

Mtra. María Elena Contreras Garfias  
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
**PRESENTE**

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	12	10	2021		13	10	2021

**Datos del Alumno**

Nombre : <b>Tania Valeria Garcia Reyes</b>	
Matrícula : <b>2122031110</b>	Licenciatura : <b>Química Farmacéutica Biológica</b>
Domicilio : <b>Av. Hacienda Vista Hermosa no. 52A, CTM Culhuacán, 04490, Coyoacán, CDMX.</b>	
Teléfono : <b>5511245315</b>	Celular : <b>5511245315</b>
Correo Electrónico : <b>tanngarcia23@gmail.com</b>	CURP : <b>GART920523MMCRYN09</b>

**Datos del Proyecto**

Nombre del Proyecto : <b>Formación del Biobanco Nacional de Brucelosis</b>							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : <b>Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez"</b>							
Dependencia : <b>Secretaría de Salud de México</b>							
Entidad Federativa : <b>Distrito Federal</b>							
Municipio : <b>Álvaro Obregón</b>				Localidad : <b>Lomas de Plateros</b>			
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	17	2	2020		21	8	2020

**PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES**

Sector: <b>3.- Público</b>	Tipo: <b>1.- Externo</b>
Orientación: <b>9.- Seguridad y Bienestar Social</b>	

**FIRMAS**

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez, 37622

**Asesor Interno**  
Nombre, firma y No. Económico

**Tania Valeria García Reyes**

**Alumno**  
Nombre, firma

QBP. Eduardo Jiménez Sánchez, 10571361

**Asesor Externo**  
Nombre, firma y No. Económico

**Dra. Norma A. Noguez Méndez**  
**Vo. Bo. de la Comisión**  
Nombre y firma de la persona que autoriza



CARTA TÉRMINO SERVICIO SOCIAL

Ciudad de México, a 24 de agosto del 2020

Mtro. Jesús Obdulio López Murillo  
Coordinador de Servicio Social Divisional de CBS

**PRESENTE**

Por este conducto hacemos constar que la alumna Tania Valeria García Reyes, estudiante de la carrera de Química Farmacéutica Biológica, con número de matrícula 2122031110, ha concluido satisfactoriamente el servicio social en el Laboratorio de Brucelosis, en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez" (InDRE), con el programa Sistema para el Diagnóstico de Laboratorio con Impacto en salud Pública, se realizó en un periodo comprendido del 17 de febrero del 2020 al 21 de agosto del 2020, con un horario de 9:00 a 13:00, cubriendo un total de 480 horas efectivas de trabajo, mismos que ocurrieron a distancia por la situación de pandemia por COVID-19, por la que atraviesa el país.

**Atentamente**

**Edgar Adrian Ponce Lerma**  
Responsable de Gestión para la Capacitación



INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y  
REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS  
"Dr. Manuel Martínez Báez"

**QFB. Eduardo Jiménez Sánchez**  
Jefe del Laboratorio de Brucelosis

Sección/Serie: 1S.3

FJMP/eapl



México, Ciudad de México a 13 de octubre de 2021

**DR. Juan Esteban Barranco Florido**  
**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**PRESENTE**

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el alumno: **Tania Valeria Garcia Reyes** con número de matrícula **2122031110** concluyó el proyecto de Servicio Social: **"Formación del Biobanco Nacional de Brucelosis"** que se realizó en el departamento de Bacteriología, laboratorio de Brucelosis del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez", ubicado en Francisco de P. Miranda 177, Lomas de Plateros, Álvaro Obregón, 01480 Ciudad de México, CDMX.  
Del 17 de febrero de 2020 al 21 de agosto de 2020 bajo mi asesoría, cubriendo un total de 480 horas.

Agradeciendo de antemano su atención a la presente, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE



QBP. Eduardo Jiménez Sánchez  
Cédula profesional 10571361  
Jefe de Laboratorio de Brucelosis

c.c.p. Mtra. María Elena Contreras Garfias. Directora de la DCBS UAM-X.





Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Xochimilco**

México, Ciudad de México a 13 de octubre de 2021

**DR. Juan Esteban Barranco Florido**

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**PRESENTE**

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que la alumna: **Tania Valeria Garcia Reyes** con número de matrícula **2122031110** concluyó el proyecto de Servicio Social: **“Formación del Biobanco Nacional de Brucelosis”** que se realizó en el departamento de Bacteriología, laboratorio de Brucelosis del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez", ubicado en Francisco de P. Miranda 177, Lomas de Plateros, Álvaro Obregón, 01480 Ciudad de México, CDMX.

Del 17 de febrero de 2020 al 21 de agosto de 2020 bajo mi asesoría, cubriendo un total de 480 horas.

Agradeciendo de antemano su atención a la presente, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

  
Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

37622

c.c.p. Mtra. María Elena Contreras Garfias. Directora de la DCBS UAM-X

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL:**

"Formación del Biobanco Nacional de Brucelosis"

**PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO:**

Evaluación de productos relacionados con la salud

**ETAPA:** Desarrollo de reactivos analíticos y de diagnóstico

**PRESENTA:**

Tania Valeria Garcia Reyes

Matrícula 2122031110

**ASESOR INTERNO:**

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Profesor investigador titular C

**ASESOR EXTERNO:**

QBP. Eduardo Jiménez Sánchez

Jefe del Laboratorio de Brucelosis

**LUGAR DE REALIZACIÓN:**

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez"  
(InDRE), Laboratorio de Bacteriología, departamento de Brucelosis.

**FECHA DE INICIO:** 17 de febrero del 2020

**FECHA DE TERMINACIÓN:** 21 de agosto del 2020

## Contenido

1. ANTECEDENTES.....	3
1.1 Biobanco .....	3
1.1.2 Composición de un banco de muestras biológicas .....	3
1.1.3 Tipos de Biobancos.....	4
1.1.4 Relevancia de los Biobancos.....	5
1.2 Brucelosis.....	5
1.2.1 Etiología .....	5
1.2.2 Especies de <i>Brucella</i> .....	6
1.2.3 Diagnóstico .....	7
2. JUSTIFICACIÓN.....	8
3. OBJETIVOS .....	9
3.1 Objetivo general .....	9
3.2 Objetivos específicos.....	9
4. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	9
4.1 Mantenimiento y actualización de la seroteca .....	9
4.2 Mantener y verificar la viabilidad del cepario de Brucelosis .....	10
4.3 Actualización y conformación del biobanco de material genético de Brucelosis .....	11
5. RESULTADOS .....	11
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	12
7. CONCLUSION.....	13
8. BIBLIOGRAFÍA.....	14
9. ANEXO 1 .....	16

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Biobanco

Un biobanco es un establecimiento público o privado, sin ánimo de lucro, que acoge una colección de muestras biológicas concebida con fines diagnósticos o de investigación biomédica, está organizado como una unidad técnica con criterios establecidos en un sistema de gestión de calidad, regido bajo protocolos de trabajo estrictos, metodológicos y sistematizados que garantizan la calidad y custodia de las muestras y datos que almacena (Baptista, 2010; Gardeazába 2018).

Desde el punto de vista funcional debe proveer el espacio físico, ser receptores de muestras, garantizar su adecuado almacenamiento y organización para guardar de la forma indicada las muestras biológicas; así mismo debe estar organizado de manera tal que garantice el soporte técnico necesario para manejo, conservación y transferencia de muestras para potenciar aquellos estudios biomédicos considerados especialmente relevantes al centrarse en el análisis y mejora del conocimiento de patologías, en donde se ha destacado como relevante la necesidad de estudiar un volumen amplio de muestras, las características propias de las personas de las que se obtuvieron dichas muestras, sus hábitos sociales y alimenticios, las características medioambientales de su entorno de vida, etc., (Martínez et al., 2012; Doménech & Cal, 2014). El almacenamiento masivo de muestras biológicas plantea cuestiones técnicas complejas que afectan desde la propia recolección de la muestra, transporte, identificación, rastreabilidad, conservación adecuada, recuperación de la muestra guardada y tratamiento informático de los datos, etc (Baptista, 2010; Gardeazába 2018).

#### 1.1.2 Composición de un banco de muestras biológicas

En términos generales, un biobanco debe disponer de muestras biológicas representativas de los distintos constituyentes de la función vital como son tejidos, restos tumorales, proteínas, células, plasma, ADN y glóbulos rojos. Las muestras pueden provenir de pacientes que padecen diversos tipos de enfermedades.

Las muestras deben ser obtenidas de acuerdo con un objetivo de investigación específico; una vez realizado el análisis primario, éstas se deben almacenar en los congeladores adecuados que permiten garantizar su conservación en condiciones apropiadas para asegurar que cada muestra pueda ser utilizada tiempo después de su obtención. Este sistema de almacenamiento permite contar con un importante potencial de información sobre enfermedades y otros aspectos en la medida que aparezcan nuevos recursos de investigación, nuevas tecnologías, nuevas líneas de investigación, sin que se tenga que convocar a los pacientes para repetidas extracciones (Martínez et al., 2012).

### 1.1.3 Tipos de Biobancos

Atendiendo a los posibles fines a los que se destinan las muestras, los biobancos se pueden clasificar atendiendo a su diseño. Además, los biobancos pueden desarrollar diferentes estrategias organizativas atendiendo a su organización.

Se pueden establecer los siguientes tipos de biobancos:

- Por su diseño:

a) Biobancos Poblacionales

Su objetivo principal es investigar sobre biomarcadores de susceptibilidad. El sustrato operativo es DNA genómico y sangre con sus derivados, en un gran número de donantes sanos que representen un país concreto, una región o una cohorte étnica (Díaz et al., 2016).

b) Biobancos epidemiológicos

Su actividad se centra en biomarcadores de exposición, mediante un gran número de muestras. Son herramientas indispensables para multitud de áreas de investigación ya que albergan series de muestras representativas de una gran variedad de patologías, junto a sus datos clínicos asociados (Díaz et al., 2016; Zazo & Rojo, 2009).

c) Biobancos generales para una enfermedad

Sus objetivos corresponden con los biomarcadores de una enfermedad específica a investigar por medio de colecciones potenciales y/o retrospectivas, por ejemplo, las muestras tumorales y sus derivados (ADN/ARN/proteínas), material biológico asociados a los datos clínicos y, a veces asociados a los ensayos clínicos (Díaz et al., 2016).

- Por su estructura:

a. Biobancos en red

Biobanco con una única organización y una actividad descentralizada. Varios biobancos se asocian creando un nodo central que se constituye como figura jurídica única que incluye a todas las demás. Las muestras suelen distribuirse en las diferentes instituciones que componen el biobanco (Zazo & Rojo, 2009).

b. Red de biobancos

Varios biobancos se asocian entorno a un nodo central que actúa como nexo entre ellos, llevando a cabo funciones de gestión y coordinación, aunque la entidad jurídica pertenece a cada uno de los biobancos de forma individual (Zazo & Rojo, 2009).

c. Biobanco Nacional  
Biobanco con fines de investigación biomédica.

#### 1.1.4 Relevancia de los Biobancos

Los biobancos han existido en alguna forma desde hace más de 60 años, pero su reciente aumento en el número, tamaño e importancia se ha dado especialmente por la naturaleza cambiante de la investigación biomédica, las relaciones entre los investigadores, los actores participantes en la investigación y las organizaciones que financian la investigación. El incremento en número de los biobancos coincide con el éxito en la secuenciación del genoma humano en el año 2003, la posterior explosión de las nuevas tecnologías en bioinformática y la evolución de secuenciación de nueva generación y la visión de mejorar la salud por medio de la medicina genómica, por lo tanto, los descubrimientos pertinentes derivados de la investigación biomédica traslacional dependen en gran medida del funcionamiento de los biobancos (Díaz et al., 2016).

### 1.2 Brucelosis

La brucelosis es una zoonosis mundial con impacto, tanto en la salud pública en humanos como en la salud animal, afecta a varias especies de mamíferos pero su principal blanco son los ganados bovino, equino, porcino, ovino y caprino, así como otras especies silvestres de relevancia económica, por lo cual genera grandes pérdidas económicas en la industria ganadera (Álvarez et al., 2015). En el ser humano la brucelosis se adquiere mediante contacto directo con el microorganismo (animales infectados), ingestión (leche o quesos no pasteurizados) o inhalación (infección asociada al laboratorio). En México la brucelosis es un padecimiento sujeto a vigilancia epidemiológica y de notificación obligatoria en los sistemas de información oficial (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez", 2016). Es ocasionada por bacterias del género *Brucella spp*, tiene una distribución universal y es endémica en nuestro país.

#### 1.2.1 Etiología

*Brucella* es un bacilo gramnegativo de 0.5-0.7µm de diámetro por 0.5-1.5µm de longitud. Son inmóviles y aeróbicos estrictos, de crecimiento lento, no poseen cápsulas ni forman esporas. De metabolismo oxidativo, utilizan nitratos como aceptores de electrones; son catalasa y oxidasa positivas, no afectan la gelatina ni modifican la leche y en general no fermentan azúcares. Su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos (Álvarez et al., 2015). Carece de los factores de virulencia clásicos que se han reportado en otros gramnegativos, tales como: toxinas, flagelos, cápsula, etc. A pesar de esto, es una bacteria

asombrosamente virulenta. En animales de experimentación se ha reportado que su dosis mínima infectante, va desde 10 hasta 100 células, ya sea por vía aerosoles o por vía subcutánea (Guzmán et al., 2016).

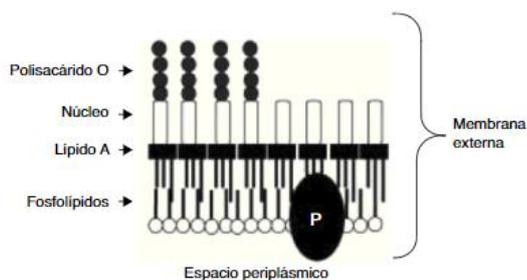
### 1.2.2 Especies de *Brucella*

**Tabla 1:** Especies de *Brucella*, hospedadores conocidos y biovariedades (Fuente: Álvarez et al., 2015).

Especie	Hospedadores conocidos	Biovariedades
<i>B. melitensis</i>	Cabras, bovinos, ovinos, cánidos, hombre	1-3
<i>B. abortus</i>	Bovinos, cánidos, hombre	1-9
<i>B. suis</i>	Cerdos, cánidos, hombre	1-5
<i>B. canis</i>	Cánidos, hombre	
<i>B. ovis</i>	Ovinos	
<i>B. neotomae</i>	Roedores	
<i>B. ceti</i>	Delfines, marsopas, ballenas	
<i>B. pinnipedialis</i>	Focas	
<i>B. microti</i>	Zorros rojos, roedores de campo	
<i>B. inopinata</i>	Desconocido	

El género *Brucella* ha sido clasificado en base a la patogenicidad y al hospedero en 10 especies, como se ejemplifica en la tabla 1: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. ovis*, *B. pinnipedialis* y *B. inopinata*. De estas especies sólo las primeras cuatro son capaces de infectar al hombre (*B. melitensis* 98% y *B. abortus* 2%) (Álvarez et al., 2015).

De acuerdo con las características de las colonias de *Brucella* en medio sólido, algunas especies pueden ser lisas (S) o rugosas (R) dependiendo de la expresión del lipopolisacárido (LPS) en la superficie de cada especie, en general las cepas lisas son más virulentas (Álvarez et al., 2015). La conformación estructural de la bacteria, como se muestra en la figura 1, posee una membrana externa, la cual es rica en fosfatidilcolina y el componente más abundante es el lipopolisacárido (LPS), del cual se van a distinguir tres regiones: el lípido A, el núcleo y la cadena O, este último tiene mucha importancia, ya que con base al tipo de unión entre los residuos de N-formil perosamina, alfa 1-2 o alfa 1-3, se identifican dos configuraciones denominadas A y M que van a tener un papel importante en la determinación de las biovariedades. Así mismo las *Brucellas* contienen una serie de proteínas de la membrana externa (PME), las cuales dependiendo de su peso molecular se van a clasificar en tres grupos: PME del grupo 1 (94 kd), PME del grupo 2 (34 a 40 kd) y PME del grupo 3 (30 kd). La importancia de estas proteínas radica en su alta especificidad, siendo de gran utilidad para el diagnóstico serológico y para la eventual fabricación de vacunas (Vega et al., 2008; Álvarez et al., 2015).



**Figura 1:** Conformación de la membrana externa de la pared celular de *Brucella*. P: proteínas. Extraída de Álvarez et al., 2016

Debido a su capacidad de formar fácilmente aerosoles, se encuentra en la lista de bacterias, que pueden ser utilizadas en bioterrorismo y debido a ello, en algunos países está restringido trabajar con *Brucella*, tanto en laboratorios clínicos, de investigación o en los que se realiza la producción de vacunas para animales. De acuerdo con los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) *Brucella spp* debe manipularse en laboratorios de bioseguridad nivel 3 (Guzmán et al., 2016).

### 1.2.3 Diagnóstico

La muestra de elección para el diagnóstico serológico de la brucelosis es el suero, el cual se obtiene al permitir la coagulación de la sangre total. Se establece el algoritmo del análisis serológico de esta enfermedad, mediante la prueba presuntiva con Rosa de Bengala y las pruebas confirmatorias de SAT y 2-ME.

Se realiza mediante la detección de anticuerpos anti-*Brucella* por medio de reacciones de aglutinación antígeno-anticuerpo. Se emplea una suspensión de bacterias de *Brucella abortus* 99S o 1119 -3 de baja virulencia inactivada que actúan como antígeno que reacciona con los anticuerpos específicos anti-*Brucella* presentes en el suero del paciente, estos se ponen de manifiesto al formar una malla de aglutinación. En la prueba tamiz (Aglutinación con Antígeno Rosa de Bengala) se detectan anticuerpos totales y se ponen de manifiesto por la formación de grumos. Los anticuerpos detectados en la prueba de Aglutinación Estándar en Microplaca (SAT) principalmente son de la clase IgM e IgG y cuando se realiza la prueba en presencia de 2-mercaptoetanol (2-ME) éste rompe los puentes disulfuro lo que inactiva las inmunoglobulinas IgM por lo que básicamente se detectan las inmunoglobulinas IgG (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez", 2016). El resultado se tiene que emitir en los primeros 5 días de emitida la muestra.

Sin embargo en los últimos años se han descrito varias estrategias moleculares para la identificación y diferenciación entre especies del género *Brucella*. Entre estas, la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena o PCR que permiten obtener el resultado entre 4-6 horas.

Existen en el mercado gran variedad de kits para extracción de ADN que se consideran la mejor opción debido a la naturaleza del patógeno que estamos tratando, ya que utilizan una tecnología consolidada para ofrecer un método simple y rápido de aislamiento y purificación de ADN genómico a partir de muestras de 200 µl de muestras; se puede utilizar sangre completa fresca o congelada y sangre tratada con citrato o EDTA.

Los procedimientos que se utilizan son sencillos, incluyen centrifugación y vacío permitiendo el procesamiento simultáneo de múltiples muestras, no requieren ni la extracción con fenol/cloroformo ni la precipitación con alcohol y precisan una intervención mínima por parte del usuario, lo que permite la manipulación segura de muestras potencialmente infecciosas. Los procedimientos están diseñados para minimizar la contaminación cruzada de una muestra a otra. Obteniendo ADN purificado listo para su uso en una PCR o cualquier otra aplicación o puede conservarse a entre  $-25^{\circ}\text{C}$  y  $-15^{\circ}\text{C}$  para un uso posterior.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La brucelosis humana ha permanecido endémica en varias zonas del país desde que se tiene noticia de ella, pues aunque se han identificado todos los elementos para el control de la brucelosis en los humanos y en los animales, una de las principales limitantes para su total erradicación es la dificultad para lograr un buen diagnóstico, confiable y oportuno.

El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez" (InDRE) es el órgano normativo para el diagnóstico de la brucelosis en México, por lo tanto, tiene la obligación de establecer y dar a conocer los procedimientos estandarizados de diagnóstico, control de calidad y referencia de las muestras, para un diagnóstico oportuno de calidad, que garantice la confiabilidad diagnóstica. Cuenta con un banco de material biológico que está conformado por muestras clínicas (sangre total, LCR, suero) y cepas (distintas especies de *Brucella*) que representan muestras de importancia epidemiológica a nivel nacional; sin embargo los biobancos están predispuestos a evolución permanente dependiente de las nuevas técnicas y nuevos objetivos científicos. Como respuesta a los nuevos retos que impone la evolución de la investigación biomédica y con esto la oportunidad de lograr un diagnóstico confiable y oportuno se tiene la necesidad de desarrollar diagnósticos moleculares con alta sensibilidad y especificidad para la Brucelosis como la técnica de amplificación de ácidos nucleicos por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ya que representa una alternativa para diagnosticar enfermedades infecciosas causadas por microorganismo de lento crecimiento, tales como los del género *Brucella*, además que permite un diagnóstico más rápido y eficaz en aproximadamente 4-6 horas.

Debido a esto se tiene la necesidad de dar seguimiento y continuidad al biobanco del InDRE, así mismo implementar el resguardo de muestras de material genético (ADN) para hacer frente a los avances en investigación y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de la Brucelosis.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

- Dar continuidad y seguimiento al biobanco de Brucelosis de muestras clínicas e implementar nueva metodología para conformar el biobanco de material genético (ADN) con muestras de interés epidemiológico garantizando la calidad y trazabilidad de las muestras biológicas

#### 3.2 Objetivos específicos

- Mantener y verificar la viabilidad del cepario de Brucelosis para control de calidad de nivel de bioseguridad 1 y 2
- Estandarizar metodología de extracción de ADN de *Brucella* a partir de muestras biológicas
- Acondicionar muestras biológicas para su resguardo
- Generar base de datos de interés en salud pública

### 4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Este estudio es de tipo experimental-documental, retrospectivo y longitudinal. Las muestras biológicas de Brucelosis que se van a manipular / procesar son de interés epidemiológico a nivel nacional; debido a que es un microorganismo potencialmente peligroso, su manipulación se realizará en un laboratorio de Bioseguridad nivel 2, aplicando prácticas de laboratorio nivel 3 bajo supervisión de personal calificado.

#### 4.1 Mantenimiento y actualización de la seroteca

##### 4.1.2 Registros

Verificar en la bitácora correspondiente que la muestra de suero a resguardar en la seroteca sea de interés epidemiológico.

##### 4.1.3 Consideraciones

Muestras de sangre que no se encuentren completamente separadas, se deben centrifugar a una velocidad de 5000 rpm durante 10 minutos.

Muestras de suero que se observen turbias o haya presencia de contaminación se deben filtrar con filtro millipore (siempre y cuando su resguardo sea de suma importancia, de lo contrario se desecha).

#### 4.1.4 Fraccionamiento de muestra

Con una micropipeta se transfieren 200  $\mu$ L de muestra de suero a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, los cuales deben de estar correctamente identificados con el número de muestra, ubicación en el cepario y año de resguardo. Sellar el tubo con papel Parafilm para asegurar su calidad.

#### 4.1.5 Conservación

Colocar los eppendorf con la muestra de suero en el congelador a una temperatura de 2-8 °C, una vez congelados se transfieren a la cámara de congelación para su resguardo a una temperatura de  $-70\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

## 4.2 Mantener y verificar la viabilidad del cepario de Brucelosis

### 4.2.1 Revisión de bitácora

Se revisa la información relevante de la cepa desde su ingreso al cepario como: identificación de la cepa, fecha de recepción, viabilidad, pureza, condiciones de almacenamiento y recuperación.

### 4.2.2 Reconstitución de cepa

Se realiza de acuerdo con el método de preservación de cepa utilizado ya sea liofilización o congelación. Si es una cepa liofilizada se requiere reconstitución e hidratación que debe realizarse con un líquido disolvente estéril. Si se trata de una cepa congelada ( $-70 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) se debe descongelar de 2-8°C.

### 4.2.3 Recuperación y viabilidad de la cepa

La cepa reconstituida se transfiere a un caldo nutritivo, se incuba a temperatura de 37°C durante 48-72 horas.

Para evaluar la pureza y viabilidad de la cepa se siembra por aislamiento una muestra obtenida del caldo inoculado en un medio de cultivo sólido de TSA, se incuba a temperatura de 37°C durante 48-72 horas.

Una vez finalizado el periodo de incubación, se evalúa el crecimiento de acuerdo con la morfología colonial y microscópica, se confirma realizando tinción Gram. Si se observa la morfología típica de *Brucella*, la cepa es viable y no hay contaminación.

La identificación de la cepa a conservar se realiza mediante pruebas bioquímicas.

### 4.2.4 Conservación

Para la conservación de la cepa se adiciona en un criovial identificado correctamente con datos de la cepa, fecha de almacenamiento y verificación, un mL del crioprotector (leche descremada, glicerol y sacarosa) y un mL de la cepa recuperada en caldo nutritivo. Se conserva en congelación a  $-70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ .

### 4.3 Actualización y conformación del biobanco de material genético de Brucelosis

Realizar una revisión bibliográfica de los diferentes métodos de extracción de ADN considerando las condiciones patológicas del microorganismo que estamos tratando, dificultad del método y recursos disponibles en el InDRE.

## 5. RESULTADOS

6.1 Se resguardaron en la cámara de congelación 200µL de cada muestra de suero de pacientes con brucelosis que se consideraron de interés epidemiológico, es decir, que tuvieron resultados positivos a las muestras confirmatorias de laboratorio como: aglutinación estándar y aglutinación en presencia de 2-mercaptoetanol y que sean o no positivos a hemocultivo. Para asegurar la autenticidad del cepario, se dejaron fuera las muestras que presentaban contaminantes o turbidez o que no estaban completamente separadas.

Todo quedó debidamente identificado y registrado en la bitácora correspondiente, para facilitar su oportuna búsqueda.

6.2 Para mantener y verificar la viabilidad del cepario se seleccionó una cepa que cumpliera con las siguientes características: estable antigénicamente, baja virulencia, almacenamiento entre 1-5 años, condiciones de almacenamiento e identificación seguras.

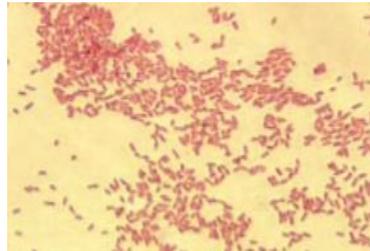
Se seleccionó una cepa congelada ( $-70^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ ), se procedió a descongelar ( $2^{\circ}\text{C}$ - $8^{\circ}\text{C}$ ) para su reconstitución y para su recuperación se resembró en agar TSA; se incubó a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, observándose un crecimiento favorable, al evaluar minuciosamente las colonias se observaba la misma morfología colonial en toda la placa.

Sin embargo, para asegurar la pureza de la cepa, se seleccionaron 4 colonias (una por cada cuadrante de la placa) y se sembraron por aislamiento en agar TSA, se incubaron a  $37^{\circ}$  durante 48 horas, obteniéndose colonias circulares, convexas con bordes regulares, traslúcidas y coloración ámbar, a la luz reflejada eran brillantes, ligeramente opalescentes; como se muestra en la figura 2. Esta morfología coincide con lo reportado como característico para esta especie.



**Figura 2:** Aislamiento de *Brucella* en agar TSA

Se confirma la pureza de la cepa aislada con tinción de GRAM, observándose la morfología típica de *Brucella*: Bacilos cortos GRAM- , hasta 1.5  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura 3).



**Figura 3:** Tinción de GRAM de *Brucella*

Por lo tanto se determina que la cepa seleccionada es viable y no hay contaminación microbiológica. Posteriormente se transfiere en un criovial que contiene crioprotector, se conserva a  $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  y se actualiza su registro e identificaciones necesarias.

6.3 Existen diferentes métodos para extracción de DNA, así como diversos kits en el mercado, pero se inclinó por la extracción de DNA de *Brucella* empleando columnas de QIAamp® DNA Mini and Blood Kit comercial de la marca QIAGEN, ya que representa un método simple, seguro y es uno de los activos con que cuenta el InDRE:

Cada procedimiento de este kit comprende 4 etapas:

- Lisis de las células presentes en la muestra de sangre
- Unión del ADN genómico del lisado celular a la membrana de una columna de centrifugación QIAamp Mini
- Lavado de la membrana:
- Elución del ADN genómico de la membrana

Observar la metodología propuesta por el fabricante en el anexo 1

## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los biobancos son de gran importancia en la investigación biomédica actual y futura ya que representan una fuente inagotable de muestras biológicas asociadas

a información clínica que permite un estudio exhaustivo en búsqueda de diagnósticos oportunos, medidas preventivas y tratamientos eficaces de enfermedades; siempre y cuando se tengan criterios que aseguren la calidad e idoneidad de las muestras biológicas obtenidas y almacenadas. Además, al ser el laboratorio de Brucelosis del InDRE el órgano normativo para el diagnóstico de la brucelosis en México, necesita grandes cantidades de muestra para capacitación, desarrollo de nuevos métodos, vacunas, investigaciones, etc. Por lo cual es de suma importancia darle mantenimiento y seguimiento al biobanco existente y buscar actualización y mejora del mismo para dar frente a la evolución de los patógenos que afectan la calidad de la vida, logrando la búsqueda temprana para prevenir o controlar con precisión.

Como se mencionó en el marco teórico, en México se utilizan generalmente pruebas serológicas para el diagnóstico de brucelosis, sin embargo éstas presentan la desventaja de ser poco sensibles y/o específicas pudiéndose tener falsos positivos; se ha demostrado que causan reactividad cruzada con ciertas bacterias como *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, por mencionar algunas, debido a la gran similitud de los lipopolisacáridos (LPS) presentes en la superficie de estas bacterias. Mientras que resultados falsos negativos pueden ocurrir durante las primeras etapas de la enfermedad o en casos de infección focal. Por ello se propone que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) debería ser aplicada como prueba complementaria y/o alternativa para obtener un diagnóstico rápido, específico y sensible de esta enfermedad. Se estima que la totalidad de la prueba puede ser realizada de 4-6 horas, lo que permite obtener un resultado rápido en comparación con el cultivo (hasta 30 días) o las muestras serológicas (hasta 5 días).

Hay diversos métodos de extracción de ADN genómico, pero diversos autores (Padilla et al., 2013; Xiomara et al., 2008) recomiendan el uso de kits comerciales de extracción de ADN, en este caso QIAamp® DSP DNA Blood Mini debido a su simplicidad, no utiliza reactivos corrosivos (como la extracción con fenol y cloroformo), por la reproducibilidad de producción de ADN purificado y sobre todo porque es uno de los activos con que cuenta el InDRE. Además, esta prueba podría ser aplicada directamente a muestras sanguíneas, aspirados de médula, biopsias de hígado, líquido cefalorraquídeo, cultivos primarios de pocos días y alimentos. Lo que facilita su uso en el InDRE para comenzar a crear un biobanco de genética ya que actualmente se cuenta con un banco de material biológico que está conformado por muestras clínicas (sangre total, LCR, suero) y cepas (distintas especies de *Brucella*) que podrían utilizarse para sentar las bases del biobanco de genética y posteriormente, ya que el método este estandarizado y validado optar por hacer el diagnóstico de la enfermedad por medio de PCR.

## 7. CONCLUSION

La finalidad de darle seguimiento y actualización al biobanco de brucelosis es potenciar los estudios biomédicos, centrándose en el análisis y mejora de la patología para contar con un diagnóstico oportuno y eficaz que ayudará a tomar las

medidas preventivas para disminuir el número de casos y contribuir de manera importante en la lucha contra la brucelosis. Pues aunque no sea una enfermedad muy conocida, es endémica en México y su incidencia va en ascenso generando grandes pérdidas.

La conformación e implementación del biobanco de genética de *Brucella* representa la oportunidad de avanzar en el diagnóstico de la brucelosis permitiendo la implementación de pruebas moleculares rápidas y eficaces.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, N.E., Díaz, M., & Ortiz, M. (2015). Brucelosis, una zoonosis frecuente. Elsevier, 3(2),129-133.

Baptista, H. (2010). *Hacia la participación de los biobancos en la investigación biomédica en México*. Revista Médica del Sur, 17(3), 152-156.

Díaz, N., Páez, M., Luna M., Guío, E. (2016). *Biobanco: Herramienta fundamental para la investigación biomédica actual*. Revista de la Universidad Industrial de Santander, 48(1), 97-117.

Doménech, N., Cal, N. (2014). *Biobancos y su importancia en el ámbito clínico y científico en relación con la investigación biomédica en España*. Reumatología clínica Elsevier Doyma, 10(5), 304-308.

Gardeazába P.(2018). *Biobancos como herramienta de investigación en salud pública, colombia*. Tesis de grado para Maestría en Salud Pública, Universidad El Bosque, Bogotá.

Guzmán, R., Contreras, A., Rodríguez, E., Ávila D., & Morales, R. (2016). *Brucelosis: zoonosis de importancia en México*. Revista Chilena Infectología, 33 (6), 656-662.

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez". (2016). *Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de la brucelosis*, InDRE. México: Secretaría de Salud.

Martínez, J., Briceño, I., Hoyos, A., Gómez A. (2012). *Biobancos. Una estrategia exigente y esencial para la conservación de muestras biológicas*. Acta Médica Colombiana, 37(3), 158-162.

Mosquera C., Xiomara; Bernal V., Carmen; Muskus L., Carlos., & Berdugo G. (2008). *Detección de Brucella abortus por PCR en muestras de sangre y leche de vacunos*. Revista MVZ Córdoba, 13(3), 1504-1513.

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

Vega, C., Ariza, R., & Rodríguez, F. (2008). *Brucelosis. Una infección vigente.* Acta Médica grupo Angeles, medigraphic, 6(4), 158-165.

Zazo, S., & Rojo, F. (2013). *Luces y sombras en la investigación clínica* (1ª ed., pp. 418-434). Madrid: Triacastela; Fundació Víctor Grífols I Lucas.

**Vo. Bo. de los asesores respecto a los contenidos académicos**



---

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez  
Profesor investigador titular C  
No. económico: 37622



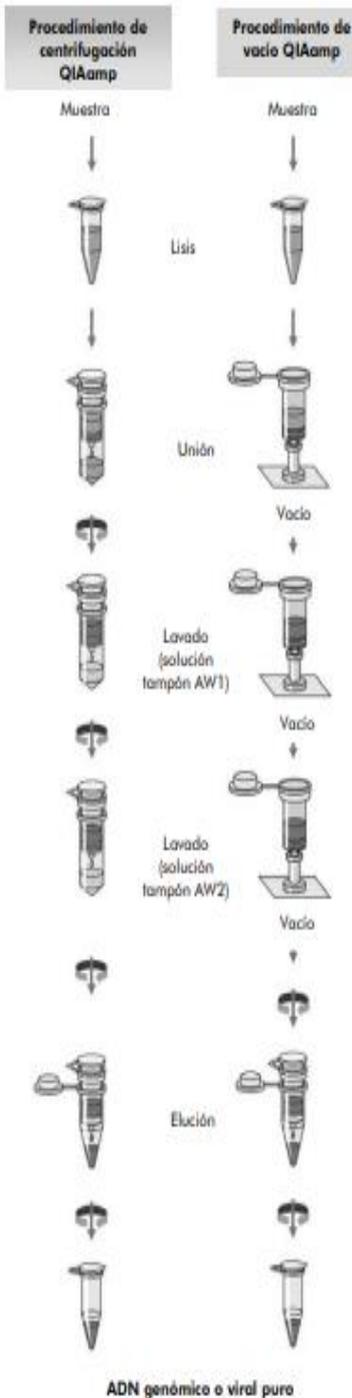
---

QBP. Eduardo Jiménez Sánchez  
Jefe de Laboratorio de Brucelosis  
No. de cédula profesional: 1057136

## 9. ANEXO 1

### MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Inactivación del ADN genómico de las cepas de *Brucella* durante 15 minutos a 100°C.



Añada a un tubo de lisis (LT) 20 µl de QP, 200 µl de muestra y 200 µl de AL.

Agite con la agitadora vorticial 15 segundos.

Incube 10 minutos ( $\pm 1$  minuto) a 56°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Añada 200 µl de etanol.

Agite con la agitadora vorticial 15 segundos.

Transfiera el lisado a la columna de centrifugación QIAamp Mini.

Procedimiento de centrifugación: centrifugue 1 minuto a 6.000 x g.

Procedimiento de vacío: aplique vacío.

Procedimiento de centrifugación: ponga la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de lavado nuevo, añada 500 µl de AW1 y centrifugue 1 minuto a 6.000 x g.

Procedimiento de vacío: añada 750 µl de AW1 y aplique vacío.

Procedimiento de centrifugación: ponga la columna de centrifugación QIAamp Mini en un nuevo tubo de lavado, añada 500 µl de AW2 y centrifugue 1 minuto a la máxima velocidad (aproximadamente 20.000 x g o 14.000 rpm).

Procedimiento de vacío: añada 750 µl de AW2 y aplique vacío.

Ponga la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de lavado

Centrifugue 3 minutos a la máxima velocidad (aproximadamente 20.000 x g o 14.000 rpm).

Ponga la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de elución.

Añada 50–200 µl de AE e incube durante 1 minuto.

Centrifugue 1 minuto a 6.000 x g.