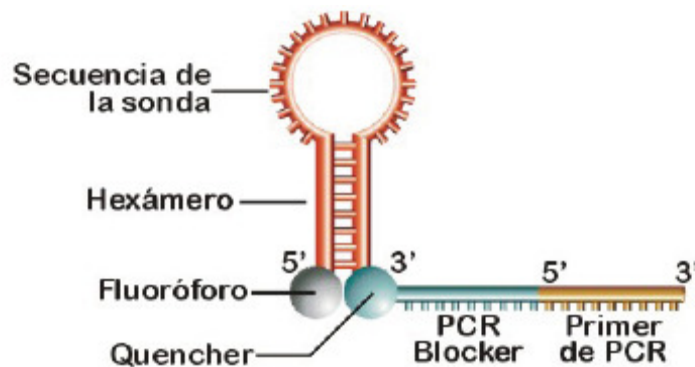


Figura 18. Estructura de una sonda Scorpions.

Después de la unión de la sonda al ADN diana, la ADN-polimerasa copia la secuencia de nucleótidos a partir del extremo 3' del cebador. En el siguiente paso de desnaturalización la secuencia específica de la sonda se une a la región complementaria dentro de la misma hebra de ADN recién amplificada. Esta hibridación abre la estructura de horquilla de tal forma que el f-aceptor ya no queda próximo al f-donador y se observa un incremento en la fluorescencia.

La unión intramolecular de la sonda es cinéticamente favorable y altamente efectiva. Además, no es necesaria la ruptura enzimática de la sonda, por lo que se reduce el tiempo necesario para obtener señal. No obstante, como el f-aceptor y el

f-donador permanecen en la misma hebra de ADN y relativamente próximos, a veces se puede producir el quenching incluso cuando la horquilla esté abierta, figura 19.

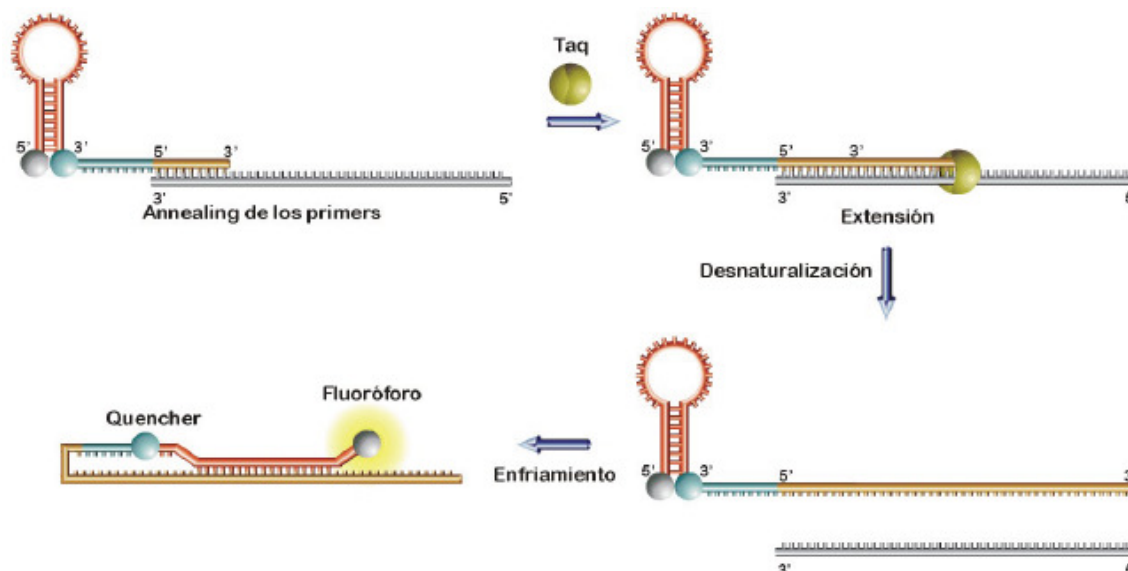
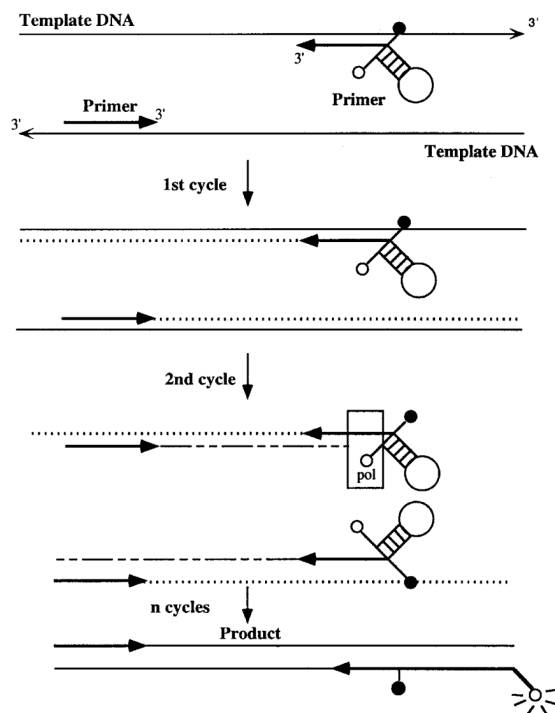


Figura 19. Mecanismo de acción de una sonda Scorpions.

8.3.2.3.2.2.3. Cebadores fluorescentes o “Sunrise™ primers”

Fueron creados por Oncor (Gaithersburg, MD, USA) y son similares a las sondas Scorpions. La diferencia es que combina el cebador y el mecanismo de detección de la PCR en la misma molécula (Nazarenko y cols., 1997), es decir, es el cebador el que lleva asociados los fluoróforos. Este tipo de cebador presenta una estructura en forma de horquilla en su extremo 5', donde están localizados el f-donador y el f-aceptor, y el extremo 3' actúa como cebador de la PCR. Cuando este cebador está libre, la horquilla está intacta, el f-donador transfiere la energía al f-aceptor en forma de quenching FRET. Cuando el cebador se une al ADN diana y éste es amplificado, el f-donador y el f-aceptor se separan lo suficiente para que haya emisión por parte del f-donador (Wong y Medrano, 2005), figura 20.

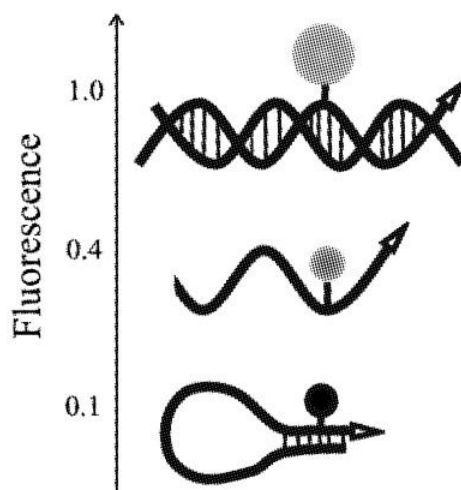


Nazarenko. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 15;25(12):2516-21

Figura 20. Mecanismo de acción de una sonda "SunriseTM primers". Emisión de fluorescencia, por parte del f-donador, tras la incorporación del primer sunrise al producto de PCR amplificado.

8.3.2.3.2.2.4. Light Upon Extension (LUXTM) fluorogenic primers

Los cebadores fluorogénicos tienen estructura secundaria en forma de horquilla y están marcados con un único f-donador en el extremo 3'. No necesitan la presencia de un f-aceptor. Esta estructura les proporciona la capacidad de disminuir la señal de fluorescencia cuando el cebador está libre e incrementarla varias veces cuando se une a su secuencia diana y maximizarla cuando el cebador está incorporado en la doble cadena de ADN (Nazarenko y cols., 2002), figura 21. Esta técnica simplifica la cinética de la PCR, y los oligonucleótidos en forma de horquilla previenen la formación de los dímeros de cebadores y la unión inespecífica de cebadores (de la terminología inglesa "mispriming") a secuencias parcialmente complementarias presentes en el ADN de la muestra (Nazarenko y cols., 2002). Una ventaja más es que la incorporación de un fluoróforo permite el análisis del producto amplificado con las curvas de fusión. Este sistema ofrece alta sensibilidad y especificidad sin usar una sonda o una molécula aceptora de fluorescencia (Nordgren y cols., 2008).



Nazarenko. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):e37.

Figura 21. Aumento de la señal de un cebador fluorogénico.

8.3.2.3.2.3. Sondas con “Minor groove binders” (MGB)

Los ligandos de unión al surco menor (MGB) del ADN, son moléculas pequeñas con unas características químicas únicas que les permiten su unión, no covalente, al surco menor del ADN de doble cadena. Su unión apenas causa distorsión en el esqueleto fosfodiéster y estabiliza la estructura de ADN (Afonina y cols., 1997; Harris y cols., 2001; Wemmer, 2000). Este tipo de ligandos se une de manera selectiva a las secuencias ricas en AT, donde la amplitud del surco suele ser menor, lo que favorece la inserción de los anillos aromáticos tanto por interacciones de van der Waals como electrostáticas, la interacción se estabiliza con la formación de puentes de hidrógeno (Kutyvain y cols., 1997; Wemmer, 2000). Estos ligandos son tripéptidos, por ejemplo: dihydrocyclopyrroloindole tripeptide (DIP₃) y 1,2-dihydro-(3H)-pyrrolo [3,2-e] indole-7-carboxylate (CDPI₃).

Este tipo de sondas MGB ofrece varias ventajas con respecto a las sondas no MGB. Las sondas conjugadas con MGB forman duplex muy estables, permitiendo el diseño de sondas más cortas al incrementar, el MGB, la temperatura de fusión (T_m) (Sylvain y cols., 2004), aumentando su especificidad (Kutyvain y cols., 2000).

En los últimos años, han aparecido distintos tipos de sondas conjugadas con un MGB: TaqMan-MGB, Eclipse-MGB y Pleiades-MGB, figura 22. Este tipo de sondas se caracteriza por el empleo de un “*quencher*” no fluorescente u oscuro (NFQ), esta molécula actúa como aceptor en la transferencia de energía desde el “*reporter*”, pero no emite señal fluorescente detectable por sí misma. La ventaja es que se emite una señal más limpia y con menos ruido de fondo fluorescente procedente de la reacción, mejorando la discriminación y facilitando la interpretación de los datos.

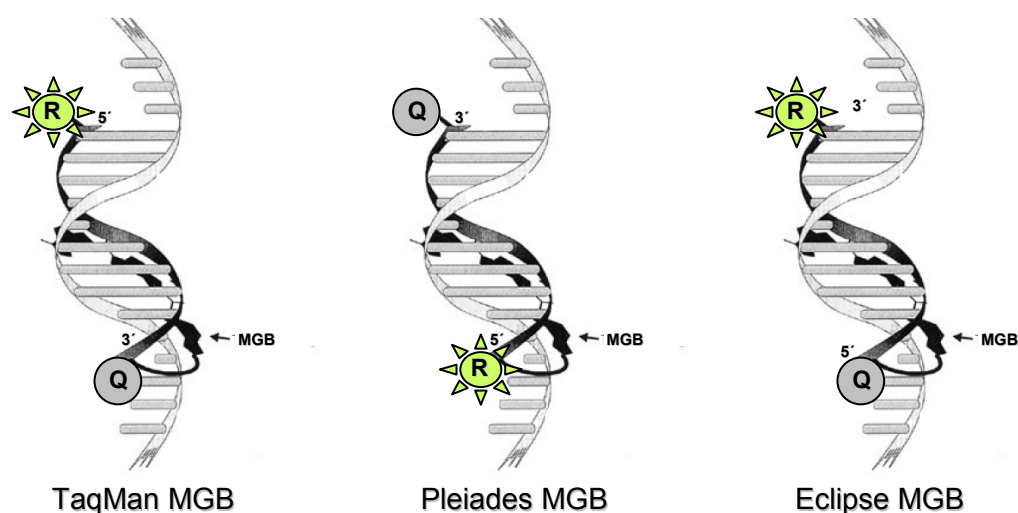


Figura 22. Sondas con MGB.

En la tabla 6, se muestran los tres tipos de sondas MGB anteriormente comentadas y sus características.

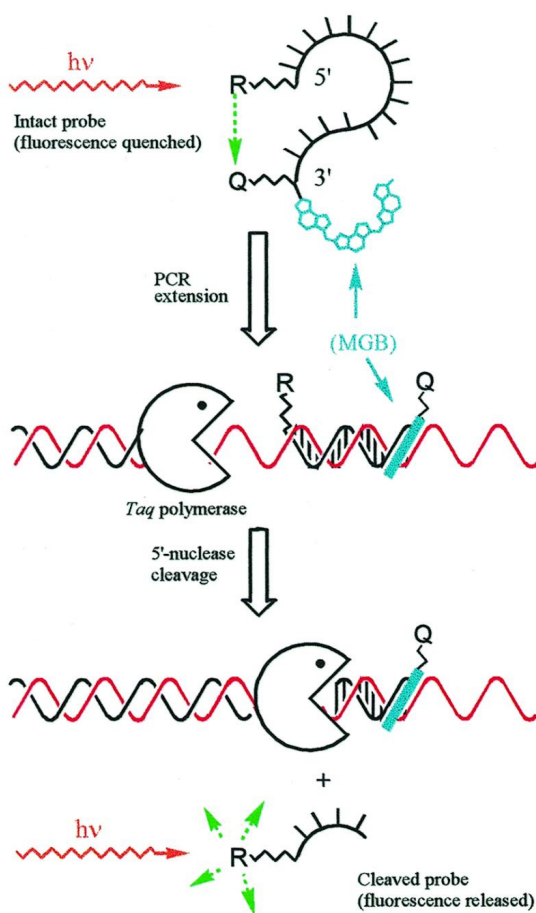
Tabla 6. Sondas MGB.

Sonda MGB	“ <i>reporter</i> ”	“ <i>quencher</i> ” no fluorescente	MGB	Tipo de sonda	Registro de la fluorescencia
TaqMan MGB	extremo 5’	extremo 3’	extremo 3’	Hidrólisis	Fase extensión
Pleiades MGB	extremo 5’	extremo 3’	extremo 5’	Hibridación	Fase hibridación
Eclipse MGB	extremo 3’	extremo 5’	extremo 5’	Hibridación	Fase hibridación

“*reporter*” o fluoróforo donador; “*quencher*” o fluoróforo aceptor.

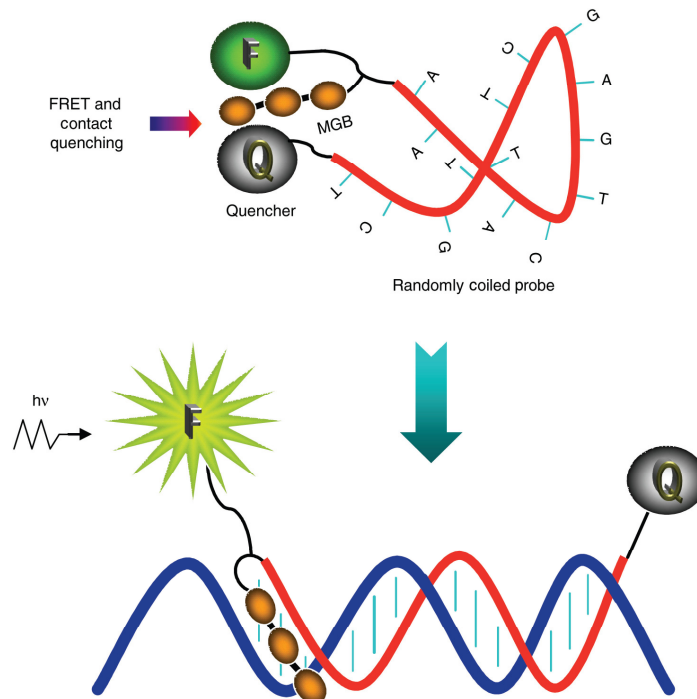
Cuando las sondas TaqMan MGB, Pleiades MGB y Eclipse MGB, no están unidas a su diana, el fluoróforo reportero está apantallado por el “*quencher*” porque la sonda adopta una estructura en espiral cuando está libre. Cuando se unen a su diana,

el “*quencher*” y el “*reporter*” están espacialmente separados, y las sondas emiten fluorescencia (Afonina y cols., 2002), como se muestra en las figuras 23,24,25. En la tabla 6, se puede apreciar que las sondas TaqMan MGB son sondas de hidrólisis mientras que las Pleiades MGB y Eclipse MGB son sondas de hibridación. La posición del MGB en el extremo 5', de estas dos últimas sondas, las protege de ser hidrolizadas por la ADN-polimerasa durante la PCR y esto supone que estén intactas para el análisis de las curvas de disociación post-PCRtr.



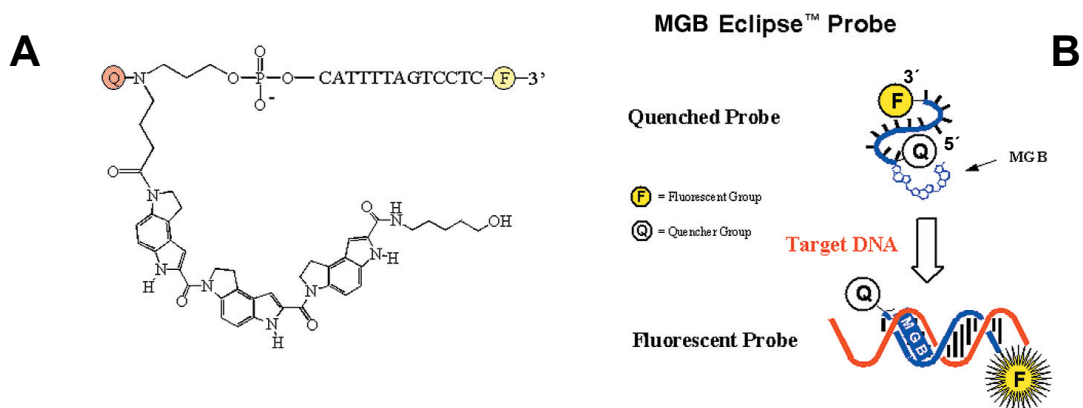
Kutyavin N. *Nucleic Acids Research* 2000;28:655.

Figura 23. Mecanismos de acción de una sonda TaqMan MGB. La sonda lleva en el extremo 5' un “*reporter*” (R, fluorescente), y en el extremo 3', un “*quencher*” interno (Q, TAMRA) junto al MGB. La fluorescencia de la sonda libre, después del FRET, es apantallada por el quencher. Cuando la sonda hibrida, la molécula MGB estabiliza la unión pegándose al surco menor de la doble cadena de ADN generada entre la sonda y la secuencia diana (Rodríguez, 2004). Durante la fase de extensión de los cebadores la sonda hibridada es hidrolizada por la ADN-polimerasa, gracias a su actividad 5'-exonucleasa, por lo que el “*reporter*” liberado emite fluorescencia que es registrada por el fluorímetro de la PCRtr.



Lukhatanov EA. *Nucleic Acids Research* 2007;35:e30

Figura 24. Estructura y mecanismo de acción de las sondas Pleiades MGB. La sonda lleva en el extremo 5' un MGB junto con un "reporter" interno (F, fluorescente), y en el extremo 3' un "quencher" (Q). La fluorescencia de la sonda libre, después del FRET, es apantallada por el "quencher". El MGB de la sonda, evita la degradación de la sonda por la ADN-polimerasa durante la fase de extensión de la PCR, y la fluorescencia se registra durante la fase de hibridación de la PCRtr (Lukhatanov y cols., 2007).



Afonina IA. *BioTechniques* 2002;32:940-49.

Figura 25. Sonda Eclipse MGB. (A) Estructura. En el extremo 3' se encuentra el "reporter" (F) y en el extremo 5' un "quencher" interno (Q). El MGB de la sonda, unido al extremo 5', previene a la sonda de la degradación, por parte de la actividad 5'-3' de la *Taq* polimerasa durante la fase de extensión de la PCR (Belousov y cols., 2004). (B) Sistema de detección, la fluorescencia de este tipo de sondas se registra durante la fase de hibridación de la PCRtr.

8.3.2.3.2.2.4. Análogos de ácidos nucleicos (AN)

En la actualidad se han descrito una gran variedad de análogos de los ácidos nucleicos, por ejemplo: ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) (Nielsen y cols., 1991); 2'-fluoro N3-P5'-phosphoramidites (Schulz y Gryaznov, 1996); ácidos nucleicos 1', 5'-anhydrohexitol (HNAs) (Verheggen y cols., 1995; Hendrix y cols., 1997); phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO) (Summerton y Weller, 1997) y los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) (Singh y cols., 1998). De todos estos análogos, se están utilizando los PNAs y los LNAs en distintas aplicaciones de la PCR en tiempo real.

8.3.2.3.2.2.4.1. Sondas PNAs (Peptide Nucleic Acid)

Los ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) fueron descritos por Nielsen y cols. en 1991 (Nielsen y cols., 1991). Son análogos de ADN quirales y eléctricamente neutros, en los que el esqueleto de azúcar-fosfato ha sido reemplazado por un polímero de naturaleza peptídica formado por polimerización de N-(2- aminoetil)-glicina, al cual las bases nucleicas están unidas mediante enlaces metilencarbonilo (Nielsen y cols., 1991; Egholm y cols., 1992; Egholm y cols., 1993).

El PNA se caracteriza por su capacidad para hibridarse de manera estable y específica con ADN complementario, de acuerdo con las reglas de paridad de bases de Watson-Crick (Egholm y cols., 1993). De hecho, los PNAs de cadena sencilla (ssPNA) presentan mayor afinidad por el ssADN complementario que el propio ssADN de la misma secuencia. Esto se debe principalmente al carácter eléctricamente neutro del PNA, que evita fenómenos de repulsión entre cadenas (Nielsen y cols., 1991; Wittung y cols., 1994). La alta afinidad del PNA por el ADN, figura 26, permite incluso la hibridación de ssPNA a ADN de cadena doble (dsADN) mediante un proceso denominado "invasión de hebra" (Demidov y cols., 1995; Nielsen, 2001; Demidov y cols., 2002) y permite usar sondas de PNA para inducir recombinación y/o bloqueo específico de genes concretos (Rogers y cols., 2002).

Por otra parte, dada la estructura de su esqueleto peptidomimético, el PNA no es sensible (i) a la acción de enzimas biodegradadoras como DNAsas, RNAsas o proteasas, y (ii) a las variaciones de pH o de fuerza iónica. Esto hace que el PNA

posea una mayor estabilidad biológica (Nielsen, 1999) y química (Egholm y cols., 1993; Kambhampati y col., 2001) que el ADN o el ARN.

Por todas estas razones, se ha utilizado este análogo del ADN para detectar ADN o ARN específico con las denominadas sondas PNAs, que, conjugadas con el colorante fluorescente, naranja de tiazol, aumentan la fluorescencia después de la unión específica al ADN o ARN (Köhler y cols., 2005).

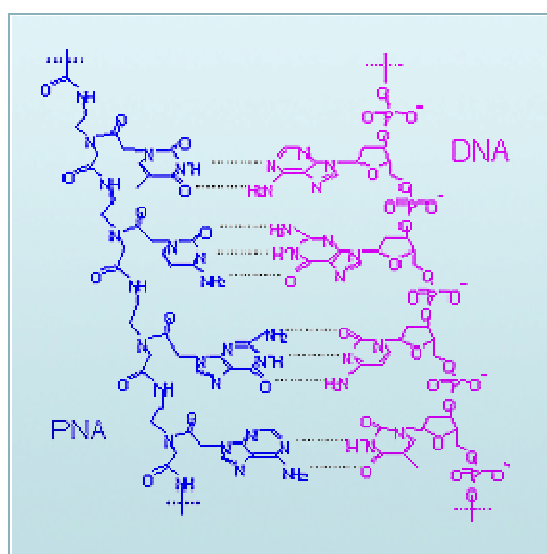
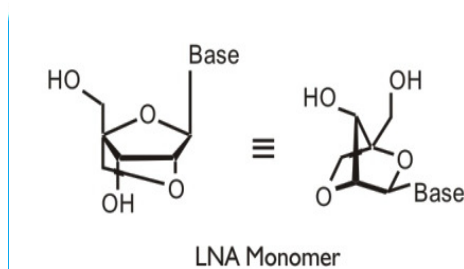


Figura 26. Comparación de la estructura de un PNA y ADN.

8.3.2.3.2.2.4.2. **LNA[®]** o “**Locked Nucleic Acid**”

Un ácido nucleico bloqueado o LNA[®] es un análogo de los ácidos nucleicos (ADN o ARN) descrito por Singh y cols. en 1998 (Singh y cols., 1998). Un LNA es un ácido nucleico que tiene uno o más nucleótidos modificados (Koshkin y cols., 1998). Estos monómeros de LNA presentan una modificación en el anillo de la ribosa, un puente metileno entre los átomos 2'-O, 4'-C que forman un anillo bicíclico (Koshkin y cols., 1998). Esta conformación estructural se encuentra a menudo en la forma A del ADN o ARN, figura 27.



http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/16881/PP_LNAFP-Brochure_web.pdf

Figura 27. Estructura de un monómero LNA®.

Los nucleótidos LNA® pueden ser mezclados con los nucleótidos habituales del ADN y ARN, esto aumenta la estabilidad térmica (T_m) de los oligonucleótidos (Kaur y cols., 2006) y se traduce en un aumento de la especificidad. Por cada nucleótido LNA que contenga un nucleótido, la T_m aumenta de 3-5°C y de 4-8°C para el ADN y el ARN, respectivamente. En la tabla 7, se muestra un ejemplo de los incrementos en los valores de la T_m según el número de nucleótidos LNA introducidos en un oligonucleótido.

Tabla 7. Aumento en la T_m de los oligonucleótidos que llevan monómeros de LNA.

Probe Sequence (5' -> 3')	LNA base	T_m^*	ΔT_m	$\Delta T_m/LNA$
dG dT dG dA dT dA dT dG dC	-	29°C	-	-
dG +T dG dA +T dA +T dG dC	3	44°C	15°C	+5°C
+G +T +G +A +T +A +T +G +C	9	64°C	35°C	+3.9°C

* T_m of duplex between probe and its complementary DNA sequence

Note: + symbol denotes the LNA base.

http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/16881/PP_LNAFP-Brochure_web.pdf

Las sondas fluorescentes LNA® han sido introducidas, como una nueva alternativa, en la PCR en tiempo real para las siguientes aplicaciones: detección de mutaciones, genotipado, discriminación alélica, polimorfismos de un único nucleótido (SNPs), y detección y cuantificación de patógenos.

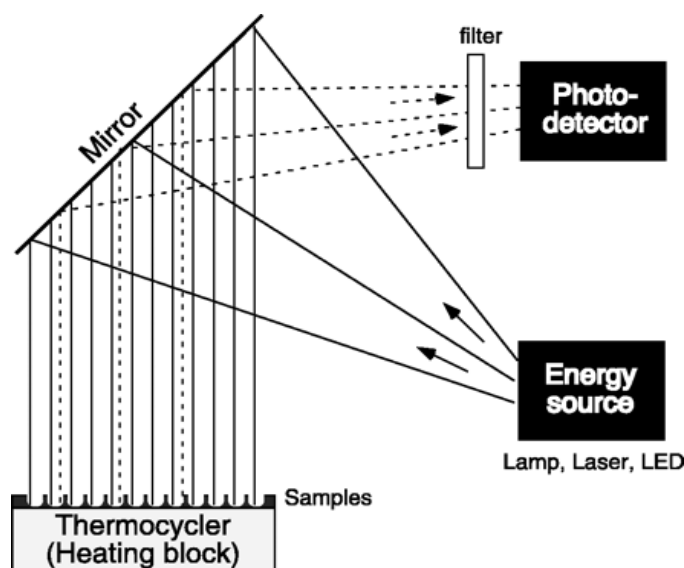
Este tipo de sondas incrementan, tanto, la estabilidad térmica (T_m) del duplex (Braasch y cols., 2003) como la especificidad de la sonda a su secuencia diana (Latorra y cols., 2003). Además, estas sondas siguen las reglas de apareamiento de las bases de Watson y Crick (Egholm y cols., 1993) y son más resistentes a la

degradación por nucleasas, tanto exo- como endo-nucleasas (Frieden y cols., 2003) que las sondas de ADN.

8.3.2.4. Instrumentación

Un requisito que debe cumplir este tipo de instrumentos es la capacidad de detectar la señal fluorescente y grabar el proceso de la reacción de la PCR. Los instrumentos deben emitir y detectar longitudes de onda específicas simultáneamente, por lo que la química de esta técnica y la instrumentación están estrechamente relacionados (Valasek y Repa, 2005).

Hay tres formas fundamentales para suministrar la energía de excitación para los fluoróforos: mediante lámparas, diodos emisores de luz (LED) o láser (figura 28). Las lámparas son instrumentos de emisión de amplio espectro, mientras que el de los LEDs y láseres es más restringido. Los equipos que presentan lámparas (generalmente de tungsteno halógeno o cuarzo tungsteno halógeno) pueden incluir filtros que limitan la luz emitida a longitudes de onda de excitación específicas. Entre ellos se encuentran el ABI Prism 7000 de Applied Biosystems, el Mx4000 y Mx3000P de Stratagene, y el iCycler iQ de Bio-Rad. El sistema de LED está representado por el LightCycler de Roche, el SmartCycler de Cepheid, el Rotor-Gene de Corbett y el DNA Engine Opticon 2 de MJ Research. La única máquina que utiliza láser para la excitación hasta el momento es el ABI Prism 7900HT (Valasek y Repa, 2005).



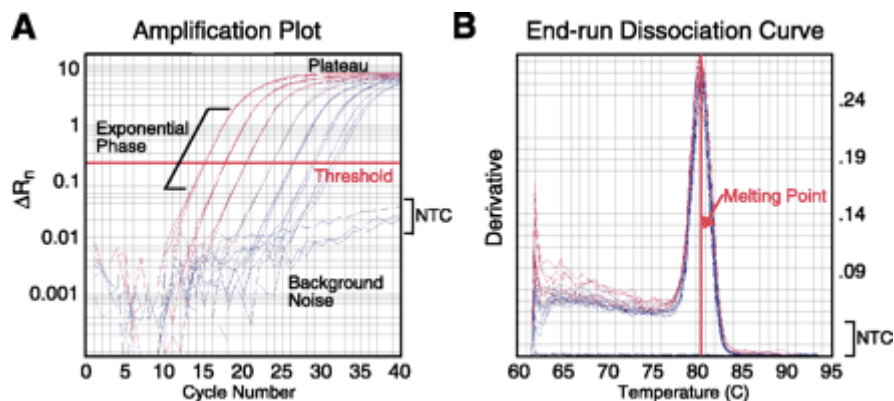
Valasek y Repa. *Adv Physiol Educ.* 2005;29:151-9.

Figura 28. Hardware de una PCRtr. Las muestras están colocadas en un termociclador, el cual controla las temperaturas requeridas en cada ciclo de la PCR. Las muestras son expuestas a la energía de excitación, y la fluorescencia resultante es medida por un fotodetector en cada ciclo. LED, diodo emisor de luz.

Para registrar los datos, la energía de emisión de los fluoróforos también debe ser detectada en longitudes de onda específicas. Los detectores están representados por cámaras acopladas a dispositivos de carga, tubos fotomultiplicadores u otro tipo de fotodetectores. Generalmente se emplean filtros o canales para detectar pequeños rangos de longitudes de onda. Normalmente se pueden detectar varias longitudes de onda discretas simultáneamente, lo que permite correr múltiples ensayos en un solo tubo de reacción (Valasek y Repa, 2005).

Otra parte importante de la instrumentación consiste en un termociclador efectivo para llevar a cabo las reacciones de PCR. Es muy importante que estos mantengan una temperatura constante a lo largo de la reacción en todos los tubos de ensayo dado que pequeñas desviaciones de la temperatura resultan en errores graves de cuantificación (Wilhelm y cols., 2000; Zuna y cols., 2002; von Kanel T y cols., 2007). Los bloques calentadores, ya sean Peltier o por resistencia, cambian de temperatura más lentamente que los calentadores de aire, lo que implica ciclos más largos de PCRtr. Los más utilizados usan una combinación de ambos.

La instrumentación de la PCRtr no estaría completa sin un hardware y un software para el análisis de los datos. El software simplifica el análisis de los datos y ofrece los resultados en forma de gráficos que muestran la amplificación y disociación de los productos. Las curvas de amplificación permiten el análisis cinético y la cuantificación del ADN de partida (figura 29.A), mientras que las curvas de disociación revelan las características, entre ellas la pureza, del producto final de la reacción (figura 29.B).



Valasek y Repa. *Adv Physiol Educ.* 2005;29:151-9.

Figura 29. Resultados de una PCRtr. (A) Curva de amplificación, ilustra el incremento de la señal de fluorescencia (eje_y, escala logarítmica) en cada ciclo de PCR (eje_x); (B) Curva de disociación, en este análisis aparece un único pico sugiriendo que solo se ha formado un producto específico de PCR.

El primer termociclador de PCRtr fue producido por Applied Biosystems de forma comercial en 1997, el ABI 7700. Posteriormente, Roche Diagnostics comenzó la distribución del LightCycler, el cual utiliza pequeños capilares de vidrio como tubos de reacción (Wittwer y cols., 1989; Wittwer y cols., 1997). En la tabla 8 se describen los equipos para llevar a cabo la PCRtr y sus fabricantes. Los más utilizados son los equipos fabricados por Applied Biosystems y Roche Diagnostics. Las diferencias más importantes entre estos equipos hacen referencia a la rapidez y al número de muestras que se pueden procesar al mismo tiempo. El número de canales de lectura que presentan los equipos también es importante, ya que disponer de varios canales de lectura permite identificar diferentes tipos de ADN diana en la misma reacción (PCR-Multiplex) o incorporar controles internos a la reacción, para detectar la presencia de inhibidores (Costa J, 2004).

Instrumento	Fabricante	Sistema Técnico	Tiempo de Reaccion	Capacidad
Serie GeneAmp	Applied Biosystems	Convencional	2 hs.	96
Serie AbiPrism	Applied Biosystems	Convencional	2 hs.	96
ICycler iQ	Bio Rad	Convencional	3 hs.	96-384
Light Cycler	Roche	Aire	20-60 min	32
Smart Cycler	Cepheid	Ceramica	40-60 min	16-96
MX4000	Stratagene	Convencional	90 min	96
Rotor Gene	Corbett	Aire	50 min	32

Costa J. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:299-304.

Tabla 8. Equipos para PCR en tiempo real.

8.3.2.5. Análisis de los datos

Los programas de los equipos de PCRtr tienen diversas opciones:

8.3.2.5.1. Amplificación y detección de ADN o ARN diana

8.3.2.5.1.1. Curvas de amplificación

Los datos se reflejan gráficamente en curvas de amplificación para cada uno de los estándares, muestras y controles. En estas curvas se representa la fluorescencia detectada *versus* el número de ciclos de la PCR. Las curvas de amplificación tienen tres fases: fase exponencial, fase lineal y fase plató, figura 30. La fase exponencial es el segmento inicial de la curva, en la cual el producto se incrementa de forma exponencial, debido a las condiciones óptimas de la reacción, donde la concentración de los reactivos todavía no es limitante. La fase lineal se caracteriza por un incremento lineal del producto de PCR, puesto que los reactivos empiezan a ser limitados. Finalmente, alcanzará la fase plató durante los últimos ciclos de la PCR. En esta fase no se distinguen grandes cambios en la fluorescencia, a pesar de que se siguen acumulando productos, debido a que algunos reactivos empiezan ya a agotarse (Yuan y cols., 2006).

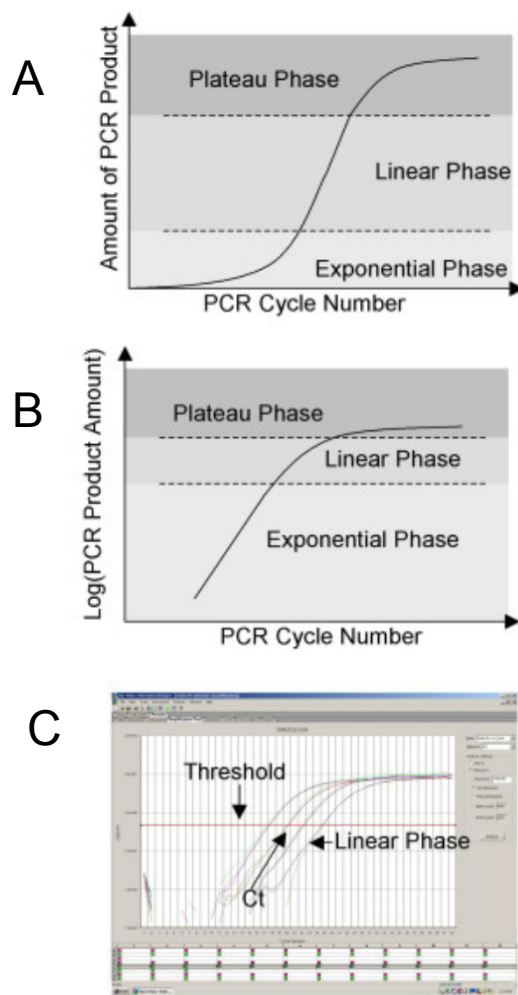
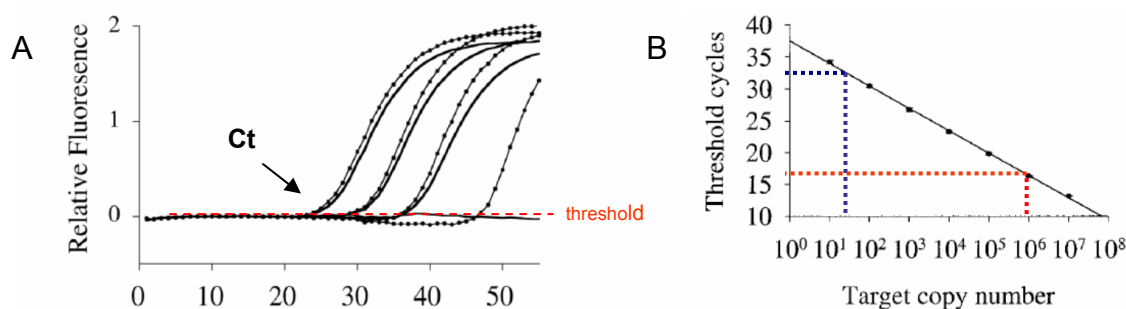


Figure 30. Representación de las curvas de amplificación. (A) Representación teórica del número de ciclos de la PCRtr contra la cantidad de producto de PCR. En la PCR se observan tres fases: fase exponencial, fase lineal y fase plató; (B) Representación teórica del número de ciclos de la PCR contra el logaritmo de la cantidad de producto de PCR; (C) Gráfico experimental de diluciones seriadas realizadas con el termociclador en tiempo real ABI 7000.

Yuan JS. *BMC Bioinformatics*. 2006 Feb 22;7:85.

8.3.2.5.1.2. Ciclo umbral (Ct)

El parámetro fundamental en una PCRtr y en función del cual se van a realizar todos los cálculos analíticos y obtención de resultados, es el denominado Ciclo Umbral (de la terminología inglesa “Threshold Cycle” o Ct), que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es significativa por encima del ruido de fondo (background). El valor Ct puede considerarse como la unidad de medida básica de la PCRtr (Bubner y Baldwin, 2004). El Ct se determina en la fase exponencial de la reacción de PCR, figura 31-A, y es inversamente proporcional al número de copias del ADN molde. Por lo tanto, cuanto más alto es el número de copias iniciales de los ácidos nucleicos a amplificar, antes se observa un aumento significativo en la fluorescencia, y son más bajos los valores de Ct, figura 31-B.



Nazarenko I. *Nucleic Acids Research* 2002;30-9e97

Figura 31. Curva de amplificación y curva estándar. (A) Curva de amplificación, donde se señala el Ct de la fase exponencial; (B) El Ct es inversamente proporcional al nº de copias, así a mayor nº de copias menor Ct (trazo rojo) y a menor nº de copias mayor Ct (trazo azul).

Para lograr una mayor exactitud en la cuantificación es necesario calcular la eficiencia de la amplificación. Durante la fase exponencial, en condiciones óptimas de PCR, el producto se duplica en cada ciclo y la eficiencia es del 100%. Por cada unidad de Ct que cambia en el resultado de una amplificación, se incrementa al doble la concentración inicial de muestra calculada.

Durante la fase exponencial, la señal de fluorescencia, S , puede ser representada por la ecuación 1 (Wilhelm y Pingoud, 2003):

$$S = pN_0\varepsilon^c \quad (1)$$

Donde: p es un factor de proporcionalidad que relaciona la concentración del producto de PCR y la señal de fluorescencia, S ; N_0 es la cantidad de ADN inicial; ε es la eficiencia de la amplificación ($1 \leq \varepsilon \leq 2$; donde $\varepsilon=2$ significa una eficiencia del 100%) y c es el número de ciclo.

Si despejamos c tenemos la siguiente ecuación:

$$c = -(\log \varepsilon)^{-1}(\log N_0 + \log p - \log S) \quad (2)$$

si consideramos $m = -(\log \varepsilon)^{-1}$, $b = -(\log \varepsilon)^{-1}(\log p - \log S)$, tenemos:

$$c = m \log N_0 + b \quad (3)$$

Esta ecuación describe la relación lineal entre los valores de Ct y el logaritmo de la concentración de ADN, N_0 . Los parámetros m y b pueden determinarse por regresión

lineal a partir de los valores (S;Ct) de los estándares de ADN de concentración conocida.

Despejando N_0 obtenemos:

$$N_0 = 10^{(Ct-b)/m} \quad (4)$$

La eficiencia puede ser entonces calculada como:

$$\epsilon = 10^{-1/m} \quad (5)$$

Si sustituimos ϵ en la ecuación 4, obtenemos la ecuación 6:

$$N_0 = \epsilon^{(b-Ct)} \quad (6)$$

El máximo valor de ϵ es 2.0 (si se duplica la cantidad de producto en cada ciclo), pero los valores experimentales de ϵ fluctúan entre 1.5 y 1.9. Si la eficiencia es baja disminuye la sensibilidad del ensayo pero permite cuantificaciones con mayor precisión (mayor reproducibilidad entre repeticiones).

El error en los valores de Ct resulta del ruido de fondo y del método de cálculo de Ct. En ensayos altamente optimizados, podemos obtener errores estándares menores de ± 0.2 ciclos, asumiendo una eficiencia de amplificación del 100%, lo que implica que el error relativo mínimo para la cuantificación está entre el 10 y el 20%.

8.3.2.5.2. PCR múltiple o multiplex

Este ensayo nos permite detectar o cuantificar varios genes diana simultáneamente, utilizando distintos cebadores y fluoróforos para cada ADN diana de la muestra.

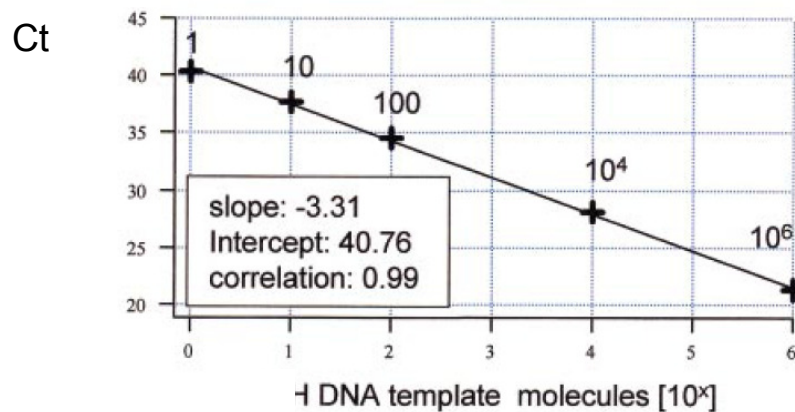
8.3.2.5.3. Cuantificación del ADN o ARN diana en la muestra

Esta cuantificación puede ser absoluta o relativa.

8.3.2.5.3.1. Cuantificación absoluta: El objetivo es determinar el número exacto de moléculas de ADN o ARN presentes en una muestra. El resultado estará expresado en las mismas unidades que los estándares de la curva de calibración (número de copias/ml, ng/ml, entre otros). Este tipo de cuantificaciones se emplean

para la detección y cuantificación de cargas virales, agentes patógenos o en la terapia génica.

Se puede cuantificar la concentración inicial de ADN o ARN diana en la muestra de manera muy sencilla, creando una curva estándar o patrón. Para ello se amplifican diluciones seriadas de un estándar de concentración conocida (Wong y Medrano, 2005). En cada ciclo de PCR se registra el incremento de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ADN del estándar. Se representa el logaritmo decimal de las concentraciones de los estándares versus el Ct (Heid y cols., 1996), figura 32. El resultado es una recta, $y = -m \text{ Log } (x) + b$, cuya pendiente (m) deberá ser teóricamente igual a -3.32 si tenemos una eficiencia de amplificación del 100% (Ecuación 5). En la práctica, un ensayo es aceptable hasta con un 92% de eficiencia.



Liss B. Nucleic Acids Research 2002;30:e89

Figura 32. Ejemplo de una curva de calibración de cuantificación absoluta, cuya recta es $y = -3.31 \text{ Log}(x) + 40.76$.

Una vez construida la curva estándar la concentración de ADN inicial de la muestra se calcula interpolando en ella los valores de los Ct de cada muestra problema.

El estándar de PCR puede ser un fragmento de ADN de cadena sencilla (ssADN), doble (dsADN) o ARN relacionado con la secuencia diana. La construcción de estos estándares es muy variada, por ejemplo, se puede clonar la secuencia diana dentro de un plásmido (Gerard y cols., 1998), purificar el producto de una PCR estándar (Liss, 2002), o directamente sintetizar el ADN diana. Los estándares de ADN muestran un mayor rango de cuantificación, reproducibilidad, y estabilidad que los

estándares de ARN (Pfaffl y cols., 2004). Sin embargo, un estándar de ADN no se puede usar en una RT-PCRtr debido a la ausencia de un control para la eficiencia de la retro-transcripción (Giulietti y cols., 2001).

8.3.2.5.3.2. Cuantificación relativa: Este tipo de cuantificación nos permite determinar los cambios en la expresión de un gen de una muestra con respecto a un estándar externo o la expresión de un gen de referencia, también llamado calibrador (Livak y Schmittgen, 2001). Cuando se usa un calibrador, los resultados son expresados como un cociente entre diana/referencia. Existen numerosos modelos matemáticos para calcular la expresión del gen normalizado mediante un ensayo de cuantificación relativa. Dependiendo del método empleado, los resultados pueden diferir y variar el error estándar (Liu y Saint, 2002; Muller y cols., 2002). En la tabla 9 aparecen los distintos métodos de cuantificación relativa, con una pequeña descripción de cada método.

Tabla 9. Características de los métodos de cuantificación relativa.

Métodos (Bibliografía)	Corrección Eficiencia Amplificación	Cálculo Eficiencia Amplificación	Suposición Eficiencia Amplificación	Programa Automático Basado-Excel
Curva estándar (Livak K, 1997)	NO	Curva estándar	la muestra no sufre variación experimental	NO
Comparativo $C_t (2^{-\Delta\Delta C_t})$ (Livak y Schmittgen, 2001)	SI	Curva estándar	referencia=diana	NO
Pfaffl et al. (Pfaffl, 2001)	SI	Curva estándar	muestra=control	REST ^a
Q-Gene (Muller y cols., 2002)	SI	Curva estándar	muestra=control	Q-Gene ^b
Gentle et al. (Gentle y cols., 2001)	SI	Datos en bruto	el investigador define la fase log-lineal	NO
Liu and Saint (Liu y cols., 2002)	SI	Datos en bruto	los genes de referencia y diana pueden tener distinta eficiencia	NO
AD-PCRtr (Peirson y cols., 2003)	SI	Datos en bruto	define estadísticamente la fase log-lineal	DART-PCR ^c
Ct: ciclo umbral; AD-PCRtr: análisis de datos para PCRtr; REST: "relative expression software tool"; DART-PCR: "Data analysis for RT". ^a www.gene-quantification.info ^b www.BioTechniques.com ^c nar.oupjournals.org/cgi/content/full/31/14/e73/DC1				

Wong y Medrano. *Biotechniques*. 2005 Jul;39(1):75-85.

La aplicación más utilizada, de la cuantificación relativa, es la comparación de los niveles de expresión génica (mRNA) entre diferentes tejidos, en un mismo tejido a lo largo del tiempo, o la respuesta de un tejido a diferentes tratamientos.

Vamos a describir uno de estos métodos descrito por Livak y Schmittgen (Livak y Schmittgen, 2001): el método del cálculo del $\Delta\Delta Ct$. El primer paso que debemos realizar es una normalización de la cantidad relativa de cada muestra respecto a un gen normalizador, preferentemente de expresión constitutiva en la célula (control endógeno). Estos genes mantienen un nivel de expresión constante aún en diferentes estados fisiológicos de la célula y no deben afectarse en respuesta a los tratamientos que estamos evaluando. Para que este método sea útil los niveles de la muestra y del control endógeno deben ser similares. Un método sensible para evaluar si esta regla se cumple es calcular la ΔCt para diferentes diluciones de la muestra y del gen normalizador.

$$\Delta Ct = Ct (\text{muestra}) - Ct (\text{normalizador}),$$

donde Ct (muestra) y Ct (normalizador) es el ciclo al cual la muestra y el normalizador respectivamente alcanzan el nivel umbral de fluorescencia en el ensayo de PCRtr.

El cálculo de ΔCt se realiza para diferentes diluciones del gen diana y del gen de referencia, y se representa la dilución analizada *versus* el resultado del ΔCt para cada una de las diluciones. Esta evaluación tiene como propósito determinar la eficiencia de amplificación entre diferentes concentraciones de ARNm tanto para la muestra como para el control endógeno, y demostrar que para una misma muestra, la proporción obtenida entre el ARNm diana y la del gen de referencia sea siempre la misma. Si la eficiencia de amplificación de la muestra y la del gen de referencia es similar, el resultado de esta gráfica debe ser una línea recta de pendiente prácticamente 0 ó menor de 0.1, como se muestra en la figura 33.

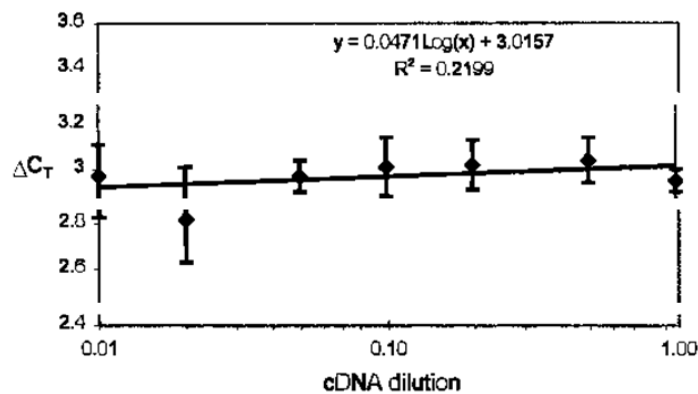


Figura 33. Ejemplo de una curva de calibración de cuantificación relativa.

Aquí, el valor de la pendiente de la gráfica es de 0,0471. Es de esperar que el valor de ΔC_t sea mayor en la muestra que en el normalizador, teniendo en cuenta que el nivel de expresión del mensajero sea mayor en el normalizador, por lo que ΔC_t debe ser un valor positivo, aunque puede ser negativo también.

Luego procedemos al cálculo del $\Delta\Delta C_t$:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{muestra}) - \Delta C_t (\text{referencia}),$$

donde la muestra puede ser el nivel de expresión mRNA en riñón, pulmón, etc de un gen X y el calibrador puede ser el nivel de expresión de ese mismo gen en cerebro (tejido de referencia).

Entonces el $\Delta\Delta C_t$ se calcula para diferentes tejidos así como la expresión relativa de ARNm, que está dada por la ecuación:

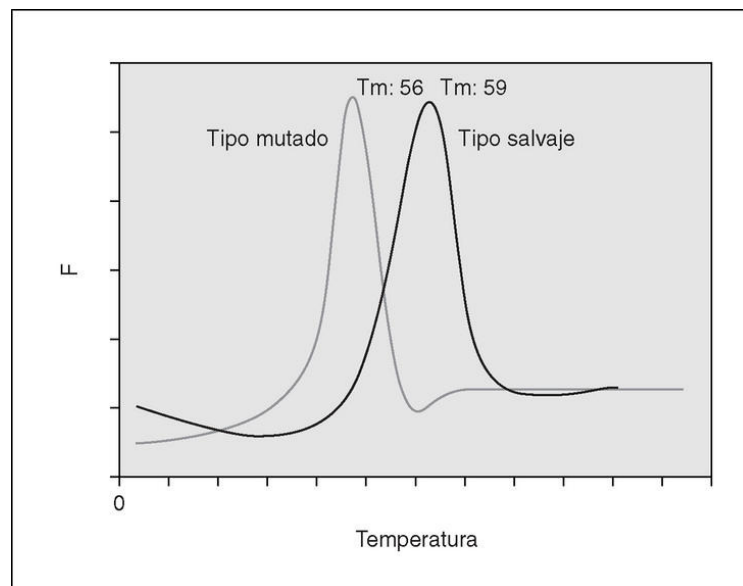
$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Si el tejido de referencia a comparar es el de menor expresión de mensajero, su valor de ΔC_t será el mayor y el nivel de expresión de las muestras siempre aumentará respecto a la referencia, pero de igual forma puede disminuir.

8.3.2.5.4. Análisis de curvas de disociación.

Se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar, (i) la T_m de los amplificados para comprobar su especificidad y (ii) el análisis de mutaciones puntuales, que se puede abordar de diferentes maneras. Por ejemplo, se puede usar una sonda complementaria con el ADN diana de tipo salvaje, que abarque la posición del polimorfismo de forma que el híbrido formado entre sonda y ADN de tipo salvaje

tendrá una estabilidad mayor que el formado entre la sonda y el ADN mutado, puesto que en este caso la complementariedad no es absoluta. La mayor estabilidad de la unión entre la sonda y el ADN salvaje se reflejará en una T_m superior y las diferencias en las temperaturas de disociación de los híbridos nos permitirá discriminar perfectamente entre el ADN de tipo salvaje y el de tipo mutado, pudiéndose establecer además, de forma relativa, la cantidad de ADN de tipo salvaje y la de tipo mutado cuando ambos están presentes en la misma muestra (figura 34).



Costa J. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:299-304.

Figura 34. Determinación de mutaciones puntuales, fenotipo salvaje y mutado, mediante análisis de curvas de disociación.

8.3.2.6. Aplicaciones de PCR en tiempo real

La tecnología de la PCRtr ha demostrado su versatilidad y utilidad para la investigación y el desarrollo de productos en áreas relacionadas con la biomedicina, microbiología, veterinaria, agricultura, farmacología, biotecnología o toxicología, donde la imaginación de investigadores y fabricantes de nuevos equipos, productos y servicios no parece tener límites.

A continuación se describen algunas de estas aplicaciones:

- Cuantificación de la expresión génica
- Validación de los datos de microarrays
- Detección y cuantificación de uno o varios de patógenos: humanos, animales o plantas (Multiplex)
- Cuantificación de microARNs
- Identificación de cepas bacterianas, levaduras u hongos
- Identificación de especies con elevado grado de homología
- Detección y cuantificación de ADN metilado
- Discriminación alélica y genotipado
 - Diagnóstico: detección de mutaciones específicas
 - Análisis de número de copias de genes, regiones cromosómicas y detección de aneuploidias
 - Identificación de alteraciones cromosómicas (microdeleciones, translocaciones)
 - Análisis de haplotipos (SNPs)
 - Análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH) con microsatélites
 - Diagnóstico prenatal a partir de sangre fetal contenida en sangre materna, y diagnóstico preimplantacional
 - Diagnóstico pre-sintomático
 - Monitorización: enfermedad mínima residual (leucemias) después transplante de médula ósea.
 - Monitorización de quimerismo tras el transplante de médula ósea
- Estudios forenses: estimación del número de copias de ADN nuclear y mitocondrial y valoración del grado de degradación del ADN; determinación del sexo
- Detección y cuantificación de organismos modificados genéticamente (GMOs)

Como se ha citado anteriormente, una de las aplicaciones de la PCRtr es la microbiología clínica que incluye la detección, cuantificación y genotipado de bacterias, virus, parásitos, hongos y protozoos.

8.3.2.6.1. PCRtr en Microbiología clínica

La PCRtr y los nuevos sistemas automáticos para la purificación de ácidos nucleicos, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares de los agentes infecciosos de interés clínico. Debido a sus indudables ventajas, como la facilidad de empleo, la mayor rapidez o el menor riesgo de contaminación, la PCRtr, irá reemplazando la PCR estándar y se extenderá a un amplio abanico de aplicaciones microbiológicas, implementándose progresivamente en la rutina asistencial (Costa, 2004).

Algunas empresas de diagnóstico (Roche Diagnostics, Artus, Abbott, Celera) han hecho ya una apuesta decidida por la nueva tecnología y tienen disponibles, o los tendrán en breve, kits para el diagnóstico de los agentes infecciosos de mayor interés comercial mediante sistemas de PCRtr (VIH, VHB, VHC, citomegalovirus). Sin embargo, hay muchas enfermedades infecciosas, con menor interés comercial, en las que el uso de métodos moleculares de diagnóstico aporta indudables ventajas. La PCRtr, combinada con los nuevos sistemas automáticos para la preparación de las muestras, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación, cuantificación y genotipado de esos agentes infecciosos. Es el caso de muchos virus como los Herpesvirus, virus respiratorios, enterovirus, virus JC, virus BK, entre otros (Mackay y cols., 2002; Niesters, 2002) o de bacterias que no crecen en medios de cultivo como *Tropheryma wippeli* (Maibach y Altwegg; 2003), o que crecen mal como *Bordetella pertussis* (Lind-Brandberg y cols., 1998) o *Bartonella* (Zeaiter y cols., 2003) o muy lentamente como *Mycobacterium tuberculosis* (Miller y cols., 2002) y *Brucella* spp. (Yagupsky, 1999). También, de micosis invasivas (Loeffler y cols., 2000), especialmente por *Aspergillus* spp. o de infecciones parasitarias como las ocasionadas por *Toxoplasma gondii* (Delhommeau y Forestier, 2002) en líquido amniótico o en líquido cefalorraquídeo (LCR) (Costa, 2004).

Otra aplicación es la identificación de organismos fácilmente cultivables, cuya detección rápida sea beneficiosa por algún motivo. Por ejemplo, la identificación de *Streptococcus* del grupo B (*S. agalactiae*) en frotis vaginales (Ke y cols., 2000). La colonización del tracto genital de mujeres parturientas por este agente se relaciona con un mayor riesgo de infección neonatal grave. El tiempo necesario para el aislamiento de esta bacteria mediante cultivo es de 1-2 días, mientras que por PCRtr su identificación se puede llevar a cabo en 30 min. La reducción del tiempo de diagnóstico puede mejorar la prevención de esas infecciones en recién nacidos. En otros casos, como la sepsis, la supervivencia del enfermo puede depender de un diagnóstico precoz del agente causal que permita establecer el tratamiento antibiótico específico en etapas tempranas del proceso. Probablemente en pocos años se habrán optimizado protocolos de PCR múltiple en tiempo real para la identificación de los 10 o 20 agentes más frecuentes de la sepsis en unas pocas horas. Lógicamente, la PCRtr no va a reemplazar al hemocultivo, porque la sepsis puede estar ocasionada por una variedad de microorganismos mucho más amplia, pero la demora en el tratamiento se podrá reducir en un número considerable de casos, lo que sin duda puede mejorar el pronóstico de este grave proceso (Costa, 2004).

El éxito de un tratamiento no sólo se basa en un diagnóstico etiológico precoz, sino que en muchas ocasiones la determinación rápida de la sensibilidad del agente causal a los fármacos antimicrobianos puede ser determinante. La PCRtr proporciona métodos ágiles y sencillos para la identificación de mutaciones puntuales asociadas con resistencias a fármacos antimicrobianos. Por ejemplo, en apenas una hora se puede determinar la presencia en heces de enterococos resistentes a vancomicina (Ostrowsky y cols., 2001), facilitando el control de la transmisión de este patógeno en los centros sanitarios (Costa, 2004). En los últimos años se han desarrollado métodos sencillos para la detección rápida de mutaciones asociadas con resistencias a meticilina (Reischl y cols., 2000) en *Staphylococcus aureus* y a rifampicina y a isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis* (Torres y cols., 2000). También se han descrito procedimientos para la identificación de mutaciones asociadas con resistencia a agentes antivíricos, como la lamivudina en VHB (Whalley y cols., 2001).

Hoy día ya están disponibles kits comerciales para algunas aplicaciones comentadas en este apartado y en el futuro irán apareciendo muchos otros. Incluso para las enfermedades infecciosas menos frecuentes están, o estarán disponibles, protocolos bien optimizados, sencillos y rápidos para que puedan ser implementados en la rutina asistencial. No obstante, hay que hacer hincapié en que esta potente

metodología sólo será útil si los laboratorios de microbiología clínica participan en programas de control de calidad coordinados por laboratorios de referencia nacionales.

C. OBJETIVOS

El principal objetivo de esta memoria es la puesta a punto de un sistema de PCR cuantitativa en tiempo real (PCRtrQ) para el diagnóstico de la brucelosis. Para el abordaje del mismo se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Desarrollar una técnica de PCRtrQ que nos permita detectar y cuantificar ADN de *Brucella melitensis* en sangre de pacientes con brucelosis.
2. Estudiar la utilidad de PCRtrQ como método diagnóstico en los pacientes con brucelosis, tanto en el momento del diagnóstico como en la recidiva.

Preguntas de investigación

- 1.- ¿Es posible obtener un método de PCRtrQ reproducible y estándar para el diagnóstico de brucelosis?
- 2.- ¿Es la técnica de PCRtr el mejor método diagnóstico de la brucelosis humana frente a las pruebas serológicas clásicas y microbiológicas?

D. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Especies y cepas bacterianas

Las cepas de las especies de *Brucella* fueron suministradas por el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (Aragón, España) y las bacterias relacionadas filogenéticamente y serológicamente con las especies de *Brucella* por la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España) y el Departamento de Microbiología de la Universidad de Navarra (Pamplona, España), tabla 10.

Analizamos el ADN de 21 cepas pertenecientes a 6 especies diferentes del género *Brucella*, 8 cepas relacionadas filogenéticamente con *Brucella* spp. y 5 bacterias gram-negativas que muestran reacción cruzada serológica con *Brucella* spp..

Tabla 10. Especies y cepas bacterianas testadas en este estudio.

Especies y cepas bacterianas	Cepa	Fuente^a
<i>Brucella melitensis</i> , bv.1	16M	CITA
<i>Brucella melitensis</i> , bv.1	Rev 1	CITA
<i>Brucella melitensis</i> , bv.2	63/9	CITA
<i>Brucella melitensis</i> , bv.3	Ether	CITA
<i>Brucella abortus</i> , bv.1	RB51	CITA
<i>Brucella abortus</i> , bv.1	544	CITA
<i>Brucella abortus</i> , bv.1	S19	CITA
<i>Brucella abortus</i> , bv.2	86/8/59	CITA
<i>Brucella abortus</i> , bv.3	Tulya	CITA
<i>Brucella abortus</i> , bv.4	292	CITA
<i>Brucella abortus</i> , bv.5	B3196	CITA
<i>Brucella abortus</i> , bv.6	870	CITA
<i>Brucella abortus</i> , bv.9	C/68	CITA
<i>Brucella suis</i> , bv.1	1330	CITA
<i>Brucella suis</i> , bv.2	Thomsen	CITA
<i>Brucella suis</i> , bv.3	686	CITA
<i>Brucella suis</i> , bv.4	40	CITA
<i>Brucella suis</i> , bv.5	513	CITA
<i>Brucella neotomae</i>	5K33	CITA
<i>Brucella ovis</i>	Reo198	CITA
<i>Brucella canis</i>	RM6/66	CITA
Bacterias relacionadas genéticamente		
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		CECT
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		CECT
<i>Agrobacterium vitis</i>		CECT
<i>Ochobacterium intermedium</i>	3301	FMN
<i>Ochobacterium anthropi</i>		CECT
<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>		CECT
<i>Phyllobacterium rubiacearum</i>		CECT
<i>Vibrio cholerae</i>		CECT
Bacterias relacionadas antígenicamente		
<i>Escherichia coli</i>		CECT
<i>Francisella tularensis</i>		FMN
<i>Pasteurella multocida</i>		CECT
<i>Salmonella urbana</i>		CECT
<i>Yersinia enterocolitica</i>		CECT

^aCentro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón (España); Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de Valencia (España); Facultad de Medicina de Navarra (FMN) de Pamplona (España).

1.2. Pacientes y muestras clínicas

1.2.1. Pacientes y muestras clínicas

Se analizaron, de forma retrospectiva, muestras de sangre periférica de pacientes con brucelosis, diagnosticados en el Servicio de Medicina Interna (SMI) del Hospital Comarcal de Hellín (Albacete), y en el SMI y en la Unidad de Enfermedades Infecciosas (UEI) del Hospital General Universitario de Albacete. El diagnóstico de brucelosis se estableció de acuerdo con los siguientes criterios: (i) aislamiento de *Brucella* spp. en sangre o cualquier otro fluido corporal o muestra de tejido, o (ii) la presencia de un cuadro clínico (fiebre, sudores, artralgias, hepatomegalia, esplenomegalia, signos de enfermedad focal, entre otros) compatible con títulos significativos de anticuerpos específicos o seroconversión. Se consideraron títulos significativos cuando el título de la seroaglutinación de Wright's fue $\geq 1/160$ o el título del test de Coomb's anti-*Brucella* fue de $\geq 1/320$ (FAO/WHO, 1986). Se consideró recidiva, (i) la existencia de un nuevo hemocultivo positivo, (ii) la reaparición de una sintomatología compatible, no explicable por otras causas, junto con un nuevo incremento en los títulos serológicos, o (iii) la aparición de una nueva forma focal altamente sugestiva de brucelosis (por ejemplo: artritis periférica, sacroileitis, orqui epididimitis, meningitis linfocítica, endocarditis, entre otros) con persistencia de altos títulos serológicos (Morata y cols., 1999).

Las muestras de sangre se recogieron, en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), en el momento del diagnóstico antes de empezar el tratamiento antibiótico. Estas muestras se alicuotaron y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento. Las muestras fueron registradas, asignándoles un número de entrada, anotando la fecha de recogida de la muestra, nombre y apellidos, número de historia clínica del paciente e indicando el lugar de procedencia. Las muestras recogidas fueron analizadas aleatoriamente siguiendo un protocolo de simple ciego.

1.2.2. Grupo control

El grupo control utilizado para determinar la especificidad en cada termociclador ha sido diferente. En el termociclador ABI Prism[®], se han analizado muestras de sangre periférica de 30 individuos sanos, procedentes del banco de

sangre del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA), recogidas al azar sin tener en cuenta si habían tenido antecedentes de brucelosis o exposición a *Brucella*. En el grupo control analizado en el termociclador LightCycler® se recogieron muestras de sangre de 45 individuos, de los cuales 30 fueron individuos sanos (banco de sangre del CHUA) sin antecedentes de brucelosis o exposición a *Brucella* (estas treinta muestras son distintas a las del grupo control analizadas en el termociclador ABI Prism®), y 15 fueron pacientes con síndromes febriles que inicialmente plantearon un diagnóstico diferencial con la brucelosis: 4 pacientes con bacteriemia (2 casos debidos a *Escherichia coli*, 1 debido a *Staphylococcus hominis* y 1 debido a *Streptococcus pneumoniae*), 4 pacientes con espondilodiscitis (1 caso debido a *Mycobacterium tuberculosis*, 1 debido a *Klebsiella*, 1 debido a *E. coli* y *Proteus* y 1 debido a *Staphylococcus aureus*), 1 paciente con un absceso hepático por *E. coli*, 1 con celulitis del miembro inferior derecho por *Pseudomonas aeruginosa*, 1 con osteomielitis por *Staphylococcus aureus*, 1 con empiema pleural por *Bacillus* spp., 1 con tuberculosis pulmonar, 1 con un adenocarcinoma pulmonar y 1 con una piomiositis por *Staphylococcus aureus*. Las muestras recogidas fueron analizadas aleatoriamente siguiendo un protocolo de simple ciego.

1.3. Material utilizado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica tiene varias fases bien diferenciadas, en las que se empleó el material que se relaciona a continuación:

1.3.1. Material para la extracción y cuantificación de ADN

- Aislamiento de ADN procedente de sangre:
 - QIAamp® DNA Blood Midi Kit (Qiagen (GmbH, Hilden, Germany))
 - UltraClean™ DNA BloodSpin™ Kit (MoBio Laboratories (Inc,CA,US))
- Ultracentrífugas (modelo GS-15R de Beckman Coulter, Inc. (CA, US) y modelo Mini Spin Plus de Eppendorf Research (AG, Hamburg, Germany)).
- Baño termostático (modelo W 28, Eppendorf, AG Hamburg, Germany).
- Bloque termostático (Thermostat Plus, Eppendorf).
- Espectrofotómetro para la cuantificación de ADN (GeneQuant II RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, U.K.) y NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (NanoDrop® Technologies, Inc. Wilmington, US).

1.3.2. Material para la amplificación de ADN

- Los cebadores y sonda TaqMan tienen la siguiente secuencia:

5'- tgtcttgctcagaataatcca -3' EFQ1

5'- gcatgccgtatgatcttggtagc 3' ERQ2

5'- FAM atagcttaccgccaatcttcgccc TAMRA t-3' STqME

Los cebadores y la sonda han sido diseñados por nosotros con el programa "Primer Express" teniendo en cuenta la región descrita por Redkar y cols. (Redkar y cols., 2001) como específica de *B. melitensis*. Estos cebadores amplifican un fragmento de 251 pares de bases (pb) (FE251), que cruza una región del genoma de *Brucella melitensis* (GenBank, número de acceso AE009555) y el elemento de inserción IS711. Estos cebadores y sonda han sido sintetizados por TIB[®] MOLBIOL Syntheselabor (Berlin, Germany) y PROLIGO (Primers & Probes, France SAS, France).

- Termociclador convencional GeneAmp[®] 2400 (Perkin-Elmer (Norwalk, Connecticut, US)).
 - AmpliTaq[®] DNA Polymerase, 5U/μl, (Perkin-Elmer).
 - GeneAmp[®] (Perkin-Elmer): Tampón de PCR 10X [100mM Tris-HCl, pH 8.3 (a 25°C); 500mM KCl] y 25 mM MgCl₂.
 - GeneAmp[®] dNTPs (Perkin-Elmer): Desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs, Roche): dATP, dCTP, dGTP y dTTP, en una mezcla a partes iguales de cada uno de ellos, siendo la concentración final de 10 mM.
 - MicroAmp[®] Reaction Tube with Cap (Perkin-Elmer).
- Termociclador en tiempo-real ABI Prism[®] 7000 Sequence Detection System (Ttr-ABI Prism[®]) de Applied Biosystems Inc, CA, US.
 - TaqMan[®] Exogenous Internal Positive Control Reagents (Applied Biosystems): este kit contiene un control positivo interno ("internal positive control" (IPC), según la terminología inglesa). Este IPC exógeno sirve para detectar posibles falsos negativos de posibles inhibidores de PCR, este IPC contiene: ADN, cebadores y sonda. La sonda está marcada con el fluoróforo VIC, que no

interfiere en la detección del gen diana, en nuestro caso *Brucella melitensis*, puesto que esta sonda está marcada con el fluoróforo FAM.

- TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) el cual contiene AmpliTaqGold DNA Polymerase, AmpErase UNG, dNTPs con dUTP, Passive Reference y componentes que optimizan el tampón. La AmpErase uracil-N-glycosylase (UNG) es un componente que previene la reamplificación de productos de PCR previos, destruyendo cualquier grupo uracil incorporado en ADN de doble cadena o sencilla.
 - Optical Tubes (8 Tubes/Strip) (Applied Biosystems).
 - Optical Caps (8 Caps/Strip) (Applied Biosystems).
 - MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate and Optical Caps (Applied Biosystems).
 - Centrifuga Labofuge 400R (Heraeus Instruments).
 - ABI Prism[™] Optical Adhesive Cover (Applied Biosystems)
- Termociclador en tiempo real LightCycler[®] (Ttr-LightCycler[®]) de Roche Molecular Biochemicals (GmbH Mannheim, Germany).
 - LightCycler[®] FastStart DNA Master^{PLUS} Hybridization Probes (Roche): este kit contiene los siguientes reactivos: la enzima FastStart-LightCycler (Taq DNA polimerasa), tampón de reacción, mezcla de dNTPs (con dUTP en lugar de dTTP), 10 mM de MgCl₂ y agua estéril grado PCR.
 - MgCl₂, Stock Solution de Roche Molecular Biochemicals.
 - LightCycler[®] Capillaries (20 µl) de Roche Molecular Biochemicals.
 - LightCycler[®] Centrifuge Adapters de Roche Molecular Biochemicals.
 - LightCycler[®] Uracil-DNA glycosylase.
 - Campana TELSTAR Mini-V/PCR (Terrassa, España).

1.3.3. Material para clonar el FE251 de *Brucella melitensis*

- Bioclean Kit para purificación de bandas de ADN (Biotools B&M Labs, SA, Madrid, España).
- pGEM-T[®] Easy Vector Systems (Promega Corporation, Madison, WI, US).
- JM109 Competent Cells, High Efficiency (Promega).
- Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

1.3.4. Material para electroforesis

- Fuentes de electroforesis (EVT 2000 Edvotek, Ecogen, Madrid, España).
- Cubetas de electroforesis (Edvotek, Ecogen).
- Tampón TBE (Laboratorios Conda, Pronadisa, Madrid, España)
- Agarosa (Pronadisa, Madrid, España)
- Bromuro de etidio (Sigma Aldrich, US).
- Marcador de peso molecular IX (72-1353 bp) de Roche Molecular Biochemicals y ϕ x174 de Sigma Aldrich.
- Tampón de carga 6X ("*loading buffer*", de la terminología inglesa): constituido por 0,25% (p/v) azul de bromofenol, 40% (p/v) sacarosa y agua.
- Transiluminador ultravioleta Mod. TS-10 (Edvotek, Ecogen)
- Cámara de fotos instantánea (Mod. 667, Polaroid)
- Sistema de fotodocumentación Mod. IP-010-SD (Vilber Lourmat (Torcy, Marne la Vallée, Cedex, France).

1.3.5. Material general de laboratorio

Micropipetas automáticas (Eppendorf), puntas de pipeta con filtro (VWR Internacional (US) y ART Molecular Products (San Diego, CA, US)) y sin filtro, vortex (Labnet VX100 (Labnet internacional, Inc, Woodbridge, NJ, US)), tubos de 0,5 y 1,5 ml, tubos "Falcon", botellas de cristal resistentes al autoclave, matraces, agua destilada, agua ultrapura (Milli-Q, Milipore Corporation, Massachusetts, USA) y guantes.

La elaboración de los tampones de proteinasa-K, TBE, tampón de carga y del marcador de peso molecular se realizó en el laboratorio de acuerdo con los protocolos habituales.

2. MÉTODOS

2.1. Hemocultivos y métodos serológicos

A cada individuo se le realizaron dos o tres hemocultivos los cuales fueron procesados en un sistema BACTEC 9050 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Towson, Md.), siguiendo las técnicas bacteriológicas usuales. La identificación de *Brucella* spp. se realizó según el protocolo de Hausler y cols. (Hausler y cols, 1984). Todas las cepas aisladas fueron enviadas al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón, para su identificación y biotipado. La seroaglutinación en tubo (SAT) y el test de Coombs se hicieron como describe Otero y cols. (Otero y cols, 1982).

2.2. Extracción del ADN a partir de cepas bacterianas

El ADN de las cepas bacterianas analizadas se extrajo con el siguiente protocolo:

1. Lavar con 1 ml de H₂O miliQ la placa del cultivo, girándola suavemente y transferir todo el volumen a un tubo eppendorf.
2. Incubar a 100°C durante 30min.
3. Centrifugar 14.000 rpm durante 5min. Recuperar el sobrenadante.
4. Centrifugar 14.000 rpm durante 1min.
5. Recoger el sobrenadante
6. Medir la concentración final y pureza del ADN en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm, respectivamente.

2.3. Extracción del ADN a partir de muestras clínicas

Se han utilizado dos kits comerciales para la extracción de ADN a partir de sangre periférica: (i) "QIAamp® DNA Blood Midi kit" de Qiagen, y (ii) "UltraClean™ DNA BloodSpin™ Kit" de MoBio Laboratorios. Estos kits están basados en la capacidad del ADN para ser retenido por una resina con carga positiva y no requieren la extracción con fenol/cloroformo o precipitaciones con alcohol. Los

ADNs purificados están libres de proteínas, nucleasas y otros contaminantes o inhibidores. Obtienen ADNs puros y con una buena concentración.

2.3.1. QIAamp[®] DNA Blood Midi Kit (QIAGEN)

Las instrucciones del fabricante se han modificado ligeramente:

- 1.- Añadir 100µl de proteinasa k y 1,2ml de Buffer AL a 1ml de sangre-EDTA.
- 2.- Agitar en el vortex 3 veces durante 5s.
- 3.- Incubar 10min al baño Maria a 70° C.
- 4.- Añadir 1ml de etanol absoluto (96-100%). Vortex aproximadamente 10s.
- 5.- Recoger la solución obtenida y pasarla a un tubo con columna.
Centrifugar 3min a 3.000 rpm.
- 6.- Retirar la solución filtrada y añadir a la columna 2ml de Buffer AW1.
Centrifugar 3min a 4.500 rpm.
- 7.- Sin retirar la solución y añadir a la columna 2ml de Buffer AW2.
Centrifugar 20min a 4.500 rpm.
- 8.- Cambiar la columna a una tubo limpio y añadir a la columna 200µl de Buffer AE.
Dejarlo incubar 5min a T^a ambiente. Centrifugar durante 6min a 4.500 rpm.
- 9.- Para obtener una máxima concentración, recoger el ADN y volver a ponerlo en la columna. Incubar durante 5min a T^a ambiente y centrifugar durante 6min a 4.500 rpm.
- 10.- Recoger el ADN eluído y ponerlo en un eppendorf.
- 11.- Cuantificar y hacer alícuotas de aproximadamente 30µl.

2.3.2. UltraClean[™] DNA BloodSpin[™] Kit (MoBio)

Las instrucciones del fabricante se han modificado ligeramente:

- 1.- Añadir 200 µl de sangre entera a 40 µl de proteinasa k.
- 2.- Añadir 200 µl de solución B1.
- 3.- Homogeneizar por vortex durante 15s.
- 4.- Incubar a 65°C durante 15min.
- 5.- Centrifugar durante 30s a 8.000 rpm.

- 6.- Añadir 200 μ l de solución B2 y agitar en el vortex durante 15s.
- 7.- Repetir el paso 5.
- 8.- Transferir todo el volumen a un tubo con la columna.
- 9.- Centrifugar 1min a 14.000 rpm.
- 10.- Transferir la columna a un nuevo tubo.
- 11.- Añadir 500 μ l de la solución B3 al filtro.
- 12.- Centrifugar 30s a 14.000 rpm.
- 13.- Retirar la columna, retirar la solución eludida con la pipeta y volver a colocar la columna en el mismo tubo.
- 14.- Añadir 500 μ l de la solución B4 a la columna.
- 15.- Centrifugar 30s a 14.000 rpm.
- 16.- Retirar el filtro, retirar la solución eludida con la pipeta y volver a colocar el filtro en el mismo tubo.
- 17.- Centrifugar 30s a 14.000 rpm.
- 18.- Cuidadosamente retirar la columna y transferir a un tubo nuevo.
- 19.- Añadir 50 μ l de la solución B5, para aumentar el rendimiento incubar 5min a 65°C.
- 20.- Centrifugar 1min a 14.000 rpm.
- 21.- Cuantificar el ADN eluido.

2.4. Clonaje y secuenciación del producto amplificado

2.4.1. Extracción del fragmento amplificado del gel de agarosa TBE

Este kit es un sistema de purificación, concentración y eliminación de sales basado en la utilización de una matriz de sílice, para bandas de ADN de 0,1 a 10 kb.

Las instrucciones del fabricante se han modificado ligeramente:

1. Cortar la banda de ADN de interés del gel. Poner el fragmento de gel en un tubo eppendorf de 1,5 ml y añadir 1 ml de Solución AgarMelt, esta solución contiene un agente caotrópico que separa el ADN de la agarosa y permite que el ADN se una a la matriz de sílice posteriormente.
2. Calentar el tubo a 65°C hasta que el fragmento de gel se haya disuelto.
3. Añadir 2 μ l de matriz de sílice BC y mezclar suavemente por inversión. Incubar durante 5min a temperatura ambiente, mezclando por inversión cada 2 ó 3 min.

4. Centrifugar 1min a 12.000 rpm. Descartar el sobrenadante.
5. Añadir 200 µl de la solución de lavado fría al pellet de matriz de sílice. Resuspender mediante pipeteo. Centrifugar 1min a 12.000 rpm y descartar el sobrenadante.
6. Repetir el paso de lavado 4. Centrifugar de nuevo 1min a 12.000 rpm y eliminar cuidadosamente el sobrenadante, con cuidado de no arrastrar la matriz de sílice. Dejar secar bien.
7. Añadir 19 µl de tampón TE precalentado a 65°C, resuspender bien con pipeta e incubar durante 2min a 65°C. Centrifugar 1min a 12.000 rpm.
8. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN (en tampón TE) a un tubo eppendorf estéril, con cuidado de no arrastrar nada de matriz de sílice.

2.4.2. Construcción del plásmido recombinante con el vector pGEM-T[®] Easy

Las condiciones de la reacción de ligación se modificaron ligeramente con respecto a las instrucciones del fabricante. Para un volumen final de reacción de 15 µl, se añadieron:

- 7,5 µl de 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase
 - 1 µl de pGEM-T[®] Easy Vector (50 ng)
 - 5,5 µl Fragmento de ADN purificado (251 pb)
 - 1 µl T4 DNA Ligase
- Incubar toda la noche a temperatura ambiente.

2.4.3. Transformación en células competentes *E. coli* JM109 Hight Efficiency

Las instrucciones del fabricante se han modificado ligeramente:

1. Preparar dos placas de LB/ampicilina/IPTG/X-Gal para cada reacción de ligación, además de dos placas para determinar la eficiencia de la transformación. IPTG (1M). X-Gal (20mg/ml)

2. Centrifugar los tubos conteniendo las reacciones de ligación. Añadir 2 µl de cada reacción de ligación a un tubo de microcentrifuga estéril de 1,5 ml en hielo.
3. Descongelar en hielo el vial de células competentes JM109 (Promega). Invertir los tubos suavemente para mezclar las células.
4. Con cuidado, transferir 50 µl de las células competentes a cada tubo del paso 2 (tubos con la reacción de ligación) y 100 µl de células para determinar la eficiencia de la transformación.
5. Invertir los tubos suavemente para mezclar y colocarlos en hielo durante 20 min.
6. Dar un choque térmico de 30 s en un baño a 42°C.
7. Inmediatamente poner los tubos de nuevo en hielo durante 2 min.
8. Añadir 1 ml de medio LB e incubar 1 h a 37°C con una agitación de 150 rpm.
9. Centrifugar 1min a 7000 rpm. Retirar el sobrenadante, dejando aproximadamente 100 µl para sembrarlo en las dos placas de LB-ampicilina-IPTG-XGal.
10. Incubar toda la noche a 37°C.

2.4.4. Selección de colonias transformantes: PCRs de colonias

Para corroborar que las colonias seleccionadas poseían nuestro EF251 de *Brucella melitensis* fue necesario extraer el ADN plasmídico y comprobar por restricción enzimática y/o PCR específica la presencia del inserto. En nuestro caso procedimos a comprobar la presencia de nuestro inserto mediante una PCR estándar directamente sobre una colonia ("*colony-PCR*", según la terminología inglesa).

A la mezcla de reacción de la PCR se les añadieron los siguientes componentes:

Componentes de la PCR	SP6/T7 ^a	EFQ1/ERQ2 ^b
Cebadores (100 µM ^a ;500 nM ^b)	0,1 µl	0,5 µl
Buffer 10X	2,0 µl	5,0 µl
dNTPs (200 µM)	1,6 µl	4,0 µl
MgCl ₂ (1,5 mM)	1,2 µl	3,0 µl
Taq-Polimerasa (0,5 U)	0,1 µl	0,1 µl
Colonia	--	--
H ₂ O d	20-5,1=14,9 µl	50-13,1=36,9 µl
Volumen final de reacción	20 µl	50 µl

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: (i) para los cebadores EFQ1/ERQ2, una desnaturalización inicial a 93°C durante 5min seguido por 40 ciclos de 30s a 90°C, 30s a 58°C y 30s a 72°C y 7min a 72°C; y (ii) para los cebadores SP6/T7, una desnaturalización inicial a 94°C durante 3min seguido por 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 52°C y 30s a 72°C y 5min a 72°C.

2.4.5. Extracción del plásmido recombinante

Las instrucciones del fabricante se han modificado ligeramente:

1. Seleccionar dos colonias positivas y sembrar en tubos con 3 ml de LB y 100 µg/ml de ampicilina.
2. Incubar a 37°C durante toda la noche con agitación.
3. Centrifugar 1,5 ml del cultivo durante 30s a 12.000 rpm. Descartar el sobrenadante, agregar el resto del cultivo y centrifugar de nuevo. Descartar el sobrenadante.
4. Con cuidado, resuspender el pellet con 250 µl de la solución de resuspensión de células (Cell Resuspension Solution).
5. Añadir 250 µl de la solución de lisis de células (Cell Lysis Solution) a cada muestra; e invertir 4 veces para mezclar.
6. Añadir 10 µl de la solución de proteasa alcalina (Alkaline Protease Solution); e invertir 4 veces para mezclar. Incubar 5min a temperatura ambiente.
7. Añadir 350 µl de solución neutralizadora (Neutralization Solution); e invertir 4 veces para mezclar.
8. Centrifugar a 12.000 rpm durante 10min a temperatura ambiente. Retirar el sobrenadante y ponerlo en la columna suministrada en el kit.
9. Centrifugar a 12.000 rpm durante 1min a temperatura ambiente. Descartar el eluido y colocar otra vez la columna en el tubo de recolección.
10. Añadir 750 µl de la solución de lavado (Wash Solution). Centrifugar a 12.000 rpm durante 1min. Descartar el eluido y colocar otra vez la columna en el tubo de recolección.
11. Repetir el paso anterior con 250 µl de la solución de lavado (Wash Solution).
12. Centrifugar a 12.000 rpm durante 2min a temperatura ambiente.
13. Transferir la columna a un tubo estéril de microcentrifuga.

14. Añadir al filtro 100 µl de agua libre de nucleasas (Nuclease-Free Water).
Centrifugar a 12.000 rpm durante 1min a temperatura ambiente.
15. Descartar la columna y guardar a -20°C.

2.4.6. Secuenciación

Los FE251 obtenidos en la colony-PCR fueron secuenciados, por la Dra. Lourdes Gómez del Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIA) de la Universidad de Castilla La-Mancha, utilizando el método desarrollado por Sanger y cols. (Sanger y cols., 1977). Las reacciones se realizaron con el "Kit Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing" y las secuencias se determinaron en un secuenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Los resultados de la secuenciación fueron analizados con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul y cols., 1990), con el fin de determinar si nuestro fragmento clonado correspondía a *Brucella melitensis*.

2.5. Construcción de la curva estándar

2.5.1. Cálculos molares

Después de la extracción del plásmido recombinante procedimos a calcular el número de moléculas que teníamos de nuestro futuro estándar. Para ello seguimos varios pasos:

Densidad óptica (D.O.): Medimos a 260 nm la concentración del plásmido pGEM-T Easy con nuestro fragmento clonado.

D.O. x 100 µg/ml x Factor corrección de dilución x Volumen total de DNA (ml) = X µg

Peso molecular (PM): PM plásmido + PM inserto

$$PM = (A \times 312.2) + (G \times 328.2) + (C \times 288.2) + (T \times 303.2) - 61 = Y$$

$$1 \text{ mol} = \text{peso} / PM = X / Y = Z \text{ } \mu\text{mol}$$

Nº Avogadro: $6.022 \cdot 10^{23}$ moléculas/mol

$$Z \text{ } \mu\text{mol} \times 6.022 \cdot 10^{23} \text{ moléculas/1mol} =$$

$$Z \cdot 10^{-6} \text{ mol} \times 6.022 \cdot 10^{23} \text{ moléculas/1mol} =$$

$$Z \times 6.022 \cdot 10^{15} \text{ moléculas}$$

2.5.2. Curva estándar

La amplificación de las diluciones seriadas del plásmido con el FE251 clonado de *B. melitensis*, genera una recta que correlaciona el valor de C_t (ciclo umbral del inglés “threshold value”) y el número de copias del plásmido. Por ejemplo: $C_t = -3,637 \times \log(\text{copias \#}) + 45,833$, con una R^2 de 0,99 y una eficiencia de la PCRtrQ de 1,89 (Figura 35).

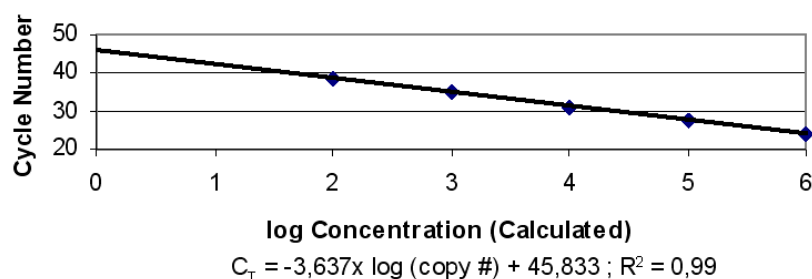


Figura 35. Curva de calibración del ensayo de PCRtrQ con sonda TaqMan. Los valores de C_T han sido representados contra el número de copias del plásmido inicial (copy #).

Por lo tanto, a partir de esta curva estándar se determina el número de copias bacterianas presentes en una muestra clínica por interpolación de su valor C_t a la curva estándar.

2.5.3. Cálculo del número de copias

El número de copias/ml de *Brucella melitensis* en cada muestra se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C \text{ (copias/ml)} = \frac{\Sigma Q}{\Sigma V \text{ PCRQ (copias/ } \mu\text{l)}} \times \frac{V \text{ eluído ADN}}{V \text{ Extracción (} \mu\text{l/ ml)}}$$

Donde:

ΣQ = Suma del número de copias cuantificadas en las tres réplicas

$\Sigma V \text{ PCRQ}$ = Volumen total de ADN añadido en PCRQ en las tres réplicas

$V \text{ eluído}$ = Volumen de ADN eluído en la extracción

$V \text{ extracción}$ = Volumen de partida para la extracción

2.6. Ensayos de PCRs

2.6.1. PCR estándar

A la mezcla de reacción de la PCR se les añadieron los siguientes componentes:

Componentes de la PCR	EFQ1/ERQ2
Cebadores (500nM)	0,5 µl
Buffer 10X	5,0 µl
dNTPs (200µM)	4,0 µl
MgCl ₂ (1,5mM)	3,0 µl
Taq-Polimerasa (0,5U)	0,1 µl
ADN	--
H ₂ O	--
Volumen final de reacción	50 µl

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 93°C durante 5min seguido por 40 ciclos de 30s a 90°C, 30s a 58°C y 30s a 72°C y 7min a 72°C.

2.6.2. PCR en tiempo real cuantitativa (PCRtrQ)

2.6.2.1. Termociclador ABI Prism® 7000 SDS de Applied Biosystems

El volumen final de la reacción fue de 25 µl conteniendo; 200 ng del ADN genómico, 900nM de cada cebador; 200 nM de la sonda StqME; 1X TaqMan Exogenous Internal Positive Control (IPC); 1X de TaqMan Universal PCR Master Mix que contiene AmpliTaqGold DNA Polymerase, AmpErase UNG, dNTPs con dUTP, Passive Reference y componentes que optimizan el tampón. Las condiciones del termociclador, fueron las siguientes: un primer paso de 50°C durante 2min donde se produce la incubación para que actúe la UNG AmpErase; un segundo paso de 95°C durante 10min donde se produce la activación de la polimerasa ya que es del tipo "Hot-Start"; y un tercer paso donde se realizan 55 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1min. Los datos fueron analizados usando el software ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (SDS) de Applied Biosystems. Las muestras de los pacientes se analizaron por triplicado.

2.6.2.2. Termociclador LightCycler® de Roche

Los ensayos se realizaron en capilares Ttr-LightCycler® con un volumen de reacción final de 20 µl incluyendo 400 ng de ADN humano, 400 nM de cada primer, 100 nM de la sonda TaqMan, 6 mM de MgCl₂ y 4 µl de la mezcla de reacción (5X). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, seguido por 45 ciclos de 10s a 95°C, 10s a 60°C y 15s a 72°C. Los datos fueron analizados usando el software LightCycler®, versión 3.5 (Roche Molecular Biochemicals). Las muestras de los pacientes se analizaron por triplicado.

2.6.3. *Controles positivos y negativos*

En cada ensayo de PCRtrQ se añadieron controles positivos y negativos, el FE251 de *B. melitensis* biovar 1 y agua, respectivamente.

2.6.4. *Medidas para evitar y controlar las contaminaciones en la PCR*

Se tomaron varias medidas para tratar de evitar contaminaciones tanto en el proceso de extracción del ADN como en la PCRtrQ.

- Las micropipetas y gradillas se trataron, antes de cada uso, con Real DNA-Remove (Durviz, S.L.) que es una mezcla de detergentes formulada especialmente para eliminar de una forma muy simple y efectiva el ADN o ARN de las superficies de trabajo y material de laboratorio.

- Se usaron puntas con filtro, libres de DNAasas y RNAasas. Estas puntas evitan la contaminación por arrastre de aerosoles al pipetear las muestras y reactivos.

- La mezcla de reacción de la PCRtr se preparó en una campana TELSTAR MiniV/PCR, y el material usado fue irradiado con luz ultravioleta (UV) durante 20 min (Queipo-Ortuño, 1998) antes de comenzar.

- Los geles de agarosa y las correspondientes electroforesis se realizaron en otro laboratorio, las pipetas y los demás materiales son de uso exclusivo en dicho laboratorio.

- Durante la PCRtr se incorporan dUTP a los productos de PCR y todos los amplificados tienen dUTP en vez de dTTP. Cuando hay problemas de contaminación estos amplificados, de PCR previas, pueden ser degradados por la “Uracil-DNA glycosylase” antes de comenzar una nueva reacción de amplificación (por calentamiento durante 10min a 95°C). Así nos aseguramos que los productos de la PCR son amplificados a partir del ADN de nuestra muestra.

2.7. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas, edad y carga bacteriana (copias de ADN de *B. melitensis*/ ml de sangre), se expresan como el valor de la media \pm la desviación estándar. En el caso de las variables cualitativas, los resultados se presentan como frecuencias y porcentajes. El análisis estadístico se ha llevado a cabo con el paquete estadístico SPSS, versión 14.0.

E. RESULTADOS

En la puesta a punto de nuestro ensayo de PCRtr para cuantificar el ADN de *Brucella melitensis* en sangre de pacientes con brucelosis, se han producido diversos cambios en la metodología y se han esquematizado en la figura 36. Primero, (A) se empleó el kit de extracción de ADN, “QIAamp® DNA Blood Midi Kit” en el Ttr-ABI Prism®; en segundo lugar (B) utilizamos el “QIAamp® DNA Blood Midi Kit” en el Ttr-Lightcycler®, estas dos opciones se desecharon pues se obtuvieron falsos negativos; y por último la opción que se ha seguido en este estudio ha sido la (C), donde hemos utilizado el kit de extracción de ADN “UltraClean DNA BloodSpin Kit” en el Ttr-Lightcycler® y se ha obtenido un 100% de sensibilidad.

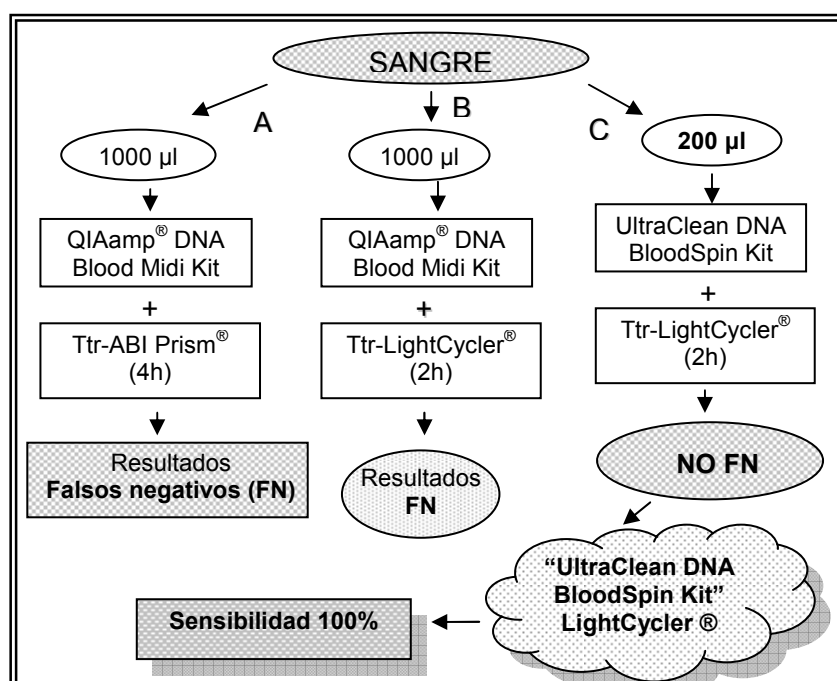


Figura 36. Esquema de los cambios que se han producido en la metodología de este estudio.

1. Diseño de cebadores y sonda

Los cebadores fueron diseñados con el programa “Primers Express” (versión 2.0) teniendo en cuenta la región descrita por Redkar y cols. (Redkar y cols., 2001) como específica de *B. melitensis*. No pudimos utilizar los cebadores y sondas descritos por este autor, debido a que el Ttr-ABI Prism[®] que íbamos a utilizar no detectaba las sondas de hibridación, también llamadas sondas FRET o Lightcycler[®]. Por lo tanto, nos vimos obligados a diseñar de nuevo los cebadores y una sonda tipo TaqMan, siguiendo los criterios que se describen en la tabla 11.

Tabla 11. Criterios para diseñar los cebadores y la sonda.

Cebadores	
Tm 58°-60°C	
30-80% GC	
Longitud 18-30 nucleótidos	
< 2°C de diferencia entre la Tm de los dos cebadores	
Máximo de 2/5 G's o C's en el extremo 3', para evitar dímeros estables	
Sonda	
Tm: 8-10°C más alta que la Tm de los cebadores (68-70°C)	
30-80% GC	
Longitud máxima: 30 bases (si no, diseñar sondas MGB), mínimo 13 bases	
No debe tener G's en el extremo 5'(quencher)	
<3 G's contiguas	
Seleccionar la hebra que contenga C's que G's	

Escogimos la pareja de cebadores EFQ1/ERQ2, que según la secuencia de nucleótidos de la base de datos GenBank (nº de acceso AE009555_Anexo) amplifican un FE251 específico de *B. melitensis*. En la tabla 12 se detallan la secuencia de los cebadores y la sonda, así como otros datos de interés.

Tabla 12. Secuencias, temperaturas de melting (Tm), %GC y tamaños (pb) de los cebadores y sonda diseñados.

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)	%GC	Tamaño (pb)	Amplificado (pb)
EFQ1	tgt ttc ggc tca gaa taa tcc a	58°	41	22	251
ERQ2	gca tgc cgt atg atc tgg tta c	58°	50	22	
Sonda	Secuencia 5'-3'				
STqME	F ata gct tac ccg cca atc ttc gcc cXt p	69°	54	26	

F: 6-carboxi-fluoresceína (FAM); X: 6-carboxi-tetrametil-rodamina (TAMRA); p: el extremo-3' se bloqueó con un grupo fosfato para prevenir la extensión de la sonda en la reacción de PCRtrQ.

En la figura 37 se representa la posición que ocupan los cebadores y la sonda en el locus AE009555 de *B. melitensis*.

LOCUS	AE009555	10607 bp
DNA	linear	BCT 28-DEC-2001
DEFINITION	<i>Brucella melitensis</i> strain 16M chromosome I, section 112 of 195 of the complete sequence.	
ACCESSION	AE009555	AE008917
Secuencia de nucleótidos:		
10261	tgctggaat	cgcttaaca agcggcacc ctaaaaaatc aggag tgttt cggctcagaa
10321	taatccacag	aaggtagagc agtaatatcc aatagacgcc attaacaata gcgagattgg
10381	aatagcttac cgc	caatct tgc ccctgcc accagccaat aacggcaatt atcgtgtca
10441	ctgttgcaag	tatggcagcg agcgtctag cgtgacgaag cactgtcttt ctgacaattt
10501	ccagattcac	ccctagggcg tgtctgcatt caac gtaacc agatcatagc gcatgc gaga
10561	tggacgaagc	ccatgaatgc ggtcaatggt ttctcgcatc gcagcgc

Figura 37. Representación gráfica de la localización de los cebadores EFQ1/ERQ2 (color azul) y de la sonda STqME (color rojo) empleados para la amplificación del FE251 de *Brucella melitensis*.

2. Optimización de la PCRtrQ

2.1. Ttr-ABI Prism®

Las condiciones de amplificación se optimizaron mediante variaciones en el número de ciclos y en la concentración de cebadores, sonda y magnesio.

Para optimizar la concentración de cebadores y sonda, realizamos una matriz con un rango de concentraciones de 50-300-900nM para los cebadores y de 50-100-150-200-250nM para la sonda. La concentración óptima de los cebadores fue de 900nM para cada uno EFQ1/ERQ2 y 200nM de sonda STqME. En cuanto al MgCl₂ se probó un rango de concentraciones de 0-1-2-3-4mM. La concentración óptima fue 0mM, es decir, que al tampón TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) no se le añadió MgCl₂. Se escogieron aquellas concentraciones que tuvieron una Ct menor, y a igual Ct las que presentaron una mayor variación en la fluorescencia (ΔRn). En la figura 38 se muestran los resultados de la PCRtr de la optimización de MgCl₂. En cuanto al número de ciclos

ensayamos con 45, 50, 55 y 60 ciclos, escogiendo 60 ciclos para nuestro método de PCRtr.

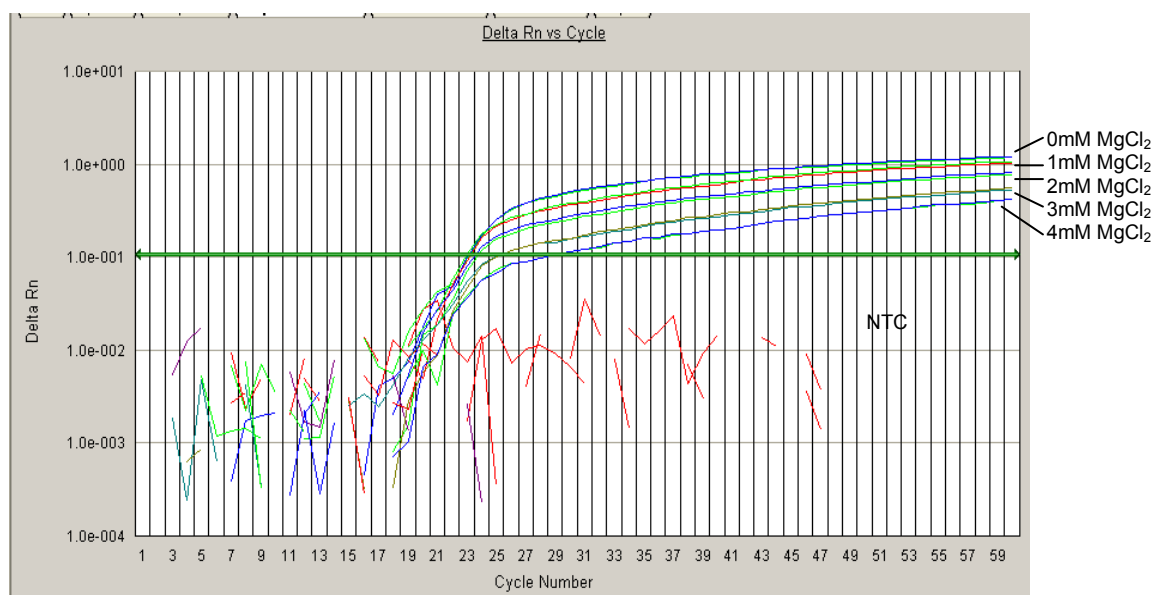


Figura 38. Resultados de la PCRtrQ para optimizar la concentración de $MgCl_2$, en el Ttr-ABI Prism[®]. Se escogieron aquellas concentraciones que tuvieron una Ct menor, y a igual Ct las que presentaron una mayor variación en la fluorescencia (ΔRn). NTC: control negativo sin ADN.

Al escoger la sangre periférica como muestra para nuestros análisis tuvimos en cuenta la presencia del ADN genómico humano, además de la presencia o no del ADN bacteriano. Por lo tanto, hicimos un estudio de sensibilidad del ADN genómico ($1\mu g$, 800-600-400-300-200-100ng) al que se le añadió 250pg de ADN de *Brucella melitensis* a cada muestra. Se hicieron dos réplicas de cada muestra y se determinó 200 ng como cantidad de ADN genómico para añadir a la PCRtrQ, figura 39.

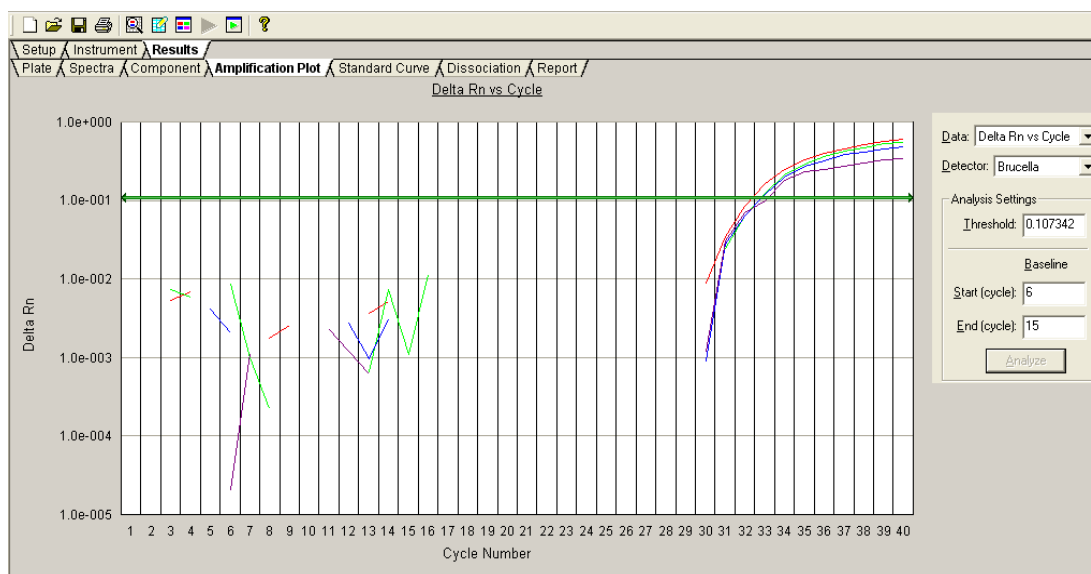


Figura 39. Sensibilidad de la PCRtrQ para detectar ADN de *B. melitensis* en presencia de ADN genómico humano, en el Ttr- ABI Prism®. Se muestran resultados parciales de la PCRtrQ. No hubo amplificación en el control negativo sin ADN (NTC) y control negativo con ADN genómico humano. Trazos rojo y verde, control positivo (250pg); trazos azul y morado, 200ng de ADN genómico humano a los que se les ha añadido 250pg de *B. melitensis*.

2.2. Ttr-LightCycler®

Las condiciones de amplificación se optimizaron mediante variaciones en la concentración de cebadores, sonda y magnesio. Así como variaciones en la temperatura y tiempo de hibridación (del inglés “*annealing*”) y el número de ciclos.

Para optimizar la concentración de cebadores y sonda, ensayamos un rango de concentraciones de 200-300-400-500nM para los cebadores y de 50-100-200-300-400-500nM para la sonda. La concentración óptima de cebadores fue de 400 nM (figura 40-A) y 100nM de sonda (figura 40-B). En cuanto al $MgCl_2$ se probó un rango de concentraciones de 1-2-3-4-5-6mM, la concentración óptima fue 6mM. Se escogieron aquellas concentraciones que tuvieron una Ct menor, y a igual Ct las que presentaron una mayor variación en la fluorescencia (ΔRn).

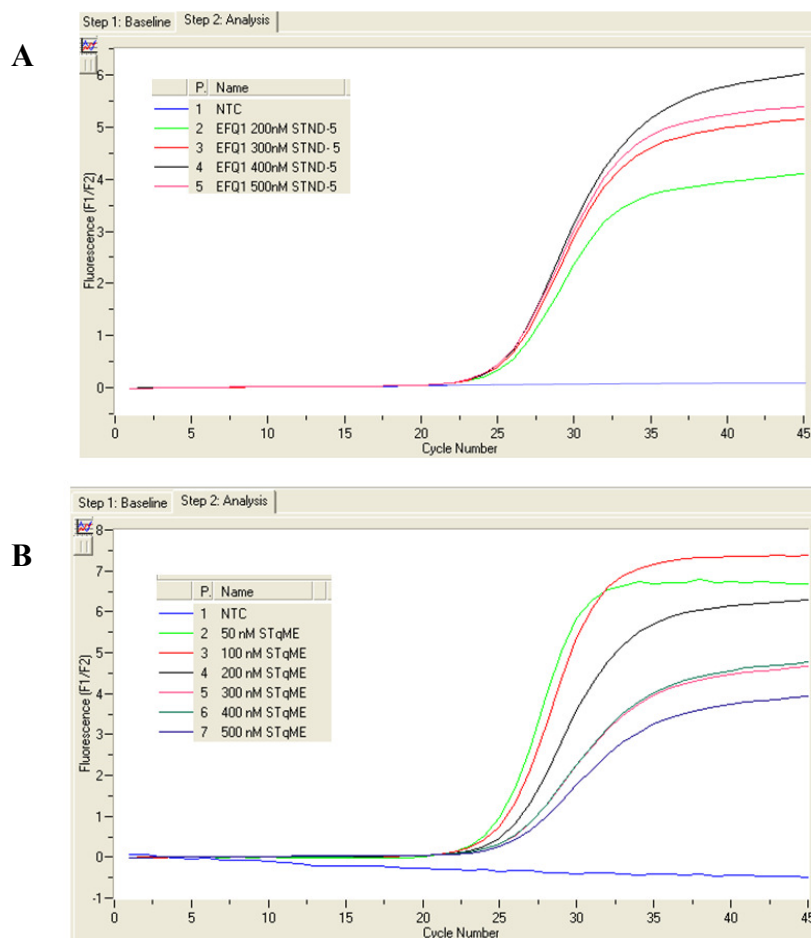


Figura 40. Resultados de las PCRtrs para optimizar las concentraciones de cebadores y sonda en el Ttr-LightCycler®. (A) En la posición 1, control negativo sin ADN (NTC); posición 2,3,4 y 5, añadimos 200,300,400 y 500nM de cada cebador EFQ1/ERQ2, respectivamente. (B) En la posición 1, control negativo sin ADN (NTC); posición 2,3,4,5,6 y 7, añadimos 50,100,200,300,400 y 500nM de la sonda STqME, respectivamente.

Para valorar la posible interferencia del ADN humano en la detección de *B. melitensis* se extrajo ADN de un control sano y se realizó una matriz con las siguientes concentraciones 100-200-300-400-500-600ng de ADN genómico humano y 10^2 - 10^3 - 10^4 - 10^5 copias del estándar. Se hicieron dos réplicas de cada muestra y se determinó 400 ng como cantidad de ADN genómico para añadir a la PCRtrQ, figura 41.

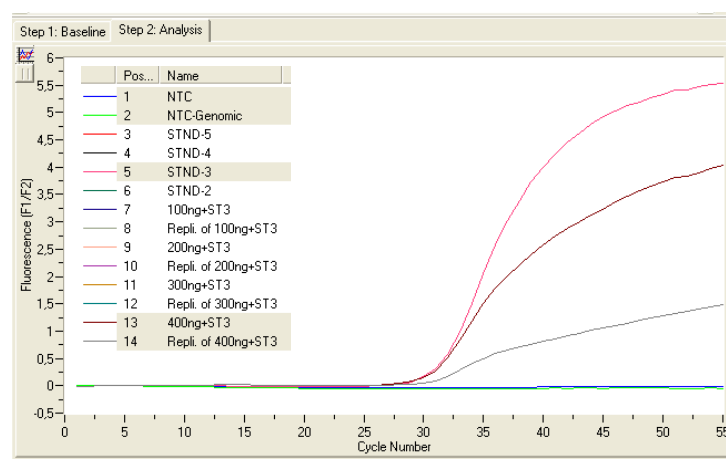


Figura 41. Sensibilidad de la PCRtrQ para detectar ADN de *B. melitensis* en presencia de ADN genómico humano. Se muestran resultados parciales de la PCRtrQ. En la posición 1, control negativo sin ADN (NTC); posición 2, control negativo con ADN genómico humano; posición 5, control positivo (10^3 copias); posición 13-14, 400ng de ADN genómico humano a los que se les ha añadido 10^3 copias del estándar.

La temperatura y el tiempo de hibridación se variaron de la siguiente forma:

Segmento	T ^a (°C)	Tiempo (s)	T ^a (°C)	Tiempo (s)	T ^a (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	95	15	95	15	95	10
Hibridación	58	30	60	30	60	10
Elongación	72	30	72	30	72	15
Nº de Ciclos	45		45		45	
Opción	A		B		C	

El número de ciclos fue de 45 y con respecto a las tres opciones planteadas en la tabla superior hubo pequeñas variaciones, pero no se observó pérdida de la eficiencia y especificidad de la amplificación al aumentar la temperatura de hibridación ni al reducir el tiempo de los tres segmentos. Por ello se optó por utilizar los datos de la opción C para el desarrollo de las sucesivas PCRtrQs, para ahorrar tiempo.

La fluorescencia se analizó en el canal F1/F2 y el análisis de los datos se hizo por el método de la segunda derivada máxima, utilizando la versión 3.5 del LightCycler 3.

3. Especificidad de los cebadores y sonda

La especificidad teórica de los cebadores y sonda seleccionados para la amplificación *B. melitensis* fue determinada por comparación de las secuencias en la base de datos GenBank usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul y cols., 1990) (Anexo), y confirmada experimentalmente (Tabla 13). Para ello analizamos ADN de 21 cepas pertenecientes a 6 especies diferentes del género *Brucella*, 8 cepas relacionadas filogenéticamente con *Brucella* spp. y 5 bacterias gram-negativas que muestran reacción cruzada serológica con *Brucella* spp..

Tabla 13. Especies y cepas bacterianas analizadas en este estudio.

Especies y cepas bacterianas	Cepa	PCRtrQ ABI Prism® <i>B. melitensis</i>	PCRtrQ LightCycler® <i>B. melitensis</i>
<i>Brucella melitensis</i> , bv.1	16M	+	+
<i>Brucella melitensis</i> , bv.1	Rev 1	+	+
<i>Brucella melitensis</i> , bv.2	63/9	+	+
<i>Brucella melitensis</i> , bv.3	Ether	+	+
<i>Brucella abortus</i> , bv.1	RB51	—	—
<i>Brucella abortus</i> , bv.1	544	—	—
<i>Brucella abortus</i> , bv.1	S19	—	—
<i>Brucella abortus</i> , bv.2	86/8/59	—	—
<i>Brucella abortus</i> , bv.3	Tulya	—	—
<i>Brucella abortus</i> , bv.4	292	—	—
<i>Brucella abortus</i> , bv.5	B3196	—	—
<i>Brucella abortus</i> , bv.6	870	—	—
<i>Brucella abortus</i> , bv.9	C/68	—	—
<i>Brucella suis</i> , bv.1	1330	—	—
<i>Brucella suis</i> , bv.2	Thomsen	—	—
<i>Brucella suis</i> , bv.3	686	—	—
<i>Brucella suis</i> , bv.4	40	—	—
<i>Brucella suis</i> , bv.5	513	—	—
<i>Brucella neotomae</i>	5K33	—	—
<i>Brucella ovis</i>	Reo198	—	—
<i>Brucella canis</i>	RM6/66	—	—
Bacterias relacionadas genéticamente			
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		—	—
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		—	—
<i>Agrobacterium vitis</i>		—	—
<i>Ochobacterium intermedium</i>	3301	—	—
<i>Ochobacterium anthropi</i>		—	—
<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>		—	—
<i>Phyllobacterium rubiacearum</i>		—	—
<i>Vibrio cholerae</i>		—	—
Bacterias relacionadas antigenicamente			
<i>Escherichia coli</i>		—	—
<i>Francisella tularensis</i>		—	—
<i>Pasteurella multocida</i>		—	—
<i>Salmonella urbana</i>		—	—
<i>Yersinia enterocolitica</i>		—	—

3.1. Ttr-ABI Prism®

La PCRtrQ para *B. melitensis* tuvo una especificidad del 100% porque fue positiva para las cepas 16M, Rev 1, 63/9 y Ether de *B. melitensis* y negativa para el resto de las bacterias del género *Brucella* y bacterias relacionadas filogenéticamente y serológicamente (figuras 42 y 43); en todos los casos de PCRtrQ negativa hubo amplificación del control positivo interno (IPC), figura 44.

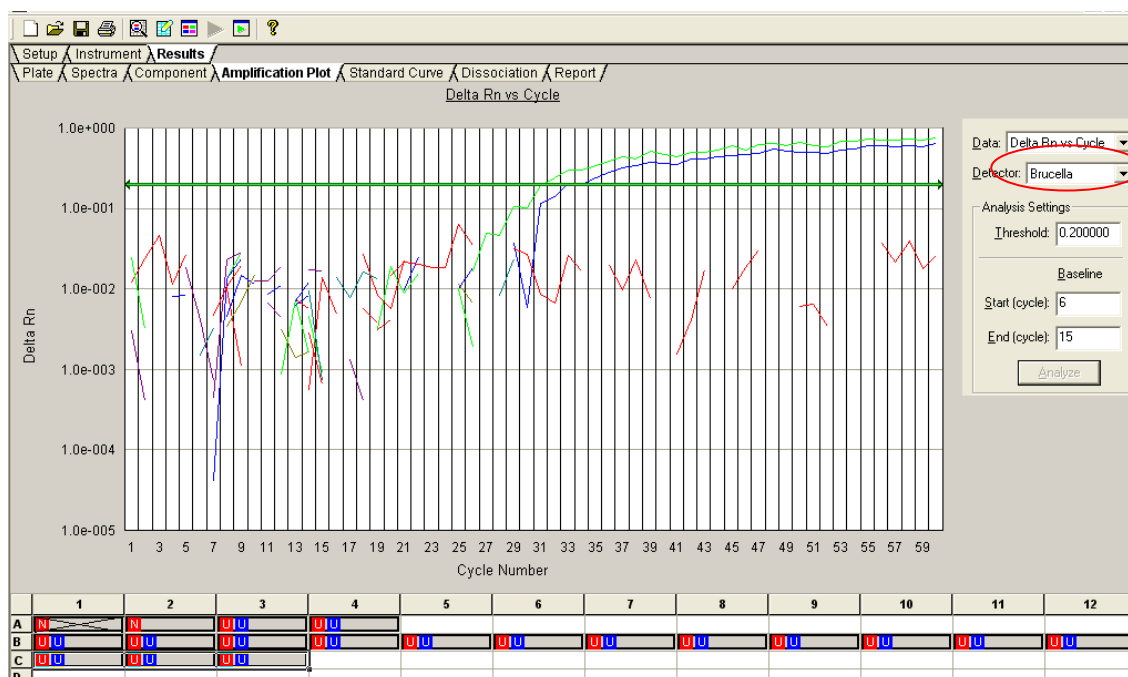


Figura 42. PCRtrQ negativa de *B. abortus*, cepas RB51 y 870; *B. suis*, cepa 1330; *B. neotomae*, cepa 5K33 y *Ochobactrum anthropi*, se muestra el detector para *Brucella*. Los únicos amplificados que se aprecian corresponden al control positivo de la reacción *Brucella melitensis*, cepa Rev1.

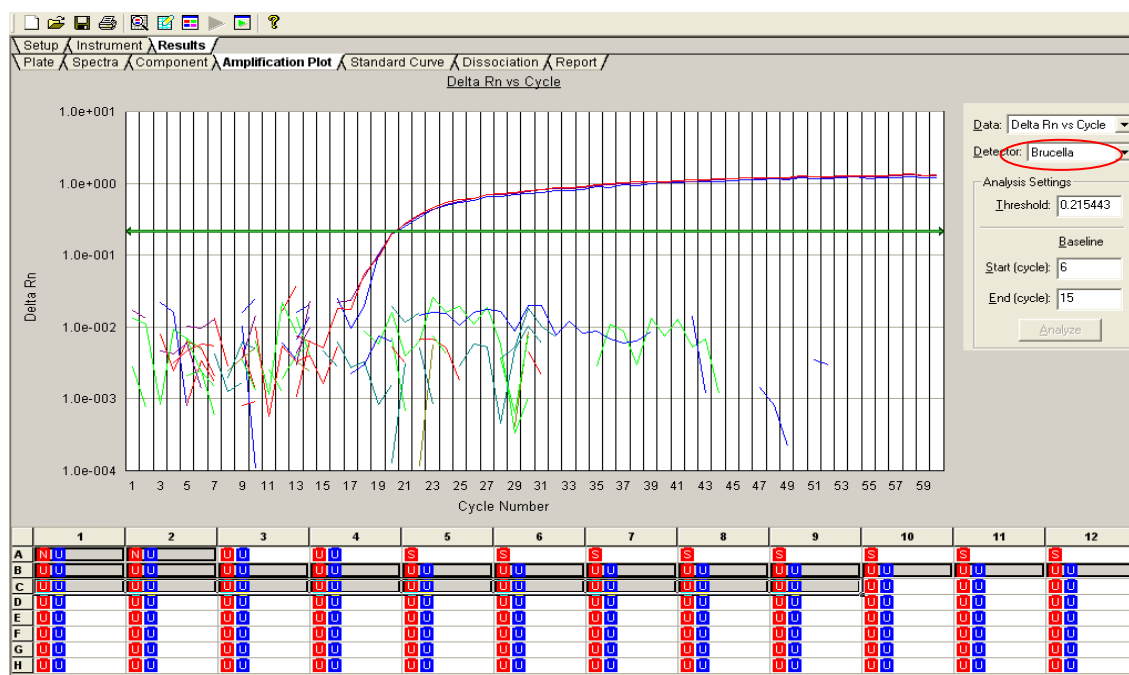


Figura 43. PCRtrQ de algunas bacterias relacionadas genéticamente y antigénicamente con el género *Brucella*, se muestra el detector para *Brucella*. Fueron PCRtrQ negativa *Vibrio cholerae*, *Agrobacterium radiobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Pasteurella multocida*. Los únicos amplificados que se aprecian corresponden a *Brucella melitensis*, cepa Rev1.

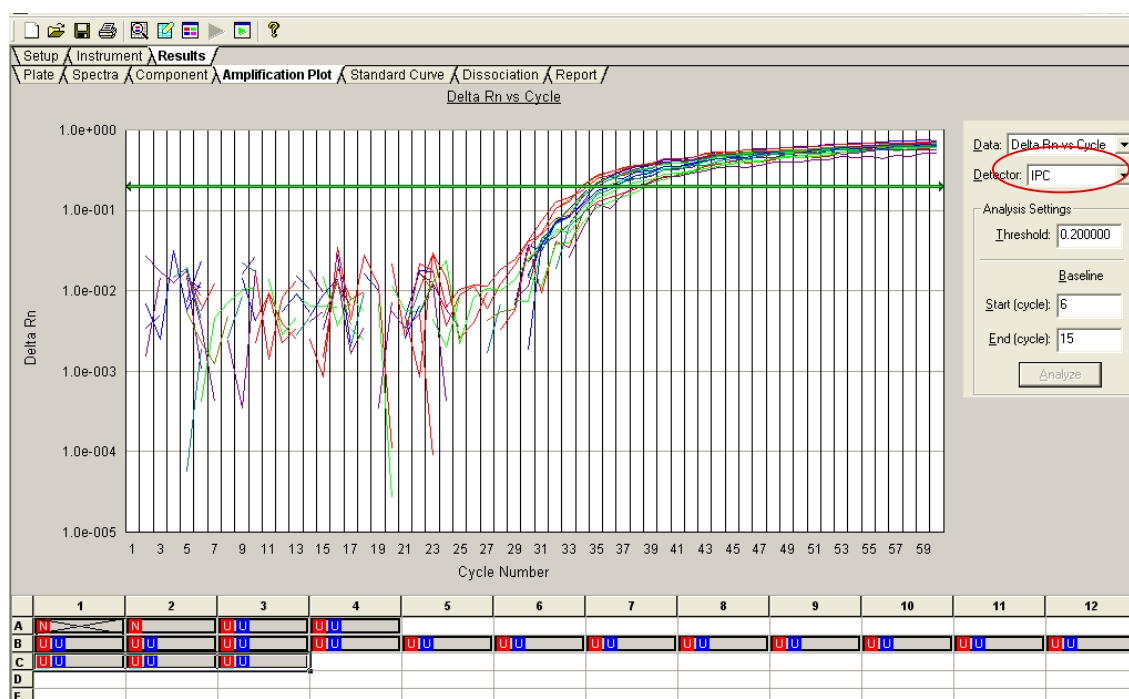


Figura 44. PCRtrQ de *B. abortus*, cepas RB51 y 870; *B. suis*, cepa 1330; *B. neotomae*, cepa 5K33 y *Ochobractrum anthropi*, se muestra el detector para IPC. Hubo amplificación en todos los casos.

3.2. Ttr-LightCycler®

La PCRtrQ para *B. melitensis* tuvo una especificidad del 100% porque fue positiva para las cepas 16M, Rev 1, 63/9 y Ether de *B. melitensis* y negativa para el resto de las bacterias del género *Brucella* y bacterias relacionadas filogenéticamente y serológicamente (figura 45).

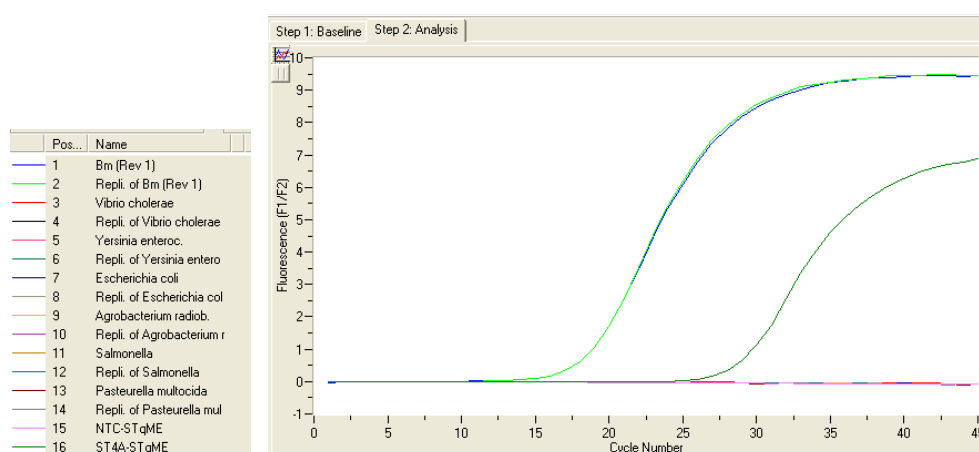


Figura 45. PCRtrQ de algunas bacterias relacionadas genéticamente y antígenicamente con el género *Brucella*. Fueron PCRtrQ negativa *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium radiobacter*, *Salmonella* y *Pasteurella multocida*. Los únicos amplificadas que se aprecian corresponden a *Brucella melitensis*, cepa Rev1 (posición 1-2) y el estándar o control positivo de amplificación (posición 16). NTC: control negativo sin ADN.

4. Sensibilidad

4.1. Ttr-ABI Prism®

La sensibilidad analítica de la PCRtrQ se calculó analizando diluciones seriadas (desde 250ng hasta 25fg) de ADN de *B. melitensis*-Rev1 (63,8µg/ml). Se añadieron 3,9µl de cada dilución a cada muestra, y las condiciones de amplificación fueron las descritas en el apartado 2.6.2.1. de material y métodos. La PCRtrQ detectó hasta 250fg de ADN de *B. melitensis*. Esto es equivalente a 16-25 copias del stock de bacterias a partir del cual se ha extraído el ADN, asumiendo que 10-15 fg de ADN es equivalente a 1 genoma (Redkar y cols., 2001), figura 46.

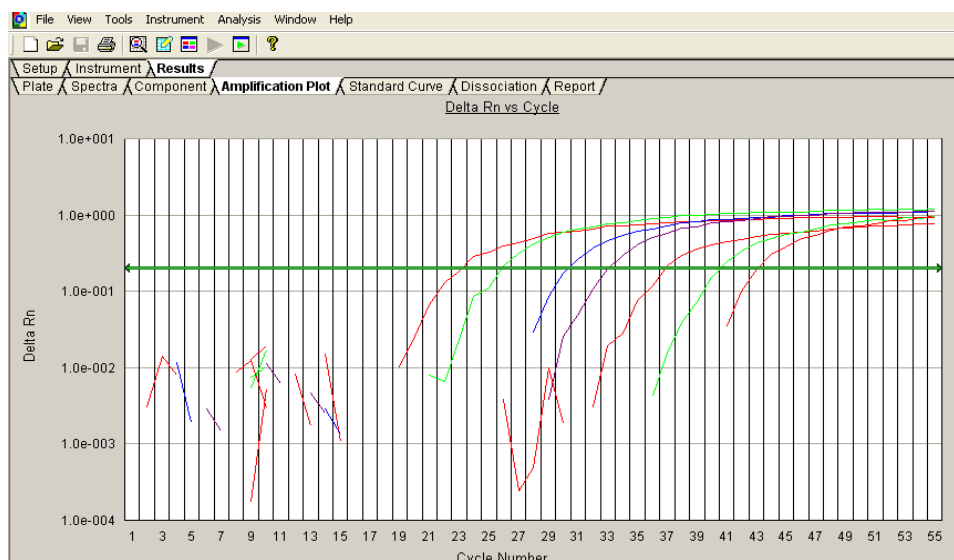


Figura 46. PCRtrQ de siete diluciones seriadas, desde 250ng hasta 25fg, de ADN de *B. melitensis* (Rev1) en el Ttr-ABI Prism®. Hubo amplificación desde 250ng a 250fg. Se muestra el detector para *Brucella*.

4.2. Ttr-LightCycler®

La sensibilidad analítica de la PCRtrQ se calculó analizando diluciones seriadas (desde 150ng hasta 15fg) de ADN de *B. melitensis*-Rev1. Se añadieron 1,29 μ l de cada dilución a cada muestra, y las condiciones de amplificación fueron las descritas en el apartado 2.6.2.2. de material y métodos. La PCRtrQ detectó hasta 15fg de ADN de *B. melitensis*. Esto es equivalente a 1 copias del stock de bacterias a partir del cual se ha extraído el ADN (Figura 47).

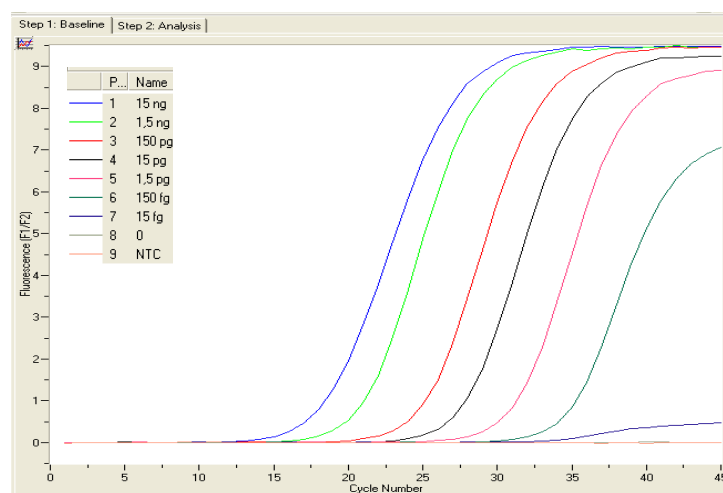


Figura 47. PCRtrQ de siete diluciones seriadas, desde 150ng hasta 15fg, de ADN de *B. melitensis* (Rev1) en el Ttr-LightCycler®. Hubo amplificación desde 150ng a 15fg. Asumiendo que 10-15 fg de ADN es equivalente a 1 genoma, la siguiente dilución a 15fg fue negativa. NTC: control negativo sin ADN.

5. Clonación del fragmento de 251pb de *B. melitensis* en el vector pGEM-T Easy

Una vez escogida la pareja de cebadores EFQ1/ERQ2, realizamos una PCR estándar con ADN de *B. melitensis* (Rev 1). Después de comprobar, en gel de agarosa, que amplificaban un FE251 (Figura 48) se purificó la banda para clonarla en el vector pGEM-T Easy, transformando el resultado de la ligación en células competentes de *E.coli*, (Figura 49).

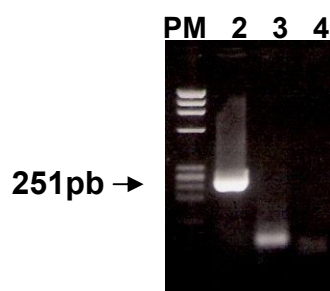


Figura 48. Electroforesis en gel de agarosa correspondiente a la amplificación por PCR estándar del ADN de *B. melitensis* y *B. abortus* con los cebadores EFQ1/ERQ2. Calle 1, marcador de peso molecular Φ X174; calle 2, 25 ng de ADN de *B. melitensis*; calle 3, 25 ng de ADN de *B. abortus*; calle 4, control de reactivos sin ADN.

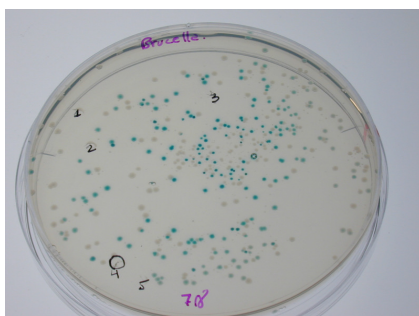


Figura 49. Colonias transformadas de *E. coli* con el inserto de 251 pb de *B. melitensis*, colonias blancas.

La selección de los clones con el inserto se realizó haciendo una PCR estándar directamente sobre las colonias transformadas (del inglés “*colony-PCR*”). Al realizar la PCR con los cebadores EFQ1/ERQ2 y SP6/T7, las colonias negativas amplificaban ningún fragmento mientras que las colonias positivas presentaban una banda a 251 y 392 pb, respectivamente (Figura 50).

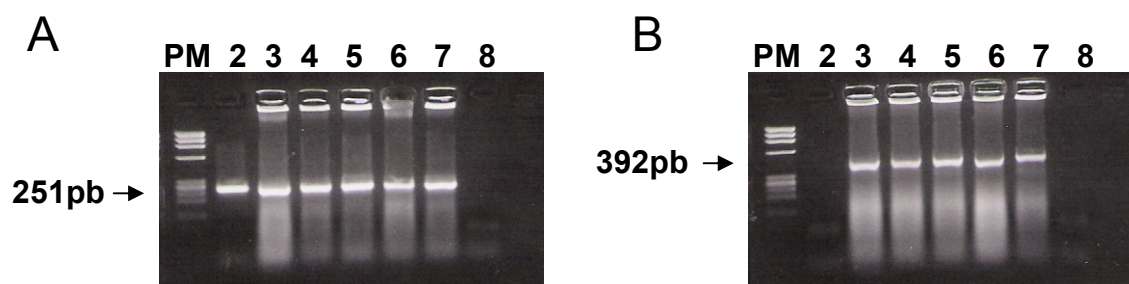


Figura 50. PCRs de colonias. Selección de clones con distintos cebadores (A) EFQ1/ERQ2, amplifican un fragmento de 251pb. Calle 1, marcador de peso molecular (MWM) Φ X174; calle 2, ADN de *B. melitensis*; calle 3-7, distintos clones que contienen el inserto y calle 8, control de reactivos sin ADN. (B) SP6/T7, amplifican un fragmento de 392pb indicando la presencia de inserto. Calle 1, MWM Φ X174; calle 2, ADN de *B. melitensis*; calle 3-7, distintos clones que contienen el inserto y calle 8, control de reactivos sin ADN.

Una vez que habíamos seleccionado los clones con nuestro inserto procedimos a su extracción de *E. coli*. Para comprobar que el FE251 que amplificaban los cebadores EFQ1/ERQ2 correspondía a *B. melitensis*, el producto amplificado se purificó y se secuenció (resultados no mostrados). La secuencia obtenida coincidió con la secuencia de *B. melitensis* esperada, disponible en GenBank con n° de acceso AE009555.

6. Construcción de la curva estándar

La cuantificación del plásmido con nuestro inserto se hizo por densidad óptica a 260nm, como se ha descrito en el apartado 2.5.1. de material y métodos. El número de moléculas que obtuvimos fue 55370886874 moléculas/ml. Una vez calculado el número de moléculas de nuestro fragmento clonado, establecimos un volumen (9.03 μ l) en el que hubiera un número de moléculas (10^{11} moléculas) con el que nos resultara fácil trabajar y efectuar diluciones seriadas con el fin de construir una curva estándar con la que poder determinar el número de moléculas o copias de *Brucella melitensis* presentes en las muestras analizadas.

6.1. Ttr-ABI Prism®

La amplificación de cinco diluciones seriadas del plásmido pGEM-T Easy con el fragmento FE251 clonado de *B. melitensis* (Rev1) mostró un rango de detección lineal de 10^5 a 10^2 copias por mezcla de reacción, con una R^2 de 0,99 y una eficiencia de la PCR

de 1,89. El factor de amplificación ideal para determinar la eficiencia de la PCR es de 2 por ciclo de PCR ($A=10^{(-1/pendiente)}$; $E=[10^{(-1/pendiente)}]-1$). La correlación del valor de C_t (ciclo umbral del inglés "threshold value") y el número de copias (copias #) del plásmido fue $C_t = -3,679 \times \log(\text{copias \#}) + 46,002$ (Figura 51).

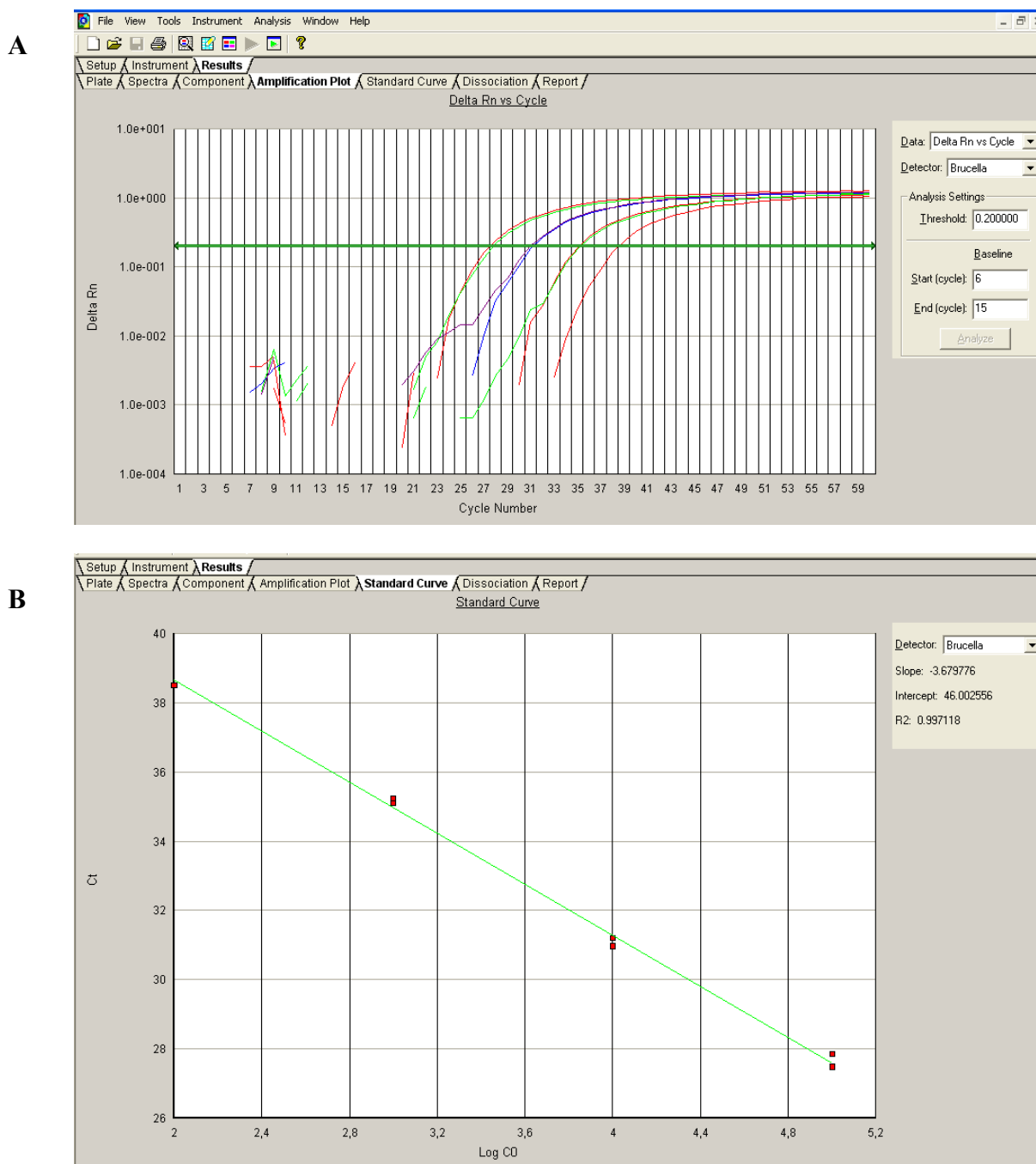


Figura 51. Amplificación de diluciones seriadas del estándar para la construcción de la curva estándar en el Ttr-ABI Prism[®]. (A) Hubo una detección lineal de 10^5 a 10^2 copias por mezcla de reacción. (B) Curva de calibración del ensayo del PCRtrQ con sonda TaqMan. Los valores de C_t han sido representados contra el log del número de copias del plásmido inicial.

6.2. Ttr-LightCycler®

La amplificación de 7 diluciones seriadas del plásmido con el fragmento clonado de 251 pb de *B. melitensis* reveló un rango de detección lineal de 10^7 a 1 copia por mezcla de reacción (Figura 52.A). La correlación del valor de C_t y el número de copias del plásmido es $C_t = -3,260 \times \log(\text{copias \#}) + 37,59$; con una R^2 de 1,00 y una eficiencia de la amplificación de la PCR de 2,0 (Figura 52.B).

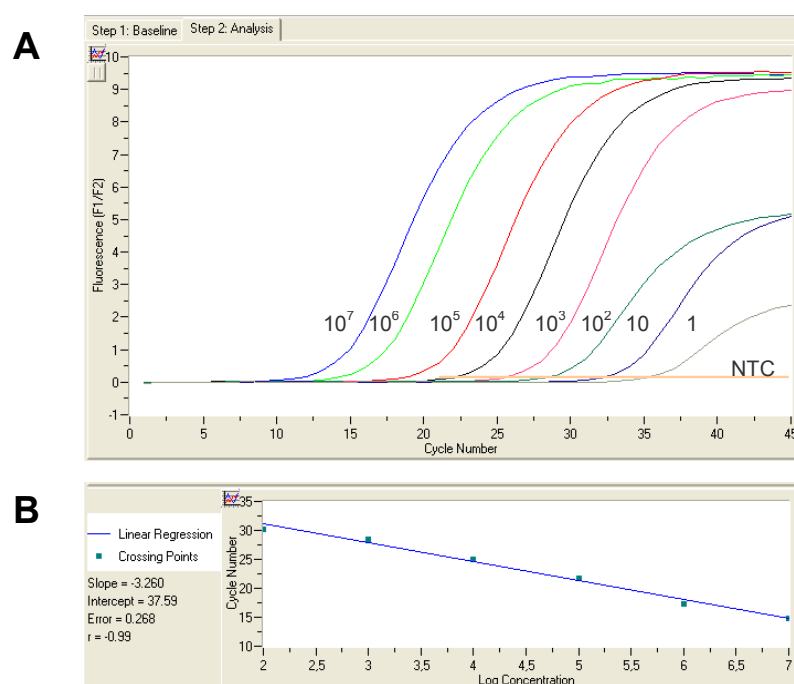


Figura 52. Amplificación de diluciones seriadas del estándar para la construcción de la curva estándar en el Ttr-ABI Prism®. (A) Hubo una detección lineal de 10^7 a 1 copias por mezcla de reacción. (B) Curva de calibración del ensayo del PCRtrQ, los valores de C_t han sido representados contra el log de la concentración del plásmido inicial. NTC: control negativo sin ADN.

El número de copias de ADN de *B. melitensis*, presentes en 200ng y 400ng de ADN genómico humano, se calculó después de cada amplificación por interpolación de los valores de C_t sobre cada curva estándar, en el Ttr-ABI Prism® y Ttr-LightCycler®, respectivamente.

Si asumimos que 10-15fg de ADN de *Brucella* equivalen a 1 copia, 1-1,5pg equivaldrían a 10^2 copias, 10-15pg a 10^3 copias y 100-150pg a 10^4 copias. Para verificar que el número de copias de nuestro estándar estaba en éste rango, realizamos una PCRtrQ que se muestra en la figura 53.

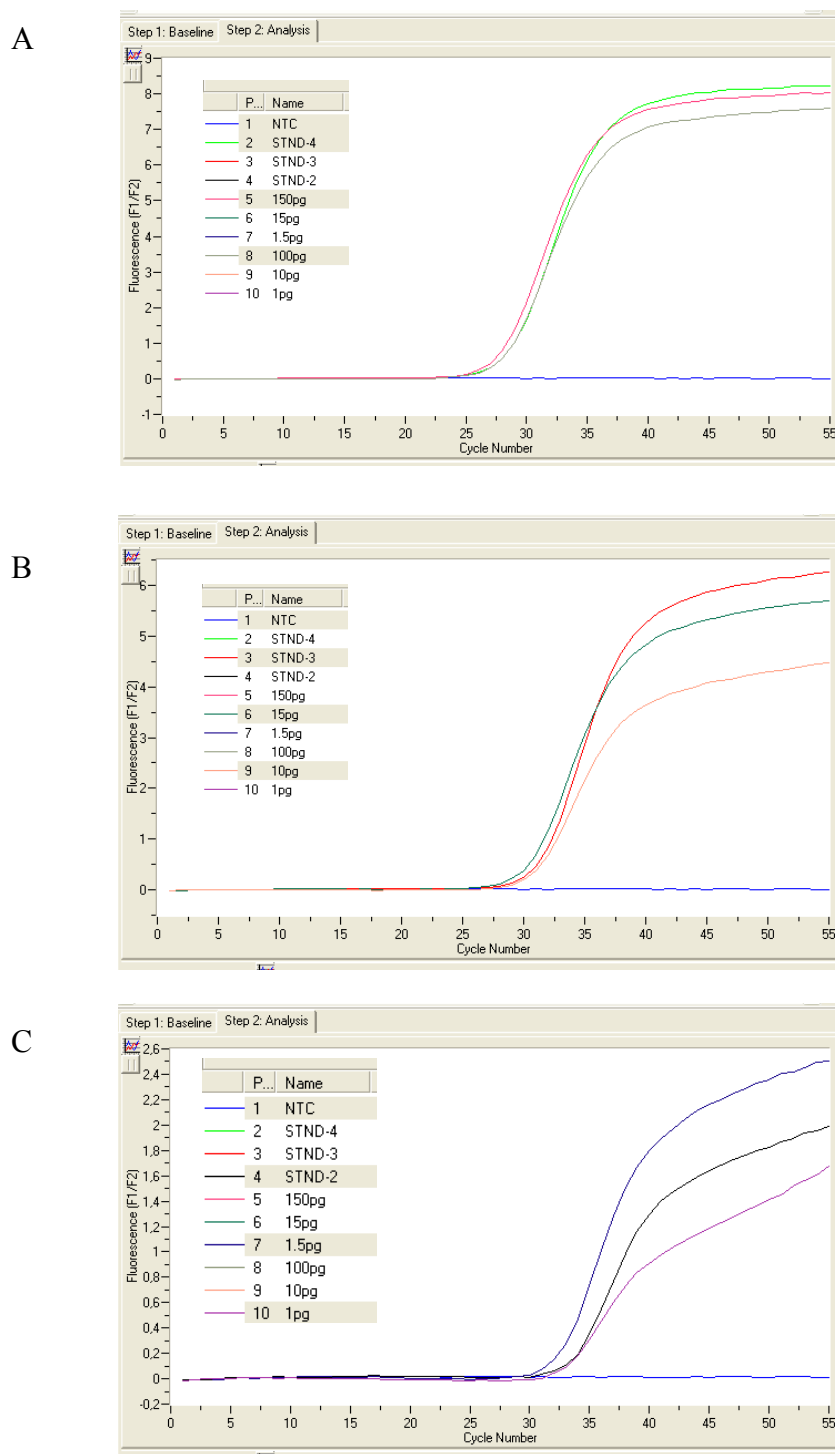


Figura 53. PCRtrQ en la que se muestra la correlación del número de copias de nuestro estándar y la concentración de ADN de *B. melitensis*. Se muestran resultados parciales de la PCRtrQ. (A) 10^4 copias del estándar=100-150pg; (B) 10^3 copias=10-15pg; (C) 10^2 copias=1-1,5pg. NTC: control negativo sin ADN.

7. Reproducibilidad en el Ttr-LightCycler®a

Cinco diluciones del estándar, desde 10^5 copias hasta 1 copia, se analizaron por triplicado en tres ensayos diferentes para valorar, tanto, la reproducibilidad intra-ensayo e inter-ensayo de la amplificación de la PCRtrQ. Las PCRtrQ se realizaron según el protocolo descrito en el apartado 2.6.2.2. de material y métodos. En la figura 54 se muestra una de las PCRtrQ realizadas para valorar la reproducibilidad intra-ensayo.

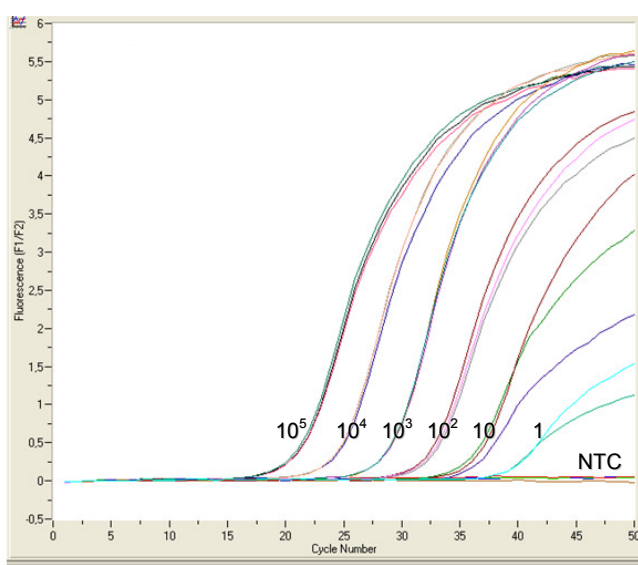


Figura 54. Reproducibilidad intra-ensayo. Las diluciones del estándar se analizaron por triplicado. Nuestro método de PCRtrQ detectó las tres réplicas desde la dilución 10^5 hasta la 10, y dos réplicas de la última dilución, correspondiente a una copia. NTC: control negativo sin ADN.

En la tabla 14, se muestra la media de los valores de $Ct \pm$ la desviación estándar de cada una de las diluciones en las tres PCRtrQs, así como, el coeficiente de variación y el número de réplicas positivas de las nueve réplicas analizadas.

Tabla 14. Reproducibilidad inter- e intra-ensayo de la PCRtrQ del estándar de *B. melitensis* en el Ttr-LightCycler®.

PCR	10 ⁵ copias	10 ⁴ copias	10 ³ copias	10 ² copias	10 copias	1 copias
1 ^a Intra-ensayo	20,57±0,04 ^a	24,17±0,04	27,60±0,21	32,07±0,09	35,90±0,25	40,11±0,60
	0,19% ^b (3/3) ^c	0,15% (3/3)	0,76% (3/3)	0,28% (3/3)	0,70% (3/3)	1,50% (2/3)
2 ^a Intra-ensayo	21,24±0,04	24,74±0,02	29,00±0,08	32,60±0,10	35,93±0,38	38,79±0,52
	0,170% (3/3)	0,08% (3/3)	0,28% (3/3)	0,31% (3/3)	1,07% (3/3)	1,35% (2/3)
3 ^a Intra-ensayo	21,00±0,11	24,81±0,11	28,52±0,07	32,85±0,19	36,68±1,17	38,72±0,08
	0,50% (3/3)	0,43% (3/3)	0,23% (3/3)	0,57% (3/3)	3,18% (3/3)	0,2% (2/3)
Inter-ensayo	20,94±0,30	24,57±0,31	28,38±0,62	32,50±0,38	36,17±0,73	39,20±0,79
	1,43% (9/9)	1,26% (9/9)	2,18% (9/9)	1,17% (9/9)	2,03% (9/9)	2,00% (6/9)

^a Media de los valores de C_t y la desviación estándar (C_t±DS).

^b La variabilidad se muestra como coeficiente de variación de las tres PCR realizadas para valorar la reproducibilidad intra e inter-ensayo.

^c N° de réplicas positivas/N° total de réplicas.

8. Grupo control

Calculada la especificidad, el límite de sensibilidad de nuestros cebadores y sonda, optimizadas las condiciones de PCRtrQ y confirmada la identidad del producto amplificado, comprobamos si existía especificidad con el ADN genómico humano del grupo control que en un futuro pudiera causar interferencias en la detección de *B. melitensis* en pacientes con brucelosis.

8.1. Ttr-ABI Prism®

Se extrajo ADN a partir de sangre periférica de 30 individuos sanos procedentes del banco de sangre, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.1 de material y métodos. Después de realizar las PCRtrQs, veintinueve de los treinta controles fueron negativos, por lo tanto la especificidad fue del 96.7%. Esta muestra control positiva para la PCRtrQ fue negativa para el RB, SAT y para el test de Coombs. El amplificado de este control se secuenció y se encontró una homología del >99% con *B. melitensis*.

8.2. Ttr-LightCycler®

Se recogieron muestras de sangre periférica de un grupo de 45 sujetos. Este grupo estaba compuesto por 15 pacientes con síndromes febriles que inicialmente plantearon un diagnóstico diferencial con la brucelosis y 30 individuos sanos procedentes

del banco de sangre (este grupo control es diferente al analizado anteriormente para el Ttr-ABI Prism®). El ADN, de la sangre, se extrajo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.2 de material y métodos. La PCRtrQ mostró una especificidad del 97,8% para detectar ADN de *B. melitensis* en sangre periférica (Figura 55). Esta muestra control corresponde a un paciente con síndrome febril de otra etiología, *Streptococcus pneumoniae*, y fue negativa para el RB, SAT y para el test de Coombs. El amplificado en la PCRtr, de este control, se secuenció y se encontró una homología del >99% con *Brucella melitensis*.

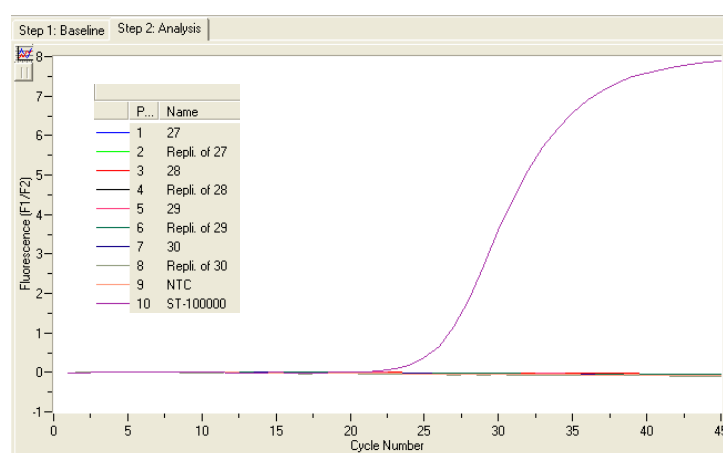


Figura 55. Especificidad clínica de la PCRtrQ. De la posición 1-8, por duplicado, aparecen cuatro muestras de sangre periférica perteneciente a cuatro controles sanos; en la posición 9 aparece el control negativo sin ADN (NTC) y en la posición 10 el control positivo (10^5 copias).

9. Valoración de la PCRtrQ en el diagnóstico

9.1. Características de los pacientes

De acuerdo con los criterios definidos en el apartado 1.2.1. de material y métodos se incluyeron 17 pacientes con brucelosis aguda, de los cuales se analizaron 30 muestras de sangre periférica. Once fueron varones (65%) y seis mujeres (35%), la edad media (\pm SD) fue 39 ± 15 años (rango, r=18-68). En 14 casos (82.4%) la infección fue adquirida a través de contacto con ganado (ganaderos, pastores o mantenimiento de granjas) y en 3 casos (17.6%) trabajaban o tenían relación con una fábrica de quesos. La media (\pm SD) del tiempo de evolución antes del diagnóstico fue de 25.5 ± 21.3 días (r=3-60): en 8 pacientes (47%), la duración fue ≤ 2 semanas; en 2 (11.8%), fue entre 2

semanas y un mes; y en 5 (29.4%), de 1 a 2 meses. En el momento del diagnóstico inicial catorce pacientes (82.4%) tuvieron fiebre y ninguno presentó focalidad. Las características clínicas de los 17 pacientes en el momento del diagnóstico se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Características clínicas de los 17 pacientes incluidos en este estudio en el momento del diagnóstico.

Pacientes	Edad (años)/ Género	Tiempo evo- lución (días)	Manifestaciones clínicas	Tratamiento(días) ^a	Recidiva
1	31/M	20	Adenopatía, fiebre, artralgia, mialgias.	Doxiciclina (45)+ Levofloxacino (45)	SI
2	42/V	13	Fiebre, sudoración, anorexia, artralgias, astenia, cefalea	Doxiciclina (45)+ Gentamicina (7)	SI
3	34/V	60	Fiebre, mialgias, astenia, artralgias	Doxiciclina (45)+ Gentamicina (7)	NO
4	28/V	7	Fiebre, mialgias	Doxiciclina (45)+ Estreptomocina (14)	NO
5	38/M	35	Fiebre, sudoración	Doxiciclina (45)+ Gentamicina (7)	NO
6	18/V	10	Fiebre, sudoración, malestar general, adenopatias	Doxiciclina (45) + Gentamicina (7)	NO
7	35/V		Lumbociatalgia derecha	Doxiciclina (45)+ Gentamicina (7)	NO
8	68/M	60	Fiebre, anorexia, astenia	Doxiciclina (60)	SI
9	37/V		Fiebre sin otros síntomas	Doxiciclina (60)	NO
10	29/M	7	Fiebre, artralgias, mialgias	Doxiciclina (60)	NO
11	22/V	30	Mal estar, astenia, anorexia, fatiga	Doxiciclina (45)+ Gentamicina (7)	SI
12	36/V	7	Fiebre, astenia, dolores lumbares	Doxiciclina (60)	SI
13	52/V	3	Fiebre, artralgias, mialgias	Doxiciclina (90) + Gentamicina (21) + Rifampina (90)	NO
14	20/V	15	Fiebre, artralgias	Doxiciclina (60)	NO
15	61/M	60	Astenia, anorexia, fiebre, artralgias	Doxiciclina (60)	SI
16	53/M	45	Astenia, artralgias	Doxiciclina (60)+ Gentamicina (7)	NO
17	62/V	10	Fiebre, tiritonas, escalofríos, sudoración, artralgias, astenia, anorexia, fatiga, malestar.	Doxiciclina (60)	NO

^a Doxiciclina 200mg/día (oral); gentamicina 240mg/día (im); estreptomocina 1g/día (im); rifampicina 600-900mg (oral); levofloxacino 500mg/día (oral). **M:** mujer; **V:** varón.

Seis (35.3%) del total de pacientes tuvieron una recidiva, 3 de estos seis (50%) fueron microbiológicas y otros 3 (50%) clínicas: la media (\pm SD) de aparición de esta recidiva con respecto al episodio agudo fue de 160 ± 93 y 268 ± 287 días, respectivamente. Los tres pacientes con recidiva clínica presentaron signos de focalidad: artritis, sacroileitis

y orquiepididimitis. Las características clínicas de los 6 pacientes en el momento de la recidiva se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Características clínicas en el momento de la recidiva.

Pacientes	Edad(años)/ Género	Tiempo evo- lución (días)	Tratamiento(días) ^a	Recidiva	Manifestaciones clínicas
1	31/M	5	Rifampicina (45)	MB	Adenopatía, fiebre, artralgia, escalofríos.
2	42/V	52	Doxiciclina (45)+ Gentamicina (7)	MB	Fiebre, sudoración, astenia, cefalea
8	68/M	30	Doxiciclina (60) + Estreptomina (15)	C	Artritis
11	22/V	30	Doxiciclina (45)+ Gentamicina (7)	MB	Dolor lumbar
12	36/V	3	Doxiciclina (45) + Estreptomina (14)	C	Sacroileitis, orquiepididimitis
15	61/M	7	Doxiciclina (60) + gentamicina (7)	C	Sacroileitis,

^a Doxiciclina 200mg/día (oral); gentamicina 240mg/día (im); estreptomina 1g/día (im); rifampicina 600-900mg (oral). **M**: mujer; **V**: varón. **MB**: Recidiva microbiológica; **C**: Recidiva clínica.

Respecto al tratamiento seguido por los 17 pacientes, 7 (41.2%) fueron tratados con monoterapia y 10 (58.8%) con terapia combinada, tabla 17. Observamos que el 42.9% (3/7) de los pacientes que fueron tratados con monoterapia recidivaron, frente al 30% (3/10) de los pacientes tratados con terapia combinada.

Tabla 17. Tratamiento de los 17 pacientes en el episodio inicial de brucelosis.

	Monoterapia	Terapia combinada	
No recidivan	4/7 (57.1%)	7/10 (70%)	n=11
Recidivan	3/7 (42.9%)	3/10 (30%)	n=6
n=17	n=7	n=10	n=17

En nuestro estudio el 35.3% (6/17) de los pacientes recidivaron después del tratamiento, de los cuales el 50% (3/6) fueron tratados con terapia combinada y el 50% (3/6) con monoterapia. En el tratamiento de la recidiva se pautó terapia combinada a todos los pacientes, excepto a una mujer embarazada que se trató con rifampicina durante 45 días. Estos pacientes tuvieron una buena evolución y no volvieron a recidivar.

9.2. Cuantificación del número de copias de ADN de *B. melitensis* en sangre

En este estudio se han analizado 30 muestras de sangre periférica, mediante PCRtrQ, de 17 pacientes las cuales se han recogido de la siguiente manera: 17 en el

diagnóstico del episodio inicial de brucelosis, 6 en el diagnóstico de la recidiva y 7 durante el tratamiento. Los pacientes se han clasificado en dos grupos: (i) pacientes que curan y pertenecen asintomáticos (n=11) y (ii) pacientes que recidivan tras la finalización del tratamiento (n=6). Las muestras se han recogido en el momento basal del episodio agudo, en la recidiva y durante el tratamiento.

9.2.1. Grupo de pacientes que no recidivó

En este grupo de pacientes se analizaron un total de 15 muestras de sangre periférica, de las cuales 11 corresponden al momento inicial del diagnóstico y 4 al tratamiento, todas las muestras tuvieron hemocultivos positivos. El resultado de la PCRtrQ y de los diferentes métodos diagnósticos de este grupo de pacientes se muestra en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados de los hemocultivos, RB, SAT, test de Coombs y PCRtrQ en muestras de sangre del grupo de pacientes que no recidivó.

Paciente	Muestra	HC ^b	RB ^b	SAT ^c	Coombs ^c	PCRtrQ (nº mols/ml) ^d	
						Applied	LightCycler
3	49	+3/3	+	1280	5120	805	489
4	50	+2/2	+	160	20480	667	124
	51^a	+1/2	+	160	5120	567	259
5	57	+2/3	+	320	1280	0	122
6	66	+3/3	+	2560	2560	128	808
7	67	+1/3	+	320	5120	0	3323
9	87	+3/3	+	320	640	110	3253
10	104	+2/2	+	640	640	396	348
13	224	+2/2	+	20	10240	0	75
	225^a	+2/2	+	160	20480	0	3
14	239	+2/2	+	640	10240	0	4528
	240^a	+1/2	+	640	10240	0	845
16	266	+1/2	+	160	5120	0	354
	267^a	+1/2	+	160	2560	0	112
17	137	-	-	20	320	190	256

^a Muestra recogida durante el tratamiento.

^b Los resultados de los hemocultivos (HC) y el RB se expresan como positivo (+) o negativo (-), en el caso del HC se indica el nº de HC positivos con respecto al nº de HC extraídos.

^c Los resultados de la seroaglutinación en tubo (SAT) y el test de Coombs (Coombs) se expresan en forma de títulos.

^d nº mols/ml, cálculo realizado según se ha descrito en el apartado 2.5.4. de material y métodos. Se ha considerado un resultado de PCRtrQ positivo cuando al menos una de las réplicas fue positiva.

9.2.1.1. Ttr-ABI Prism®

La PCRtr se hizo según el protocolo descrito en el apartado 2.6.2.1., con los correspondientes controles positivo y negativo. Se tomaron las medidas descritas en el apartado 2.6.4. para evitar las contaminaciones en la PCRtr.

La media (\pm SD) de la carga de ADN de *Brucella melitensis* de estos 11 pacientes en el momento del diagnóstico fue 209 ± 289 copias/ml (rango, 0-805 copias).

De las 11 muestras de sangre analizadas en el momento del diagnóstico inicial, pudimos cuantificar la carga de ADN bacteriano en 6 de ellas correspondientes a 6 pacientes. Por lo tanto, 5 muestras fueron resultados falsos negativos.

9.2.1.2. Ttr-LightCycler®

La PCRtr se hizo según el protocolo descrito en el apartado 2.6.2.2., con los correspondientes controles positivo y negativo. Nuestros controles negativos de extracción de ADN, con “UltraClean™ DNA BloodSpin™ Kit”, fueron siempre negativos. Se tomaron las medidas descritas en el apartado 2.6.4. para evitar las contaminaciones en la PCRtr.

En el momento del diagnóstico, la media (\pm SD) de la carga del ADN bacteriano de los 11 pacientes fue 1244 ± 1623 copias/ml (rango, 75-4528 copias).

Se analizaron 4 muestras de sangre recogidas durante el tratamiento correspondientes a 4 pacientes, la carga de ADN de *Brucella melitensis*, en el momento basal de estos 4 pacientes, fue de 1270 ± 2175 copias/ml (rango, 75,4528) y en el momento del tratamiento de 305 ± 376 copias/ml (rango, 3-845 copias). Estas muestras fueron positivas a los 2,75 días (media) de iniciar el tratamiento, con un rango de 2 a 4 días.

En la figura 56 se muestra el resultado de la PCRtrQ de la muestra 137, que corresponde al paciente número 17.

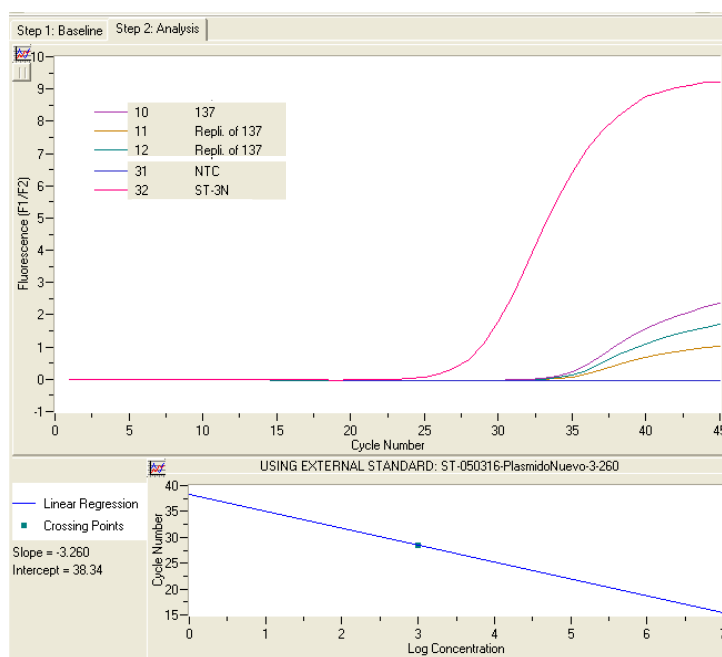


Figura 56. PCRtrQ de la muestra de un paciente. Se muestran resultados parciales de la PCRtrQ. En la posición 31, control negativo sin ADN (NTC); posición 32, estándar (10^3 copias) y posición 10-12, ADN de la sangre de un paciente con hemocultivos negativos, fue diagnosticado en base a criterios clínicos y serológicos. La muestra se analizó por triplicado y se importó la curva estándar.

9.2.2. Grupo de pacientes que recidivó

El resultado de la PCRtrQ y de los distintos métodos diagnósticos de los 6 pacientes que recidivan durante el seguimiento se muestra en la tabla 19. Se trata de 3 recidivas microbiológicas y 3 clínicas. Se analizaron un total de 15 muestras de sangre, de las cuales 6 corresponden al momento del diagnóstico inicial, 3 al tratamiento y 6 al momento de la recidiva. Los hemocultivos de las 3 muestras correspondientes al tratamiento fueron positivos.

Tabla 19. Resultados de los hemocultivos, RB, SAT, test de Coombs y PCRtrQ en muestras de sangre del grupo de pacientes que recidivó.

Paciente	Muestra	HC ^b	RB ^b	SAT ^c	Coombs ^c	PCRtrQ (n° mols/ml) ^d	
						Applied	LightCycler
1	1	+1/2	+	160	320	1439	1002
	7 RM	+3/3	+	80	1280	743	113
2	8	+3/3	+	1280	1280	0	2797
	9 ^a	+3/3	+	2560	2560	182	4447
	27 RM	+3/3	+	640	10240	0	4920
	39 ^a	+1/2	+	640	10240	0	50
8	74	+2/2	+	320	2560	90	44
	75 ^a	+2/2	+	640	1280	0	284
	275 RC	-	+	160	1280	0	223
11	111	+3/3	+	40	320	506	2757
	163 RM	+1/3	+	40	640	0	2587
12	210	+2/2	+	80	640	2	4982
	234 RC	-	+	20	320	0	5
15	261	+2/2	+	160	2560	0	7
	325 RC	-	+	40	2560	0	88

^a Muestra recogida durante el tratamiento.

^b Los resultados de los hemocultivos (HC) y el RB se expresan como positivo (+) o negativo (-), en el caso del HC se indica el n° de HC positivos con respecto al n° de HC extraídos.

^c Los resultados de la seroaglutinación en tubo (SAT) y el test de Coombs (Coombs) se expresan en forma de títulos.

^d n° mols/ml, cálculo realizado según se ha descrito en el apartado 2.5.4. de material y métodos. Se ha considerado un resultado de PCRtrQ positivo cuando al menos una de las réplicas fue positiva.

9.2.2.1. Ttr-ABI Prism®

La PCRtr se hizo según el protocolo descrito en el apartado 2.6.2.1., con los correspondientes controles positivo y negativo. Se tomaron las medidas descritas en el apartado 2.6.4. para evitar las contaminaciones en la PCRtr.

En el momento del diagnóstico, la media (\pm SD) de la carga de ADN bacteriano de los 6 pacientes fue 340 ± 573 copias/ml (rango, 0-1439 copias).

De las 6 muestras de sangre analizadas en el diagnóstico de la recidiva, pudimos cuantificar la carga de ADN bacteriano en 4 muestras correspondientes a 4 pacientes. Por lo tanto, 2 muestras fueron resultados falsos negativos.

En el diagnóstico de la recidiva, la media (\pm SD) de la carga de ADN de *Brucella melitensis* de los 6 pacientes fue 124 ± 303 copias/ml. En este grupo la media (\pm SD) de la carga de ADN bacteriano fue 248 ± 429 copias/ml para los 3 pacientes con recidiva microbiológica y 0 copias/ml para los 3 pacientes con recidiva clínica.

9.2.2.2. Ttr-LightCycler®

La PCRtr se hizo según el protocolo descrito en el apartado 2.6.2.2., con los correspondientes controles positivo y negativo. Nuestros controles negativos de extracción de ADN, con “UltraClean™ DNA BloodSpin™ Kit”, fueron siempre negativos. Se tomaron las medidas descritas en el apartado 2.6.4. para evitar las contaminaciones en la PCRtr.

La media (\pm SD) de la carga de ADN de *Brucella melitensis* de estos 6 pacientes en el momento del diagnóstico fue 1932 ± 1942 copias/ml (rango, 7-4982 copias).

En el diagnóstico de la recidiva, la media (\pm SD) de la carga de ADN bacteriano de los 6 pacientes fue 1323 ± 2023 copias/ml. En este grupo la media (\pm SD) de la carga de ADN bacteriano fue 2540 ± 2404 copias/ml para los 3 pacientes con recidiva microbiológica y 105 ± 110 copias/ml para los 3 pacientes con recidiva clínica.

Se analizaron 3 muestras de sangre recogidas durante el tratamiento correspondientes a 2 pacientes, la carga de ADN de *Brucella melitensis*, en el momento basal, fue de 2587 ± 2445 copias/ml (rango, 44-4920) y en el momento del tratamiento de 1594 ± 2474 copias/ml (rango, 50-4447 copias). La media de los días en tratamiento fue de 13 días con un rango de 2 a 29 días.

9.3. Sensibilidad de la PCRtrQ, hemocultivos y métodos serológicos.

En la tabla 20 se muestra la sensibilidad del hemocultivo, los métodos serológicos y la PCRtrQ. Se han analizado el total de las muestras ($n=30$) y, además, se han dividido en tres grupos: en el momento del diagnóstico, en la recidiva y en el tratamiento.

Tabla 20. Sensibilidad de los distintos tests diagnósticos.

	Sensibilidad (n° (%))					
	HC	RB	SAT ^a	Coombs ^b	PCRtrQ	
					Applied	LightCycler
Diagnóstico (n=17)	16(94.1)	16(94.1)	13(76.5)	17(100)	10(58.8)	17(100)
Recidiva (n=6)	3(50)	6(100)	2(33.3)	6(100)	1(16,7)	6(100)
Tratamiento (n=7)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	2(28.6)	7(100)
Muestras analizadas (n=30)	26(86.7)	29(96.7)	22(73.3)	30(100)	13(43.3)	30(100)

^a Se consideró positivo cuando el SAT fue $\geq 1/160$;

^b Se consideró positivo cuando el Coombs fue $\geq 1/320$.

De las 30 muestras analizadas, 26 tuvieron hemocultivos positivos y 4 negativos; 3 corresponden a tres recidivas clínicas y una al momento del diagnóstico de la brucelosis de uno de los pacientes que no recidivó, tabla 15. Todos los aislados fueron identificados como *B. melitensis*, biotipo 3. Dieciséis (94.1%) pacientes tuvieron hemocultivos positivos en el momento del diagnóstico y uno (13.4%) fue diagnosticado en base a criterios clínicos y serológicos. Aunque durante el tratamiento de los 17 pacientes desaparecieron los síntomas iniciales, seis pacientes tuvieron 7 hemocultivos positivos durante el tratamiento, a los 3±2 días de iniciar la terapia (4 no recidivaron y 2 recidivaron).

En el momento del diagnóstico, (i) el RB fue positivo en el 96.7% de las muestras analizadas, sólo una muestra fue negativa (paciente n° 17, tabla 16), (ii) la seroaglutinación en tubo fue la prueba serológica con menor sensibilidad, tanto en el diagnóstico 76.5% ((13/17)) como en la recidiva (33.3% (2/6)), y (iii) el tests de Coombs tuvo una sensibilidad del 100%, en todos los grupos analizados.

La sensibilidad de la PCRtrQ en el Ttr-ABI Prism[®] fue inferior al 60% (58.8% (10/17)) en el momento del diagnóstico, del 16.7% (1/6) en la recidiva y del 28.6% (2/7) en el tratamiento. Estos datos contrastan con la sensibilidad del 100%, en los tres grupos, de la PCRtrQ realizada en el termociclador LightCycler.

El paciente n° 17 es un varón de 62 años, pastor de ovejas y cabras con abortos recientes. Sin antecedentes de brucelosis y no refiere ingesta de lácteos sin higienizar. Con un tiempo de evolución de 10 días, presentó fiebre diaria y vespertina de hasta 39°C, con tiritonas, escalofríos, sudoración profusa, poliartralgias en rodilla derecha y pie izquierdo junto con malestar generalizado. El suero del paciente fue negativo para HC,

RB y SAT, y positivo para Coombs (1/320) y PCRtrQ (190 copias/ml (+1/3)-ABI Prism 7000 SDS y 256 copias/ml (+3/3)-LightCycler). Este suero se envió al Dr. Ramón Díaz, del Servicio de Microbiología de la Clínica Universitaria de Navarra, para realizar algunas pruebas serológicas más específicas: RB, SAT y Coombs IgG e IgA a pH 7,2 y pH 5,0, DTT, doble difusión en gel (DDG), CIEF e inmunocromatografía. Los resultados de dichos análisis se muestran en la tabla 21 y los de la CIEF se muestran en la figura 57.

Tabla 21. Resultados de las pruebas serológicas con el suero 137 del paciente nº 17.

Suero	SAT	Coombs IgG	Coombs IgA	RB	DDG	CIEF	Inmunocromatografía
				4+	Neg	1/8	1+
pH 7.2	<20	1280	80				
pH 5.0	80	≥2560	80				
DTT	<20	1280	80				

RB: rosa de Bengala; **DDG:** doble difusión en gel; **CIEF:** contraimmunoelectroforesis.

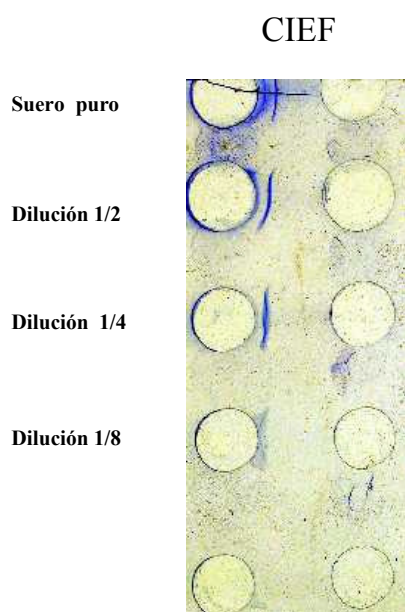


Figura 57. Fotografía de la contraimmunoelectroforesis, donde se observan bandas de precipitación hasta la dilución 1/8.

F. DISCUSIÓN

La PCR en tiempo real es un método emergente para la detección e identificación de una gran variedad de agentes infecciosos en el laboratorio clínico (Espy y cols., 2006). La PCRtr fue desarrollada para mejorar la sensibilidad, especificidad, y velocidad de detección de los productos de PCR (Tenover y cols., 2007). Además, no requiere la manipulación post-amplificación de los productos de PCR por lo que se reduce el riesgo de contaminación y los falsos positivos (Vrioni y cols., 2008). Por otra parte, la PCRtr es una poderosa herramienta para la cuantificación de la carga vírica o bacteriana; concepto importante en numerosas enfermedades infecciosas como, por ejemplo, la hepatitis y la infección por VIH (Vrioni y cols., 2008).

Actualmente, son numerosos los estudios realizados para la detección de ADN de *Brucella* mediante PCRtr. En ellos se describen diferentes genes diana, parejas de cebadores, sondas, métodos de PCR y procedimientos de extracción de ADN. Estos ensayos de PCRtr han sido aplicados en la detección del género, en la tipificación de las distintas especies de *Brucella* (Redkar y cols., 2001; Newby y cols., 2003; Probert y cols., 2004; Bogdanovich y cols., 2004; Al-Dahouk y cols., 2007; Foster y cols., 2008; Scholz y cols., 2008a; Fretin y cols., 2008; Gopaul y cols., 2008; Hinic y cols., 2008) y en el diagnóstico animal (O'Leary y cols., 2006; Marianelli y cols., 2008) y humano de la brucelosis (Queipo-Ortuño y cols., 2005a; Al-Dahouk y cols., 2005; Colmenero y cols., 2005; Queipo-Ortuño y cols., 2005b; Debeaumont y cols., 2005; Queipo-Ortuño y cols., 2006; Navarro y cols., 2006; Kattar y cols., 2007; Theegarten y cols., 2008; Queipo-Ortuño y cols., 2008a; Navarro-Martínez A y cols., 2008; Vrioni y cols., 2008; Queipo-Ortuño y cols., 2008b).

En nuestro estudio hemos puesto a punto un ensayo para detectar y cuantificar ADN de *B. melitensis* en sangre de pacientes con brucelosis mediante PCRtrQ (Navarro y cols., 2006).

1. Cebadores y sonda TaqMan

La brucelosis es endémica en Castilla La-Mancha y está producida mayoritariamente por infección de *B. melitensis*. Por lo tanto, nuestro objetivo fue detectar y cuantificar esta especie de *Brucella* en sangre de pacientes con brucelosis.

En 2001, Redkar y cols. (Redkar y cols., 2001) describen por primera vez un ensayo de PCRtr (LightCycler LC-24) en el cual detectan ADN de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* de cultivo puro. Estos autores amplifican una región específica de *B. melitensis* descrita por Bricker y Halling en 1994 (Bricker y Halling, 1994). Redkar y cols. amplifican un fragmento de 252 pb de *B. melitensis*, donde el cebador avanzado deriva del extremo 3' del elemento de inserción IS711 (nº de acceso GenBank M94960) común a *Brucella* spp. y el cebador inverso de un fragmento específico de *B. melitensis*. Para la detección de dicho fragmento utilizaron sondas de hibridación o sondas FRET. El cebador inverso y las sondas FRET hibridan en el fragmento específico de *B. melitensis*.

Lo más sencillo hubiera sido utilizar los cebadores y las sondas descritas por Redkar, pero el termociclador que íbamos a utilizar no detectaba este tipo de sondas. Por lo tanto, nos vimos obligados a rediseñar los cebadores y la sonda de hidrólisis, también llamada TaqMan, teniendo en cuenta la región descrita por Redkar y cols. como específica para *B. melitensis* (gen BMEI1162; nº de acceso GenBank AE009555). Otros autores, también han rediseñado sus cebadores y sondas teniendo en cuenta esta región descrita por Redkar y cols. para detectar *B. abortus* y *B. melitensis* con el fin de adaptarlos a un formato de PCR-Múltiple con sondas TaqMan (Probert y cols., 2004).

Se han descrito otros genes, como diana de cebadores y sondas, para la detección de *Brucella* a nivel de género y de especie. Por ejemplo, ensayos de PCRtr (i) género-específicos: gen *bscp31*, este gen codifica una proteína de 31 kD inmunogenética específica del género *Brucella* (Queipo-Ortuño y cols., 2005a; Al-Dahouk y cols., 2005; Debeaumont y cols., 2005; Vrioni y cols., 2008), 16S-23S ITS (Kattar y cols., 2007) y (ii) especie-específicos: gen BMEI1162 (Probert y cols., 2004; Navarro y cols., 2006), gen M94960/IS711 (Redkar y cols., 2001), gen *alkB*/IS711 (Newby y cols., 2003).

2. Extracción de ADN de muestras clínicas

La muestra clínica óptima para la PCRtr está todavía por determinar (Kattar y cols., 2007), debido a que el aislamiento de *Brucella* spp. a partir de muestras clínicas es algunas veces difícil y complicado (Queipo-Ortuño y cols., 2008a). *Brucella* es un

género intracelular facultativo, por lo tanto, los niveles que se encuentran en pacientes con brucelosis normalmente son muy bajos (Gamazo y cols., 1993). Debido a que *Brucella* spp. sobrevive y se multiplica dentro de las células del sistema fagocítico mononuclear, la sangre entera y especialmente los leucocitos, se utilizan como muestra para la extracción de ADN (Matar y cols., 1996; Queipo-Ortuño y cols., 1997; Romero y cols., 1995). Aunque podemos encontrar el mayor número de bacterias con respecto a otras muestras, existe una mayor probabilidad de presencia de inhibidores de PCR (Queipo-Ortuño y cols., 1999; Al-Soud y Rådström, 2001). Por otro lado, diversos estudios describen la presencia de ácidos nucleicos de patógenos en muestras de suero que probablemente son liberados a la circulación como productos de descomposición durante la bacteriemia (Zerva y cols., 2001, Bougnoux y cols., 1999; Brown y cols., 1995; Kawamura y cols., 1999; Murdoch y cols., 1996), aunque la cantidad de ADN circulando en suero sea presumiblemente menor y a pesar de la existencia de potentes inhibidores como la Ig G (Queipo-Ortuño y cols., 2008b; Al-Soud y cols., 2000). Escogimos la sangre como muestra idónea para nuestro estudio, ya que existen en el mercado diferentes kits de extracción, que obtienen ADN con gran pureza, buena concentración y libres de inhibidores.

La carga bacteriana presente en el ADN extraído, mediante el “QIAamp[®] DNA Blood **Midi** kit” de Qiagen, fue cuantificada en el Ttr-ABI Prism[®] (Figura 36). Los resultados obtenidos no fueron los esperados, ya que la sensibilidad de la PCRtrQ fue menor que la del hemocultivo, 43.3% y 86.7%, respectivamente. Ante esta situación optamos por utilizar el Ttr-LightCycler[®] en lugar del Ttr-ABI Prism[®] con el kit de extracción de Qiagen (Figura 36). Los resultados fueron desalentadores debido a que las muestras de sangre analizadas fueron negativas. Una posible explicación a estos falsos negativos es que al partir de 1 ml de sangre puedan quedar restos de inhibidores en el ADN extraído como los componentes del grupo hemo procedentes de los eritrocitos (Queipo-Ortuño y cols., 1999; Al-Soud y Rådström, 2001) y la lactoferrina procedente de los leucocitos (Al-Soud y Rådström, 2001). Aunque se han publicado estudios que han utilizado el “QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit” que parte de 200 µl de muestra (Debeaumont y cols., 2005; Kattar y cols., 2007; Vrioni y cols., 2008), no se ha publicado ningún estudio que haya utilizado “QIAamp[®] DNA Blood **Midi** Kit”, que parte de 1000 µl de muestra. Por lo tanto, decidimos cambiar el kit de extracción de ADN ya que nuestro método de PCRtrQ optimizado en el Ttr-LightCycler[®] era capaz de detectar ADN de *B. melitensis* de cultivo puro. Escogimos el

UltraClean™ DNA BloodSpin™ Kit de MoBio Laboratorios por su rapidez, sencillez y bajo coste (Figura 36).

Recientemente, se ha publicado un estudio donde se comparan siete kits comerciales de extracción de ADN para recuperar el ADN de *Brucella* spp. añadido a muestras de suero humano, este ADN es detectado y cuantificado mediante PCRtr género-específica (Queipo-Ortuño y cols., 2008a). Entre los kits estudiados aparecen el “UltraClean™ DNA BloodSpin™ Kit” y el “QIAamp® DNA Blood **Mini** Kit”. Aunque, estos kits demuestran tener una sensibilidad similar, el ADN extraído con “UltraClean™ DNA BloodSpin™ Kit” tiene mayor pureza, no muestra contaminación en los controles negativos de extracción, tiene menor coste por muestra, menor tiempo de extracción y es el que menor coeficiente de variación muestra en cuanto a la reproducibilidad inter-ensayo al aislar ADN de *Brucella* añadido al suero humano.

3. Condiciones de la PCR en tiempo real para la amplificación del ADN de *B. melitensis*

La eficiencia de la técnica de PCR está influenciada por una serie de parámetros que deben ser determinados empíricamente, con el fin de mejorar la reproducibilidad de la amplificación del ADN. Aunque los cebadores y las sondas son los principales determinantes de la especificidad de un ensayo de PCRtr, otros factores pueden verse involucrados como son: (i) la temperatura de hibridación; (ii) el tiempo de incubación de la polimerasa en los pasos de hibridación y extensión; y (iii) la concentración de cebadores, sondas y cloruro magnésico (Weiss, 1995). Por lo tanto, la tecnología de la PCRtr mejora la especificidad del ensayo debido a que la instrumentación reduce el tiempo de incubación de hibridación y extensión, y utiliza sondas que proporcionan un nivel adicional de especificidad a la reacción (Navarro y cols., 2004).

La comparación de la metodología optimizada en el presente estudio con la publicada por otros autores (Redkar y cols., 2001; Newby y cols., 2003; Probert y cols., 2004; Bogdanovich y cols., 2004; Queipo-Ortuño y cols., 2005b; Debeaumont y cols., 2005; Kattar y cols., 2007; Al-Dahoud y cols., 2007; Vrioni y cols., 2008) es bastante difícil, debido a la gran variedad descrita en: (i) las concentraciones de los cebadores y sondas, las (ii) temperaturas de hibridación de los cebadores y (iii) el

tiempo de incubación de la polimerasa en los pasos de hibridación y extensión. Sin embargo, el número de ciclos de la PCR es más homogéneo. Nosotros hemos optimizado 60 ciclos para el termociclador ABI Prism, este número de ciclos es similar al descrito por Newby y cols. y Vrioni y cols. (Newby y cols., 2003; Vrioni y cols., 2008). Por otro lado, el número de ciclos optimizado en el termociclador LightCycler ha sido de 45 ciclos que coinciden con la mayoría de los autores (Redkar y cols., 2001; Probert y cols., 2004; Bogdanovich y cols., 2004; Queipo-Ortuño y cols., 2005b; Debeaumont y cols., 2005; Kattar y cols., 2007; Al-Dahoud y cols., 2007).

Otro parámetro muy importante que optimizamos fue la concentración de $MgCl_2$. A pesar de que el kit utilizado (LightCycler® FastStart ADN MAster^{PLUS} Hybridization Probes) recomienda no añadir $MgCl_2$, en los ensayos realizados se ve como el aumento de la concentración de $MgCl_2$ mejora las condiciones de amplificación. Los ensayos de PCRtr diseñados con sondas FRET, utilizan un rango de concentración de 1,5-3mM $MgCl_2$ (Redkar y cols., 2001; Kattar y cols., 2007; Al-Dahoud y cols., 2007; Vrioni y cols., 2008), los diseñados con sondas TaqMan un rango de 5-6mM $MgCl_2$ (Newby y cols., 2003; Probert y cols., 2004; Bogdanovich y cols., 2004), nuestra concentración fue de 6mM, y los que utilizan SYBR-Green, 4-5mM $MgCl_2$ (Newby y cols., 2003; Queipo-Ortuño y cols., 2005b). Por lo tanto, parece que la actividad de la enzima, en presencia de una sonda tipo TaqMan, requiere una mayor concentración de $MgCl_2$.

La optimización de nuestra PCRtr incidiendo en: (i) el tiempo de hibridación; (ii) la concentración de $MgCl_2$, cebadores y sonda; (iii) así como en el número de ciclos del proceso, permitió obtener amplificadores específicos, correspondientes a *B. melitensis*.

4. Sensibilidad analítica y especificidad de la PCR en tiempo real

La sensibilidad y la especificidad son los dos criterios más importantes para que una prueba diagnóstica sea útil. La sensibilidad analítica de un ensayo debería ser determinada usando organismos enteros, ADN diana clonado (Navarro y cols., 2004) o ADN del microorganismo (Weiss, 1995). Además de una selección apropiada del método de PCR, la sensibilidad analítica depende de varios factores: (i) del proceso de extracción del ADN; (ii) de los posibles inhibidores presentes en las muestras; (iii) del

proceso de detección (Schmidt, 1997); y (iv) de la interferencia del ADN del hospedador en la detección del ADN del microorganismo.

La sensibilidad analítica, de este estudio, se ha determinado con el fragmento de 251pb de *B. melitensis* clonado en el vector pGEM-T[®] Easy. La PCRtr detectó 250fg y 15fg de ADN de *B. melitensis*, equivalentes a 16-25copias y 1 copia, en el termociclador ABI Prism[®] 7000 SDS y LightCycler[®], respectivamente. Por lo tanto, el LightCycler[®] mostró una mayor sensibilidad analítica que el termociclador ABI Prism[®] 7000 SDS. Los niveles detectados en el ABI Prism[®], son similares a los detectados por Redkar y cols., 2001; Probert y cols., 2004 y Bogdanovich y cols., 2004. Mientras que los niveles detectados en el LightCycler[®], son similares a los descritos por Queipo-Ortuño y cols., 2005; Debeaumont y cols., 2005; Kattar y cols., 2007; Al-Dahoud y cols., 2007 y Vrioni y cols., 2008. Debemos destacar que los ensayos de PCRtr que detectan ADN de cultivo puro (Redkar y cols., 2001; Probert y cols., 2004; Bogdanovich y cols., 2004) son menos sensibles que los que detectan ADN en muestras clínicas (Queipo-Ortuño y cols., 2005b; Debeaumont y cols., 2005; Kattar y cols., 2007 y Vrioni y cols., 2008).

La inhibición de la reacción de PCR en muestras clínicas ocurre muy frecuentemente, lo cual demanda el uso de un control positivo interno (IPC, de la terminología inglesa "*internal positive control*") (Al-Dahouk y cols., 2007). A pesar de ello, sólo un estudio con muestras clínicas ha incluido un IPC en la reacción para detectar la presencia de inhibidores en dichas muestras (Vrioni y cols., 2008). Desgraciadamente dichos autores no han publicado la secuencia de los cebadores ni de la sonda del IPC y tampoco hacen referencia a si han tenido algún caso de inhibición en la reacción de PCRtr en el análisis de las muestras clínicas. Otros autores, incluyen en el ensayo de PCRtr un IPC amplificando ADN de *Campylobacter* (Lübeck y cols., 2003; Bogdanovich y cols., 2004) o del bacteriofago λ (Tomaso y cols., 2003; Al-Dahouk y cols., 2007) sobre cultivo puro de *Brucella*, detectando un fragmento de 116pb y 278pb mediante una sonda de hidrólisis y sondas de hibridación, respectivamente. Nosotros también hemos utilizado un IPC en el termociclador ABI Prism[®], el cual no interfería la amplificación de las distintas cepas de *B. melitensis* del estudio de especificidad y del estándar, pero cuando se analizaron muestras clínicas, este IPC, interfería en la detección del ADN de *B. melitensis* presente en la muestra. Dado que la misma muestra era positiva sin IPC y cuando se añadía a la mezcla de reacción era negativa. Esto puede deberse a que las pequeñas cantidades de ADN de *Brucella* presentes en la mezcla de reacción de la PCRtr

pueden desafiar incluso a los ensayos más sensibles puesto que los dNTPs, el $MgCl_2$ y la enzima pueden dirigirse a la amplificación del IPC, a pesar de la previa optimización de los distintos componentes de la mezcla de reacción. En el termociclador LightCycler® no utilizamos IPC.

La interferencia del ADN del hospedador en la detección, mediante PCR estándar, del ADN del microorganismo se ha descrito para *Borrelia burgdorferi* (Cogswell y cols., 1996) y *Brucella* (Morata y cols., 1998; Navarro y cols., 2002). Cogswell y cols., demuestran que más de 500ng del ADN del hospedador inhiben la PCR para *Borrelia burgdorferi*. Morata y cols. proponen utilizar entre 1 y 2µg de ADN, y Navarro y cols. recomiendan añadir 200ng de ADN humano para que no se inhiba la amplificación del ADN de *Brucella* de la muestra. Una posible explicación a este fenómeno observado es que el ADN del hospedador es capaz de inhibir de forma competitiva la unión del cebador al ADN diana cuando el ADN del hospedador está presente a altas concentraciones. Esta inhibición puede ocurrir como una simple consecuencia del descenso en la velocidad de difusión de todos los componentes macromoleculares de la mezcla de reacción, en presencia de grandes cantidades de ADN del hospedador (Cogswell y cols., 1996). Por otro lado, una secuencia de ADN de 25 ó 30pb, longitud que tienen la mayoría de los cebadores, es probable que tenga más del 50% de identidad con algunas de las muchas secuencias de ADN de primate (humano o mono) disponibles en las bases de datos. Estos niveles de identidad son obviamente insuficientes para generar un falso amplificado. Pero la unión de estos cebadores en distintas regiones del ADN del hospedador puede producir una “distracción” temporal de los cebadores por el ADN diana, así como, una bajada significativa de la velocidad de reacción de la PCR (Cogswell y cols., 1996). Los estudios publicados para detectar ADN de *Brucella*, mediante PCRtr, en muestras de sangre no han contemplado la posible interferencia del ADN humano en la detección de ADN de *Brucella*, añadiendo un volumen fijo de ADN en la mezcla de reacción de la PCRtr (Kattar y cols., 2007; Vrioni y cols., 2008). Nuestros resultados han variado dependiendo del termociclador utilizado, así hemos determinado que la cantidad óptima de ADN genómico humano es de 200ng y 400ng para el termociclador ABI Prism® y LightCycler® (Navarro y cols., 2006), respectivamente.

La especificidad de una técnica diagnóstica es su capacidad de no producir falsos positivos. Por lo tanto, la especificidad de un ensayo determina si puede detectar e identificar todas las especies y cepas aisladas de distintas localizaciones geográficas, así como excluir todos los organismos relacionados, tanto desde el punto

genético como serológico. La reacción cruzada de los cebadores y la sonda/s seleccionados pueden ser confirmados mediante búsquedas en bases de datos para secuencias, sin embargo, las bacterias estrechamente relacionadas deben ser testadas experimentalmente (Schmidt, 1997; Navarro y cols., 2004). El análisis de las secuencias del ARN ribosomal 16S, ha permitido ubicar a *Brucella* en el grupo α , subgrupo 2 de las Proteobacterias. Este subgrupo incluye géneros patógenos de plantas y animales (*Agrobacterium*, *Bartonella*, *Brucella*), bacterias endosimbiontes de plantas (*Phyllobacterium*) y bacterias del medio ambiente asociadas a infecciones oportunistas en el hombre como *Ochrobactrum* spp. ([www.microbiología.org. mx/microbiosenlinea/CAPITULO-10/Capitulo10.pdf](http://www.microbiología.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO-10/Capitulo10.pdf)). La especificidad de nuestro ensayo, en ambos termocicladores, fue del 100% pues no hubo amplificación de 5 bacterias Gram-negativas que muestran reacción cruzada serológica con *Brucella* spp. y de 8 cepas relacionadas filogenéticamente con *Brucella* spp., incluidos *Ochrobactrum anthropi* y *O. intermedium*, tabla 13. Esta especificidad concuerda con la descrita por otros autores que describen ensayos de PCRtr para detectar (Kattar y cols., 2007) y cuantificar (Debeaumont y cols., 2005) *Brucella* spp. en pacientes con brucelosis. Otros autores (Queipo-Ortuño y cols., 2005a; Colmenero y cols., 2005; Queipo-Ortuño y cols., 2005b; Queipo-Ortuño y cols., 2006; Queipo-Ortuño y cols., 2008b; Vrioni y cols., 2008) han descrito ensayos aplicados al diagnóstico humano con un buen grado de especificidad, pues a excepción de *Ochrobactrum* spp., no han detectado amplificación en un amplio panel de microorganismos relacionados serológicamente o filogeneticamente con *Brucella* spp..

Un método diagnóstico aun siendo sensible y específico podría ver limitado su uso clínico si técnicamente fuera difícil de realizar o si consumiera excesivo tiempo (Queipo-Ortuño, 1998). El kit de extracción de ADN que hemos utilizado (UltraClean™ DNA BloodSpin™ Kit) ha sido evaluado por Queipo-Ortuño y cols. (Queipo-Ortuño y cols., 2008a). Estos autores han comparado 7 kits de extracción de ADN y concluyen que el ADN extraído con nuestro kit mostró gran pureza y que es el más rápido, barato y fácil de realizar, además, al aislar el ADN de *Brucella* spp. mostró gran sensibilidad y reproducibilidad. En cuanto a la técnica de PCRtr que hemos desarrollado es sensible, específica y rápida, pues no necesita un análisis post-PCR, por lo tanto pensamos puede ser un buen método diagnóstico en pacientes con brucelosis.

5. Curva estándar, eficiencia y reproducibilidad

La concentración de ADN de un agente patógeno presente en una muestra clínica puede ser estimada a partir de una curva estándar, donde, se representa el logaritmo decimal de las concentraciones de los estándares *versus* el Ct de cada una de ellas (Heid y cols., 1996; Weiss, 1995; Bubner y Baldwin, 2004). Por último, el número inicial de copias se calcula interpolando en la curva estándar el valor del Ct de cada muestra (Boeckh y Boivin, 1998).

La curva estándar se representa por la ecuación de regresión lineal y el coeficiente de correlación (r). Además, la pendiente de la ecuación determinará el factor de amplificación ($A=10^{(-1/pendiente)}$) y la eficiencia de la reacción de amplificación ($E=[10^{(-1/pendiente)}]-1$). Así, en un ensayo de PCR con una eficiencia de 1 ($E=1$) la cantidad de producto debe duplicarse en cada ciclo ($A=2$) (Bubner y Baldwin, 2004; Raeymaekers, 2000). Los valores de la eficiencia y del factor de amplificación oscilaran entre 0-1 y 1-2, respectivamente. Por lo tanto, el factor de amplificación ideal para determinar la eficiencia de la PCR es de 2 por ciclo de PCR.

La ecuación de regresión lineal y el coeficiente de correlación de nuestro ensayo en el termociclador LightCycler® son similares a los publicados por Newby y Kattar (Newby y cols., 2003; Kattar y cols., 2007) ya que el factor de amplificación de la eficiencia de la PCR es 2. Newby y cols., comparan tres ensayos de PCRtr (SYBR Green I, sondas TaqMan y sondas FRET) para detectar ADN de *B. abortus* en cultivos, donde el más eficiente fue el diseñado con sondas TaqMan. Kattar y cols. detectan *Brucella* spp. en muestras de sangre humana y en tejidos incluidos en parafina mediante sondas FRET. El factor de amplificación de la eficiencia del ensayo en el Ttr-ABI Prism®, fue menor que en el LightCycler®. No se han podido comparar nuestros resultados con el resto de los estudios publicados, pues no existe un consenso en la comunidad científica en cuanto a los datos que se deben publicar de la curva estándar. Así, encontramos estudios de detección y/o cuantificación de *Brucella* que publican: (i) la ecuación de regresión lineal, el coeficiente de correlación y la eficiencia de la reacción (Newby y cols., 2003; Debeaumont y cols., 2005; Navarro y cols., 2006; Kattar y cols., 2007); (ii) la pendiente de la ecuación de regresión lineal y el coeficiente de correlación (Queipo-Ortuño y cols., 2005b); y otros (iii) presentan la equivalencia de la cantidad de copias en Ct ya sea de la curva estándar (Vrioni y cols., 2008) o de las muestras de los pacientes (Queipo-Ortuño y cols., 2005b; Kattar y cols., 2007). Ante esta diversidad en la exposición de los resultados el lector no puede

comparar los resultados de distintas publicaciones. Por lo tanto, habría que unificar el criterio para comunicar los resultados de cara a una cuantificación de la carga de un agente patógeno. Por ejemplo, se debería dar la correlación entre el número de copias y el C_t (media \pm DS) de cada dilución del estándar, así como la ecuación de regresión lineal, el coeficiente de correlación y el factor de amplificación o la eficiencia de la reacción de PCR.

Para valorar la reproducibilidad intra- e inter-ensayo de un ensayo de PCRtr, cada estándar debe testarse varias veces con el fin de observar posibles variaciones en el C_t causadas bien por las limitaciones físicas del equipo o por pequeños cambios en las condiciones de la reacción que pueden afectar a la sensibilidad de la PCR (Bubner y Baldwin, 2004). Nuestra PCR, en el Ttr-LightCycler[®], muestra una buena reproducibilidad intra- e inter-ensayo para las tres réplicas de cada dilución del estándar analizadas, como se ha expuesto en la tabla 14 del apartado 7 de resultados. Estos resultados concuerdan con los descritos por Queipo-Ortuño y cols. (Queipo-Ortuño y cols., 2008a) en un estudio donde comparan siete kits de extracción de ADN comerciales y donde concluyen que el “UltraClean[™] DNA BloodSpin[™] Kit”, utilizado por nosotros en el termociclador LightCycler[®], presenta una gran reproducibilidad inter-ensayo al aislar ADN de *Brucella* añadido al suero humano. En otro estudio publicado por Debeaumont y cols. (Debeaumont y cols., 2005) en el cual detectan y cuantifican *Brucella* spp. en suero de pacientes con brucelosis, describen una alta reproducibilidad de los estándares. Los diversos estudios publicados para detectar y/o cuantificar *Brucella*, a nivel de género o especie, en cultivo puro o en muestras humanas no presentan datos sobre la reproducibilidad de la curva estándar (Redkar y cols., 2001; Newby y cols., 2003; Probert y cols., 2004; Bogdanovich y cols., 2004; Al-Dahouk y cols., 2007; Kattar y cols., 2007; Vrioni y cols., 2008).

Aunque no parece existir diferencia entre los coeficientes de variación de los estándares con un alto y bajo número de copias, lo que sí parece que disminuye es el número de réplicas detectadas, en el termociclador LightCycler[®]. Así, en nuestro ensayo de la PCRtr se amplifican y se detectan las nueve réplicas que se han ensayado de los estándares desde 10^5 copias hasta 10 copias, pero cuando ponemos una copia del estándar se detectan seis de nueve réplicas. Queipo-Ortuño y cols. (Queipo-Ortuño y cols., 2008a) logran resultados similares al amplificar y detectar cuatro réplicas del ADN diana, desde 10^6 fg hasta 10^3 fg, tres para 10^2 fg y dos para 10fg, de las cuatro réplicas que utilizan para cada dilución. Esto parece indicar que aunque la PCR es capaz de amplificar pequeñas cantidades de ADN diana en la

práctica no siempre es así. Quizás sea un problema debido al azar, o bien porque los componentes macromoleculares de la mezcla de reacción no encuentran al ADN diana en la muestra o porque al pipetear no se coja del stock el número de copias (por ejemplo: 1 copia) que se debe amplificar y detectar después de analizar los datos de nuestra PCRtr.

Una ventaja en la metodología del termociclador LightCycler® con respecto al ABI Prism® 7000 SDS es que en cada ensayo de PCR no es necesario crear una curva estándar. Por lo tanto, en cada ensayo se introduce un punto del estándar y posteriormente se importa la curva estándar, construida en un ensayo previo, para cuantificar las distintas muestras analizadas.

Ante tal diversidad de publicaciones, la comunidad científica debería centrarse en validar un ensayo de PCR y un estándar universal de ADN de *Brucella*, así como verificar la reproducibilidad inter-laboratorio, como ya se ha hecho para otros patógenos. Con estos ensayos de PCRtr, específicos de género o de especie, los laboratorios clínicos podrían cuantificar la carga bacteriana presente en cualquier tipo de muestra, con el fin de poder comparar los resultados de diferentes estudios en el diagnóstico de infecciones por *Brucella* spp..

6. Grupo control

La especificidad del ensayo de PCRtrQ, en los termocicladores ABI-Prism® y LightCycler®, ha sido de 96.7% (1/30) y 97.8% (1/45), respectivamente. El grupo control utilizado para determinar la especificidad, en cada termociclador, ha sido diferente. En el ABI-Prism® se han utilizado 30 muestras de sangre de individuos sanos procedentes del banco de sangre, y en el LightCycler® se han utilizado 45 muestras procedentes de 30 individuos sanos sin antecedentes de brucelosis o exposición a *Brucella* spp. y de 15 pacientes con síndromes febriles, que inicialmente plantearon un diagnóstico diferencial con la brucelosis. El falso positivo obtenido, en el ABI-Prism®, fue la muestra de un control sano y en el LightCycler® la de un paciente con síndrome febril de otra etiología, *Streptococcus pneumoniae*.

Uno de los principales problemas asociados con el diagnóstico molecular de algunas enfermedades infecciosas es la interpretación de ciertos resultados (Queipo-Ortuño y cols., 2005 a). Los dos falsos positivos obtenidos en los ensayos pueden ser

debidos a una contaminación o a la amplificación del ADN de *Brucella melitensis* que podría estar presente en estas muestras. Dado que la infección asintomática con *Brucella* spp. no es rara (Coghlan y Longmore, 1973; Poole, 1975), en una región endémica como Castilla La-Mancha, y que estos dos pacientes aunque asintomáticos, han vivido en el medio rural, hacen que una infección asintomática sea más probable que un resultado falso positivo. La alta sensibilidad de la PCR permite la amplificación de los restos de ADN circulantes en sujetos asintomáticos (Kami y cols., 2001).

La especificidad de los dos ensayos de PCRtrQ, ABI-Prism® y LightCycler®, descritos en este trabajo, es similar a la descrita por otros autores (Queipo-Ortuño y cols., 2005 a; Queipo-Ortuño y cols., 2005 b; Kattar y cols., 2007), aunque menor que la publicada por Debeaumont, Navarro y Vrioni que describen una especificidad del 100% (Debeaumont y cols., 2005, Navarro y cols., 2006; Vrioni y cols., 2008). Los grupos controles utilizados en cada ensayo son muy heterogéneos. Así, Queipo-Ortuño y cols. publican una especificidad del 94.6% y 95.4% en distintos estudios donde el grupo control está formado por 37 y 65 sujetos, respectivamente, divididos en varios grupos: pacientes con síndrome febril de otra etiología que inicialmente plantearon un diagnóstico diferencial con la brucelosis; pacientes asintomáticos con historia previa de brucelosis tratada; sujetos asintomáticos expuestos a infección por *Brucella* y sujetos sanos (Queipo-Ortuño y cols., 2005 a; Queipo-Ortuño y cols., 2005 b). Kattar y cols. describen una especificidad del 99.7% y estudian un grupo control muy amplio (299 muestras) en el que incluyen infecciones bacterianas, víricas, parasitarias y fúngicas, además de enfermedades reumatológicas, autoinmunes y tumorales (Kattar y cols., 2007). Debeaumont y cols. incluyen sueros de 30 donantes sanos y 30 de pacientes con infecciones víricas y bacterianas (Debeaumont y cols., 2005), y por último, Navarro y Vrioni incluyen 30 y 50 sangres de donantes sanos, respectivamente (Navarro y cols., 2006; Vrioni y cols., 2008). Podemos observar que la especificidad del ensayo disminuye si se incluyen en el grupo control, sujetos asintomáticos expuestos a infección por *Brucella* y pacientes asintomáticos con historia previa de brucelosis tratada. Puesto que la infección asintomática con *Brucella* spp. no es rara (Coghlan y Longmore, 1973; Poole, 1975) y que en pacientes que han sido tratados, *Brucella* spp., puede permanecer en el interior de los macrófagos o neutrófilos (Pizarro-Cerdá y cols., 1998), y ser detectado y cuantificado por PCRtr.

7. Cuantificación del número de copias de ADN de *B. melitensis* en sangre mediante PCRtrQ

Actualmente, se utiliza tanto el suero como la sangre en el diagnóstico de la brucelosis mediante PCRtr. Recientemente, Queipo-Ortuño y Debeaumont (Queipo-Ortuño y cols., 2005b; Debeaumont y cols., 2005) han utilizado muestras de suero para detectar ADN de *Brucella* spp. mediante PCRtr con una sensibilidad del 93.9% y 64.7%, respectivamente. Aunque los cebadores de ambos estudios amplifican fragmentos de distinta longitud, utilizan el mismo gen diana, *bscp31* (proteína de membrana externa específica del género *Brucella*). Por lo tanto, la discordancia en la sensibilidad de estos dos estudios puede estar relacionada con los diferentes métodos de extracción de ADN, y/o con menor probabilidad, con los distintos formatos de detección de PCRtr, SYBR Green I y sondas de hibridación, utilizados en cada ensayo (Newby y cols., 2003). Otros estudios han utilizado la sangre como muestra (Kattar y cols., 2007; Vrioni y cols., 2008), con una sensibilidad clínica del 66.7% y 100%, respectivamente. Dado que el método de extracción de ADN (QIAamp, Mini) y el formato de detección de la PCRtr (sondas de hibridación_FRET) fue el mismo, esta diferencia en la sensibilidad, quizás pueda deberse al gen diana utilizado para la detección de *Brucella* spp., 16S-23S ITS (“*internal transcribed spacer region*”) y *bscp31*, respectivamente. La sensibilidad de nuestro ensayo (100%) concuerda con la descrita por Vrioni y cols. en sangre (Vrioni y cols., 2008) y es mayor que la obtenida por Queipo-Ortuño y Debeaumont en suero (Queipo-Ortuño y cols., 2005b; Debeaumont y cols., 2005) y Kattar en sangre (Kattar y cols., 2007).

Es aconsejable testar en paralelo varias réplicas del ADN purificado a partir de una muestra clínica para incrementar la probabilidad de un resultado positivo (Al-Dahouk y cols., 2007). De los estudios publicados que detectan ADN de *Brucella* spp. en muestras clínicas mediante PCRtr (Queipo-Ortuño y cols., 2005b; Debeaumont y cols., 2005, Kattar y cols., 2007; Vrioni y cols., 2008) sólo un estudio ha testado por duplicado las muestras clínicas, aunque no hacen referencia a cuando consideran un resultado positivo o negativo (Queipo-Ortuño y cols., 2005b). En nuestro estudio, todas las muestras se analizaron por triplicado y consideramos un resultado positivo de PCRtr cuando al menos una de las réplicas es positiva. Esta decisión puede llamar la atención, pero cuando obtenemos tres hemocultivos de un paciente y sólo uno es positivo para *Brucella* spp., le ponemos tratamiento y quedamos satisfechos porque hemos tenido una confirmación microbiológica. En un futuro, podremos actuar de la misma forma cuando nos confirmen un resultado positivo por PCRtr, como sucedió

con uno de nuestros pacientes. En el momento del diagnóstico, este paciente (nº17) tuvo RB y SAT negativos, un Coombs de 1/320, PCRtr positiva y hemocultivos pendientes. Se le pautó tratamiento con antibiótico con mejoría de los síntomas y los hemocultivos fueron finalmente negativos. Enviamos el suero de este paciente al Dr. Ramón Díaz, del Servicio de Microbiología de la Clínica Universitaria de Navarra, para que realizara pruebas serológicas más específicas, los resultados fueron positivos para el RB, Coombs, CIEF e inmunocromatografía. Este paciente, pastor de profesión, no refería antecedentes de brucelosis ni ingesta de productos lácteos sin higienizar, pero sí abortos en ganado ovino y caprino. Por lo tanto, podemos pensar que estos resultados son debidos a la continua exposición con el ganado a lo largo de los años.

En el presente estudio hemos detectado y cuantificado, por primera vez, ADN de *Brucella melitensis* en sangre de pacientes con brucelosis en el momento del diagnóstico, en el tratamiento y en la recidiva mediante PCRtr (Navarro y cols., 2006). Actualmente, dos grupos han confirmado estos resultados: (i) uno detecta ADN de *Brucella* spp. por PCR estándar en suero (Maas y cols., 2007) y (ii) otro detecta y cuantifica ADN de *Brucella* spp. por PCRtr en sangre (Vrioni y cols., 2008). Aunque se han publicado otros estudios que utilizan la PCRtr para la detección de ADN de *Brucella* spp., estos no estudian la evolución de la carga microbiológica en distintos estados de la enfermedad (Debeaumont y cols., 2005; Kattar y cols., 2007). No podemos comparar la carga de ADN de *Brucella*, de nuestro estudio, con los obtenidos por Vrioni y cols. (Vrioni y cols., 2008) en distintas fases de la enfermedad, debido a que los niveles de ADN se expresan en distintas unidades, copias/ml de sangre y copias/5µl ADN extraído, respectivamente.

Una de las principales características de brucelosis humana es su marcada tendencia a la recidiva después de la conclusión del tratamiento (Young, 1995; Ariza y cols., 1995) y su difícil diagnóstico por métodos convencionales (Queipo-Ortuño y cols., 1997). Este problema está relacionado con la habilidad de *Brucella* spp. a evadir algunos de los mecanismos básicos del sistema inmune del hospedador (Morata y cols., 1999), de manera que *Brucella* se localiza en los leucocitos polimorfonucleares y en el sistema reticuloendotelial después de sobrevivir a los mecanismos intracelulares por fagocitosis (Young, 1995; Solera y cols., 1997). Diversos estudios han detectado ADN de *Brucella* spp. en la recidiva, tanto por PCR estándar (Morata y cols., 1999; Nimri y cols., 2003; Maas y cols., 2007), como por PCRtr (Vrioni y cols., 2008). Nuestros resultados coinciden con este último estudio, que observa que no hay un aumento o descenso significativo en la carga bacteriana durante la recidiva. Aunque,

en nuestro estudio, los niveles del ADN de *Brucella melitensis* son mayores en aquellos pacientes con recidiva microbiológica que con recidiva clínica. La sensibilidad de nuestro ensayo fue del 100% en el diagnóstico de la recidiva, indicando que el ensayo podría ser útil como herramienta para confirmar una recidiva ante una brucelosis ya tratada. Sin embargo, la alta sensibilidad de la técnica la capacita para amplificar ADN de bacterias no viables o de los restos de ADN presentes en las células mononucleares circulantes de pacientes que han concluido el tratamiento con éxito (Morata y cols., 1999), hecho que debería ser considerado a la hora de poner un tratamiento.

La terapia combinada es más efectiva que la terapia con un solo antibiótico. La proporción de las recidivas puede ser hasta un 50% más alto en caso de monoterapias (Solera y cols., 1997; <http://www.ksu.edu/research/animal/occhs/fact14.htm>). Se necesitan largos periodos con antibióticos para tratar recidivas y formas focales de la enfermedad, como meningitis y osteomielitis (Solera y cols., 1997). A pesar de que el número de pacientes, de nuestro estudio, es muy pequeño para valorar la eficacia del tratamiento, nuestros resultados están de acuerdo con que la terapia combinada es más efectiva que la monoterapia ya que recidivaron el 30% y el 42.9% de los pacientes, respectivamente. La carga de ADN de *B. melitensis* durante el tratamiento de los pacientes que no recidivaron fue menor que los que recidivaron. Maas y cols. también han detectado mediante PCR estándar, ADN de *Brucella* spp. durante el tratamiento de pacientes con brucelosis (Maas y cols., 2007). La importancia de estos hallazgos está basada en el hecho de que durante el tratamiento *Brucella* spp. es difícil de detectar por cultivo. En esta fase de la enfermedad probablemente estemos detectando, tanto ADN de bacteria viva como de bacteria muerta liberada como consecuencia de la acción del tratamiento antibiótico. Estos resultados deberían ser considerados cuando se interpreten los resultados de la PCRtr (Nimri y cols., 2003).

Nuestro ensayo de PCRtr es un método que presenta ventajas adicionales frente a los métodos convencionales, ya que es (i) simple y rápido de realizar (< 2 horas); (ii) seguro, porque no existe manipulación directa con el patógeno y se reduce el riesgo de infección del personal del laboratorio (Yagupsky y cols., 2000); (iii) cómodo, debido a que las muestras pueden ser procesadas en el mismo momento en que se extraen o pueden ser congeladas a -20°C para su posterior análisis; y (iv) su coste se puede asumir en aquellos laboratorios equipados con la infraestructura necesaria.

8. Diferencia en la sensibilidad clínica de los dos métodos de PCRtrQ

Hemos obtenido una sensibilidad clínica del 100% utilizando el kit de extracción “UltraClean DNA BloodSpin” de MoBio en el Ttr-LightCycler[®] (Figura 36 C) y del 43.3% usando el kit “QIAamp[®] DNA Blood Midi” de Quiagen en el Ttr-ABI Prism[®] (Figura 36 A), estos resultados no se pueden comparar ya que se han utilizado kits de extracción de ADN y termocicladores diferentes. En un principio, comparamos la sensibilidad clínica en ambos termocicladores utilizando el kit de extracción de Quiagen (Figura 36 A y B), y los resultados preliminares, en ambos termocicladores, fueron similares con un alto porcentaje de falsos negativos. La presencia de inhibidores fue examinada mediante un IPC de la reacción de PCR en el Ttr-ABI Prism[®]. Para excluir la posibilidad de una extracción de ADN ineficiente, alícuotas de la muestra original se descongelaron y el ADN fue re-extraído y usado como muestra para la PCR, obteniendo el mismo resultado en ambos termocicladores. Estos resultados confirman que este kit de Quiagen, no es una buena elección para este tipo de análisis. Después de analizar estos resultados optamos, primero, por cambiar de kit de extracción y segundo, por utilizar el Ttr-LightCycler[®] ya que la sensibilidad analítica era mayor (aproximadamente, un logaritmo) y el tiempo de ejecución era menor, obteniendo una sensibilidad clínica del 100%. Con nuestro primer objetivo alcanzado, no hemos comprobado que sensibilidad clínica hubiéramos obtenido utilizando el kit de MoBio en el Ttr-ABI Prism[®]. El kit “QIAamp[®] DNA Blood Midi” de Quiagen no ha sido utilizado en ningún estudio en el que se ha detectado o cuantificado ADN de *Brucella* spp. en muestras de sangre o suero de pacientes con brucelosis (Queipo-Ortuño y cols., 2005a; Queipo-Ortuño y cols., 2005b; Debeaumont y cols., 2005; Kattar y cols., 2007; Vrioni y cols., 2008). Algunos de estos autores han usado un kit, también de Quiagen, el “QIAamp[®] DNA Blood Mini” con buenos resultados y todos han utilizado un Ttr-LightCycler[®] (Debeaumont y cols., 2005; Kattar y cols., 2007; Vrioni y cols., 2008).

9. Comparación de la PCRtrQ con los métodos serológicos y el hemocultivo

El cuadro clínico de la brucelosis es muy heterogéneo e inespecífico, y su diagnóstico es por lo tanto generalmente difícil, requiriendo la confirmación por técnicas microbiológicas y pruebas serológicas (Araj, 1999). Las pruebas clásicas de uso más extendido son el rosa de Bengala y la seroaglutinación en tubo para la detección de anticuerpos aglutinantes y la prueba de Coombs para cuantificar los

anticuerpos no aglutinantes (Díaz y Moriyón, 1992). Los resultados negativos de estas tres pruebas prácticamente excluye el diagnóstico de brucelosis. (Ariza J, 2002). En áreas con baja prevalencia de brucelosis la dificultad principal para el diagnóstico estriba en la falta de sospecha de la enfermedad. Por el contrario, en áreas endémicas la sospecha es fácil y la brucelosis se incluye automáticamente en los diagnósticos diferenciales, pero la dificultad radica en la interpretación de los resultados serológicos (Rodríguez-Torres, 1988; Martín-Moreno y cols., 1992). Los tests serológicos pueden no ser útiles en (i) estados tempranos de la enfermedad cuando los niveles de los anticuerpos son bajos, (ii) durante reinfecciones y recidivas en áreas endémicas, (iii) en exposiciones ocupacionales y (iv) en pacientes con brucelosis crónicas donde estos niveles pueden permanecer altos (Ariza y cols., 1992; Young, 1991).

El hemocultivo es considerado el “*gold standard*” en el laboratorio para el diagnóstico de la brucelosis, aunque su sensibilidad varía desde un 40% al 90% y necesitan largos periodos de incubación (Yagupsky, 1999). En casos de brucelosis con focalidad el hemocultivo puede no confirmar el 70% de los casos (Morata y cols., 2001). Además, la manipulación de los hemocultivos de *Brucella* spp. supone un riesgo de infección para el personal de laboratorio, ya que *Brucella* spp. requiere un nivel 3 de bioseguridad (Young, 1995; Yagupsky, 1999).

En las últimas décadas, la PCR se ha aplicado en el diagnóstico de enfermedades infecciosas en las que las técnicas convencionales son demasiado lentas o poco sensibles. Desde que Fekete y cols. describieron en 1990 (Fekete y cols., 1990) el primer estudio sobre la detección de *Brucella* por PCR estándar, se ha producido un gran desarrollo en el diagnóstico molecular con respecto a la brucelosis humana.

Diversos estudios han descrito la PCR estándar como una técnica alternativa rápida, sensible y específica a la serología y al hemocultivo en el diagnóstico de la brucelosis, tanto en el momento del diagnóstico y en la recidiva, como en estados focales de la enfermedad (Morata y cols., 1998; Navarro y cols., 1999; Queipo-Ortuño y cols., 1997; Romero y cols., 1995; Zerva y cols., 2001; Morata y cols., 1999 y Morata y cols., 2001). Los resultados obtenidos, en estos estudios, varían de unos laboratorios a otros, y no existe un procedimiento estandarizado para el diagnóstico de la brucelosis mediante PCR estándar.

En los últimos años, se ha desarrollado la PCRtr que nos permite cuantificar la carga bacteriana, reduce el tiempo del ensayo y es más sensible que la PCR estándar (Loeffler y cols., 2000; Bergeron y cols., 2000). Además, no requiere la manipulación de los amplificadores de PCR reduciendo, por ello, el riesgo de contaminación y falsos positivos. En 2001, Redkar y cols., (Redkar y cols., 2001) describieron el primer ensayo en el cual detectaban ADN de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* de cultivo puro, desde entonces, son numerosos los estudios que se han publicado aplicando la PCRtr en el diagnóstico molecular de la brucelosis humana (Queipo-Ortuño y cols., 2005a; Al-Dahouk y cols., 2005; Colmenero y cols., 2005; Queipo-Ortuño y cols., 2005b; Debeaumont y cols., 2005; Navarro y cols., 2006; Queipo-Ortuño y cols., 2006; Kattar y cols., 2007; Theegarten y cols., 2008; Queipo-Ortuño y cols., 2008a; Navarro-Martínez A y cols., 2008; Vrioni y cols., 2008; Queipo-Ortuño y cols., 2008b).

La sensibilidad de nuestro ensayo de PCRtr es mayor que la sensibilidad del hemocultivo, RB y SAT e igual que la del Coombs, en el momento del diagnóstico y en la recidiva. La alta sensibilidad y especificidad hacen de este ensayo un valioso instrumento para el diagnóstico de la brucelosis, aunque debemos ser cautos a la hora de poner a un paciente un tratamiento.

En resumen, nuestro método detecta y cuantifica el ADN de *Brucella melitensis* en muestras de sangre de pacientes con brucelosis en el momento del diagnóstico, del tratamiento y de la recidiva, tanto clínica como microbiológica. La metodología desarrollada en este trabajo utilizando el Ttr-LightCycler® es una técnica rápida, sensible y específica, con un gran potencial en el diagnóstico de la brucelosis. Actualmente, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, “Centers for Disease Control and Prevention”) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, anteriormente Oficina Internacional de Epizootias) no han validado ningún método de PCR, estándar o en tiempo real, para el diagnóstico de la brucelosis debido a la falta de consenso en la comunidad científica. Esta potente metodología sólo será útil si, después de validar un método de PCRtrQ, los laboratorios de microbiología clínica participan en programas de control de calidad coordinados por laboratorios de referencias nacionales o internacionales.

G. CONCLUSIONES

En el presente estudio, hemos puesto a punto la metodología para detectar y cuantificar ADN de *Brucella melitensis* en muestras de sangre de pacientes con brucelosis mediante PCR en tiempo real en dos termocicladores, ABI Prism® y LightCycler®. De acuerdo a los objetivos planteados inicialmente y a través de los resultados obtenidos en el presente estudio pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. Los cebadores EFQ1/ERQ2 y la sonda TaqMan, STqME, seleccionados son 100% específicos para detectar *Brucella melitensis*, al no producir falsos positivos, tanto en el Ttr- ABI Prism® como en el Ttr-LightCycler®.
2. La sensibilidad analítica es de 250fg (16-25 copias) y de 15fg (1 copia) en el Ttr- ABI Prism® y Ttr-LightCycler®, respectivamente.
3. La especificidad clínica en el Ttr- ABI Prism® y en el Ttr-LightCycler® es de 96.7% y 97.8%, respectivamente.
4. La sensibilidad clínica de las 30 muestras analizadas, en el Ttr- ABI Prism®, es del 43.3% (13/30), por lo que un 56.7% (17/30) fueron falsos negativos. Por lo tanto, se ha desestimado este ensayo para la detección y cuantificación de ADN de *Brucella melitensis* en sangre de pacientes con brucelosis.
5. En el Ttr-LightCycler®, la sensibilidad clínica es del 100% en el total de las muestra analizadas. Este ensayo detecta y cuantifica el ADN de *Brucella melitensis* en muestras de sangre en el momento del diagnóstico, en el tratamiento y en la recidiva, tanto clínica como microbiológica, de pacientes con brucelosis.
6. La PCR en tiempo real, diseñada, en el Ttr- LightCycler® es una técnica rápida, sensible y específica, con un gran potencial en el diagnóstico de la brucelosis que podría ser implantada en los laboratorios de microbiología clínica. Estos laboratorios deberían participar en programas de control de calidad coordinados por laboratorios de referencias nacionales o internacionales.

H. BIBLIOGRAFÍA

A

- Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jul 1;25(13):2657-60.
- Afonina IA, Reed MW, Lusby E, Shishkina IG, Belousov YS. Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *Biotechniques.* 2002 Apr;32(4):940-4, 946-9.
- Ahmed K, Al-Matrouk KA, Martínez G, Oishi K, Rotimi VO, Nagatake T. Increased serum levels of Interferon-g and Interleukin-12 during human brucellosis. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(3): 425-7.
- Al Dahouk S, Nöckler K, Hensel A, Tomaso H, Scholz HC, Hagen RM, Neubauer H. Human brucellosis in a nonendemic country: a report from Germany, 2002 and 2003. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005 Jul;24(7):450-6.
- Al Dahouk S, Nöckler K, Scholz HC, Pfeffer M, Neubauer H, Tomaso H. Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella* spp. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(11):1464-70.
- Alişkan H, Colakoğlu S, Turunç T, Demiroğlu YZ, Yazic AC, Arslan H. Evaluation of diagnostic value of Brucellacapt test in brucellosis. *Mikrobiyol Bul.* 2007 Oct;41(4):591-5.
- Al-Soud WA, Jönsson LJ, Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol.* 2000 Jan;38(1):345-50.
- Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol.* 2001 Feb;39(2):485-93.
- Alton GG, Jones LM, Pietz DE. *Laboratory techniques in brucellosis.* Geneva: World Health Organization 1975.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Techniques for the brucellosis laboratory.* Paris, Institut National de la Recherche Agronomique 1988.
- Altschul SF, Gish W, Mileer W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990;215:403-410.
- Anónimo 1. Joint Food and Agricultura Organization/Word Health Organization. FAO-WHO Expert Committee on Brucellosis (sixth report). WHO Technical Report Series N° 740. Geneva: World Health Organization; 1986: p.56-7.
- Anónimo 2. Vigilancia de la brucelosis. Castilla-La Mancha. AÑO 2005, Vol 18, nº 8 Agosto 2006. www.jccm.es/sanidad/salud/epidemiologia/4_806.pdf.
- Anónimo 3. Boletín Epidemiológico Semanal, 2006 vol 14 nº 17/193-204, semana 38.

- Aragón V, Díaz R, Moreno E, Moriyón I. Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 1996;178(4):1070-9.
- Araj GF, Kaufmann AF. Determination by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA to *Brucella melitensis* major outer membrane proteins and whole-cell heat-killed antigens in sera of patients with brucellosis. *J Clin Microbiol*. 1989 Aug;27(8):1909-12
- Araj GF, Azzam RA. Seroprevalence of *Brucella* antibodies among persons in high-risk occupation in Lebanon. *Epidemiol Infect*. 1996 Oct;117(2):281-8.
- Araj GF. Human brucellosis: a classical infectious disease with persistent diagnostic challenges. *Clin Lab Sci*. 1999 Jul-Aug;12(4):207-12.
- Aréstegui MB, Gualtieri CS, Domínguez J, Scharovsky G. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. *Vet Mex* 2001; 32(2): 131-9.
- Ariza J. Brucelosis: Perspectiva actual de la enfermedad. Perfil de las inmunoglobulinas específicas en el curso de su evolución. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis doctoral. 1988.
- Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992;14:131-140.
- Ariza J, Corredoira J, Pallares R, Viladrich PF, Rufi G, Pujol M, Gudiol F. Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clin Infect Dis*. 1995 May;20(5):1241-9.
- Ariza J. Brucellosis. *Curr Opin Infect Dis* 1996;9:126-31.
- Ariza J. Brucellosis: an update. The perspective from the Mediterranean basin. *Rev Med Microbiol* 1999;10:125-35.
- Ariza J. Brucelosis en el siglo XXI. *Med Clin (Barc)* 2002;119(9):339-44.

B

- Baldi PC, Miguel SE, Fossati CA, Wallach JC. Serological follow-up of human brucellosis by measuring IgG antibodies to lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella* species. *Clin Infect Dis*. 1996 Mar;22(3):446-55.
- Belousov YS, Welch RA, Sanders S, Mills A, Kulchenko A, Dempcy R, Afonina IA, Walburger DK, Glaser CL, Yadavalli S, Vermeulen NM, Mahoney W. Single nucleotide polymorphism genotyping by two colour melting curve analysis using the MGB Eclipse Probe System in challenging sequence environment. *Hum Genomics*. 2004 Mar;1(3):209-17.

- Bergeron MG, Ke D, Ménard C, Picard FJ, Gagnon M, Bernier M, Ouellette M, Roy PH, Marcoux S, Fraser WD. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. *N Engl J Med*. 2000 Jul 20;343(3):175-9.
- Bernard PS, Wittwer CT. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clin Chem*. 2000 Feb;46(2):147-8.
- Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(3):533-554.
- Bogdanovich T, Skurnik M, Lübeck PS, Ahrens P, Hoorfar J. Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2261-63.
- Bougnoix M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, Nicolas-Chanoine M. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol*. 1999 Apr;37(4):925-30.
- Braasch DA, Jensen S, Liu Y, Kaur K, Arar K, White MA, Corey DR. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry*. 2003 Jul 8;42(26):7967-75.
- Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv.1 by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994 Nov;32(11):2660-6.
- Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol*. 1995 Jun;33(6):1640-2.
- Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, Jensen AE. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest*. 2003 Jul;15(4):374-8.
- Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard CO, Terpstra WJ, Levett PN. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol*. 1995 Aug;43(2):110-4.
- Bubner B, Baldwin IT. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Rep* 2004;23:263-271.
- Buchanan TM, Sulzer CR, Frix MK, Feldman RA. Brucellosis in the United States, 1960-1972. An abattoir-associated disease. Part II. Diagnostic aspects. *Medicine (Baltimore)*. 1974 Nov;53(6):415-25.

Buchanan TM, Faber LC. 2-mercaptoethanol Brucella agglutination test: usefulness for predicting recovery from brucellosis. *J Clin Microbiol.* 1980 Jun;11(6):691-3.

C

Canning PC, Roth JA, Deyoe BL. Release of 5'-guanosine monoophosphate and adenina by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. *J Infect Dis* 1986; 154(3):467-70.

Casao MA, Smits HL, Navarro E, Solera J. Clinical utility of a dipstick assay in patients with brucellosis: correlation with the period of evolution of the disease. *Clin Microbiol Infect.* 2003 Apr;9(4):301-5.

Casao MA, Navarro E, Solera J. Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis. *J Infect.* 2004 Aug;49(2):102-8.

Clegg RM. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol.* 1992;211:353-88.

Cloekaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, Godfroid J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect* 2001; 3(9):729-38.

Coghlan JD, Longmore HJ. The significance of *Brucella* antibodies in patients in a rural area. *Practitioner.* 1973 Nov;211(265):645-52.

Cogswell FB, Bantar CE, Hughes TG, Gu Y, Philipp MT. Host DNA can interfere with detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy specimens by PCR. *J Clin Microbiol.* 1996 Apr;34(4):980-2.

Colmenero JD, Reguera JM, Cabrera FP, Hernández S, Porrás J, Manchado P, Miranda MT. Combined use of rose Bengal and indirect immunofluorescence in the diagnosis of brucellosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1989 Jun-Jul;7(6):316-20.

Colmenero JD, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, Baeza G, Salazar JA, Morata P. Real time polymerase chain reaction: a new powerful tool for the diagnosis of neurobrucellosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Jul;76(7):1025-7.

Cooper CW. Prevalence of antibody to *Brucella* in asymptomatic well individuals in Saudi Arabia. *J Trop Med Hyg.* 1992 Apr;95(2):140-2.

Corbel MJ, Morgan WJB. Proposal for minimal standards dor descriptions of new species and biotypes of the genus *Brucella*. *Int J Syst Bacteriol.* 1975;25:83-89.

Corbel MJ, Morgan WJB. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173 AL. In: Holt JG, editos. *Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1.* Baltimore (MD): Williams and Wilkins, 1984:377-88.

- Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis*. 1997 Apr-Jun;3(2):213-21.
- Corbeil LB, Blau K, Inzana TI, Neilsen KH, Jacobson RH, Corbeil RR, Winter AJ. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect Immun* 1988; 56: 3251-61.
- Costa J. Real-time PCR. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004 May;22(5):299-304.

CH

- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res*. 1992 Apr 11;20(7):1717-23.

D

- Dana-Arie M, Serre A. The special properties of seric IgA in human brucellosis. *Ann Immunol (Paris)*. 1974 Mar-Apr;125(3):523-6.
- Daza RM, Damaso D, Moreno M. Comparative study of different serological tests for the diagnosis of brucellosis. *Med Clin (Barc)*. 1981 Jan 25;76(2):57-60.
- Delhommeau F, Forestier F. Quantification of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid by rapid cycle real-time PCR. En: Reischl U, Wittwer C, Cockerill, editors. *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications. Microbiology and Food Analysis*. Berlin: Springer-Verlag, 2002; p. 133-8.
- Debeaumont C, Falconnet PA, Maurin M. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 Dec;24(12):842-5.
- De Klerk E, Anderson R. Comparative evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the laboratory diagnosis of brucellosis. *J Clin Microbiol*. 1985 Mar;21(3):381-6.
- DeVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 8;99(1):443-8. Epub 2001 Dec 26.
- Demidov W, Yavnilovich MV, Belotserkovskii BP, Frank- Kamenetskii MD, Nielsen PE. Kinetics and mechanism of polyamide ("peptide") nucleic acid binding to dúplex DNA. *Proc Nati Acad Sci USA*. 1995;92: 2637-2641.

- Demidov W, Protozanova E, Izvolsky KI, Price C, Nielsen PE, Frank-Kamenetskii MD. Kinetics and mechanism of the DNA double helix invasion by pseudocomplementary peptide nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:5953-5958.
- Díaz R, Dorronsoro I. Contribution to the serological diagnosis of brucellosis and yersiniosis. I. Use of the gel precipitation reaction. *Rev Clin Esp*. 1971 May;121(4):367-72.
- Díaz R. Valor de la prueba de Rosa de Bengala y la demostración de anticuerpos anti-proteína de *Brucella* en el diagnóstico serológico de la brucelosis y yersiniosis. *Med Clin* 1974;63:463.
- Díaz R, Maravi-Poma E, Rivero-Puente A. Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis. *Bull. World Health Org* 1976;53:417-424.
- Díaz R, Maravi-Poma E, Fernández JL, García-Merlo S, Rivero-Puente A. Brucellosis: study of 222 cases. IV. Diagnosis of human brucellosis. *Rev Clin Esp*. 1982 Aug 15-31;166(3-4):107-10.
- Díaz R, Moriyón I. Laboratory techniques in the diagnosis of human brucellosis. En: Young EJ, Corbel MJ, editors. *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. Boca ratón, Florida: CRS Press, Inc 1989.
- Díaz R, Moriyón I. Laboratory techniques in the diagnosis of human brucellosis. En: Young EJ, Corbel MJ, editors. *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. Boca ratón, Florida:CRS Press, Inc 1992.
- Díaz R, Dorronsoro I. Brucelosis: Paradigma del diagnóstico microbiológico. *Medicine* 2002;8(61):3289-96.

E

- Edwards JM, Tannahill AJ, Bradstreet CM. Comparison of the indirect fluorescent antibody test with agglutination, complement-fixation, and Coombs test for *Brucella* antibody. *J Clin Pathol*. 1970 Mar;23(2):161-5.
- Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE, Berg RH. Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogues with an achiral backbone. *J Am Chem Soc* 1992;114:1895-1898.
- Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, Berg RH, Kim SK, Norden B, Nielsen PE. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 1993;365:566-568.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan;19(1):165-256. Erratum in: *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jul;19(3):595.

F

Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol.* 1990 Aug;69(2):216-27.

FAO-WHO. Food and Agriculture Organization-World Health Organization. FAO-WHO Expert Committee on Brucellosis sixth report. World Health Organization technical report series No. 740. Geneva: World Health Organization, 1986.

Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckart A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007 Nov;57(Pt 11):2688-93.

Foster JT, Okinaka RT, Svensson R, Shaw K, De BK, Robison RA, Probert WS, Kenefic LJ, Brown WD, Keim P. Real-time PCR assays of single-nucleotide polymorphisms defining the major *Brucella* clades. *J Clin Microbiol.* 2008 Jan;46(1):296-301. Epub 2007 Nov 21. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2008 Jul;46(7):2474.

Foz A, Arcalís L. Die Komplementbindungs-Reaktion in der Diagnose der menschlichen Brucellose. *Z Hyg* 1953;136:55-56.

Foz A, Garriga S. Relation between complement fixation and incomplete antibodies (Coombs' test) in human brucellosis. *Rev Immunol Ther Antimicrob.* 1954;18(4):288-98.

Foz A, Arcalis I, Garriga S, Manzanares J, Ortiz F. Valor de algunos métodos de laboratorio en el diagnóstico de la brucelosis humana. *Rev Diag Biol* 1954;3:349-383.

Foz A, Díaz R. Brucellosis. En: Perea E, ed. *Enfermedades infecciosas. Patogénesis y diagnóstico.* Barcelona: Editores SA, 1983;705-725.

Foz A, Pellicer T. Diagnóstico serológico de la brucellosis humana. Encuentro internacional sobre Brucellosis. Madrid 1985. Ed Garsi, **1986**: pp 27-38.

Fretin D, Whatmore AM, Al Dahouk S, Neubauer H, Garin-Bastuji B, Albert D, Van Hessche M, Ménart M, Godfroid J, Walravens K, Wattiau P. *Brucella suis*

identification and biovar typing by real-time PCR. *Vet Microbiol.* 2008 Oct 15;131(3-4):376-85. Epub 2008 May 21.

Frieden M, Hansen HF, Koch T. Nuclease stability of LNA oligonucleotides and LNA-DNA chimeras. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2003 May-Aug;22(5-8):1041-3.

G

Gamazo C, Vitas AI, López-Goñi I, Díaz R, Moriyón I. Factors affecting detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR730, a nonradiometric system for hemocultures. *J Clin Microbiol.* 1993 Dec;31(12):3200-3.

García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Vizmanos JL, López-Goñi I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin Chem.* 2006 Apr;52(4):779-81.

Gazapo E, Gonzalez Lahoz J, Subiza JL, Baquero M, Gil J, de la Concha EG. Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: importance for diagnosis and follow-up. *J Infect Dis.* 1989 Feb;159(2):219-25.

Gentle A, Anastasopoulos F, McBrien NA. High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *BioTechniques* 2001;31:502-508.

Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, Reading C, Hanania EG. Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. *Cancer Res.* 1998 Sep 1;58(17):3957-64.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):995-1001.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001 Dec;25(4):386-401.

Glenchur H, Seal US, Zinneman HH, Hall WH. Serum precipitins in human and experimental brucellosis. *J Lab Clin Med.* 1962 Feb;59:220-30.

Goldbaum FA, Rubbi CP, Wallach JC, Miguel SE, Baldi PC, Fossati CA. Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring antiprotein humoral immune responses. *J Clin Microbiol.* 1992 Mar;30(3):604-7.

- Gómez MC, Rosa C, Geijo P, Escribano MA. Comparative study of the Brucella agglutination test versus the Coombs test for Brucella. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1999 Jun-Jul;17(6):283-5.
- Gopaul KK, Koylass MS, Smith CJ, Whatmore AM. Rapid identification of Brucella isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiol*. 2008 Jun 2;8:86.

H

- Hall WH, Manion RE. Comparison of the Coombs test with other methods for Brucella agglutinins in human serum. *J Clin Invest*. 1953 Jan;32(1):96-106.
- Harris SA, Gavathiotis E, Searle MS, Orozco M, Laughton CA. (2001). Cooperativity in drug-DNA recognition: a molecular dynamics study. *J Am Chem Soc* 2001;123:12658-12663.
- Hausler WJ, Moyer NP, Holcomb LA. Brucella. In: Lannette Eh, Ballows A, Hausler WJ, eds. *Manual of clinical microbiology*. 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1984; 382-6.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):986-94.
- Hendrix C, Rosemeyer H, De Bouvere B, Van Aerschot A, Seela F, Herdewijn P. 1',5'-Anhydrohexitol oligonucleotides: hybridisation and strand displacement with oligoribonucleotides, interaction with RNase H and HIV reverse transcriptase. *Eur J Chem*. 1997;3:1513–1520.
- Heremans JF, Vaerman JP, Vaerman C. Studies on the immune globulins of human serum. II. A study of the distribution of anti-brucella and anti-diphtheria antibody activities among gamma-ss, gamma-im and gamma-1a-globulin fractions. *J Immunol*. 1963 Jul;91:11-7.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992 Apr;10(4):413-7.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 1993;11(9):1026-30.
- Hinić V, Brodard I, Thomann A, Cvetnić Z, Makaya PV, Frey J, Abril C. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J Microbiol Methods*. 2008 Oct;75(2):375-8. Epub 2008 Jul 15.

Hoffmann EM, Houle JJ. Failure of *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. *Vet Immunol Immunopathol* 1983; 5: 65-76.

Hoffmann EM, Houle JJ. Contradictory roles for antibody and complement in the interaction of *Brucella abortus* with its host. *Crit Rev Microbiol* 1995; 21(3): 153-63.

I

Irmak H, Buzgan T, Evirgen O, Akdeniz H, Demiroz AP, Abdoel TH, Smits HL. Use of the *Brucella* IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Jun;70(6):688-94.

Ishiguro T, Saitoh J, Yawata H, Yamagishi H, Iwasaki S, Mitoma Y. Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Anal Biochem.* 1995 Aug 10;229(2):207-13.

J

Jahans KL, Foster G, Broughton ES. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol.* 1997; 57(4):373-82.

Jiang X, Baldwin C. Iron augments macrophage-mediated killing of *Brucella abortus* alones and in conjunction with interferon g. *Cell Immunol* 1993; 148: 397-407.

K

Kaltenboeck B, Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv Clin Chem* 2005;40:219-49.

Kambhampati D, Nielsen PE, Knoll W. Investigating the kinetics of DNA-DNA and PNA-DNA interactions using surface plasmon resonance-enhanced fluorescence spectroscopy. *Biosens Bioelectron* 2001;16:1109-18.

Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, Kanda Y, Kashima T, Yamazaki Y, Hamaki T, Mori S, Akiyama H, Mutou Y, Sakamaki H, Osumi K, Kimura S, Hirai H. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 2001 Nov 1;33(9):1504-12.

Kattar MM, Zalloua PA, Araj GF, Samaha-Kfoury J, Shbaklo H, Kanj SS, Khalife S, Deeb M. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of

- human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 Sep;59(1):23-32. Epub 2007 May 29.
- Kaur H, Arora A, Wengel J, Maiti S. Thermodynamic, Counterion, and Hydration Effects for the Incorporation of Locked Nucleic Acid Nucleotides into DNA Duplexes. *Biochemistry* 2006;45 (23): 7347–55
- Kawamura S, Maesaki S, Noda T, Hirakata Y, Tomono K, Tashiro T, Kohno S. Comparison between PCR and detection of antigen in sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 1999 Jan;37(1):218-20.
- Ke D, Ménard C, Picard FJ, Boissinot M, Ouellette M, Roy PH, Bergeron MG. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin Chem* 2000;46:324-31.
- Kerr WR, Coghlan JD, Payne DJ, Robertson L. The laboratory diagnosis of chronic brucellosis. *Lancet*. 1966 Nov 26;2(7474):1181-3.
- Kerr WR, McCaughey WJ, Coghlan JD, Payne DJ, Quaife RA, Robertson L, Farrell ID. Techniques and interpretations in the serological diagnosis of brucellosis in man. *J Med Microbiol*. 1968 Nov;1(2):181-93.
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*. 1971 Mar 14;56(2):341-61.
- Ko J, Splitter G. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccines development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 2003;16(1):65-78.
- Köhler O, Jarikote DV, Seitz O. Forced intercalation probes (FIT Probes): thiazole orange as a fluorescent base in peptide nucleic acids for homogeneous single-nucleotide-polymorphism detection. *Chembiochem*. 2005 Jan;6(1):69-77.
- Koshkin AA, SK Singh, P Nielsen, VK Rajwanshi, R Kumar, M Meldgaard, CE Olsen, J Wengel. LNA (Locked Nucleic Acid): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron*. 1998;54:3607-3630.
- Kutyavin IV, Lukhtanov EA, Gamper HB, Meyer RB. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res*. 1997 Sep 15;25(18):3718-23.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB,

Hedgpeth J. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 15;28(2):655-61.

L

- Latorra D, Arar K, Hurley JM. Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol Cell Probes.* 2003 Oct;17(5):253-9.
- Le Pecq JB, Paoletti C. A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal Biochem.* 1966 Oct;17(1):100-7.
- Lind-Brandberg L, Welinder-Olsson C, Lagergård T, Taranger J, Trollfors B, Zackrisson G. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. *J Clin Microbiol.* 1998 Mar;36(3):679-83.
- Liss B. Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucleic Acids Res.* 2002 Sep 1;30(17):e89.
- Liu W, Saint DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem.* 2002 Mar 1;302(1):52-9.
- Livak, K. ABI Prism 7700 Sequence Detection System, User Bulletin 2. PE Applied Biosystems, Foster City, CA.1997.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Method Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
- Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagemeyer L, Schumacher U, Einsele H. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol.* 2000 Feb;38(2):586-90.
- Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene.* 1990 Sep 1;93(1):125-8.
- López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckert A, Ferreira AC, Cardoso R, Corrêa de Sá MI, Walravens K, Albert D, Garin-Bastuji B. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol.* 2008 Oct;46(10):3484-7. Epub 2008 Aug 20.
- Lübeck PS, Wolffs P, On SL, Ahrens P, Rådström P, Hoorfar J. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters*: assay development and analytical validation. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Sep;69(9):5664-9.

Lukhtanov EA, Lokhov SG, Gorn VV, Podyminogin MA, Mahoney W. Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(5):e30. Epub 2007 Jan 26.

M

Maas KS, Méndez M, Zavaleta M, Manrique J, Franco MP, Mulder M, Bonifacio N, Castañeda ML, Chacaltana J, Yagui E, Gilman RH, Guillen A, Blazes DL, Espinosa B, Hall E, Abdoel TH, Smits HL. Evaluation of brucellosis by PCR and persistence after treatment in patients returning to the hospital for follow-up. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Apr;76(4):698-702.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002 Mar 15;30(6):1292-305.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Mar;10(3):190-212.

Magee JT. An enzyme-labelled immunosorbent assay for *Brucella abortus* antibodies. *J Med Microbiol.* 1980 Feb;13(1):167-72.

Maibach RC, Altwegg M. Cloning and sequencing an unknown gene of *Tropheryma whipplei* and development of two LightCycler PCR assays. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003 Jul;46(3):181-7.

Maravi-Poma E, García-Carasusan M, Gamboa J, Eguaras J, Pérez C, Díaz R, Rivero-Puente A. Brucellosis: study of 222 cases. I. Epidemiology. *Rev Clin Esp.* 1982 Jul 15-31;166(1-2):55-8.

Margni RA, Binaghi RA. Purification and properties of non-precipitating rabbit antibodies. *Immunology* 1972; 22(4): 557-63.

Margni RA, Hajos S. Biological and physicochemical properties of purified anti-DNP guinea-pig non-precipitating antibodies. *Immunology* 1973; 24(3): 435-43.

Margni RA, Binaghi RA. Nonprecipitating asymmetric antibodies. *Annual Review of Immunology* 1988; 6: 535-34.

Marianelli C, Martucciello A, Tarantino M, Vecchio R, Iovane G, Galiero G. Evaluation of molecular methods for the detection of *Brucella* species in water buffalo milk. *J Dairy Sci.* 2008 Oct;91(10):3779-86.

Marrodán T. Brucelosis humana: significado de las inmunoglobulinas anti-lipopolisacárido, anti-polisacárido B y anti-proteínas en la evaluación clínica de la enfermedad. Universidad de Navarra. Tesis doctoral. 1998.

Marrodán T, Nenova-Poliakova R, Rubio M, Ariza J, Clavijo E, Smits HL, Diaz R. Evaluation of three methods to measure anti-*Brucella* IgM antibodies and

- interference of IgA in the interpretation of mercaptan-based tests. *J Med Microbiol.* 2001 Aug;50(8):663-6.
- Martín Moreno S, Guinea Esquerdo L, Carrero González P, Visedo Orden R, García Carbajosa S, Calvo del Olmo T, Reverte Cejudo D. Diagnosis of brucellosis in an endemic area. Evaluation of routine diagnostic tests. *Med Clin (Barc)* 1992;98:481-5.
- Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J Clin Microbiol.* 1996 Feb;34(2):477-8.
- Miller N, Cleary T, Kraus G, Young AK, Spruill G, Hnatyszyn HJ. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast bacillus smear-positive respiratory specimens and BacT/ALERT MP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Nov;40(11):4143-7.
- Moody MD, Biegeleisen JZ, Taylor GC. Detection of brucellae and their antibodies by fluorescent antibody and agglutination tests. *J Bacteriol.* 1961 Jun;81:990-5.
- Morata P, Queipo-Ortuño MI, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol.* 1998 Sep;36(9):2443-6.
- Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Pichardo C, Colmenero JD. Posttreatment follow-up of brucellosis by PCR assay. *J Clin Microbiol.* 1999 Dec;37(12):4163-6.
- Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, Miralles F, Lopez-Gonzalez JJ, Colmenero JD. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. *J Clin Microbiol.* 2001 Oct;39(10):3743-6.
- Morgan WJ, MacKinnon DJ, Lawson JR, Cullen GA. The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet Rec.* 1969 Dec 6;85(23):636-41.
- Moriyón I, Ramón D, López-Goñi I. Bacteriología del género *Brucella*. En: Manual de brucelosis. Ed. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. 2001: 21-30.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998 Jun;24(6):954-8, 960, 962.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* 2002; 32:1372-1379.

- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
- Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990 Apr;262(4):56-61, 64-5.
- Murdoch DR, Walford EJ, Jennings LC, Light GJ, Schousboe MI, Cheresky AY, Chambers ST, Town GI. Use of the polymerase chain reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1996 Sep;23(3):475-80.

N

- Navarro E, Fernandez JA, Escribano J, Solera J. PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol.* 1999 May;37(5):1654-5.
- Navarro E, Escribano J, Fernández J, Solera J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002 Oct 11;34(2):147-51.
- Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004 Jan;4(1):115-23.
- Navarro E, Segura JC, Castaño MJ, Solera J. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor the evolution of *Brucella melitensis* DNA load during therapy and post-therapy follow-up in patients with brucellosis. *Clin Infect Dis.* 2006 May 1;42(9):1266-73. Epub 2006 Mar 31.
- Navarro-Martínez A, Navarro E, Castaño MJ, Solera J. Rapid diagnosis of human brucellosis by quantitative real-time PCR: a case report of brucellar spondylitis. *J Clin Microbiol.* 2008 Jan;46(1):385-7. Epub 2007 Oct 31.
- Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 15;25(12):2516-21.
- Nazarenko I, Lowe B, Darfler M, Ikonomi P, Schuster D, Rashtchian A. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):e37.
- Newby DT, Hadfield TL, Roberto FF. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 5'-exonuclease and hybridization probe assays. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 4753-9.
- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science.* 1991 Dec 6;254(5037):1497-500.

- Nielsen PE. Applications of peptide nucleic acids. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:71-75.
- Nielsen PE. Peptide nucleic acid targeting of double stranded DNA. *Methods Enzymol.* 2001;340: 329-340.
- Niesters HG. Clinical virology in real time. *J Clin Virol.* 2002 Dec;25 Suppl 3:S3-12.
- Nimri LF. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. *BMC Infect Dis.* 2003 Apr 28;3:5.
- Nordgren J, Bucardo F, Dienus O, Svensson L, Lindgren PE. Novel light-upon-extension real-time PCR assays for detection and quantification of genogroup I and II noroviruses in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2008 Jan;46(1):164-70. Epub 2007 Oct 24.

O

- O'Leary S, Sheahan M, Sweeney T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res Vet Sci.* 2006 Oct;81(2):170-6. Epub 2006 Mar 20.
- Orduña A, Almaraz A, Prado A, Gutierrez MP, Garcia-Pascual A, Dueñas A, Cuervo M, Abad R, Hernández B, Lorenzo B, Bratos MA, Torres AR. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol.* 2000 Nov;38(11):4000-5.
- Orduña A, Bratos MA, Abad R, Ruiz L, De Frutos M, Rodríguez A. La brucelosis. Etiología y origen de la infección humana. En: *Manual de brucelosis*. Ed. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. 2001: 13-20.
- Osterman B, Moriyón I. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. Septiembre 2003, Pamplona, Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:1173-1175.
- Ostrowsky BE, Trick WE, Sohn AH, Quirk SB, Holt S, Carson LA, Hill BC, Arduino MJ, Kuehnert MJ, Jarvis WR. Control of vancomycin-resistant enterococcus in health care facilities in a region. *N Eng J Med* 2001;344:1427-34.
- Otero JR, Fuertes A, Palenque E, Noriega AR. Microtiter-adapted method that facilitates the Coombs test for brucellosis. *J Clin Microbiol.* 1982;16(4):737-8.

P

- Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. *N Engl J Med* 2005;352:2325-36.

- Parma EA, Santisteban G, Margni RA. Analysis and in vivo assay of cattle anti *B. abortus* agglutinating and non-agglutinating antibodies. *Veter Microbiol* 1984; 9: 391-8.
- Parratt D, Nielsen KH, White RG. Radioimmunoassay of IgM, IgG, and IgA *Brucella* antibodies. *Lancet*. 1977 May 21;1(8021):1075-8.
- Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:e73.
- Pellicer T, Ariza J, Foz A, Pallares R, Gudiol F. Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. *J Infect Dis*. 1988 May;157(5):918-24.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:e45.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004 Mar;26(6):509-15.
- Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goñi I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 1998; 66 (12): 5711-24.
- Pontow S, Kery V, Stahl D. Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 1992; 137:221-41.
- Poole PM. A 6-year survey of human brucellosis in a rural area of north-western England and north Wales. *Postgrad Med J*. 1975 Jul;51(597):433-40.
- Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time Multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol* 2004;42: 1290-3.

Q

- Queipo-Ortuño MI, Morata P, Ocón P, Manchado P, Colmenero JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J Clin Microbiol*. 1997 Nov;35(11):2927-30.
- Queipo-Ortuño MI. Desarrollo y valoración de la eficacia diagnóstica de una prueba de PCR en la brucelosis humana. Universidad de Málaga. Tesis doctoral 1998.
- Queipo-Ortuño MI, Garcia-Ordoñez MA, Colmenero JD, Morata P. Hydrogen peroxide improves the efficiency of a peripheral blood PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *Biotechniques*. 1999 Aug;27(2):248-50, 252.

- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P. Comparison between LightCycler Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. *Clin Infect Dis.* **2005a** Jan 15;40(2):260-4. Epub 2004 Dec 20.
- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Pachón ME, González M, Morata P. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin Microbiol Infect.* **2005b** Sep;11(9):713-8.
- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Muñoz N, Baeza G, Clavijo E, Morata P. Rapid diagnosis of *Brucella* epididymo-orchitis by real-time polymerase chain reaction assay in urine samples. *J Urol.* 2006 Nov;176(5):2290-3.
- Queipo-Ortuño MI, Tena F, Colmenero JD, Morata P. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of *Brucella* DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2008a** Feb;27(2):109-14. Epub 2007 Nov 1.
- Queipo-Ortuño MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clin Vaccine Immunol.* **2008b** Feb;15(2):293-6. Epub 2007 Dec 12.

R

- Raeymaekers L. Basic principles of quantitative PCR. *Mol Biotechnol.* 2000 Jun;15(2):115-22.
- Reddin JL, Anderson RK, Jenness R, Spink WW. Significance of 7S and macroglobulin *Brucella* agglutinins in human brucellosis. *N Engl J Med.* 1965 Jun 17;272:1263-8.
- Redkar R, Rose S, Bricker B, et al. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol Cell Probes* 2001; 15: 43-52.
- Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeyer B, Lehn N. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:2429-33.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1997 Feb 15;245(2):154-60.

- Rodríguez-Torres A. Diagnóstico de la brucelosis humana. *Rev Esp Reumatol* 1988; 15:204-14.
- Rodríguez Zapata M, Solera Santos J, Sánchez Martínez L, Solís García del Pozo J, Álvarez-Mon Soto M. Brucelosis. *Medicine* 2002;8 (65);3455-3463.
- Rodríguez MA. Utilización de técnicas genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunológicas (ELISA), para la detección y cuantificación de diferentes especies animales en Foie Gras. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Tesis doctoral. 2004.
- Rogers FA, Vasquez KM, Egholm M, Glazer PM. Site-directed recombination via bifunctional PNA-DNA conjugates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16695-16700.
- Romero C, Gamazo C, Pardo M, López-Goñi I. Specific detection of Brucella DNA by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995 Mar;33(3):615-7.
- Rubio M, Barrio B, Díaz R. Usefulness of Rose Bengal, Coombs and counter-immunoelectrophoresis for the diagnosis of human brucellosis cases with negative seroagglutination. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2001 Oct;19(8):406-7.
- Ruiz Castañeda M. Laboratory diagnosis of brucellosis. *Bull WHO* 1961;24:73-84.

S

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5463-5467
- Sasano KT, Cawell D, Medlar EM. Complement fixation and agglutination tests in Brucella abortus infection. *J Infect Dis* 1931;48:576-580.
- Saunders BM, Liu Z, Zhan Y, Cheers C. Interleukin-6 production during chronic experimental infection. *Immunol Cell Biol* 1993; 71: 275-80.
- Schmidt BL. PCR in laboratory diagnosis of human Borrelia burgdorferi infections. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jan;10(1):185-201.
- Scholz HC, Pfeffer M, Witte A, Neubauer H, Al Dahouk S, Wernery U, Tomaso H. Specific detection and differentiation of Ochrobactrum anthropi, Ochrobactrum

- intermedium and *Brucella* spp. by a multi-primer PCR that targets the *recA* gene. *J Med Microbiol.* **2008a** Jan;57(Pt 1):64-71.
- Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P, Neubauer H, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Göllner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, Nöckler K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **2008b** Feb;58(Pt 2):375-82.
- Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, Tomaso H, Vergnaud G, Le Flèche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, Krüger M, Lodri C, Pfeffer M. Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerg Infect Dis.* **2008c** Aug;14(8):1316-7.
- Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G, Fleche PL, Whatmore AM, Dahouk SA, Pfeffer M, Krüger M, Cloeckaert A, Tomaso H. Isolation of *Brucella microti* from Mandibular Lymph Nodes of Red Foxes, *Vulpes vulpes*, in Lower Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2008d** Oct 30.
- Schulz RG, Gryaznov SM. Oligo-2'-fluoro-2'-deoxynucleotide N3'-->P5' phosphoramidates: synthesis and properties. *NAR.* 1996;24:2966-73.
- Segura JC. *Brucellosis. Guías Clínicas* 2005; 5 (25).
- Serra J, Velasco J, Godoy P, Mendoza J. Can the Brucellacapt test be substituted for the Coombs test in the diagnosis of human brucellosis?. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2001 May;19(5):202-5.
- Singh SK, P Nielsen, AA Koshkin, and J Wengel. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem Commun* 1998;4: 455-456.
- Smits HL, Basahi MA, Díaz R Marrodan T, Douglas JT, Rocha A, Veerman J, Zheludkov MM, Witte OW, de Jong J, Gussenhoven GC, Goris MG, van Der Hoorn MA. Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. *J Clin Microbiol.* 1999 Dec;37(12):4179-82.
- Smits HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Diaz R. Immunochromatographic *Brucella*-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Nov;10(6):1141-6.
- Solera J, Martínez-Alfaro E, Espinosa A. Recognition and optimum treatment of brucellosis. *Drugs.* 1997 Feb;53(2):245-56. Review.
- Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: Design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997;7:187–195.

Sylvain K, Aurélie H, Marc M, Christophe R. Rapid screening for HLA-B27 by a TaqMan-PCR assay using sequence-specific primers and a minor groove binder probe, a novel type of TaqMan trade mark probe. *J Immunol Methods*. 2004 Apr;287(1-2):179-86.

T

Teixeira-Gomes A, Cloeckaert A, Zygmunt MS. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 2000; 68(5): 2954-61.

Tenover FC. Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. *Clin Infect Dis*. 2007 Feb 1;44(3):418-23.

Theegarten D, Albrecht S, Tötsch M, Teschler H, Neubauer H, Al Dahouk S. Brucellosis of the lung: case report and review of the literature. *Virchows Arch*. 2008 Jan;452(1):97-101.

Tomaso H, Reisinger EC, Al Dahouk S, Frangoulidis D, Rakin A, Landt O, Neubauer H. Rapid detection of *Yersinia pestis* with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridisation probes. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003 Sep 22;38(2):117-26.

Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:3194-9.

Tseng SY, Macool D, Elliott V, Tice G, Jackson R, Barbour M, Amorese D. An homogeneous fluorescence polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella*. *Anal Biochem*. 1997 Feb 15;245(2):207-12.

Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*. 1996 Mar;14(3):303-8.

V

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005 Sep;29(3):151-9.

Velasco J, Marrodán T, Díaz R. Estudio comparativo entre el test Brucellacapt en el diagnóstico de la brucelosis humana. *Actas del VIII Congreso SEIMC*; Palma de Mallorca, 1998.

- Verger JM, Grimont F, Grimont PA, Grayon M. Brucella, a monoespecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:292-5.
- Verheggen I, Van Aerschot A, Van Meervekt L, Rozenski J, Wiebe L, Snoeck R, Andrei G, Balzarini J, Claes P, De Clercq E, Herdewijn P. Síntesis, biological evaluation, and structure análisis of a series of new 1,5-anhydrohexitol nucleosides. *J Med Chem*. 1995 Mar 3;38(5):826-36.
- Von Kanel T, Adolf F, Schneider M, Sanz J, Gallati S. Sample number and denaturation time are crucial for the accuracy of capillary-based LightCyclers. *Clin Chem*. 2007 Jul;53(7):1392-4.
- Vrioni G, Pappas G, Priavali E, Gartzonika C, Levidiotou S. An eternal microbe: Brucella DNA load persists for years after clinical cure. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun 15;46(12):e131-6.

W

- Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(1):113-130.
- Wemmer DE. Designed sequence-specific minor groove ligands. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2000;29:439-61
- Whalley SA, Brown D, Teo CG, Dusheiko GM, Saunders NA. Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the LyghtCycler. *J Clin Microbiol* 2001;39:1456-9.
- Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol*. 1999;17(8):804-7.
- Wiedermann G, Miescher PA, Franklin EC. Effect of mercaptoethanol on complement binding ability of human 7 S gammaglobulin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1963 Jul;113:609-13.
- Wilfert CM. Brucella. En: Zinsser, *Microbiología*. Joklik WK, Willet HP, Amos AB. 18 Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1986, p. 764-71.
- Wilhelm J, Hahn M, Pingoud A. Influence of DNA target melting behavior on real-time PCR quantification. *Clin Chem*. 2000 Nov;46(11):1738-43.
- Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*. 2003 Nov 7;4(11):1120-8.
- Wilkinson PC. Immunoglobulin patterns of antibodies against Brucella in man and animals. *J Immunol*. 1966 Mar;96(3):457-63.

- Wittwer CT, Fillmore GC, Hillyard DR. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. *Nucleic Acids Res.* 1989 Jun 12;17(11):4353-7.
- Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* 1997 Jan;22(1):176-81.
- Wittung P, Nielsen PE, Buchardt O, Egholm M, Norden B. DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid. *Nature* 1994;368: 561-563.
- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005 Jul;39(1):75-85.

Y

- Yagupsky P. Detection of Brucellae in blood cultures. *J Clin Microbiol.* 1999 Nov;37(11):3437-3442.
- Yagupsky P, Peled N, Riesenberk K, Banai M. Exposure of hospital personnel to *Brucella melitensis* and occurrence of laboratory-acquired disease in an endemic area. *Scand J Infect Dis.* 2000;32(1):31-5.
- Young EJ. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Rev Infect Dis.* 1991 May-Jun;13(3):359-72.
- Young E. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1995;21:283-9.
- Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics.* 2006 Feb 22;7:85.

Z

- Zeaiter Z, Fournier PE, Greub G, Raoult D. Diagnosis of Bartonella endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. *J Clin Microbiol.* 2003 Mar;41(3):919-25.
- Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol.* 2001 Apr;39(4):1661-4.
- Zeytinoğlu A, Turhan A, Altuğlu I, Bilgiç A, Abdoel TH, Smits HL. Comparison of *Brucella* immunoglobulin M and G flow assays with serum agglutination and 2-mercaptoethanol tests in the diagnosis of brucellosis. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(2):180-4.

Zinneman HH, Seal US, Hall WH. Some molecular characteristics of blocking antibodies in human brucellosis. Soluble antigen-antibody complexes. IX. J Immunol. 1964 Dec;93:993-1000.

Zhan Y, Cheers C. Endogenous Interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. Infect Immun 1995; 63(4): 387-9.

Zuna J, Muzikova K, Madzo J, Krejci O, Trka J. Temperature non-homogeneity in rapid airflow-based cyclers significantly affects real-time PCR. Biotechniques. 2002 Sep;33(3):508, 510, 512.

Páginas web

<http://www.microbiología.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO-10/Capitulo10.pdf>

<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/pdf%20solu/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>

<http://www.ksu.edu/research/animal/occhs/fact14.htm>

http://www2.uah.es/bioquimica/q-bp/11_contenidos.pdf

[http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~19-3-2006/Fluoresc-teorica5\(quenching\).pdf](http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~19-3-2006/Fluoresc-teorica5(quenching).pdf)

http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/Biofvirtual/Emi.pdf

I. ANEXOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMOS-PCR	PCR para detectar <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. ovis</i> y <i>B. suis</i>
AN	Ácido nucleico
anti-LPS	Anti-Lipopolisacárido
APC	Célula presentadora de antígenos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
16S ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico (subunidad 16S)
AT	Adenina-Timina
B.	<i>Brucella</i>
bcsp31	Proteína de membrana externa específica del género <i>Brucella</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bv.	Biovariedad
C	Complemento
células NK	Natural killer
CIEF	Contrainmunolectroforesis
CITA	Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria
Cols.	Colaboradores
Coombs	Coombs anti- <i>Brucella</i>
Ct	Threshold Cycle/Ciclo Umbral
°C	Grados centígrados
Da	Dalton
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
dNTP	Didesoxinucleótido trifosfato
D.O.	Densidad óptica
DPI3	Dihydrocyclopyrroloindole tripeptide/Dihidrociclopírrólindol tripéptido
dsADN	ADN de cadena doble
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDO	Enfermedad de declaración obligatoria
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay/ Enzimoimmunoensayo
EtBr	Bromuro de etidio
ETSIA	Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
f-aceptor	Fluoróforos aceptores
f-donador	Fluoróforo donador
FC	Fijación del complemento
fg	Fentogramos
FAM	6-carboxi-fluoresceína
FMN	Facultad de Medicina de Navarra
FM-UCLM	Facultad de Medicina de la Universidad de Castilla La-Mancha
FN	Falso negativo
FRET	Fluorescente Resonante Energy Transfer

FIS	Fondo de Investigación Sanitaria
GC	Guanina-Citosina
GMOs	Organismos modificados genéticamente
GMP	Guanosina 5' monofosfato
HeLa	
HN	Hapteno nativo
IDR	Inmunodifusión radial
IFN-γ	Interferón γ
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina A
IgM	Inmunoglobulina B
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
im	Intramuscular
INSDB	International Nucleotide Sequence Database
IPC	Internal Positive Control/Control positivo interno
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
KDa	KiloDalton
KDO	Ácido 3 deoxi-D-mano-2 octulosónico
LB	Medio Luria Broth
L-B	Linfocitos B
LCR	Líquido cefaloraquídeo
LED	Diodos emisores de luz
LNA	Locked Nucleic Acid
log	Logaritmo
LPS	Lipopolisacárido
LPS-R	Lipopolisacárido de cepas rugosas
LPS-S	Lipopolisacárido de cepas lisas
LTC	LT citotóxicos
LTH	Linfocitos T colaboradores o helper
M	Molar
M	Mujer
ME	Membrana externa
2-ME	2-Mercaptoetanol
MGB	Minor Groove Binders/ Surco menor del ADN
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	Minutos
ml	Mililitros
mols	Moléculas
n°	Número
ng	Nanogramos
NK	Células natural killer
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar

NTC	Negative Template Control
omp2 (gen)	Outer membrane proteins
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Open Read Frame/Fragmento de lectura abierta
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction/Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCRtr	PCR en tiempo real
PCRtrQ	PCR en tiempo real cuantitativa
pg	Picogramos
PM	Peso molecular
PME u OMPS	Proteínas de membrana externa
PMN	Polimorfonucleares
PNAs	Peptide Nucleic Acid/ Ácidos nucleicos peptídicos
PSO	Polisacárido O
r	Rango
RB	Rosa de Bengala
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SAT	Seroaglutinación en tubo o placa con pocillos
SD	Desviación estándar
SMI	Servicio de Medicina Interna
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
spp.	Especie
ssADN	ADN de cadena sencilla
ssPNA	PNAs de cadena sencilla
T^a	Temperatura
TAMRA	6-carboxi-tetrametil-rodamina
Taq polimerasa	Polimerasa de ADN de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA (Tampón de electroforesis)
Ttr-ABI Prism[®]	Termociclador ABI Prism [®] 7000 SDS de Applied Biosystems
Ttr-LightCycler[®]	Termociclador LightCycler [®] de Roche Diagnostic
Tm	Temperatura de melting
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
UEI	Unidad de Enfermedades Infecciosas
UV	Luz ultravioleta
V	Varón
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WB	Western blot
μg	Microgramo
μl	Microlitro
<	Menor

Figura 1.	Relaciones entre <i>Brucella</i> y las bacterias más importantes de la subdivisión α -2 de la Clase Proteobacteria.....	7
Figura 2.	Evolución de las tasas anuales de brucelosis en Castilla-La Mancha y en España entre los años 1971-2005.....	14
Figura 3.	Módulo propuesto por Pizarro-Cerdá y cols. del tráfico intracelular de <i>B. abortus</i> en células HeLa.....	15
Figura 4.	Representación esquemática de los principales eventos en la patogénesis de la brucelosis y la respuesta inmune del hospedador.....	18
Figura 5.	Algunas pruebas serológicas para el diagnóstico de la brucelosis humana.	29
Figura 6.	Número de publicaciones que aparecen en la base de datos MedLine que contienen la palabra “Real-Time PCR” en el título o en el resumen.....	30
Figura 7.	Reproducibilidad y precisión de la PCRtr.....	34
Figura 8.	Mecanismo de acción de los fluoróforos.....	35
Figura 9.	“Quenching”.....	36
Figura 10.	Fluorescencia.	37
Figura 11.	El espectro de emisión y absorción de los dos fluoróforos deben solapar para que se dé la transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia.....	37
Figura 12.	Mecanismos de acción del SYBR [®] Green I.....	39
Figura 13.	Análisis de las curvas de disociación	40
Figura 14.	Detección de mutaciones puntuales (SNPs) mediante PCRtr.....	40
Figura 15.	Sondas de hidrólisis.....	42
Figura 16.	Sondas adyacentes.....	43
Figura 17.	Estructura de una sonda Molecular Beacon.....	44
Figura 18.	Estructura de una sonda Scorpions.....	45
Figura 19.	Mecanismo de una sonda Scorpions.....	46
Figura 20.	Mecanismo de acción de una sonda “Sunrise [™] primers”.....	47
Figura 21.	Aumento de la señal de un cebador fluorogénico.....	48
Figura 22.	Sondas con MGB.....	49
Figura 23.	Mecanismos de acción de una sonda TaqMan MGB.....	50
Figura 24.	Estructura y mecanismo de acción de las sondas Pleiades MGB.....	51
Figura 25.	Sonda Eclipse MGB.....	51
Figura 26.	Comparación de la estructura de un PNA y ADN.....	53
Figura 27.	Estructura de un monómero LNA [®]	54
Figura 28.	Hardware de una PCRtr.....	56
Figura 29.	Resultados de una PCRtr.....	57
Figura 30.	Representación de las curvas de amplificación.....	59
Figura 31.	Curva de amplificación y curva estándar	60
Figura 32.	Ejemplo de una curva de calibración de cuantificación absoluta.....	62
Figura 33.	Ejemplo de una curva de calibración de cuantificación relativa.....	65
Figura 34.	Determinación de mutaciones puntuales, fenotipo salvaje y mutado, mediante análisis de curvas de disociación	66
Figura 35.	Curva de calibración del ensayo de PCRtrQ con sonda TaqMan.....	88
Figura 36.	Esquema de los cambios que se han producido en la metodología de este estudio.	93
Figura 37.	Representación gráfica de la localización de los cebadores EFQ1/ERQ2 y de la sonda STqME.....	95

Figura 38.	Resultados de la PCRtr para optimizar la concentración de MgCl ₂ en el Ttr-ABI Prism®	96
Figura 39.	Sensibilidad de la PCRtrQ para detectar ADN de <i>B. melitensis</i> en presencia de ADN genómico humano, en el Ttr- ABI Prism®	97
Figura 40.	Resultados de las PCRtrs para optimizar las concentraciones de cebadores (A), sonda (B) en el Ttr-LightCycler®	98
Figura 41.	Sensibilidad de la PCRtrQ para detectar ADN de <i>B. melitensis</i> en presencia de ADN genómico humano.....	99
Figura 42.	PCRtrQ negativa de <i>B. abortus</i> , cepas RB51 y 870; <i>B. suis</i> , cepa 1330; <i>B. neotomae</i> , cepa 5K33 y <i>Ochobractrum anthropi</i> , se muestra el detector para <i>Brucella</i>	101
Figura 43.	PCRtrQ de algunas bacterias relacionadas genéticamente y antígenicamente con el género <i>Brucella</i> , se muestra el detector para <i>Brucella</i>	102
Figura 44.	PCRtrQ de <i>B. abortus</i> , cepas RB51 y 870; <i>B. suis</i> , cepa 1330; <i>B. neotomae</i> , cepa 5K33 y <i>Ochobractrum anthropi</i> , se muestra el detector para IPC.....	102
Figura 45.	PCRtrQ de algunas bacterias relacionadas genéticamente y antígenicamente con el género <i>Brucella</i>	103
Figura 46.	PCRtrQ de siete diluciones seriadas, desde 250ng hasta 25fg, de ADN de <i>B. melitensis</i> (Rev1) en el Ttr-ABI Prism®	104
Figura 47.	PCRtrQ de siete diluciones seriadas, desde 150ng hasta 15fg, de ADN de <i>B. melitensis</i> (Rev1) en el Ttr-LightCycler®.....	104
Figura 48.	Electroforesis en gel de agarosa correspondiente a la amplificación por PCR estándar del ADN de <i>B. melitensis</i> y <i>B. abortus</i> con los cebadores EFQ1/ERQ2.....	105
Figura 49.	Colonias transformadas de <i>E. coli</i> con el inserto de 251 pb de <i>B. melitensis</i> , colonias blancas.....	105
Figura 50.	PCRs de colonias.....	106
Figura 51.	Amplificación de diluciones seriadas del estándar para la construcción de la curva estándar en el Ttr-ABI Prism®	107
Figura 52.	Amplificación de diluciones seriadas del estándar para la construcción de la curva estándar en el Ttr-LightCycler®.....	108
Figura 53.	PCRtrQ en la que se muestra la correlación del número de copias de nuestro estándar y la concentración de ADN de <i>Brucella</i>	109
Figura 54.	Reproducibilidad intra-ensayo.....	110
Figura 55.	Especificidad clínica de la PCRtrQ.....	112
Figura 56.	PCRtrQ de la muestra de un paciente.....	117
Figura 57.	Fotografía de la contraelectroforesis.....	121

Tabla 1.	Especies que integran el género <i>Brucella</i> , hospedadores conocidos y características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades.....	10
Tabla 2.	Mecanismos de transmisión de la brucelosis.....	12
Tabla 3.	Clases de Ig y antígenos de los principales tests serológicos para el diagnóstico de la brucelosis humana.....	21
Tabla 4.	Fluoróforos donadores y aceptores más utilizados.....	36
Tabla 5.	Sistemas para monitorizar la fluorescencia del ADN amplificado mediante PCRtr.....	38
Tabla 6.	Sondas MGB.....	49
Tabla 7.	Aumento en la T_m de los oligonucleótidos que llevan monómeros de LNA.....	54
Tabla 8.	Equipos para PCR en tiempo real.....	58
Tabla 9.	Características de los métodos de cuantificación relativa.....	63
Tabla 10.	Especies y cepas bacterianas testadas en este estudio.....	75
Tabla 11.	Criterios para diseñar los cebadores y la sonda.....	94
Tabla 12.	Secuencias, temperaturas de melting (T_m), %GC y tamaños (pb) de los cebadores y sonda diseñados.	94
Tabla 13.	Especies y cepas bacterianas analizadas en este estudio.....	100
Tabla 14.	Reproducibilidad inter- e intra-ensayo de la PCRtrQ del estándar de <i>B. melitensis</i> en el Ttr-LightCycler®.....	111
Tabla 15.	Características clínicas de los 17 pacientes incluidos en este estudio en el momento del diagnóstico.....	113
Tabla 16.	Características clínicas en el momento de la recidiva.....	114
Tabla 17.	Tratamiento de los 17 pacientes en el episodio inicial de brucelosis.....	114
Tabla 18.	Resultados de los hemocultivos, RB, SAT, test de Coombs y PCRtrQ en muestras de sangre del grupo de pacientes que no recidivó.....	115
Tabla 19.	Resultados de los hemocultivos, RB, SAT, test de Coombs y PCRtrQ en muestras de sangre del grupo de pacientes que recidivó.....	118
Tabla 20.	Sensibilidad de los distintos tests diagnósticos.....	120
Tabla 21.	Resultados de las pruebas serológicas del suero del paciente nº 17.....	121



PubMed | Nucleotide | Protein | Genome | Structure | PopSet | Taxonomy | OMIM | Books

1: AE009555. Brucella melitensis...[gi:17983127] Protein, Taxonomy

LOCUS AE009555 10607 bp DNA linear BCT 28-DEC-2001
 DEFINITION *Brucella melitensis* strain 16M chromosome I, section 112 of 195 of the complete sequence.

ACCESSION AE009555 AE008917
 VERSION AE009555.1 GI:17983127

KEYWORDS
 SOURCE *Brucella melitensis*.

ORGANISM [Brucella melitensis](#)
 Bacteria; Proteobacteria; alpha subdivision; Rhizobiaceae group; Brucellaceae; *Brucella*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 10607)
 AUTHORS DelVecchio,V.G., Kapatral,V., Redkar,R.J., Patra,G., Mujer,C., Los,T., Ivanova,N., Anderson,I., Bhattacharyya,A., Lykidis,A., Reznik,G., Jablonski,L., Larsen,N., D'Souza,M., Bernal,A., Mazur,M., Goltsman,E., Selkov,E., Elzer,P.H., Hagius,S., O'Callaghan,D., Letesson,J.-J., Haselkorn,R., Kyrpides,N. and Overbeek,R.
 TITLE The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*

JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (1), 443-448 (2002)
 PUBMED [11756688](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 10607)
 AUTHORS O'Callaghan,D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (13-NOV-2001) Faculte de Medecine, INSERM U431, Avenue Kennedy, Nimes 30900, France

REFERENCE 3 (bases 1 to 10607)
 AUTHORS Elzer,P.H. and Hagius,S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (13-NOV-2001) Department of Veterinary Science, LSU Ag Center, 111 Dalrymple Building, Baton Rouge, LA 70803, USA

REFERENCE 4 (bases 1 to 10607)
 AUTHORS Kapatral,V., Los,T., Ivanova,N., Anderson,I., Bhattacharyya,A., Lykidis,A., Reznik,G., Jablonski,L., Larsen,N., D'Souza,M., Bernal,A., Mazur,M., Goltsman,E., Selkov,E., Haselkorn,R., Kyrpides,N. and Overbeek,R.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (13-NOV-2001) Integrated Genomics, Inc., 2201 W. Campbell Park Drive, IL 60612, USA

REFERENCE 5 (bases 1 to 10607)
 AUTHORS DelVecchio,V.G., Redkar,R.J., Patra,G. and Mujer,C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (13-NOV-2001) Institute of Molecular Biology and Medicine, University of Scranton, Scranton, PA 18510, USA

REFERENCE 6 (bases 1 to 10607)
 AUTHORS Letesson,J.-J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (13-NOV-2001) Unite de Recherche en Biologie Moleculaire, Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, Universite of Namur, 61 rue de Bruxelles, Namur 5000, Belgium

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..10607
 /organism="Brucella melitensis"
 /strain="16M"
 /db_xref="taxon:29459"
 /chromosome="I"
[gene](#) complement(78..2162)
 /gene="BMEI1152"
[CDS](#) complement(78..2162)
 /gene="BMEI1152"
 /EC_number="1.6.5.3"
 /codon_start=1

```

/transl_table=11
/product="NADH-QUINONE OXIDOREDUCTASE CHAIN G"
/protein_id="AAL52333.1"
/db_xref="GI:17983128"
/translation="MAKIKVDGTEIEVDPDHYTLQAAEAAGAEVPRFCFHERLSIAGN
CRMCLVEVKGGPPKPAASCAMGVRDLRPGPNGEAPEIFTNTPMVKKAREGVMEFLLIN
HPLDCPICDQGGECDLQDQAMAFGTDGSRFRENKRAVENKYIGPLVKVTMTRCIHCTR
CVRFTTEVAGISELGLIGGEDAEITTYLERAMTSELQGNVIDLCPVGALTSRPFYAFQ
ARPWELNKTTETIDVVDAVGSNIRVDTRGREVMRIMPRVNEQVNEEWISDKTRFIWDGL
RTQRLDRPYVRKDGRLVAATWPEAFAAIAAKVSATSAAEKIGAVAGDLASVEEIIYALKG
LMTALGTANIDCRQDGAALDPALGRATYLFNSTIEGIENADALLIGSNPRIEAAVLN
ARIRKRQRMGHFPVALIGEQAELRYDYEYLGSSAETLGQLASGRHAFRDVLAKAERPL
IIIGQALTGEDGRAVLSTAAKLAQDVGAIKDDWNGFSVLHTAASRVGALDLGFVPGE
GGKAARDMLGNLDVVFLGADELDMMAKSSSFVVYIGTHGDAGAAHADVILPGAAYTE
KSGTWNLTEGRVQLGNRAGFAPGEAKEDWAILRALSDSLGKRLPFDSLQQLRAKLYAD
YPHMLAIDTITPRSADDLVALAGKASNPGNAAFVSPVKDFYLTNPIARASAVMAECS
ALAAGGFQQAAE"
gene complement (2297..3604)
/ gene="BMEI1153"
CDS complement (2297..3604)
/ gene="BMEI1153"
/EC_number="1.6.5.3"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="NADH-QUINONE OXIDOREDUCTASE CHAIN F"
/protein_id="AAL52334.1"
/db_xref="GI:17983129"
/translation="MLADKDRIFTNIYGFKDQSLKGAMARGHWDNTKGLIEKGRDWII
EEMKASGLRGRGGAGFPTGLKWSFMPKQSDGRPHYLNVNADESEPGTCKDREILRHDP
HTLIEGCVIAGCAMGVHTAYIYIRGEFMREREALQAAIDECYEAGLLKNNKCGWMDM
IYVTHGAGAYICGEETALLESELEGKKGQPRLKPPFPANMGLYGCPPTVNNVESIAVAP
TILRRGAAWFSSIGRPNNVGTKLFQMSGHVNTPCVVEEGLGIPFRELIEKHGGGIRGG
WDNLLAVIPGGASCPVKAEDMMDAVMDFDGMREKKSFGTGGLIVMDKSTDIKAIAR
LSAFFKHESCGQCTPCREGTGMMWRVMERMVKGNAQKREIDMLFDVTKQIEGHTICA
LGDAAAWPIQGLIRNFRPEIEKRIDEYTRNAVQSRNIRLEAAE"
gene complement (3608..4321)
/ gene="BMEI1154"
CDS complement (3608..4321)
/ gene="BMEI1154"
/EC_number="1.6.5.3"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="NADH-QUINONE OXIDOREDUCTASE CHAIN E"
/protein_id="AAL52335.1"
/db_xref="GI:17983130"
/translation="MSVRRLLADDAVQPATFAFNAENEAWAHKTIKYPEGRQOSAVIP
LLMRAQEQEGWVTKASIEYVAAMLNMPILIRVLEVATFYTQFQLKPVGSAHIVQCGTT
PCMLRGSEALMDVCRHKIHHDPFELNADGTLSEWEEVECQGACANAPMVMIFKDAYEDL
TPERLAEIIDAFAEAGKGDITKPGPQDGRVTSEPASGLTALTEDLDYKKGIGLETRKASD
AAAAKAKAEAEAATKDGNR"
gene complement (4321..5511)
/ gene="BMEI1155"
CDS complement (4321..5511)
/ gene="BMEI1155"
/EC_number="1.6.5.3"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="NADH-QUINONE OXIDOREDUCTASE CHAIN D"
/protein_id="AAL52336.1"
/db_xref="GI:17983131"
/translation="MAETQVRNFNINFGPQHAAHGVLRLVLELDGEVVERVDPHIGL
LHRGTEKLMEAKTYLQAVPYLDRLDYVAPMNQEHAYALAVERRLLDIEVPKRGQLIRVL
YSEIGRIINHLNVTQAMDVGALTPPLWGFEEEREKLMVYERACGARMHAAAYFRPGG
VHQDLDPQLIEDIGKVIDPFFTTLKNLDDLI TPNRIFKQRNVDIGVVKLEDAWAWGFS
GVMVRGSGAAWDLRKSQPYECYSEMEFDIPVGKNGDCYDRYLIRMEEMRQSVRIMRQC
VDLLLGERVGPVSNTHKIVPPKRGEMKRSMEALIHFKLYTEGYHVPAGEVYAAVE
APKGEFGVYLVSDGSNKPYRCKLRAPGFAHLQAMDFLCRGHMLADVSAIILGSLDIVFG
EVDR"

```

[gene](#) complement (5529..6137)
 /gene="BMEI1156"
[CDS](#) complement (5529..6137)
 /gene="BMEI1156"
 /EC_number="1.6.5.3"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="NADH-QUINONE OXIDOREDUCTASE CHAIN C"
 /protein_id="AAL52337.1"
 /db_xref="GI:17983132"
 /translation="MSEELGELSGYIRERLGDALIEEANLAYGELTLCVPPVASLIGVLTFLRDDVQCQFVNLTDISGVDYPQREKRFVQVYQLLSRPNQRIRVKVQADEDTLVPSAVPVFFGAEWYEREAYDMYGILFSGHPDLRRLTDYGFEGHPLRKDFPLTGFVEVRYNDELKRVVYEPVQLRQEFRNFDLSPWEGTDYVLPGDEKAKTN"

[gene](#) complement (6250..6852)
 /gene="BMEI1157"
[CDS](#) complement (6250..6852)
 /gene="BMEI1157"
 /EC_number="1.6.5.3"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="NADH-QUINONE OXIDOREDUCTASE CHAIN B"
 /protein_id="AAL52338.1"
 /db_xref="GI:17983133"
 /translation="MEEGGAGMGLTGTNTTLVAPQPKGILDPRGTGKPVGSDDAFFNDLNGELSDKGFIVTSADALITWARTGSLMWMTFGLACCAVEMMHISMPTYDAERFGIAPRASPRQSDVMIVAGTLTNKMAPALRKVYDQMPEPRYVISMGSCANGGGYYHYSYSVVRGCDRVVPVDIYVPGCPPTAEALLYGILLQKIRRTGTIER"

[gene](#) complement (6822..7187)
 /gene="BMEI1158"
[CDS](#) complement (6822..7187)
 /gene="BMEI1158"
 /EC_number="1.6.5.3"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="NADH-QUINONE OXIDOREDUCTASE CHAIN A"
 /protein_id="AAL52339.1"
 /db_xref="GI:17983134"
 /translation="MNELLSSYLPIVIFLGVVAIVIGAALLVAPFLVAYRQPDPEKLSAYECGFNAFDDARMKFDIRFYLVSIILFIIFDLEVAFLFPWAVSFGQIGWFGFLSMMVFLGVLTI GF IYEWKKGALWD"

[gene](#) 7695..7898
 /gene="BMEI1159"
[CDS](#) 7695..7898
 /gene="BMEI1159"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="Hypothetical Protein"
 /protein_id="AAL52340.1"
 /db_xref="GI:17983135"
 /translation="MGSKLGMEKRRHPGTREDMPSAHAAPFYALILCGRIEGRSRMVQLLLASGDYLVIGAIILSVVYLS"

[tRNA](#) complement (8011..8087)
 /product="tRNA-Asp"
[tRNA](#) 8498..8573
 /product="tRNA-Val"

[gene](#) 8762..9163
 /gene="BMEI1160"
[CDS](#) 8762..9163
 /gene="BMEI1160"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="Hypothetical Protein"
 /protein_id="AAL52341.1"
 /db_xref="GI:17983136"
 /translation="MKKLFILAAGMMLAGCITDAGKLEDRIAAQRAPSPAIKQLIINEARNILLDPYSVRDVSISLIPNLKSSNNDGFICVRFNAKNSYGAYTGLKTVGTNVISGRLLGYFTNPAICAYPTVKWHPLPEVSQLRKL"

[gene](#) complement (9609..9983)
 /gene="BMEI1161"
[CDS](#) complement (9609..9983)
 /gene="BMEI1161"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="Hypothetical Protein"
 /protein_id="AAL52342.1"
 /db_xref="GI:17983137"
 /translation="MPKVIKVVDDYQIVINRGSESGITLGSRFLIFGGGEELRDPDTG
 ENLGMLEIVRGKAKVVHVQAKMSTLDSDEYSVTPGKKRVIKRQGGVWSFSGQAGTEEV
 TEGEERHKTELEATVGDYARPI"
[gene](#) complement (10001..10510)
 /gene="BMEI1162"
[CDS](#) complement (10001..10510)
 /gene="BMEI1162"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="Hypothetical Protein"
 /protein_id="AAL52343.1"
 /db_xref="GI:17983138"
 /translation="MNLEIVRKTVLRHARALAAAILATVTAIIAIVIGWWQGEDWRVSY
 NLAIVNGVYWILLLYLLWIIILSRNTPDFLGVPLVKAIHDKKLLIVDGAPWLSIGVMTA
 IYVKDGEYERLVCTGEVNVNQTNKLVQIHIRGYEEIYNDIEAVGEKLNQTSKDAILIR
 PGLFRGLDE"

BASE COUNT 2357 a 3095 c 2834 g 2321 t
 ORIGIN

```

1 ccgacttcag cgctatgata agcgcgggca agacgtaagc tgcaaaaatt ccttccattg
61 ttccgtctct ctctcgctta ctcagctgcc tgttgggaagc cgccgggccgc gagcggccag
121 cattcggcca tgacggcgga agcgcgcgagc attgggttcg tcaggtagaa gtccttgacc
181 ggggaaacga acgcagcgcc gttgcccgga ttggatgctt tccccgcag cgcgacaaga
241 tcgtcggcgg aacgaggcgt aatgggtgctg atggccagca tatgccgata gtccgcatag
301 agtttggcgc gaagctgctg caacgaatcg aacggcaggc gcttgcccag gctgtcggaa
361 agagcgcgca ggattgcca gtcttccttc gcctcgcctg gtgcaaaacc ggcacggttg
421 ccaagctgca cgcgaccttc ggtggtgagc caggtgcccg acttttccgt ataggcggcc
481 cccggcagga taacgtcggc ggcatgtgca ccggcatcgc catgctgctc gatgtaaacg
541 acgaagctcg aactcttggc catcatgtcg agttcgtctg caccgagcgc gaacacgaca
601 tcgagattgc ccagcatgtc gcgcgctgcc ttgccgccct cgcccggcac aaagccgagg
661 tccagagcgc caacgcgcga agcagcggtg tgcagaacgg agaagccgtt ccagtcgtcc
721 ttgatcgcgc cgacgtcctg agcgagtttg gcggcgggtg acagaaccgc acggccgtct
781 tcgccggtga gcgcaccctg accgatgata atcagcggac gttcggcctt ggccagcacg
841 tcacggaagg cgtgtctgcc ggaagccagc tggccaagcg tttcagcact gctaccacga
901 tattcgtaat cgtaacgcag ttcagcctgt tcgccgatca gggcgaccgc gaaatggccc
961 atgcgctggc gcttgcgat acggcgcttc aggactgcgg cctcgatgcy cggattggaa
1021 ccgatgatga gcaaagcatc agcgttttca ataccttcaa tcgtagaatt gaaaagatag
1081 gttgcgcggc ccagtgccgg atcgagagcg gcgccatcct ggcggaatc gatattggcg
1141 gtgccgagcg cagtcacag gcccttcagc gcatagattt cttcaaccga agccagatcg
1201 cctgcaacag cgccgatctt ttcagccgag gttgcccga ccttgccgyc aatggcagca
1261 aaggcttccg gccagggtgc ggcaaccaga cggccatcct tgccggacata aggacggtcg
1321 aggcgctggg tgcgcaggcc atcccagatg aaacgggtct tgtccgaaat ccactctcgc
1381 ttcacctggt cgttgacgcy cggcatgatg cgcatacctt caccggccag ggtgtcaacg
1441 cggatggttg aaccgaccgc atccaccagc tcgatggttt cggctctgtt cagttccac
1501 ggacgcgcct ggaaagcata aggacgcgag gtcagagccc caaccgggca aagatcaatg
1561 acgttgccct gcaattccga cgtcatggcy cgttcgagat aggtggtgat ttcggcgtct
1621 tcgccgcygc cgatgaggcc cagttccgaa atgcccgcga cttccgctgt gaagcggagc
1681 cagcgcgtgc agtgaatgca gcgcgtatc accgtcttga cgagcgggcc gatataattg
1741 ttttcaacag cacgcttgtt ttcacggaag cgcgagccat ccgtgcccga agccattgcc
1801 tgatcctgca agtcgcactc gccgccctga tcgcagatcg ggcaatccag cgggtggttg
1861 atgagcagga attccatcac gccttcgcyg gccttcttga ccatcggcgt attggtgaag
1921 atttcaggtg cttcgccatt cgggcccggga cgcagatcgc gcacgccc atacacggca gtttccgcyg
1981 gccgccggtc tcggcgggcy gcccttccat tcaaccagcy acatacggca gtttccgcyg
2041 atggaaagcc gttcgtggaa acagaaacgt ggcacttccg cgcccgcgc ttcggcagcc
2101 tgaaggagcy tatagtatc gggatctcgc atctctgtgc cgtcaacctt gatctttgcy
2161 atcgcttatc caaacctgcy gctcatgcyg catcttccat ctcaaacctt tgtacctgcy
2221 cttgattgcy atggcctttt ccgaaaaccg ccaggcactt ttcggggtca tgcctgtcgc
2281 ggcaggctca cacaacttat tcagccgctt ccagacggat attacggctc tgaacggcgt
2341 tgcgagtata ttcataaatg cgttttcaa tttccggagc gaaattgcyg atcagcccct
2401 ggatcggcca tgcggccgca tcaccgagcy cgcagatcgt gtgaccttcg atctgcttgg

```

2461 tgacgtcgaa cagcatgtcg atttcacgct tctgcgcggt acccttgacc atgcgctcca
2521 tcacgcgcca catccagcca gtgccttcgc ggcacggcgt gcaactggcg cagctctcat
2581 gcttgaagaa ggcagacagg cgcgcaatcg ccttgatgat gtccggtggc ttgtccatga
2641 cgatcaagcc gccgggtccg aaggacgact tcttctcacy catgccatca aaatcatga
2701 gggcgcccat catgtccctg gecttgatga ccgggacaga cgcgcccgcg ggaatgaccg
2761 ccagcagatt gtcccagccg ccacggatac cgcgcccatt cttttcgatc agctcgcgga
2821 acggaatgcc gagcccctct tccacgacgc acggcgtggt cacatggccg gacatctgga
2881 acagcttggt gccgacattg ttcggacgtc cgatggacga gaacctatgc gcgccacgac
2941 gcaggatcgt cggcgcaacg gcaatcgatt ccacgttggt gaccgtcgtc gggcaaccgt
3001 agaggcccat attggccggg aatggaggct tgaggcgcgg ctgacccttc ttgccttca
3061 agctttcgag cagagccgtt tcttcaccgc agatataagc gccagcgcg ggggtgacat
3121 aaatgtccat atcccagccg cacttggtgt tcttgccgag aaggccggct tcgtagcact
3181 cgtcgattgc agcctgaagc gcctcacgct cagcctgaa ctcgccgcga atataaatat
3241 aagcgggtgt tacgccatc gcgcaaccgg caatcacgca gccttcgatc agcgtatgcy
3301 gatcgtggcg caggatctcg cggtccttgc aggtgcccgg ctccgattcg tcggcattga
3361 cgacgaggta atgcccggca ccatcgctct gcttgggcat gaacgacctt ttgagaccgg
3421 tcgggaagcc agcgcgcgca cggccacgca ggcgcgacgc cttcatctcc tcgatgatcc
3481 agtcgcggcc cttctcgatc aggccttgg tattgtcca atggccacg caagtcgac
3541 ccttcaggga ctgatccttg aagccgtaaa tattggtgaa gatgcgatct ttgtcagcca
3601 gcatgtctca cctgtttccg tcttttgttg ctgcctcggc ttcggcctta gctttagctg
3661 ctgctgcatc cgacgccttg cgggtttcga ggccgatctt cttgtagtcc agatcctcgg
3721 taagcgcggt caggccgctg gccggttccg acgtcacacg gccatcctgc gggccgggct
3781 tgatcgtgct gcccttgctt gcctcaaaag catcgatgat ttcagccagg cgttccggcg
3841 tcaggtcttc ataggcgtcc ttgaagatca tgaccatcgy cgcgttggcg caagcgcct
3901 gacattccac ctcttccac gacagcgtgc cgtcggcatt cagctcgaac gggtcatggt
3961 ggattttgtg acggcaaaca tccatcaaag cctctgaacc gcgcaacatg caggggcgtg
4021 tgccgcaaac ctgaaatgta gcgcgcgagc caaccggctt caactggaac tgcgtataga
4081 aggttgccac ttccagaacg cggatcagcg gcatgttgag catggcgcg acatattcga
4141 tcgacgcttt cgtaaccag ccttccgtt cctgcgcacg catgagcagc ggaatgacag
4201 ccgactgctg acggccttcc ggatatttg cgatcgtctt ggtgcccay gcctcattt
4261 ccgcgttaaa cgcgaaagt gctggctgga cggcatcctc tgcgagacgy cgaaccgaca
4321 tcagcgggtca acctaccaa acacgatatc aagcagacca agaattgccc aaacgtcggc
4381 cagcatgtgg ccccgcaaa ggaaatccat ggcttgaaga tgggcaaagc ccggagcgcg
4441 cagcttgca gataaaggct tggtggagcc atccgaaacc agatagacgc caaactcgc
4501 ctccggggct tccactgccc cataaacttc accggcagc acgtggtagc cttccgtgta
4561 aagcttgaag tgatggatga ggccttccat cgagcgttc atctcgcgc gcttgggcyg
4621 cagcaatctg tgatccgtat tggaaacggg gccgacacgc tccttgccc caagcagatc
4681 aacgcactgy ccatgatata gcaccactg gcgcatttct tccatgcgga tcagatagc
4741 atcatagcaa tcgcccgttct tgccgaccgg aatgtcgaat tccatctcgc tatagcactc
4801 gtagggctgc gacttgcgca gatcccatgc agcgcggaa ccgcaacca tgacgcggga
4861 gaagcccat gcccatgcyt cttccagctt cacaacgcgg atatcgacgt tacgctgctt
4921 gaaaatgcgg ttccggcgtga tgagatcctc gagattcttc aacgtcgtga agaatggatc
4981 gatccatttg ccgatatctt cgatcaactg gtccggcagg tcctggtgaa caccgcccgg
5041 acggaatag gctgcgtgca tacgcgcgcc gcaggcgcgc tcataaaaca ccatcagctt
5101 ttcacgctcc tcgaagcccc aaagcggcgg cgtcagcgcg ccgacgtcca tggcctcgt
5161 ggtcacgttg agaaggtggt tcaggatac gccgatttcc gaatagagaa cgcggattag
5221 ctggccgcgc ttcggcactt cgatatccag aagacgttcg acggcaagcy cataggcatg
5281 ttcttgattc atcggcgcca catagtcgag gcggtcgaga taaggcaag cctgaagata
5341 ggtcttggtt tccatcagct tttcgggtgc gcgatgcagc agaccgatat gcggatcgac
5401 gcgctcgacc acttcgcyt caagctccag caccagacgc aacacgcctt gcgcygcyg
5461 atgctgcggg ccgaagttga tattgaaatt gcggacctga gtctcagcca tgttcagctt
5521 cctgtcgtct agttcgtctt tgctttctca tcaccgggca gaacgtaatc cgttcttcc
5581 cagggcgaga gaaaatcgaa attgcyggaat tcctggcgca actgcacagc ctcgtaaaca
5641 acgcgcttca gttcgtcgtt ataacgaacc tcgacgaaac cggtgagcgg gaagtccttg
5701 cgcagcggat ggccctcaaa gccatagctc gtcaggatgc ggcgcaagtc cggatggcca
5761 gagaacagaa tgccgtacat atcgtaggcc tcgcgctcat accattccgc gccgaagaag
5821 accggaacgy cagacggcac cagcgtatct tcgtccgctt gaacctgac gcggatcgc
5881 tggttctggy cgggagacag aagctggtag acgacatcga agcgttttc gcgctcggga
5941 taatcgacgc ctgaaatata ggtcagattg acgaaactgg actgcacatc gtcacgcagg
6001 aaagtcaaaa cgcgatgag gctcgcacc ggcacgcaaa gcgtcagttc gccataagcc
6061 agattcgcct cttcgatcgc gtcgccgaga cgttccctga tatagccgga aagttaccg
6121 agagcttctt cgtcatttt ctaacttctt tctttagaac tcatgcgcc tgctttgttt
6181 tgggagggcc ttgcygggca gcagcagaac cctaacaat ttagtgtgcy caaacggcyg
6241 aaagccggat caacgctcga tcgtgcggt gcgacgtatc ttcttctgga gaagcagat
6301 accgtaaagc agcgcctccg cagttggcgg gcagcccggc acgtaaatat cgcaccggaac
6361 cagcgatca cagccacgca ccaccagta ggaatagtgg tagtagccgc gcctattggc
6421 gcaggagccc atagaaatca cataacgcgg ctctggcatc tggtcgtaga ccttgcgag
6481 agcgggcycc atcttggttg tcagcgtgcc ggcaacgatc atcacgtcgg actgacgcgg

6541 tgagggcgcg ggcgcaatgc cgaagcgttc ggcacatcgtag cgcggcatgg aaatgtgcat
6601 catttccacc gcgcagcatg ccagaccgaa ggtcatccac atcagcagc cgggtgcgcg
6661 ccaggtaatc agggcatcgg ccgatgtaac gatgaagccc ttatcggaaa gctcgcggt
6721 cagatcattg aaaaatgcat cgtccgatcc gcagggcctg cccgtgcgcg ggtcagaat
6781 gcctttcggc tgcgggcaaa cgagcgttgt attggtgccc gtcaatccca ttccagcgc
6841 cccttcttcc attcatagat gaagccgatg gtcagaacgc caaggaacac catcatggac
6901 aggaagccga accagccgat ctggccgaaa gaaacggccc acgggaacag gaagggcact
6961 tcgaggtcga agatgatgaa gagaatcgac accagataga aacggatgtc gaacttcata
7021 cgggctcat caaacgcatt gaagccgcac tcgtaagcag aaagcttttc cgggtcgggc
7081 tgtctgtagg cgacaagaaa cggcgcaacc agaaggctg caccaattac aatcgcgacg
7141 ccaagaaaga tgacgatcgg caggtaagaa cttaaaagct cgttcaggt atttatccg
7201 gcttgaatac gaggctgcgc gcgatgcat aagctttttg aagctgacga ccatgcgaca
7261 cattgcatct attgcaacct cgtcgcccca agcagcttca aaaggcatgc cgtgcgaact
7321 aagcgtttt cgccgggacg gttatcgag cacgtgcgcg agcgaaccc ctccggcact
7381 ttctattggg caaagtacag ccaagatgct taataaggca tggcatcaag gccgcttct
7441 ccatccaaac ccctatatac atgaaaagat cataatctcg tgaggaaaag tcgcacacct
7501 ctccacgag cggcaaccgc ggcagggaat caatcaccac agatgcgga gggcgtcac
7561 gaggcttcat ccccctgcc gccacctcca tggagcgaca gattctacag atttatctg
7621 gagcaatcgc tgatcgcgca acgcggcgac caagcggacg gaataatctc aggcagcga
7681 aaattccggt cgcgatgggt tccaaacttg gaatggaaaa acggagacac cccggcacac
7741 gcgaagacat gccttcagct cacgcggcct ttccctatta tgcattaata ttgtgtgga
7801 ggatcgaagg gaggtctcgc atggtccaac ttcttctcgc cagcggcgac tatctggtga
7861 tcggcgcgat catcctgtcc gtctctatc tgtcctgacg gtttgcccga tcatgctggg
7921 cagcaatctt tcaccagaat aattataaag agaaaaggcg gctggcgcca ctttctgtt
7981 aacagcattt tttgattgtt gaatggaaaa tggcgcgagt gacggggctc gaaccgcga
8041 cctccggcgt gacaggccgg cactctaacc aactgagcta caccgcgca ttttcaagg
8101 caaaccttcc ggaagccctg caccggcgtt tccgctcggc gtgtccggtc gtttaagtgg
8161 ttcgcccggg agtgtcaagc gaccgccatg aagaaacgat aagaatcttc cttttacct
8221 aaaactgttg ttttttcagg acttttggga actgaccatt atcaacagga tatcaggcat
8281 cattatcttg agtgaattc aatcgtccgc acgcgtgat tcaaaactat atcaatgaag
8341 tatggcaaa tgccgcaatg aagatgcgaa cgaacgatcc cgaagccc gcgcgcatg
8401 aaaatagttt caccgattaa gttttccggt aatcttccg cttgcaactg cgacacgaat
8461 tgcataaacg gctctcacag tgactggtga aacagtcggg cgattagctc agttggtaga
8521 gcgcttcggt tacaccgaag atgtcgggag ttcgagctc tcatcgcca ccatctatc
8581 ctatagaaat catcatagaa tttcgtttct gcgatgtaaa ttgtgtaaca attatgtgtg
8641 aatcacatgt gtagcagata agagcctgcg cccgtgggta actccatac cctcattct
8701 gacagccgat tcccgcgat gtgattgtgc cgtgggctaa tattcgactt ggggagtac
8761 catgaaaaag ctgtttattt tggccgctgg gatgatgctg gctggctgca ttaactgtc
8821 tggaaaactg gaagatcgga ttgcccctca aagagcgcct tcaccggcca taaagcaact
8881 catcatcaat gaggcgcgga atatcctgct cgatccatat tcggtcggc atgtctcgat
8941 ttcattccct attccgaatc tgaaaagctc caataatgat gggttcatat gcgtccgct
9001 caatgcaaa aatagctatg gcgcttatac ggggtctaaa acggtcggaa caaacgtcat
9061 tagtggcgg ctacttggat attttaccac tccagccata tgcgcatac ctaccgtgaa
9121 gtggcaccoc ttgcccgaag tttcgcaact gcgcaaaact tgacaggggc aaatcaaaa
9181 gccgcctac atgacgggct ttaagcttcc taccgactc tatgagaaca ttccgtaagt
9241 tggctggctc tccatagctt ccagttgctg ttcgcttctc gtctgcttcc gtcgcacgtt
9301 ctttttaagc tggcgctcaa attcaagcat atctgcctct ttaatgagct tcataaactc
9361 cttgaatctt ttctcgctca agcagacgtg caagaatttc gccgcctcac gcgcccac
9421 aatccgggtg ttttgatctt cctcgcttc gatatctatt aatataggct tggctccggt
9481 gctgtgtttt tgggggtgccc cggcagcctt acaagcccgc cgtggaacc cggcggcgc
9541 ttcttcttgt ttcacacact atttgacag gtgagtggtt attccccaa cctcaaaaag
9601 ttacctagtc aaattggtcg ggcgtagtca ccaactgttg cttcaagctc ggttttgtga
9661 cgctcctccc cctctgtaac ctctcagtt ccagcctgac cgctaaacga ccatacaccg
9721 ccttggcgct taatcaccgc ctttttgctt ggcgttacag aatactcatc actatcgagt
9781 gtgctcattt ttgcctgaac gtgcacaact ttagcttttc cccgaacaa ttccaacata
9841 ccgagatctt caccgggtgc ggggtcacgt aactcttctc caccaccaa tatcagaac
9901 cgcgagccca aagttatgct gctttctgat cctctgttga tgacgattg ataactatc
9961 accaccttga tgactttcgg caaacttttg tattctctgt tcattctgct aatccccga
10021 acaagccggg cctgatcaaa atcgcgtcct tgctggctctg attaatgttt tcaccaacag
10081 cttcgatatac gttataaatt tcttcataac cccggatatg aatctgaacc agcttatttg
10141 tctgaacgtt tactacctct ccgggtgaca caagccgctc atattcaccg tctttgacgt
10201 aaatcgcggt catgacaccc aaacttagcc atggtgcacc atcgactata agaagttct
10261 tgtcgtgaat cgccttaaca agcggcacc ctaaaaaatc aggagtggtt cggctcagaa
10321 taatccacag aaggtagagc agtaatatcc aatagacgcc attaacaata gcgagattg
10381 aatagcttac ccgccaatct tcgcccctgcc accagccaat aacggcaatt atcgtgtca
10441 ctgttgcaag tatggcagcg agcgtcttag cgtgacgaag cactgtcttt ctgacaattt
10501 ccagattcac ccctagggcg tgtctgcat caacgtaacc agatcatagc gcatgcgaga
10561 tggacgaagc ccatgaatgc ggtcaatggt ttctcgcac gcagcgc//

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

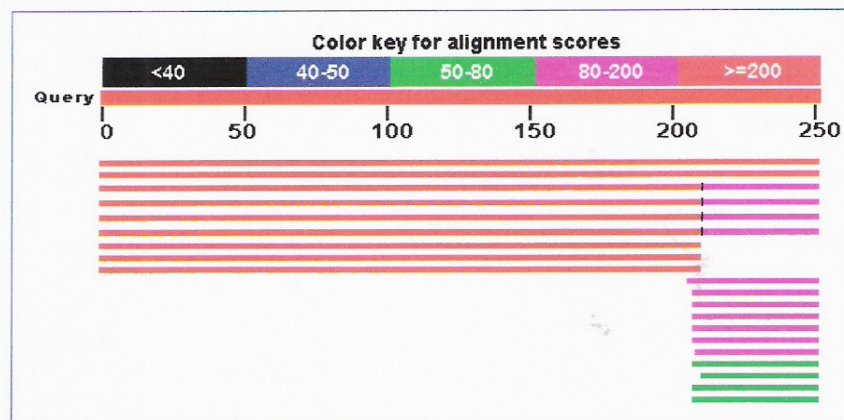
Job Title: lcl|29056 (251 letters)

•
Please, try our new design!

BLASTN 2.2.18+

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14. RID: 86G64B1U011 **Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 7,063,753 sequences; 24,304,446,854 total letters

Query= Length=251

Distribution of 55 Blast Hits on the Query Sequence

Distance tree of results **NEW**Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer**Sequences producing significant alignments:**

(Click headers to sort columns)

DQ845343.1	Brucella melitensis insertion sequence IS711, partial sequence	464	464	100%	7e-128	100%	
AE009555.1	Brucella melitensis 16M chromosome I, section 112 of 195 of the complete sequence	464	464	100%	7e-128	100%	G
CP000911.1	Brucella suis ATCC 23445 chromosome I, complete sequence	388	469	100%	4e-105	100%	
CP000872.1	Brucella canis ATCC 23365 chromosome I, complete sequence	388	474	100%	4e-105	100%	
AE014291.4	Brucella suis 1330 chromosome I, complete sequence	388	555	100%	4e-105	100%	
CP000708.1	Brucella ovis ATCC 25840 chromosome I, complete sequence	381	2190	100%	7e-103	100%	
CP000887.1	Brucella abortus S19 chromosome 1, complete sequence	377	377	83%	1e-101	99%	
AE017223.1	Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 chromosome I, complete sequence	377	377	83%	1e-101	99%	
AM040264.1	Brucella melitensis biovar Abortus 2308 chromosome I, complete sequence, strain 2308	377	377	83%	1e-101	99%	
AE009540.1	Brucella melitensis 16M chromosome I, section 97 of 195 of the complete sequence	86.1	86.1	18%	7e-14	100%	G
CP000709.1	Brucella ovis ATCC 25840 chromosome II, complete sequence	82.4	820	17%	8e-13	100%	
DQ863943.1	Brucella ovis hypothetical protein gene, partial cds; and hypothetical protein gene, complete cds	82.4	82.4	17%	8e-13	100%	
AY174070.1	Brucella cetaceae D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase-like protein gene, partial cds; and insertion sequence IS711 transposase gene, complete cds	82.4	82.4	17%	8e-13	100%	
AE009706.1	Brucella melitensis 16M chromosome II, section 68 of 107 of the complete sequence	82.4	82.4	17%	8e-13	100%	G
AE009681.1	Brucella melitensis 16M chromosome II, section 43 of 107 of the complete sequence	82.4	82.4	17%	8e-13	100%	G
AE009545.1	Brucella melitensis 16M chromosome I, section 102 of 195 of the complete sequence	80.5	80.5	17%	3e-12	100%	G
DQ000163.1	Brucella melitensis biovar Abortus 4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase (BMEII0437) gene, partial cds; L-gulonolactone oxidase (BMEII0438), hypothetical membrane spanning protein (BMEII0442), hypothetical protein (BMEII0443), and hypothetical protein (BMEII0444) genes, complete cds; and insertion sequence IS711, partial sequence	76.8	76.8	17%	4e-11	97%	
M94960.1	Brucella ovis insertion sequence IS711, complete sequence	76.8	76.8	16%	4e-11	100%	
M96454.1	Brucella ovis insertion sequence orfs 1, 2 and 3	76.8	76.8	17%	4e-11	97%	
X71024.1	B.ovis insertion sequence IS6501 DNA	76.8	76.8	17%	4e-11	97%	

Alignments

>gb|DQ845343.1| Brucella melitensis insertion sequence IS711, partial sequence
Length=733

Score = 464 bits (251), Expect = 7e-128
Identities = 251/251 (100%), Gaps = 0/251 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 60
            |||
Sbjct 268    TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 327

Query 61     CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 120
            |||
Sbjct 328    CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 387

Query 121    CAATTATCGTGTCACCTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 180
            |||
Sbjct 388    CAATTATCGTGTCACCTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 447

Query 181    TCTTTCTGACAATTTCCAGATTACCCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATC 240
            |||
Sbjct 448    TCTTTCTGACAATTTCCAGATTACCCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATC 507

Query 241    ATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 508    ATAGCGCATGC 518
    
```

>gb|AE009555.1| **GD** Brucella melitensis 16M chromosome I, section 112 of 195 of the complete sequence
Length=10607

Score = 464 bits (251), Expect = 7e-128
Identities = 251/251 (100%), Gaps = 0/251 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 60
            |||
Sbjct 10306   TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 10365

Query 61     CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 120
            |||
Sbjct 10366   CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 10425

Query 121    CAATTATCGTGTCACCTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 180
            |||
Sbjct 10426   CAATTATCGTGTCACCTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 10485

Query 181    TCTTTCTGACAATTTCCAGATTACCCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATC 240
            |||
Sbjct 10486   TCTTTCTGACAATTTCCAGATTACCCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATC 10545

Query 241    ATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 10546   ATAGCGCATGC 10556
    
```

>gb|CP000911.1| **D** Brucella suis ATCC 23445 chromosome I, complete sequence
Length=1923763

Sort alignments for this subject sequence by:
E value Score Percent identity
Query start position Subject start position

Features in this part of subject sequence:
Hypothetical protein, conserved

Score = 388 bits (210), Expect = 4e-105
Identities = 210/210 (100%), Gaps = 0/210 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 60
            |||
Sbjct 796107  TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 796048

Query 61     CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 120
            |||
Sbjct 796047  CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 795988

Query 121    CAATTATCGTGTCACCTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 180
            |||
Sbjct 795987  CAATTATCGTGTCACCTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 795928

Query 181    TCTTTCTGACAATTTCCAGATTACCCCTA 210
            |||
Sbjct 795927  TCTTTCTGACAATTTCCAGATTACCCCTA 795898
    
```

Features in this part of subject sequence:
transposase for insertion sequence element IS6501

Score = 80.5 bits (43), Expect = 3e-12
Identities = 43/43 (100%), Gaps = 0/43 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 209    TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 912742  TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 912700
    
```

>gb|CP000872.1| **D** Brucella canis ATCC 23365 chromosome I, complete sequence
 Length=2105969

Sort alignments for this subject sequence by:
 E value Score Percent identity
 Query start position Subject start position

Features in this part of subject sequence:
Hypothetical protein, conserved

Score = 388 bits (210), Expect = 4e-105
 Identities = 210/210 (100%), Gaps = 0/210 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 60
            |||
Sbjct 774626  TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 774567
Query 61     CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 120
            |||
Sbjct 774566  CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 774507
Query 121    CAATTATCGTGTCACTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 180
            |||
Sbjct 774506  CAATTATCGTGTCACTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 774447
Query 181    TCTTTCTGACAATTTCCAGATTCACCCCTA 210
            |||
Sbjct 774446  TCTTTCTGACAATTTCCAGATTCACCCCTA 774417
    
```

Features in this part of subject sequence:
transposase for insertion sequence element IS6501

Score = 86.1 bits (46), Expect = 7e-14
 Identities = 46/46 (100%), Gaps = 0/46 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 206    CCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 943749  CCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 943704
    
```

>gb|AE014291.4| **D** Brucella suis 1330 chromosome I, complete sequence
 Length=2107794

Sort alignments for this subject sequence by:
 E value Score Percent identity
 Query start position Subject start position

Features in this part of subject sequence:
hypothetical protein

Score = 388 bits (210), Expect = 4e-105
 Identities = 210/210 (100%), Gaps = 0/210 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 60
            |||
Sbjct 776262  TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 776203
Query 61     CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 120
            |||
Sbjct 776202  CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 776143
Query 121    CAATTATCGTGTCACTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 180
            |||
Sbjct 776142  CAATTATCGTGTCACTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 776083
Query 181    TCTTTCTGACAATTTCCAGATTCACCCCTA 210
            |||
Sbjct 776082  TCTTTCTGACAATTTCCAGATTCACCCCTA 776053
    
```

Features flanking this part of subject sequence:
 399 bp at 5' side: IS711, transposase orfA
 36 bp at 3' side: hypothetical protein

Score = 86.1 bits (46), Expect = 7e-14
 Identities = 46/46 (100%), Gaps = 0/46 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 206    CCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 945299  CCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 945254
    
```

Features flanking this part of subject sequence:
 399 bp at 5' side: IS711, transposase orfA
 38 bp at 3' side: hypothetical protein

Score = 80.5 bits (43), Expect = 3e-12
 Identities = 43/43 (100%), Gaps = 0/43 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 209    TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 893064  TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 893022
    
```

>gb|CP000708.1| **D** Brucella ovis ATCC 25840 chromosome I, complete sequence
 Length=2111370

Sort alignments for this subject sequence by:
 E value Score Percent identity
 Query start position Subject start position

Features flanking this part of subject sequence:
555 bp at 5' side: conserved hypothetical protein
751 bp at 3' side: hypothetical protein

Score = 381 bits (206), Expect = 7e-103
 Identities = 209/210 (99%), Gaps = 1/210 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 60
            |||
Sbjct 801059  TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAAT-GACGCCATTAA 801001

Query 61     CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 120
            |||
Sbjct 801000  CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 800941

Query 121    CAATTATCGCTGTCTACTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 180
            |||
Sbjct 800940  CAATTATCGCTGTCTACTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 800881

Query 181    TCTTTCTGACAATTTCCAGATTACCCCTA 210
            |||
Sbjct 800880  TCTTTCTGACAATTTCCAGATTACCCCTA 800851
    
```

Features in this part of subject sequence:
sarcosine oxidase beta subunit
transposase OrfB

Score = 87.9 bits (47), Expect = 2e-14
 Identities = 52/54 (96%), Gaps = 1/54 (1%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 199    GAT-TCACCCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 240491  GATATCTCCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 240544
    
```

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 86.1 bits (46), Expect = 7e-14
 Identities = 46/46 (100%), Gaps = 0/46 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 206    CCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 886665  CCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 886710
    
```

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 84.2 bits (45), Expect = 2e-13
 Identities = 45/45 (100%), Gaps = 0/45 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 207    CCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 1240168  CCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 1240212
    
```

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 84.2 bits (45), Expect = 2e-13
 Identities = 45/45 (100%), Gaps = 0/45 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 207    CCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 1561710  CCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 1561666
    
```

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 84.2 bits (45), Expect = 2e-13
 Identities = 45/45 (100%), Gaps = 0/45 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 207    CCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 1771972  CCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 1771928
    
```

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 208    CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 345291  CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 345334
    
```

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 208    CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 362094  CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 362051
    
```


Sbjct 1949716 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 1949759

Features flanking this part of subject sequence:
 80 bp at 5' side: **cadmium-translocating P-type ATPase**
 45 bp at 3' side: **conserved hypothetical protein**

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 |||
 Sbjct 1949842 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 1949799

Features in this part of subject sequence:
IS711, transposase orfB

Score = 80.5 bits (43), Expect = 3e-12
 Identities = 43/43 (100%), Gaps = 0/43 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query 209 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 |||
 Sbjct 151279 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 151237

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 80.5 bits (43), Expect = 3e-12
 Identities = 43/43 (100%), Gaps = 0/43 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query 209 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 |||
 Sbjct 765170 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 765128

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 80.5 bits (43), Expect = 3e-12
 Identities = 43/43 (100%), Gaps = 0/43 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query 209 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 |||
 Sbjct 885824 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 885866

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB
putative transposition protein

Score = 76.8 bits (41), Expect = 4e-11
 Identities = 43/44 (97%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 |||
 Sbjct 737997 CTAGGGCTTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 737954

Features in this part of subject sequence:
IS711, transposase orfB

Score = 75.0 bits (40), Expect = 1e-10
 Identities = 42/43 (97%), Gaps = 0/43 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query 209 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 |||
 Sbjct 919871 TAGGGCTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 919829

>gb|CP000887.1| **D** Brucella abortus S19 chromosome 1, complete sequence
 Length=2122487

Features flanking this part of subject sequence:
 620 bp at 5' side: **Hypothetical Membrane Spanning Protein**
 1143 bp at 3' side: **hypothetical protein**

Score = 377 bits (204), Expect = 1e-101
 Identities = 208/210 (99%), Gaps = 0/210 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query 1 TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 60
 |||
 Sbjct 796243 TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 796184
 Query 61 CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 120
 |||
 Sbjct 796183 CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 796124
 Query 121 CAATTATCGCTGTCACTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 180
 |||
 Sbjct 796123 CAATTATCGCTGTCACTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTT 796064
 Query 181 TCTTTCTGACAATTTCCAGATCCACCCCTA 210
 |||
 Sbjct 796063 TCTTTCTGACAATTTCCAGATCCACCCCTA 796034

>gb|AE017223.1| **D** Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 chromosome I, complete sequence
 Length=2124241

Features in this part of subject sequence:
hypothetical protein

Score = 377 bits (204), Expect = 1e-101
 Identities = 208/210 (99%), Gaps = 0/210 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 60
            |||
Sbjct 797942 TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 797883

Query 61     CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 120
            |||
Sbjct 797882 CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 797823

Query 121    CAATTATCGCTGTCACTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 180
            |||
Sbjct 797822 CAATTATCGCTGTCACTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTT 797763

Query 181    TCTTTCTGACAATTTCCAGATCCACCCCTA 210
            |||
Sbjct 797762 TCTTTCTGACAATTTCCAGATCCACCCCTA 797733
    
```

>emb|AM040264.1| **D** Brucella melitensis biovar Abortus 2308 chromosome I, complete sequence, strain 2308
 Length=2121359

Features in this part of subject sequence:
conserved hypothetical protein

Score = 377 bits (204), Expect = 1e-101
 Identities = 208/210 (99%), Gaps = 0/210 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 60
            |||
Sbjct 794220 TGTTCGGCTCAGAATAATCCACAGAAGGTAGAGCAGTAATATCCAATAGACGCCATTAA 794161

Query 61     CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 120
            |||
Sbjct 794160 CAATAGCGAGATTGGAATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTGCCACCAGCCAATAACGG 794101

Query 121    CAATTATCGCTGTCACTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTG 180
            |||
Sbjct 794100 CAATTATCGCTGTCACTGTTGCAAGTATGGCAGCGAGCGCTCTAGCGTGACGAAGCACTT 794041

Query 181    TCTTTCTGACAATTTCCAGATCCACCCCTA 210
            |||
Sbjct 794040 TCTTTCTGACAATTTCCAGATCCACCCCTA 794011
    
```

>gb|AE009540.1| **G D** Brucella melitensis 16M chromosome I, section 97 of 195 of the complete sequence
 Length=10277

Score = 86.1 bits (46), Expect = 7e-14
 Identities = 46/46 (100%), Gaps = 0/46 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 206    CCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 8171    CCCTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 8216
    
```

>gb|CP000709.1| **D** Brucella ovis ATCC 25840 chromosome II, complete sequence
 Length=1164220

Sort alignments for this subject sequence by:
 E value Score Percent identity
 Query start position Subject start position

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 208    CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 162028 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 162071
    
```

Features in this part of subject sequence:
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase family protein
transposase OrfB

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 208    CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 211127 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 211170
    
```

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 208    CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
            |||
Sbjct 270442 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 270399
    
```

Features in this part of subject sequence:
IS711, transposase orfB

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 506210 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 506253

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 532731 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 532774

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB
putative cell wall surface protein

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 535090 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 535047

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB
transcriptional regulator, MarR family

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 753592 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 753549

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 972933 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 972976

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 80.5 bits (43), Expect = 3e-12
 Identities = 43/43 (100%), Gaps = 0/43 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query 209 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 495494 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 495452

Features in this part of subject sequence:
transposase OrfB

Score = 80.5 bits (43), Expect = 3e-12
 Identities = 43/43 (100%), Gaps = 0/43 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query 209 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 971111 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 971069

>gb|DQ863943.1| Brucella ovis hypothetical protein gene, partial cds; and hypothetical protein gene, complete cds
 Length=975

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 780 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 823

>gb|AY174070.1| Brucella cetaceae D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase-like protein gene, partial cds; and insertion sequence IS711 transposase gene, complete cds
 Length=700

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
 Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
          |||
Sbjct 38 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 81

```

>**gb|AE009706.1|** **GD** Brucella melitensis 16M chromosome II, section 68 of 107 of the complete sequence
Length=11570

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
          |||
Sbjct 11406 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 11363

```

>**gb|AE009681.1|** **GD** Brucella melitensis 16M chromosome II, section 43 of 107 of the complete sequence
Length=14512

Score = 82.4 bits (44), Expect = 8e-13
Identities = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
          |||
Sbjct 2748 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 2791

```

>**gb|AE009545.1|** **GD** Brucella melitensis 16M chromosome I, section 102 of 195 of the complete sequence
Length=10380

Score = 80.5 bits (43), Expect = 3e-12
Identities = 43/43 (100%), Gaps = 0/43 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 209 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
          |||
Sbjct 604 TAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 646

```

>**gb|DQ000163.1|** Brucella melitensis biovar Abortus 4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase (BMEII0437) gene, partial cds; L-gulonolactone oxidase (BMEII0438), hypothetical membrane spanning protein (BMEII0442), hypothetical protein (BMEII0443), and hypothetical protein (BMEII0444) genes, complete cds; and insertion sequence IS711, partial sequence
Length=1997

Score = 76.8 bits (41), Expect = 4e-11
Identities = 44/45 (97%), Gaps = 1/45 (2%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 208 CTAGGGCGTGTCTG-CATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
          |||
Sbjct 1942 CTAGGGCGTGTCTGCCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 1986

```

>**gb|M94960.1|INSIS711A** Brucella ovis insertion sequence IS711, complete sequence
Length=842

Score = 76.8 bits (41), Expect = 4e-11
Identities = 41/41 (100%), Gaps = 0/41 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 211 GGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
          |||
Sbjct 842 GGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 802

```

>**gb|M96454.1|BRUISELEMA** Brucella ovis insertion sequence orfs 1, 2 and 3
Length=885

Score = 76.8 bits (41), Expect = 4e-11
Identities = 43/44 (97%), Gaps = 0/44 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
          |||
Sbjct 28 CTAGAGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 71

```

>**emb|X71024.1|** B.ovis insertion sequence IS6501 DNA
Length=844

Score = 76.8 bits (41), Expect = 4e-11
Identities = 43/44 (97%), Gaps = 0/44 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 208 CTAGGGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 251
          |||
Sbjct 844 CTAGAGCGTGTCTGCATTCAACGTAACCAGATCATAGCGCATGC 801

```

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

Posted date: Jul 19, 2008 5:46 PM

Number of letters in database: -1,465,356,918

Number of sequences in database: 7,063,753

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Gapped

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 0, Extension: 0
Number of Sequences: 7063753
Number of Hits to DB: 414520
Number of extensions: 0
Number of successful extensions: 0
Number of sequences better than 10: 0
Number of HSP's better than 10 without gapping: 0
Number of HSP's gapped: 0
Number of HSP's successfully gapped: 0
Length of query: 251
Length of database: 24304446854
Length adjustment: 31
Effective length of query: 220
Effective length of database: 24085470511
Effective search space: 5298803512420
Effective search space used: 5298803512420
A: 0
X1: 13 (25.0 bits)
X2: 32 (59.1 bits)
X3: 54 (99.7 bits)
S1: 13 (25.1 bits)
S2: 21 (39.9 bits)

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en el siguiente trabajo:

Navarro E, Segura JC, Castaño MJ, Solera J. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor the evolution of *Brucella melitensis* DNA load during therapy and post-therapy follow-up in patients with brucellosis. *Clin Infect Dis*. 2006 May 1;42(9):1266-73. Epub 2006 Mar 31.

La puesta a punto del ensayo de PCRtr para detectar y cuantificar ADN de *Brucella melitensis* se ha utilizado para el diagnóstico de casos puntuales, como por ejemplo:

Navarro-Martínez A, Navarro E, Castaño MJ, Solera J. Rapid diagnosis of human brucellosis by quantitative real-time PCR: a case report of brucellar spondylitis. *J Clin Microbiol*. 2008 Jan;46(1):385-7. Epub 2007 Oct 31.