



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD
XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME DE CONCLUSIÓN

NOMBRE DEL PROYECTO:

Elaboración de un control positivo para la identificación de *Brucella* spp. mediante técnicas de detección de ácidos nucleicos

MODALIDAD:

Actividades vinculadas con la profesión

ALUMNA:

Luz Alejandra Meza Vázquez

MATRÍCULA:

2183069250

ASESOR INTERNO:

M. en B. Gilberto Casillas Pétriz

No. ECONÓMICO:

24223

ASESOR EXTERNO:

QBP Eduardo Jiménez Sánchez

CÉDULA PROFESIONAL:

10571361

1. Introducción

El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dr. Manuel Martínez Báez (InDRE) se ubica en Francisco de P. Miranda #177, Col. Unidad Lomas de Plateros, Alcaldía Álvaro Obregón, Ciudad de México CP. 01480. Se fundó originalmente como Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET) en 1939, a lo largo de su historia ha tenido dos orientaciones diferentes: desde su creación y hasta 1985 fungió como hospital para enfermedades tropicales sujetas a proyectos de investigación clínica y contó con médicos de gran reconocimiento nacional e internacional.

Para apoyar los programas de vigilancia epidemiológica, se dio prioridad al desarrollo y ejecución de técnicas eficientes para el diagnóstico y la referencia, al fortalecimiento de redes nacionales de diagnóstico específico y a la generación de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP), bajo estos criterios, en 1989, el Instituto cambió su nombre por Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Doctor Manuel Martínez Báez e inició la incorporación de las redes de diagnóstico de tuberculosis, paludismo y cáncer cervicouterino, que funcionaban de manera independiente, y se implementó la red de virus de inmunodeficiencia humana (VIH) para bancos de sangre (Steinbruch-Flisser *et al.*, 2000).

La misión de dicho instituto es ofrecer productos y servicios de diagnóstico, formación de recursos humanos, evaluación de la competencia técnica e investigación y desarrollo tecnológico, que garanticen la definición de la enfermedad mediante diagnósticos de calidad comprobada, a través de la RNLSP, en respuesta a las necesidades de la salud pública. Con ello generar resultados confiables y oportunos para la toma de decisiones, que permitan mejorar los indicadores de morbilidad y mortalidad de las enfermedades sujetas a vigilancia epidemiológica, así como la alerta temprana ante la presencia de enfermedades emergentes, fortaleciendo la seguridad del personal, comunidad y el ambiente (Secretaría de Salud, 2022).

Por su parte, la visión describe al InDRE como una institución de excelencia, líder en el diagnóstico, control de calidad y referencia, así como en la formación de recursos humanos, evaluación de la competencia técnica, investigación y desarrollo tecnológico con respuesta de calidad ante los retos de salud pública, con personal comprometido en un ambiente de trabajo en equipo que fomente el desarrollo humano, la seguridad del personal, comunidad y el ambiente, así como la satisfacción entre las partes interesadas (Secretaría de Salud, 2022).

Actualmente está organizado en 4 departamentos: control de muestras y servicios, parasitología, virología y bacteriología, las actividades se desarrollaron en este último, específicamente en el Laboratorio de Brucelosis con el proyecto: “Elaboración de un control positivo para la identificación de *Brucella* spp. mediante técnicas de detección de ácidos nucleicos”, teniendo como objetivo obtener un control positivo de material genético para identificar *Brucella* spp.

2. Descripción de las actividades desarrolladas

- a) **Elaboración del protocolo de investigación:** para ello se recopiló información acerca de la enfermedad y diagnóstico de brucelosis, de igual forma se desarrolló el contenido temático de la investigación. En dicho protocolo se expuso la siguiente información:

1) Introducción

La brucelosis es una enfermedad antropozoonótica producida por el género *Brucella*. Su distribución es mundial, a pesar de que fue descubierta hace más de cien años y siendo señalada en 1986 por la Organización Mundial de la Salud como responsable de más miserias y pérdidas económicas que cualquier otra enfermedad animal conocida que afecte a los humanos (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015), continúa representando un problema importante de tipo sanitario y económico (Vega-López *et al.*, 2008).

Los casos de brucelosis han ido en aumento y frecuentemente no se diagnostica oportunamente (Vega-López *et al.*, 2008), este comportamiento es visible sobre todo en países en vías de desarrollo como México en donde aún no se han realizado actualizaciones importantes en las metodologías normalizadas para la prevención y control de dicha enfermedad en el ser humano (Moreno-Álvarez, 2021).

La PCR ha tomado protagonismo para el diagnóstico rápido y eficiente, dejando el aislamiento para otros trabajos especializados. Con su uso se acorta el tiempo necesario para el diagnóstico, aportando información útil para definir el estudio evolutivo o forma clínica de la enfermedad, así como el tratamiento más adecuado (Cevallos-Falquez *et al.*, 2010), por lo que esta técnica puede representar una manera efectiva de diagnosticar brucelosis, así como tener herramientas para actualizar el comportamiento de *Brucella* spp. mediante investigaciones.

Es sabido que, para el perfeccionamiento de técnicas como la PCR, es preciso contar con controles positivos que garanticen el desarrollo e interpretación de los ensayos. Estos controles de amplificación se emplean en la estandarización de los ensayos y permiten evaluar posibles falsos negativos, además tienen un gran valor en el caso de países libres de la enfermedad (Acevedo *et al.*, 2009). Por esta razón, este trabajo tiene como objetivo, obtener un control positivo de material genético para identificar *Brucella* spp.

2) Marco teórico

- **¿Qué es la brucelosis?**

La brucelosis también conocida como fiebre de Malta, fiebre ondulante, enfermedad de Bang o fiebre del mediterráneo es de las zoonosis bacterianas más frecuentes en todo el

mundo (Méndez-Lozano *et al.*, 2015); esta zoonosis ejemplifica la falta de interacción de los sectores de salud pública y veterinaria, haciendo de esta infección una de las más frecuentes en el mundo con especial importancia en los países mediterráneos de Europa y África, el Oriente Medio, América Central y América del Sur, Asia Central, la India y México (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015).

Afecta a varias especies de mamíferos, incluido el hombre, aunque su principal blanco son los ganados bovino, equino, porcino, ovino y caprino (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015). Su incidencia varía entre 1.3 y 70 casos por cada 100 000 habitantes, aunque es importante recalcar que estas diferencias se deben a las características de cada nación y en el año 2006, México ocupó el vigésimo primer lugar mundial en brucelosis humana y el segundo lugar en el continente americano, con una incidencia de 1.74 casos por cada 100.000 habitantes, aunque para el año 2011 aumentó a 2.97 (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016).

- **Agente etiológico**

Brucella es un género de pequeños bacilos gramnegativos, aunque carece de los factores de virulencia clásicos que se han reportado en otros gramnegativos, tales como: toxinas, flagelos, etc, mide 0.5-0.7µm de diámetro por 0.5-1.5 µm de longitud, con predominio de formas cocobacilares cortas; son inmóviles y aerobios estrictos, de crecimiento lento y no poseen cápsula ni forman esporas, poseen metabolismo oxidativo y utilizan nitratos como aceptores de electrones.

Poseen genes que codifican para componentes de flagelina y su genoma constituido por 2 cromosomas circulares y carece de plásmidos (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C en un pH de 6.6 a 7.4 (Freer y Castro- Arce, 2001). En base a la subunidad 16S del rRNA, el género *Brucella* es considerado como una alfa-2 proteobacteria y tiene una relación cercana desde el punto de vista filogenético con *Agrobacterium*, *Rickettsia*, *Rhizobium* y *Rhodobacter*, son oxidasa y catalasa positivos y no fermentan los azúcares (Vega-López *et al.*, 2008).

- **Especies del género *Brucella***

El género *Brucella* ha sido clasificado en base a la patogenicidad y al hospedero en seis especies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. maris* y *B. ovis*. De estas especies sólo las primeras cuatro son capaces de infectar al hombre (Vega-López *et al.*, 2008). Se conoce que las especies de *Brucella* tienen predilección para establecerse en ciertos hospederos, por ejemplo: *B. melitensis* infecta a caprinos, *B. abortus* infecta ganado vacuno, y *B. suis* infecta cerdos. Sin embargo, puede darse la infección cruzada, es decir, *B. melitensis* puede infectar vacas o cerdos, o *B. abortus* podría infectar cabras (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016).

En las últimas décadas se han identificado otras especies, entre ellas: *B. microti* que se aisló

de roedores endémicos de la República Checa en el año 2001, siendo reconocida en 2008 como nueva especie. En 1994, se describió el aislamiento de *Brucella* sp. en focas, marsopas, y delfines en Escocia. Después del análisis genético de diferentes aislados procedentes de mamíferos marinos, se propusieron dos nuevas especies: *B. pinnipedialis* y *B. ceti*. Posteriormente se identificó una nueva especie, denominada *B. inopinata*, la que fue aislada de un implante mamario (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015; Guzmán-Hernández *et al.*, 2016).

- **Dogma central de la biología**

El Dogma Central de la Biología fue propuesto por Francis Crick en 1958 (publicado en 1970 en la revista científica Nature), y consiste simplemente en la afirmación de que el ADN codifica la producción de RNA por transcripción, el RNA codifica la producción de proteínas por traducción y las proteínas no codifican la producción de proteínas ni de RNA ni de ADN (Moreira, 2015). Patiño y Pineda (2006), exponen que la expresión de la información genética en todas las células tiene lugar (la gran mayoría de las veces), como un sistema de una sola dirección: el ADN determina la síntesis de RNA y este, especifica la síntesis de polipéptidos que a su vez forman las proteínas.

Crick propuso como transferencia posible, aunque poco frecuente o rara, la traducción directa de ADN a proteína, fenómeno que hasta el presente no ha sido reportado. Resaltó con ímpetu que es imposible que una proteína guíe la copia de ella misma produciendo otra idéntica, también es imposible que una proteína logre fabricar el RNA o el ADN que la codifica. En este sentido según Crick, se afirma que el ADN ubicado en el núcleo de una célula es la fuente de la información (Andrade, 2011).

- **Transcripción**

La transcripción es el proceso de transmisión de la información genética del ADN al RNA (Pallares, 2007), para ello, se elabora una cadena de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) a partir de una molécula molde de ADN bicatenario (aunque para un gen determinado sólo se transcribe una de las cadenas), presente en todas las células (Portal Académico del CCH, 2017). Este proceso se lleva a cabo por la acción de la enzima RNA polimerasa, que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre ribonucleótidos. Esta enzima requiere el molde de ADN y los precursores del RNA son los ribonucleósidos trifosfato ATP, GTP, UTP y CTP (Madigan *et al.*, 2003).

- **Pruebas utilizadas para detección y diagnóstico de brucelosis en humanos**

La brucelosis en los humanos se presenta con diferentes manifestaciones clínicas inespecíficas incluyendo cuadros asintomáticos; para Cevallos-Falquez *et al.* (2010) el diagnóstico se basa en la sospecha clínica de la enfermedad que aparentemente es confirmada por demostración de *Brucella* en el organismo por la reacción antígeno-

anticuerpo a partir de la sangre, esto mismo es descrito por Guzmán-Hernández *et al.* (2016), además, agrega que el diagnóstico se debe basar en la historia clínica del paciente, sobre todo si existió contacto con animales enfermos, si visitó una zona endémica e ingirió derivados lácteos no pasteurizados.

El diagnóstico deberá incluir por una parte el cultivo de sangre aunque una de las desventajas del aislamiento, se debe a que *Brucella* es un microorganismo de lento crecimiento en el primo- aislamiento, por lo que la probabilidad de recuperarla desde un paciente es baja (alrededor de 30%) (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016); por otra se incluyen pruebas serológicas que son métodos rápidos, accesibles y de un costo aceptable aunque la dificultad es su variabilidad de interpretación (Cevallos-Falquez *et al.*, 2010).

1) Métodos directos para la detección de brucelosis

• Cultivo

El aislamiento de *Brucella* spp. constituye el método diagnóstico definitivo. Suele obtenerse por hemocultivo o cultivo de médula ósea y, más raramente, por cultivo de líquido cefalorraquídeo, líquido articular, exudado purulento, etc. (López-Cameselle *et al.*, 2018). El medio clásico de Ruiz Castañeda, que utiliza una fase sólida y otra líquida, es el más apropiado para el diagnóstico. En la mayoría de los procesos agudos, tras incubar el medio 2-4 días es posible observar en la fase sólida pequeñas colonias que se deslizan por el agar en forma que recuerdan las lágrimas de cera resbalando por la vela. Una pequeña proporción de casos presenta el crecimiento entre los 5-15 días y sólo de forma excepcional, éste se retrasa hasta pasados 30-45 días (Montes, 2005).

Una de las desventajas del aislamiento, se debe a que *Brucella* es un microorganismo de lento crecimiento en el primo-aislamiento, por lo que la probabilidad de recuperarla desde un paciente es baja (alrededor de 30%). Su eficacia es baja y un resultado negativo no puede descartar la enfermedad, sobre todo en las formas crónicas en las que los cultivos negativos son frecuentes. La toma de la muestra se debe hacer lo antes posible para que el tratamiento con antibióticos no interfiera en el resultado (Ministerio de Salud de la Nación, 2013). Debido a este inconveniente, el diagnóstico de esta enfermedad se establece a través de los test serológicos (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016).

• Detección de ácidos nucleicos (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR (Tamay de Dios *et al.*, 2013). La PCR toma un protagonismo para el

diagnóstico rápido y eficiente, dejando el aislamiento para otros trabajos especializados. Con su uso se acorta el tiempo necesario para el diagnóstico, aportando además información útil para definir el estudio evolutivo o forma clínica de la enfermedad y el tratamiento más adecuado (Cevallos-Falquez *et al.*, 2010).

Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias (Serrato-Díaz *et al.*, 2014).

El desarrollo de pruebas de reacción en cadena de polimerasa constituye una importante alternativa para el diagnóstico de muchas enfermedades provocadas por bacterias de crecimiento lento como *Brucella* sp. (Padilla *et al.*, 2003). Mediante esta prueba se puede amplificar el ADN del género *Brucella* presente en sangre u otras muestras clínicas. Para ello, se utilizan dos iniciadores de 21 nucleótidos respectivamente denominados B4 (5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3') y B5 (5'-CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG-3'). Estos oligonucleótidos amplifican una señal de 223 pares de bases del gen que codifica la síntesis de una proteína de membrana de la superficie externa de *B. abortus* de 31 kDa (BCSP31) específica del género. La mezcla se amplifica en un termociclador y posteriormente, los fragmentos amplificados, se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa y el resultado se visualiza en un transiluminador UV (Moreno-Alvarez, 2021).

2) Métodos indirectos para la detección de brucelosis

• Aglutinación con antígeno Rosa de Bengala

Se lleva a cabo con el suero obtenido de la muestra del paciente (Arciga-Vázquez *et al.*, 2021) y el antígeno que se usa es una suspensión de un cultivo de *B. abortus* cepa 1119, inactivada con fenol. Emplea brucelas inactivadas y teñidas que, mediante la observación de la aglutinación, demuestran anticuerpos específicos en el suero del paciente sospechoso de la enfermedad (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016).

La suspensión bacteriana y coloreada, es aglutinada por anticuerpos IgG o IgM presentes en el suero del paciente; el reactivo, debido a su formulación en un tampón de pH ácido, es capaz de reaccionar con anticuerpos IgG o IgM por lo que es muy útil para el diagnóstico de individuos en fase crónica de la enfermedad (los cuales presentan un nivel elevado de

anticuerpos IgG) (Spinreact, 2016). Esta prueba deberá realizarse conforme a lo siguiente:

1. Indicada en pacientes con sintomatología de brucelosis.
2. La muestra biológica requerida es suero del paciente o líquido cefalorraquídeo.
3. Se utiliza un antígeno para buscar la presencia de un aglutinado de rosa intenso.
4. La interpretación del resultado es cualitativo (positivo o negativo), positivo es presencia de aglutinación, negativo es ausencia de aglutinación. Si el resultado es positivo (prueba presuntiva), debe confirmarse mediante las pruebas de SAT y 2-ME.

Cuando el resultado es positivo se ocupan dos pruebas confirmatorias como aglutinación estándar (SAT) y aglutinación estándar en presencia de 2-mercaptoetanol (2-ME) (Arciga-Vázquez *et al.*, 2021).

- **Prueba Confirmatoria de Aglutinación Estándar (SAT)**

Consiste en la demostración de anticuerpos anti *Brucella* por aglutinación, utilizando bacterias (*B. abortus* cepa 1119-3) inactivadas con fenol (Morales-García *et al.*, 2014). Se hacen diluciones seriadas del suero en solución salina y se adiciona el antígeno, estas permiten identificar inmunoglobulinas específicas de las clases IgM (demuestra infección en etapa inicial), IgG (demuestra infección en etapa crónica) e IgA (demuestra infección previa). La prueba positiva se observa con la presencia de una malla de aglutinación en el fondo del tubo (o en los pozos de una microplaca, cuando se usa el micrométodo) y el sobrenadante transparente (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016).

Deberá realizarse conforme a lo siguiente:

1. Indicada en pacientes con sintomatología de brucelosis y prueba rosa de Bengala positiva.
2. Muestra requerida: suero, plasma o líquido cefalorraquídeo.
3. Emplea como antígeno una suspensión de *Brucella abortus* inactivada, no teñida, la cual se agrega a diluciones de la muestra problema en solución salina fenolada, se incuba y se busca la presencia de mallas de aglutinación.
4. El informe corresponde al título obtenido y este es considerado positivo con dilución \geq de 1:80.

- **Prueba Confirmatoria de Aglutinación en Presencia de 2- Mercaptoetanol (2-ME)**

Para la demostración de anticuerpos anti *Brucella* por aglutinación en presencia de este reactivo, es similar a la prueba de SAT, se usa el mismo antígeno, la única variante es la adición de 2-mercaptoetanol (2-ME) en la solución salina con la que se diluye el suero. El 2-ME, al ser un agente reductor, rompe los enlaces disulfuro y despolimeriza al pentámero de la IgM sin afectar la actividad aglutinante de la IgG por lo que de presentarse la aglutinación éstas serán de esta última. La prueba se considera positiva con títulos \geq 1:20 (Morales-García *et al.*, 2014).

La prueba deberá realizarse conforme a lo siguiente:

1. Indicada en pacientes con sintomatología de brucelosis, la prueba rosa de Bengala positiva se realiza simultáneamente con la prueba de SAT.
2. En la muestra requerida se utiliza suero, plasma o líquido cefalorraquídeo.
3. Emplea como antígeno una suspensión de *Brucella abortus* inactivada, no teñida, la cual se agrega a diluciones de la muestra problema en solución salina 2 mercaptoetanol, se incuba y se busca la presencia de mallas de aglutinación.
4. El informe corresponde al título obtenido y este es considerado positivo con dilución igual o mayor a 1:20.

b) Manejo de muestras clínicas y recopilación de datos epidemiológicos de la brucelosis: con las muestras empleadas se actualizó el biobanco y al mismo tiempo se realizó una recopilación de datos epidemiológicos de brucelosis, con los que se generó una base de datos. Dicha actividad es descrita a continuación:

- **Seroteca año 2023**

Con el objetivo de conformar y actualizar el banco de muestras del año 2023 de forma óptima, las muestras clínicas conservadas en el periodo enero/junio, se reubicaron para darle un mejor seguimiento tanto al biobanco, como a la base de datos correspondiente. Para mejorar el registro de la ubicación de cada vial se implementó una bitácora con información específica que sirvió para llenar los datos correspondientes del laboratorio a la base de datos en Excel. Una vez realizadas las pruebas tamiz y confirmatorias por parte de los químicos se procedió a conservar 600µl de cada muestra ingresada, repartida en 3 tubos Eppendorf con 200µl de suero cada uno. Cada tubo se identificó con el número y clave de cada muestra y se etiquetó con un nuevo número correspondiente al año de la seroteca en curso. Hecho lo anterior fue necesario sellar cada tubo con papel parafina para evitar la entrada de humedad y permitir que la muestra siguiera conservando sus propiedades de origen.

Finalmente se volvió a identificar en la tapa de cada tubo el número de seroteca correspondiente para facilitar su búsqueda cada que fuera necesario. Para guardar las muestras se utilizaron cajas con una capacidad para conservar 81-100 viales. Al momento de llenar una caja se identificó colocándole una etiqueta con el año, número de caja correspondiente y el rango de muestras que contenía. No se omite mencionar que en el InDRE se realiza este procedimiento con la finalidad de solventar cualquier inconsistencia, resultado del análisis de control de calidad y diagnóstico serológico emitido y que en este banco de sueros se cuida la biocustodia de cada muestra resguardada.

- **Recopilación de datos epidemiológicos de brucelosis**

La vigilancia es uno de los usos de la epidemiología más utilizados en los servicios de salud,

en particular en el primer nivel de atención, pues sus propósitos son: observar, predecir, prever y anticiparse a los hechos para alertar tempranamente, de esta manera contribuir a su eliminación mediante el desarrollo de todas sus etapas: recolección de datos, análisis e interpretación de la información y diseminación de la información (Martínez-Calvo, 2022). Con la finalidad de cumplir dichos propósitos, en este trabajo se realizó una recopilación de datos epidemiológicos obtenidos de las muestras conservadas en el biobanco con el fin de generar bases de datos de interés en salud pública.

c) Realizar las pruebas para el diagnóstico de la brucelosis y estandarizar el control positivo para su validación: en esta actividad se efectuó la integración de metodologías utilizadas en el diagnóstico de brucelosis, de igual forma, hubo manejo de muestras y material genético de *Brucella* spp.

- **Aislamiento de *Brucella* spp.**

El diagnóstico directo consiste en la identificación del agente causal de la enfermedad a través de diferentes procedimientos que evidencian el crecimiento, morfología y comportamiento bacteriano. Estos procedimientos y pruebas son las siguientes:

1) Hemocultivo: una persona que cursa un estado agudo de cierta enfermedad puede ser diagnosticada por medio del aislamiento bacteriano en hemocultivo. Para aumentar la probabilidad del aislamiento, la muestra debe ser tomada al inicio de la fase febril de la enfermedad y antes de iniciar el tratamiento antibacteriano. La cantidad de muestra para adultos es de 8 a 10 ml y para infantes de 2 a 3 ml. Para evitar la contaminación del medio se debe procurar la asepsia durante todo el proceso, tanto en la fase pre-analítica, especialmente al momento de la toma de muestra, cómo en la fase analítica.

El Medio Bifásico Ruíz Castañeda es un tipo de hemocultivo que además de otras bacterias, también favorece el crecimiento del género *Brucella*. Consiste en un frasco con un medio bifásico compuesto por una fase sólida (Agar Tripticasa Soya) y otra líquida (Caldo de Tripticasa Soya) por lo que al inclinar el frasco se genera un subcultivo en el medio sólido, sin necesidad de abrir o pinchar el frasco.

Existen otros tipos de hemocultivo más simples o más complejos según sea el caso. El hemocultivo debe incubarse a una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de no ser posible puede permanecer a temperatura ambiente sin rebasar las 18 horas. La lectura se debe realizar diariamente, sin embargo, en el caso especial de *Brucella*, el crecimiento generalmente se detecta de 3 a 7 días posteriores a la incubación, aunque en algunos casos puede tardar hasta 6 semanas. Para continuar con el aislamiento es necesario realizar una resiembra a las 78 horas de incubación.

- 2) **Aislamiento y resiembra:** los medios de cultivo que se utilizaron fueron Agar Tripticosa Soya, Agar Sangre, Agar MacConkey y Agar Sal Manitol. Cabe mencionar que cada medio se cultivó tanto en condiciones de aerobios como anaerobiosis a 37°C, de esta manera se utilizaron en total ocho placas de agar por cada resiembra.
- 3) **Serotipificación:** esta prueba determina el género y especie del microorganismo analizado, a través de la aglutinación de antígenos con anticuerpos conocidos que son; suero polivalente, suero A y suero M. El suero polivalente es utilizado para confirmar el género del microorganismo, ya que contiene los antígenos más importantes que provocan la enfermedad en humanos. El suero A identifica principalmente antígenos de *Brucella abortus*, el suero M de *Brucella melitensis* y el R identifica antígenos de cepas rugosas. Algunas bacterias suelen auto aglutinar, es por esto que la prueba también debe realizarse con solución salina y verificar que no muestren ese comportamiento, de ser así la prueba se rechaza y se vuelve a realizar. Se emplea Acriflavina a una concentración 1:1000, la presencia de aglutinación indica rugosidad en la cepa.

En un gabinete de seguridad, se realizó una suspensión de las diferentes colonias en solución salina fenolada al 2%. Posteriormente se realizó la inactivación por medio de calor a 65°C en baño María durante 2 horas. En una placa de poliestireno se agregaron en 4 pozos 50 µl de cada suero, acriflavina y solución salina. Después se agregaron 10 µl de cada muestra (antígeno), se incubó la placa a 37°C durante 24 horas, finalmente se realizó la lectura.

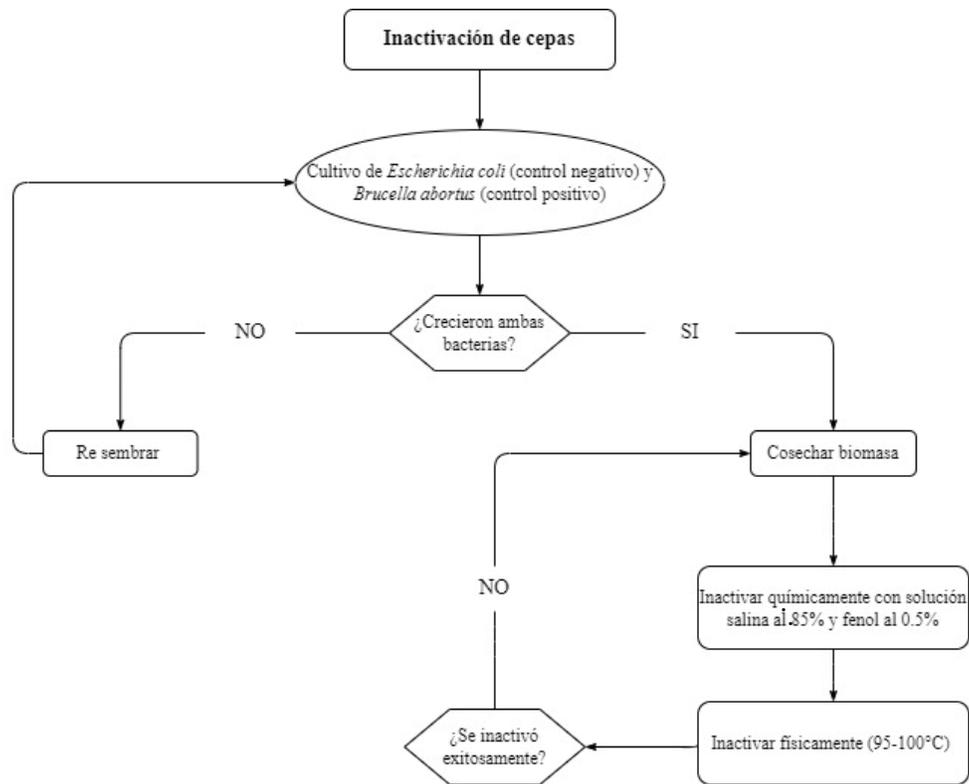
Es importante mencionar que, a petición del asesor, fueron enseñadas y realizadas las pruebas serológicas para diagnóstico de brucelosis (prueba aglutinación con antígeno Rosa de Bengala, prueba confirmatoria de Aglutinación Estándar (SAT) y prueba confirmatoria de Aglutinación en presencia de 2-Mercaptoetanol (2-ME).

- **Inactivación de cepas**

El proceso de inactivación es conocido como la metodología que finaliza el proceso de crecimiento o síntesis proteica. Para el diagnóstico molecular de cualquier agente patógeno, este proceso debe asegurar una pérdida total de la infectividad mientras conservan la integridad de los ácidos nucleicos. La agresividad de los distintos protocolos puede variar dependiendo de la especie bacteriana (Organización Panamericana de la Salud, 2014; Arellano-Arriagada, 2023).

Existen diversos protocolos de inactivación y cada uno puede variar dependiendo de la

especie bacteriana tratada (Arellano-Arriagada, 2023). Taddese *et al.* (2021) compara procesos químicos con beta-propiolactona, hidróxido de sodio, etanol, formalina, y físicos como pasteurización y luz ultravioleta C, en su trabajo expone su capacidad para inactivar bacterias de manera efectiva, su aplicabilidad en diferentes cepas y la posibilidad de estandarización. Para el fin de este trabajo, las bacterias empleadas como controles: negativo (*E. coli* CCTB-019) y positivo (*B. abortus* 995) fueron inactivadas en primer lugar de manera química con fenol al 0.5% y solución salina al 0.85% y posteriormente de manera física con calor (95° C). Este proceso es descrito en el siguiente diagrama:



- **Extracción de ADN**

La extracción de ADN es un paso fundamental para estudios moleculares. Existen varias técnicas para obtener ADN que se basan en solventes orgánicos, en precipitación con sales o en membranas de sílica. Generalmente, los kits comerciales usan membranas de sílica en el proceso de extracción de ADN. Uno de los kits disponibles en el mercado es DNeasy, mismo que fue utilizado para el desarrollo de este trabajo; Niu *et al.* (2008) describe que dicho kit usa una tecnología de membranas de silicato para purificar rápidamente el ADN celular total, sin usar solventes orgánicos que generan un riesgo para la salud humana y el medio ambiente por las dificultades para su eliminación. Este método permite una lisis directa, la cual se logra con proteinasa K, el pH se ajusta con diferentes buffers para lograr

la máxima fijación de ADN a la membrana y los contaminantes e inhibidores enzimáticos son removidos por centrifugación (Pérez-Pérez, 2018).

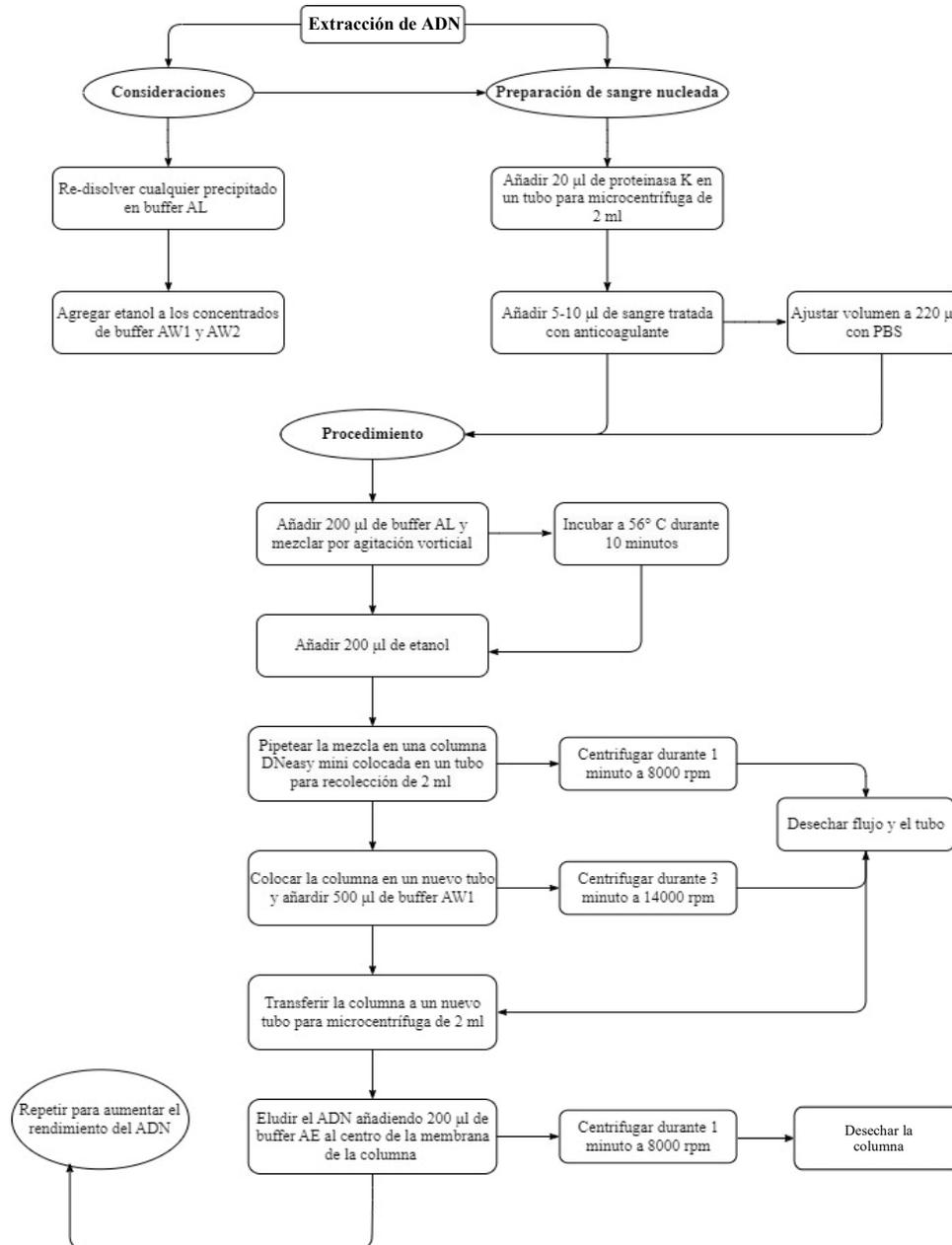


Diagrama de flujo sobre el proceso de extracción de ADN mediante el kit DNeasy blood y tissue

Durante todas las actividades desarrolladas se cumplió con las medidas de bioseguridad y biocustodia que se deben cumplir dentro del área de trabajo. También fueron entregados al InDRE de manera trimestral dos informes de trabajo (uno en el mes de abril y otro en el mes de julio) con el fin de corroborar el correcto cumplimiento de las actividades, estos fueron avalados por el asesor QBP Eduardo Jiménez Sánchez.

3. Descripción del vínculo de las actividades desarrolladas con los objetivos de formación del plan de estudios

De acuerdo con los objetivos del plan de estudios de la licenciatura en biología, los profesionales debemos ser críticos, capaces de realizar actividades científicas; por ello, trabajar en el proyecto: “Elaboración de un control positivo para la identificación de *Brucella* spp. mediante técnicas de detección de ácidos nucleicos” me permitió desempeñar esta formación a lo largo del servicio social. Además de esto, se puso en práctica la actitud creativa y de interdisciplinariedad desarrollada durante la licenciatura, pues las actividades se desarrollaron en el área de química, bacteriología y parasitología además de biología.

Es importante recalcar que la *Brucella* spp. es una bacteria altamente virulenta y que muestra alto impacto para la salud pública en humanos así como en la salud animal; por este motivo considero que al trabajar en las actividades específicas expuestas se enfatiza en el objetivo de estudiar problemas relacionados con los procesos biológicos fundamentales que rigen interrelaciones de los seres vivos y su medio ambiente; en este contexto, no se deja de considerar que se trata de un proceso salud-enfermedad en el cual se está involucrando también el ámbito social. Destacando el objetivo general de la formación del biólogo, es necesario mencionar que se estuvo trabajando con un organismo que forma parte del recurso biótico y que el proceso fue regido por metodologías propias de las ciencias biológicas.

4. Referencias

- Acevedo, A. M., Santana, E., Díaz de Arce, H., Pérez, L. J., Caballero, A., Suárez L. y Sánchez, O. (2009). Desarrollo de controles positivos para métodos moleculares de detección de virus de influenza aviar. *Revista Salud Animal*, 31(1), 50-54.
- Álvarez-Hernández, N. E., Díaz-Flores, M. y Ortiz-Reynoso, M. (2015). Brucelosis, una zoonosis frecuente. *Elsevier*, 3(2), 129-133.
- Andrade, E. (2011). La dualidad análogo digital de la información se ejemplifica en el estudio de las moléculas de RNA. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 15-42.
- Arciga-Vázquez, G. S., Santos-López, G., Castañeda-Roldán, E. I., Cedillo-Ramírez, M. L., Cano-Vázquez, E. N., Monroy-Azuara, M. G., López-Méndez, A. I., Ayón- 13 Aguilar J. y Méndez-Martínez, S. (2021). Estudio de casos confirmados de brucelosis humana en Puebla, México. *Revista Chilena Infectol*, 38(2), 281-289.
- Arellano-Arriagada, L. A. (2023). Evaluación de protocolos de inactivación de cepas de *Helicobacter pylori* y su efecto sobre integridad de membrana y citotoxicidad sobre la línea celular AGS. [Tesis de maestría]. Universidad de Concepción.

- Cevallos-Falquez, O., Carranza-Patiño, M., Saucedo-Aguiar, S., Romero-Garaicoa, D., Ramos-Gavilanes, L., Reyes-Chancay, X., Cobeña-Rosado, K., Rodríguez-Grefa, A., Mariscal-Álvarez, J., Mestanza-Uquillas, C., Lorena-Cadme, M., Escobar-Troya, A., Vera-Chang, J. y Canchignia-Martínez, F. (2010). Diagnóstico serológico (Rosa de Bengala) y molecular (PCR) de brucelosis en humanos. *Ciencia y Tecnología*, 3(1), 27- 32.
- Freer, E. y Castro-Arce, R. (2001). *Brucella*: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 22(1).
- Guzmán-Hernández, R. L., Contreras-Rodríguez, A., Ávila-Calderón, E. D. y Morales-García, M. R. (2016). Brucelosis: zoonosis de importancia en México. *Revista Chilena Infectol*, 33(6), 656-662.
- López-Cameselle, B., Cobos-Manchon, D., Moreno-Bona, N. y Gargallo-Herrero, M. J. (2018). Brucelosis: Enfermedad Infecciosa. <https://core.ac.uk/download/pdf/235852856.pdf>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. (2003). Principios de biología molecular microbiana en I. Capella (Ed.), Brock: Biología de los microorganismos (10 ed., p. 187). Editorial Pearson.
- Martínez-Calvo, S. I. (2022). La recolección de datos para la vigilancia epidemiológica de la COVID-19 en Cuba. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 59, 1-10.
- Méndez-Lozano, M., Rodríguez-Reyes, E. J. y Sánchez-Zamorano, L. M. (2015). Brucelosis, una zoonosis presente en la población: estudio de series de tiempo en México. *Salud Pública de México*, 57(6), 519-527.
- Ministerio de Salud de la Nación. (2013). Enfermedades infecciosas. Brucelosis. Diagnóstico de brucelosis. Guía para el equipo de salud. <https://www.msal.gob.ar/images/stories/ryc/graficos/0000000525cnt-guia-medicalbrucelosis.pdf>
- Montes, I. (2005). Diagnóstico de la brucelosis. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/diagbruce.pdf>
- Morales-García, M. R., García-Méndez, N., Regalado-Jacobo, D., López-Merino, A. y Contreras-Rodríguez, A. (2014). Seguimiento clínico, serológico y mediante la

reacción de polimerasa en cadena de una familia con brucelosis. *Revista Chilena Infectol*, 31(4), 425-433.

Moreira, C. (2015). Dogma Central da Biología. *Revista de Ciencia Elementar*, 3(1).

Moreno-Álvarez, C. E. (2021). Recopilación bibliográfica de las pruebas de laboratorio utilizadas para el diagnóstico de brucelosis en humanos. [Tesis de Universidad]. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Niu, C., Kebede, H., Auld, D. L., Woodward, J. E., Burow, G. y Wright, J. (2008). A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. *African Journal of Biotechnology*, 7(16), 2818-2822.

Organización Panamericana de la Salud. (2014). Procedimientos generales para inactivación de muestras potencialmente infecciosas con el virus ébola y otros agentes virales altamente patógenos. <https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2014-cha-procedimientos-inactivacion-ebola.pdf>

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

Pallares, C. P. (2007). Conjugados oligonucleótido-péptido para el reconocimiento de factores de transcripción y ADN. Universidad de Santiago de Compostela.

Patiño, P. J. y Pineda, J. R. R. (2006). El dogma central de la Biología molecular. Fondo Editorial Biogénesis, 107-118.

Portal Académico del CCH. (25 de octubre de 2017). Transcripción. <https://el.portalacademico.cch.unam.mx/alumno/biologia1/unidad2/sintesisdeproteinas/transcripcion>

Pérez-Pérez, J. (2018). Extracción de ADN con DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN), modificado para insectos. Sello Editorial Tecnológico de Antioquia.

Secretaria de Salud. (9 de septiembre de 2022). Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dr. Manuel Martínez Báez. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/instituto-de-diagnostico-y-referencia-epidemiologicos-indre>

Serrato-Díaz, A., Flores-Rentería, L., Aportela-Cortez, J. y Sierra-Palacios, E. (2014). PCR:

reacción en cadena de la polimerasa. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Spinreact. (2016). Rosa de Bengala. <https://www.spinreact.com.mx/public/instructivo/SEROLOGIA%20Y%20SEROLOGIA%20FEBRIL/1200901%20Rosa%20Bengala.pdf>

Steinbruch-Flisser, A., Escobar-Gutiérrez, A. y Correa-Beltrán, D. (2000). Actividades del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de México. *6*(42), 550-553

Taddese, R., Belzerb, C., Aalvinkc, S., I. de Jonge, M., Nagtegaal, I., Dutilh, B. y Boleij, A. (2021). Producción de especies grampositivas y gramnegativas inactivadas con morfología e integridad celular preservadas. *Journal of Microbiological Methods*, *184*, 2-10.

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

Vega-López, C. A., Ariza-Andraca, R. y Rodríguez-Weber, F. L. (2008). Brucelosis. Una infección vigente. *Acta Médica Grupo Ángeles*, *6*(4), 158-165.