

# Evaluación de la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina

## Evaluation of the polymerase chain reaction test (PCR), for the diagnosis of bovine brucellosis

Tomás Benjamín Rentería Evangelista<sup>a</sup>, Humberto Organes De los Santos<sup>b</sup>, Alexei Fedorovich Licea Navarro<sup>b</sup>, Gerardo Enrique Medina Basulto<sup>a</sup>, Klaus Nielsen<sup>c</sup>, Martín Francisco Montaña Gómez<sup>a</sup>, José Francisco Moreno Rosales<sup>a</sup>, Lourdes Carolina Pujol Manríquez<sup>a</sup>

### RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica que puede impactar fuerte en el ámbito económico, además de representar un delicado problema de salud pública. En México, el diagnóstico oficial se realiza por serología, mediante las pruebas de tarjeta, rivanol y fijación de complemento, considerándose el aislamiento y caracterización de *Brucella spp* como “la prueba de oro”. En este estudio se llevó a cabo la comparación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), con respecto a la bacteriología y la serología, en el diagnóstico de la brucelosis bovina. Un total de 51 muestras de sangre y leche fueron recolectadas de dos hatos con prevalencia histórica de presencia de brucelosis. De las 51 muestras analizadas, 24 resultaron negativas a las pruebas serológicas, bacteriológicas y PCR; 11 resultaron positivas a todas las pruebas, seis resultaron positivas a serología y PCR, una positiva a serología y bacteriología y nueve positivas a serología. De los 12 aislamientos positivos se tomó una muestra para realizar PCR obteniendo amplificación en el 100 % de los cultivos. Los resultados muestran que la proporción de detección de animales positivos mediante el PCR fue superior al aislamiento ( $P < 0.05$ ), por lo tanto puede ser una herramienta muy útil en la detección de brucelosis en muestras de leche. El PCR a partir de cultivos puros tiene una sensibilidad del 100 % y puede ser utilizado ya sea en la detección de *Brucella* o en la diferenciación de la cepa vacunal de la cepa de campo.

**PALABRAS CLAVE:** PCR, *Brucella abortus*, Vacuna RB51, Brucelosis.

### ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic disease with a strong economic impact. It is also a serious public health issue. In Mexico, the official diagnosis is made by serology, using the card, rivanol, and complement fixation tests. Nevertheless, *Brucella spp.* isolation and characterization remain as the diagnostic gold standard. In this study the polymerase chain reaction (PCR) technique was compared with bacteriology and serology in the diagnosis of bovine brucellosis. A total of 51 blood/milk samples were collected from two herds with positive brucellosis history. Of these 51 samples 24 were negative to serological, bacteriological and PCR tests; 11 were positive to all tests; six were positive to both serology and PCR; one was positive to both serology and bacteriology; and 9 were positive to serology. From the 12 positive isolations, a sample was taken for PCR. Amplification was obtained in 100 % of these cultures. Results show that the proportional detection of positive animals by PCR was higher than isolation ( $P < 0.05$ ). Therefore PCR can be a very useful tool in the detection of brucellosis in milk samples. PCR from pure cultures has a 100 % sensitivity, and it can be used either in the detection of *Brucella*, or in discriminating between vaccine and field strains.

**KEY WORDS:** PCR, *Brucella abortus*, RB51 Vaccine, Brucellosis.

Recibido el 8 de julio de 2003 y aceptado para su publicación el 11 de junio de 2004.

a Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Av. Obregón y Julián Carrillo S/N, 22100, Mexicali, Baja California. Tel (686) 5636906, Fax: (686) 5636907. mmontano5@yahoo.com. Correspondencia con el sexto autor.

b Centro de Investigación Científica y Estudios Superiores de Ensenada.

c Canadian Food Inspection Agency.

*Brucella abortus* es una bacteria patógena gram-negativa causante de la brucelosis bovina, la cual provoca una disminución en la producción de leche y abortos<sup>(1)</sup>. Además, la brucelosis es una importante enfermedad zoonótica con impacto económico y en salud pública, ya que cada año son reportados cerca de 500,000 nuevos casos a nivel mundial, con síntomas que varían desde leves a muy graves<sup>(2)</sup>. Dada la importancia de la enfermedad, es necesario establecer metodologías de detección rápidas, sensibles y altamente específicas.

En México, el diagnóstico oficial de la brucelosis bovina se realiza mediante las pruebas serológicas de tarjeta (PT), rivanol (RIV) y fijación de complemento (FC)<sup>(3)</sup>; sin embargo, durante el desarrollo de estas pruebas indirectas se pueden presentar reacciones cruzadas con otras bacterias tales como *Yersinia enterocolitica* serotipo O9, obteniéndose en consecuencia resultados falsos positivos<sup>(4)</sup>.

El diagnóstico definitivo de la brucelosis se lleva a cabo con el aislamiento de *Brucella spp.*, a partir de tejidos, líquidos corporales y leche<sup>(3)</sup>. La confirmación de la presencia de este microorganismo en cualquiera de las muestras, significa que el animal es positivo, aún en ausencia de anticuerpos séricos<sup>(3)</sup>. Por desgracia, esta práctica no es común en México, además de que los procedimientos bacteriológicos no son siempre exitosos, son tardados y representan un gran riesgo de infección para los técnicos de laboratorio<sup>(5)</sup>.

Considerando las desventajas de los métodos de diagnóstico mencionados, en los últimos 10 años el PCR ha sido ampliamente utilizado para el diagnóstico y la diferenciación de *B. abortus* (biovar 1, 2 y 4), *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis* (biovar 1)<sup>(6)</sup>, además, se ha utilizado en la diferenciación de las cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51<sup>(7)</sup> y en la detección de *Brucella spp.*, a partir de sangre y cultivos obtenidos de leche de animales infectados<sup>(5,8)</sup>.

Los resultados de la detección específica de *Brucella* por PCR empleando iniciadores derivados de la secuencia 16S rRNA fueron publicados en 1995<sup>(9)</sup>

*Brucella abortus* is a pathogenic, Gram-negative bacterium that causes cattle brucellosis. This disease results in decreased milk yield, and abortion<sup>(1)</sup>. In addition brucellosis is important as a zoonosis with both economic and public health impact. Every year nearly 500,000 new cases are reported worldwide with symptoms varying from extremely mild to extremely serious<sup>(2)</sup>. Given the importance of brucellosis, rapid, sensitive, highly specific detection techniques are needed.

In Mexico, the official diagnosis of brucellosis is made using the card (CT), rivanol (RIV), and complement fixation (CF) techniques<sup>(3)</sup>. Nevertheless, while running these indirect tests cross reactions with other bacteria such as *Yersinia enterocolitica* serotype O9 can occur. Therefore, false positive results can be obtained<sup>(4)</sup>.

The definitive diagnosis of brucellosis is obtained by the isolation of *Brucella spp.* from tissue, body fluid, or milk samples<sup>(3)</sup>. Confirmation of this organism in any sample means that the animal of origin is positive, even in the absence of serum antibodies<sup>(3)</sup>. Unfortunately, this is not a common practice in Mexico. In addition, bacteriological procedures are not always successful, they are time consuming, and they represent a risk for laboratory technicians<sup>(5)</sup>.

Considering the disadvantages of the above-mentioned diagnostic methods, the PCR technique has been widely used in the last 10 years in the diagnosis and differentiation of *B. abortus* (biovar 1, 2, and 4), *B. melitensis*, *B. ovis*, and *B. suis* (biovar 1)<sup>(6)</sup>. It has also been used in the differentiation of *B. abortus* S19 and RB51<sup>(7)</sup> vaccine strains, and in the detection of *Brucella spp.*, from blood and cultures obtained from the milk produced by infected animals<sup>(5,8)</sup>.

Results of the specific detection of *Brucella* by PCR using primers derived from the 16S rRNA sequence were published in 1995<sup>(9)</sup>. Afterwards, using the same primers on milk samples from positive animals the sensitivity of PCR was 87.5 % when compared with bacteriology<sup>(1)</sup>. More recently, *Brucella spp.* detection was performed in cow, ewe,

y posteriormente empleando los mismos iniciadores en muestras de leche de animales positivos, la sensibilidad del PCR fue del 87.5 % al compararse con la bacteriología<sup>(1)</sup>. Recientemente, se llevó a cabo la detección de *Brucella spp.*, en leche de bovinos, ovinos, caprinos y camellos mediante el uso de iniciadores con la secuencia de la inserción IS711, con un índice satisfactorio de detección<sup>(8)</sup>. La amplificación de una región intergénica entre *eryC* y *eryD* que participan en el catabolismo del eritritol por *B. abortus*, ha sido empleada para la diferenciación de la cepas de *B. abortus* cepa 19 y *B. Abortus* 2308<sup>(10)</sup>. La amplificación del gen *eryD* el cual codifica para un regulador transcripcional negativo del catabolismo del eritritol<sup>(11)</sup>, fue utilizada para el diagnóstico de *Brucella spp.*, en aislados y leche inoculada, pero aún no ha sido reportado<sup>(12)</sup>.

El PCR utilizando iniciadores para amplificar el gen *wboA* el cual codifica para una glicosil transferasa esencial en la biosíntesis del lipopolisacárido antigénico “O” ausente en la cepa RB51 (vacuna), ha sido empleado para distinguir la cepa vacunal de *B. abortus* RB51 de otras cepas de *Brucella* a partir de aislamientos<sup>(13)</sup>; sin embargo, no existen estudios publicados que hayan empleado iniciadores para amplificar los genes *eryD* y *wboA* en la detección de *B. abortus* en muestras de leche en condiciones de campo.

En el presente estudio se desarrolló el diagnóstico de brucelosis por PCR a partir de muestras de leche utilizando los genes *eryD* y *wboA* en 51 muestras de dos hatos con una alta prevalencia de brucelosis, así como a partir de los cultivos puros que se logró aislar. Las muestras analizadas por PCR fueron comparadas con los resultados obtenidos tanto en las pruebas serológicas como bacteriológicas.

Se obtuvieron muestras de leche de 51 vacas Holstein pertenecientes a dos hatos con historia de brucelosis y con un programa de vacunación con RB51. Los sueros fueron analizados mediante la PT y RIV para detectar anticuerpos a *Brucella spp.* Adicionalmente, 45 ml de leche fueron recolectados asépticamente para detectar *Brucela*

goat, and camel milk using primers including the sequence from the IS711 insert, obtaining a satisfactory detection index<sup>(8)</sup>. The amplification of an intergenic region between *eryC* and *eryD* that participate in the catabolism of erythritol by *B. abortus*, has been used for the differentiation of *B. abortus* strains 19 and 2308<sup>(10)</sup>. The amplification of the *eryD* gene that codifies for a negative transcriptional regulator of erythritol catabolism<sup>(11)</sup>, was used in the diagnosis of *Brucella spp.*, both in isolates and inoculated milk, but results have not been reported yet<sup>(12)</sup>.

The PCR using primers to amplify the *wboA* gene –which codifies for a glycosyl transferase that is essential for the biosynthesis of the antigenic lipopolysaccharide “O”, and that is absent in the vaccine strain RB51– has been used to distinguish between *B. abortus* RB51 vaccine strain from other *Brucella* isolates<sup>(13)</sup>. Nevertheless, no published studies were found using primers to amplify the *eryD* and *wboA* genes in the detection of *B. abortus* from milk samples under field conditions.

In this research, the diagnosis of brucellosis in milk with PCR was developed using the *eryD* and *wboA* genes in 51 samples from two herds with high brucellosis incidence, as well as from pure culture isolates. Samples analyzed by PCR were compared with results from both serological and bacteriological tests.

Milk samples from 51 Holstein cows in two herds with history of brucellosis and under a RB51 vaccination program were obtained. Serum samples were analyzed using both the CT and RIV in order to detect antibodies to *Brucella spp.* In addition, 45 ml of milk were aseptically collected in order to detect *Brucella spp.*, by both culture and PCR. Milk samples were frozen at -20 °C for further analysis.

Cream from thawed milk was inoculated on selective Tryptose Soy Agar medium with antibiotics and Ethyl Violet (TSAEV). Plates were incubated at 37 °C in a 10% CO<sub>2</sub> atmosphere for 7 d. Cultures were checked every day and all *Brucella* suspect colonies were selected for further identification in

*spp.*, mediante bacteriología y PCR. Las muestras de leche fueron mantenidas en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

La crema obtenida de la leche descongelada fue inoculada en placas con el medio selectivo Agar Triptosa Soya con antibióticos y Etil Violeta (TSAEV). Las placas fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera con 10 % de  $\text{CO}_2$  durante siete días. Los cultivos fueron revisados diariamente y las colonias sospechosas a *Brucella* se seleccionaron para ser identificadas de acuerdo a los criterios de morfología de colonia, tinción gram, producción de oxidasa, catalasa, ureasa, requerimientos de  $\text{CO}_2$ , inhibición por tionina/fushina, penicilina, eritritol y anti A y anti M, siguiendo los procedimientos para aislamiento y tipificación recomendados por el National Veterinary Services Laboratories (NVSL) de los Estados Unidos<sup>(14)</sup>. Un cultivo puro vacunal de *B. Abortus* RB51, así como *B. Mellitensis* Rev 1 y *B. abortus* biovar 1 fueron inoculados en medio TSAEV e incubados por cinco días a  $37^{\circ}\text{C}$ , y 3 a 5 colonias se recolectaron para la extracción de ADN.

Tres de las cinco colonias de cada muestra de leche positiva al aislamiento y cultivos puros de *B. abortus*, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev1 fueron inactivadas a  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 min y se extrajo el ADN. Las muestras de leche fueron colocadas en tubos tipo eppendorf de 2 ml y centrifugados a 12,000 xg por 1 min, eliminándose el sobrenadante y tomando el precipitado y la crema para la extracción de ADN, la cual se llevó a cabo utilizando un paquete de extracción comercial para muestras de suelo (MO BIO Laboratories, Inc. CA.), siguiendo las especificaciones del proveedor, siendo el método con el que se obtuvo la mayor cantidad de ADN<sup>(12)</sup>. Los extractos de ADN fueron conservados en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesados.

Las secuencias de los iniciadores utilizados fueron las siguientes: *eryD* F 5'-CAT-TTC-GTC-GCC-GGC-ATG-ACT-3', *eryD* R 5'-GCA-ACC-CAT-GTC-GAA-AAC-CGT-3', *wboA* F 5'-GCC-AAC-CAA-CCC-AAA-TGC-TCA-CAA-3', *wboA* R 5'-TTA-AGC-GCT-GAT-GCC-ATT-TCC-TTC-AC-

accordance with the colony morphology, Gram stain, oxidase/catalase/urease production,  $\text{CO}_2$  requirements, thionine/fuscin, penicillin, erythritol inhibition, and anti-A/anti-M, criteria. Isolation/characterization procedures stated by the US National Veterinary Services Laboratories (NVSL) were observed<sup>(14)</sup>. Vaccine *B. abortus* RB51, *B. mellitensis* Rev 1 and *B. abortus* biovar 1 pure cultures were inoculated into TSAEV, incubated for 5 d at  $37^{\circ}\text{C}$ , then 3 to 5 colonies were collected for DNA extraction.

Three of the five colonies from each milk sample positive to isolation, and pure cultures of *B. abortus*, *B. abortus* RB51 and *B. melitensis* Rev1 were killed at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min. DNA was then extracted. Milk samples were placed in 2-ml Eppendorf-type tubes and centrifuged at 12,000 xg for 1 min. Supernatant was discarded. Both sediment and milk cream were used for DNA extraction. DNA extraction was performed using a commercially-available extraction kit designed for soil samples (MO BIO Laboratories, Inc. CA.), following manufacturer's directions and using the method yielding the highest amount of DNA<sup>(12)</sup>. DNA extracts were preserved frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until processed.

Primer sequences were: *eryD* F 5'-CAT-TTC-GTC-GCC-GGC-ATG-ACT-3', *eryD* R 5'-GCA-ACC-CAT-GTC-GAA-AAC-CGT-3', *wboA* F 5'-GCC-AAC-CAA-CCC-AAA-TGC-TCA-CAA-3', and *wboA* R 5'-TTA-AGC-GCT-GAT-GCC-ATT-TCC-TTC-AC-3'. Both primer pairs were synthesized by *Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México* (Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico), using the phospho-triester method in a 391 automated synthesizer (Applied Biosystem).

For the primers pair *eryD*, the reaction consisted of 100ng total DNA from each sample of approximately 1 -10 ug total extracted DNA, 1X reaction buffer with 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM of each deoxy-nucleotide triphosphate (Invitrogen Inc. CA.), 2 U of Taq polymerase AGSGold (Hybaid, UK), 5% DMSO, 1X Enhancer (Hybaid, UK), 25 pM of each primer in a total volume of 50  $\mu\text{l}$ . The

3'. Ambos pares de iniciadores fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, empleando la técnica del fosfo-triéster en un sintetizador automatizado 391 (Applied Biosystem).

Para el par de iniciadores *eryD*, la reacción consistió en 100 ng de ADN total de cada muestra de aproximadamente 1-10 ug de ADN total extraído, buffer de reacción 1X con 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (Invitrogen Inc. CA.), 2 U de Taq polimerasa AGSGold (Hybaid, UK), 5% DMSO, Enhancer 1X (Hybaid, UK), 25 pM de cada iniciador en un volumen total de 50 µl. Se utilizó un termociclador (Hybaid, UK), con las siguientes consideraciones: la amplificación del gen *eryD* se llevó a cabo con un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min en el primer paso, seguido por cinco ciclos a 95 °C por 45 seg, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. Se llevaron a cabo otros cinco ciclos iguales a los anteriores, pero disminuyendo 1 °C por ciclo, y finalmente, 25 ciclos a 95 °C por 45 seg, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min seguidos por una extensión final a 72 °C por 10 min. Para amplificar el gen *wboA* se desnaturalizó inicialmente a 95 °C durante 5 min seguido por 40 ciclos a 95 °C por 1 min, 62 °C por 1 min y 72 °C por 1.5 min y finalmente se extendió 10 min a 72 °C<sup>(13)</sup>.

Cultivos puros de *B. abortus* biovar 1, de la cepa vacunal *B. abortus RB51*, de la cepa vacunal *B. melitensis Rev 1* y ADN extraído de leche inoculada con *B. abortus* biovar 1 se utilizaron como controles positivos. Así mismo, agua estéril y un panel de las bacterias que pudieran encontrarse en leche como: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris* y *Serratia marcescens* se emplearon como controles negativos.

El límite de detección de *B. abortus* con los iniciadores *eryD* se determinó utilizando una concentración inicial de 100 ng/ul de ADN total en leche, posteriormente se realizaron diluciones de 1/10 a 1/10000. Se empleó un microlitro de cada una de las diluciones para realizar las reacciones

thermocycler (Hybaid, UK) was used with the following considerations: *eryD* gene amplification was performed with an initial denaturation cycle at 95 °C for 5 min in the first step, followed by five steps of 95 °C for 45 sec, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min. Five additional cycles were carried out. These cycles were the same as the above-mentioned, but 1 °C was decreased per cycle. Finally, 25 cycles at 95 °C for 45 sec, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min were performed, followed by a final extension at 72 °C for 10 min. In order to amplify the *wboA* gene, an initial denaturation at 95 °C for 5 min was performed, followed by 40 cycles at 95 °C for 1 min, 62 °C for 1 min, and 72 °C for 1.5 min, with a final extension for 10 min at 72 °C<sup>(13)</sup>.

Pure cultures of *B. abortus* biovar 1, *B. abortus RB51* vaccine strain, *B. melitensis Rev 1* vaccine strain, and the DNA extracted from *B. abortus* biovar 1-inoculated milk were used as positive controls. Also, sterile water and a bacterial panel including bacteria that could be found in milk such as *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris* and *Serratia marcescens* were used as negative controls.

*B. abortus* detection limit with the *eryD* primers was determined using a total initial concentration of 100 ng/ul DNA in milk; 1/10 - 1/10000 dilutions were then prepared. One microliter of each dilution was used to perform the PCR, using the *eryD* primers. A 1 ng DNA detection limit was obtained (result not shown)<sup>(12)</sup>. For *wboA* a 5 ng of *B. abortus* DNA detection index was reported<sup>(13)</sup>.

Amplified products were separated by electrophoresis using a 1.5% agarose gel prepared on a 1X TBE buffer (89 mM Tris HCL, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8). A voltage of 100 V was used. A molecular weight marker of 100 base pairs (Hybaid, UK) was used in order to properly identify of the PCR products. Gels were stained using a 0.5 ug/ml ethidium bromide aqueous

de PCR empleando los iniciadores *eryD*. Obteniendo un límite de detección de 1 ng de ADN total (resultado no mostrado)<sup>(12)</sup>. Para *wboA* se reportó un índice de detección de 5 ng de ADN de *B. abortus*<sup>(13)</sup>.

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, preparado en buffer TBE 1X (89 mM Tris HCL, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8). Se empleó un voltaje de 100 V. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares bases (Hybaid, UK) para hacer posible la identificación correcta de los productos de PCR. Los geles se tiñeron en una solución acuosa de bromuro de etidio a una concentración de 0.5 ug por ml. Los geles teñidos se colocaron en una fuente de luz UV (Transilluminator-CLP) para observar el producto, y posteriormente se fotografiaron con una cámara FB-PDC-34 con rollo Polaroid 3000-667. El fragmento esperado para el par de iniciadores *eryD* fue de 555 pb, en tanto el fragmento esperado para los iniciadores *wboA* fue de 456 pb para la cepa silvestre y de 1298 pb para la cepa RB51<sup>(13)</sup> (números de acceso en GenBank U57100 y AF107768, respectivamente).

Los porcentajes de casos positivos para las pruebas serológicas, bacteriológicas y PCR *eryD* fueron comparados utilizando la prueba de proporciones con un nivel de confianza del 95% empleando el paquete estadístico EPI Info versión 6<sup>(15)</sup>.

Cuadro 1. Casos positivos (+) y negativos (-) a las diferentes pruebas de diagnóstico de brucelosis bovina

Table 1. Positive (+) and negative (-) cases facing different bovine brucellosis diagnostic tests

Animals(n)	Card test	Bacteriology	<i>eryD</i> -PCR
24	-	-	-
11	+	+	+
6	+	-	+
1	+	+	-
9	+	-	-

ERYD-PCR = polymerase chain reaction using the *eryD* primer.

solution. Stained gels were placed on a UV light source (Transilluminator-CLP) in order to observe the product. Gels were then photographed using a FB-PDC-34 camera provided with a Polaroid 3000-667 film. The fragment separated for the pair of *eryD* starters was 555 bp, while the expected fragment for the *wboA* starters was 456 bp for the field strain, and 1298 bp for the RB51 strain<sup>(13)</sup> (access number for GenBank U57100 and AF107768, respectively).

The percentages of positive cases for serological, bacteriological, and *eryD* PCR tests were compared with a 95% confidence level, using the statistical EPI software Info version 6<sup>(15)</sup>.

Serological, bacteriological, and PCR results are shown in Table 1. Proportions of positive cases in each test were: serology, 52.9 % (27/51); *eryD* PCR, 33.3 % (17/51); and bacteriology, 25.4 % (12/51) ( $P < 0.05$ ) (Table 2). Figure 1 shows a gel with negative PCR results using *eryD*, with the DNA of the following bacteria: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, and *Serratia marcescens*. Figure 2 shows the amplification results of Rev 1 and RB51 vaccine strains using the *eryD* and *wboA* primers. A sample was obtained from the 12 positive isolates in order to perform the PCR of the *eryD* and *wboA* genes. One hundred

Cuadro 2. Comparación de los resultados serológicos, bacteriológicos y PCR de muestras de leche de ganado bovino (%)

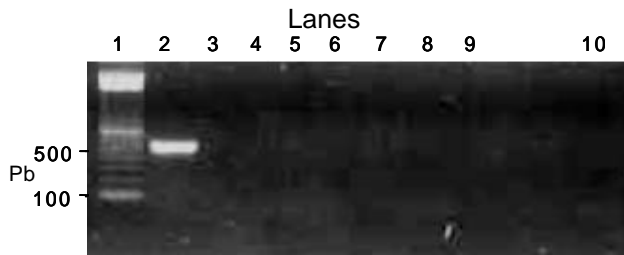
Table 2. Comparison of serological, bacteriological, and PCR results, in cow milk samples (%)

Animals	PCR	Culture		Serology	
		+	-	+	-
51	+17(33.3) <sup>a</sup>	11(23.59)	6(11.7)	17(33.3)	0(0)
	-34(66.6)	1(1.9)	33(64.7)	10(19.6)	24(47.0)
Total	51(100)	12(25.4) <sup>b</sup>	39(76.4)	27(52.9) <sup>c</sup>	24(47.0)

abc Values with a different superscript are different ( $P < 0.05$ ).

Figura 1. Productos de PCR amplificados con los indicadores *eryD* a partir de ADN de un panel de bacterias empleadas como controles negativos

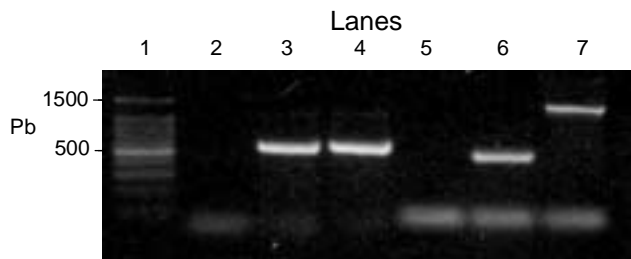
Figure 1. PCR products amplified with *eryD* primers from the DNA of panel of bacteria used as negative controls



Lane 1: molecular weight marker; 2: positive control: *Brucella abortus*; 3: *Klebsiella pneumoniae*; 4: *Staphylococcus aureus*; 5: *Pseudomonas aeruginosa*; 6: *Escherichia coli*; 7: *Pseudomonas fluorescens*; 9: *Serratia marcescens*; 10: negative control.

Figura 2. Resultados de las amplificaciones de las vacunas Rev1 y RB51 empleando los iniciadores *eryD* y *wboA*

Figure 2. Amplification results of Rev 1 and RB51 vaccine strains using the *eryD* and *wboA* primers



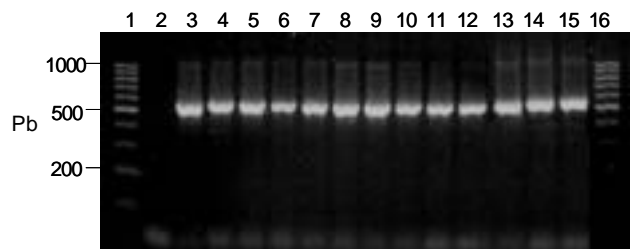
Lane 1: molecular weight marker; 2: *eryD* negative control; 3: Rev 1 *eryD*; 4: RB51 *eryD*; 5: *wboA* negative control; 6: Rev 1 *wboA*; 7: RB51 *wboA*.

Los resultados de las pruebas serológicas, bacteriológicas y PCR se muestran en el Cuadro 1. Las proporciones de los casos positivos para cada prueba fueron: 52.9 % (27/51) a serología, 33.3 % (17/51) a PCR *eryD* y 25.4 % (12/51) a bacteriología, ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 2). En la Figura 1 se muestran en un gel los resultados negativos a PCR empleando *eryD*, con ADN de las bacterias: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris* y *Serratia marcescens*. La Figura 2 muestra los resultados de las amplificaciones de las vacunas Rev 1 y RB51 empleando los iniciadores *eryD* y *wboA*. De los 12 aislamientos positivos se tomó una muestra para realizar PCR de los genes *eryD* y *wboA* obteniendo amplificación a partir del 100 % de los cultivos (Figuras 3,4). Dos gels de las 17 muestras de leche positivas a PCR empleando el gen *eryD* se muestran en las Figuras 5A y 5B. Las 17 muestras fueron seropositivas y 11 fueron positivas a bacteriología. Se utilizaron también iniciadores para amplificar el gen *wboA*; sin embargo, no se logró la amplificación a partir de muestras de leche.

Figura 3. Amplificación *eryD* por PCR a partir de ADN extraído de cultivos de *Brucella abortus*

Figure 3. PCR amplification of the *eryD* fragment from *Brucella abortus*-extracted DNA

Serology	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Culture	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Milk PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

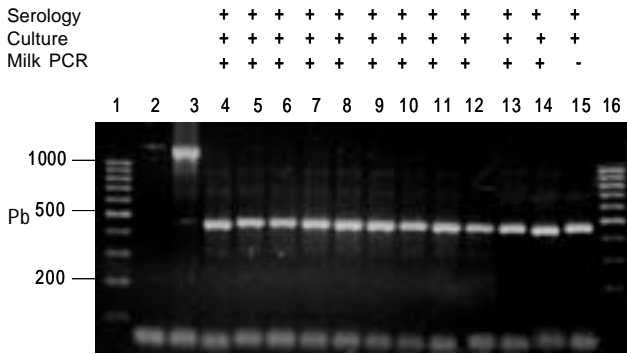


Lanes 1 and 16: molecular weight markers; 2: negative control; 3: positive control; 4-15: *B. abortus* positive isolates from milk samples.

percent (100%) amplification of the cultures was obtained (Figures 3, 4). Two gels including all 17 PCR-positive milk samples using the *eryD* gene are shown in Figures 5A and 5B. All 17 samples were PCR positive while 11 were positive to bacteriology. Starters were also used to amplify

Figura 4. Amplificación del fragmento *wboA* por PCR a partir de ADN extraído de cultivos de *Brucella abortus*

Figure 4. PCR amplification of the *wboA* fragment from *Brucella abortus*-extracted DNA



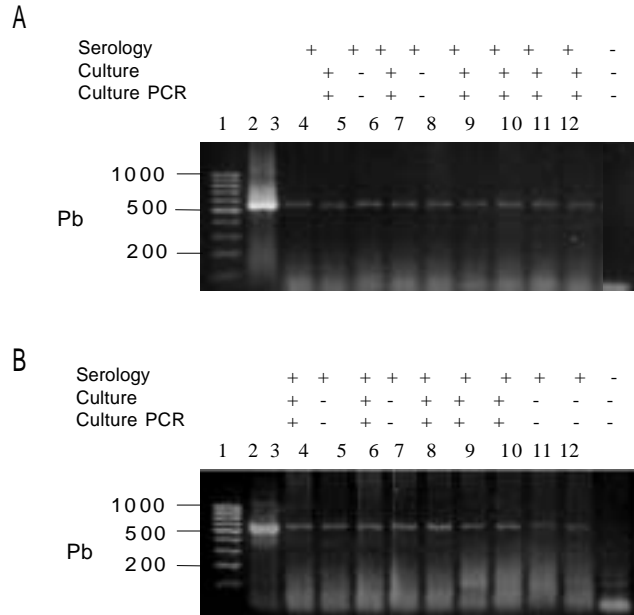
Lanes 1 and 16: molecular weight markers; 2: negative control; 3: *Brucella abortus* RB51 positive control; 4-15: *B. abortus* positive isolates from milk samples.

En México, las campañas oficiales se basan en la detección de anticuerpos a *Brucella* empleando las pruebas serológicas de PT, RIV y FC, y la bacteriología es considerada como prueba confirmatoria<sup>(3)</sup>. Los resultados de este estudio muestran que el método de amplificación de ADN empleando *eryD* para la detección de *Brucella abortus* en muestras de leche amplificó el ADN de *B. abortus* en 17 de 24 animales seropositivos, de los cuales sólo en 11 se aisló *B. abortus*. Así, con la serología hubo un mayor número de animales reactivos y el PCR como prueba confirmatoria fue más sensible que la bacteriología. Estos resultados concuerdan con los reportados en otros estudios en donde el uso de PCR en muestras de leche ha sido superior que el aislamiento en la detección de *Brucella spp.*, ya que es capaz de detectar ADN de organismos no viables<sup>(5,8,9,16)</sup>.

En cuanto al caso de un animal reactor en el que se aisló *B. abortus* biovar 1 y no fue posible la amplificación, probablemente se debió a la baja concentración de bacterias en esa muestra, ya que el límite de detección de la prueba PCR en leche fue de 1 nanogramo de ADN, lo que equivale aproximadamente a 300,000 células de *B. abortus*

Figura 5. Amplificación del fragmento *eriD* por PCR a partir de ADN extraído de muestras de leche

Figure 5. PCR amplification of the *eryD* fragment from milk sample-extracted DNA



A) Lane 1: molecular weight marker; 2: positive control: milk sample inoculated with *B. abortus*; 3: positive control: *B. abortus* RB51; 4-11: positive milk samples; 12: negative control.

B) Lane 1, molecular weight marker; 2: positive control: milk sample inoculated with *B. abortus*; 3-11: positive milk samples; 12: negative control.

the *wboA* gene; nevertheless no amplification from milk samples could be obtained.

In Mexico, official campaigns are based on the detection of *Brucella* antibodies using the Card, Rivanol, and Complement Fixation tests, while bacteriology is considered as confirmatory<sup>(3)</sup>. Results from this study show that DNA amplification using *eryD* for the detection of *Brucella abortus* in milk samples was able to amplify *B. abortus* DNA in 17 of 24 serologically-positive animals, while only 11 of them yielded positive *B. abortus* isolates. This way, serology yielded a higher number of positive reactors, and PCR was more sensitive than



(considerando un tamaño de 3.3 megapares de bases del genoma de *B. abortus* y empleando el número de Avogadro para la determinación). Esta situación de bajo límite de detección ha sido mencionada en PCR de muestras de leche de bovino y ovino<sup>(8,9)</sup>.

Debido a que el cultivo bacteriológico es un procedimiento riesgoso para los técnicos, requiere de personal capacitado y laboratorios equipados con medidas de bioseguridad<sup>(17)</sup>, el empleo de PCR para la detección del gen *eryD* de *Brucella* spp, puede ser una buena alternativa después de un muestreo tamiz utilizando las pruebas PT y RIV. La confirmación por PCR sería conveniente en hatos con baja prevalencia, en donde se requiere identificar si las respuestas serológicas son inespecíficas o cruzan con *Yersinia enterocolitica*<sup>(4)</sup>.

Al probar el PCR utilizando el gen *wboA* en cultivos de *Brucella* aislados de muestras de leche para detectar la cepa vacunal RB51, se encontró que el 100 % de las cepas coincidieron con cepas de *B. abortus* de campo; este experimento se realizó para descartar la posibilidad de que se estuviera eliminando la cepa vacunal, ya que aunque la eliminación de la vacuna RB51 no ha sido documentada, existe el riesgo en hatos de alta prevalencia en donde la vacunación es común que provoque placentitis y abortos<sup>(18)</sup>. Al probar *wboA* en extractos de ADN de muestras de leche no se obtuvo amplificación en ninguna de las 51 muestras de leche analizadas, por lo que se cree que es necesario modificar los parámetros del PCR para este par de iniciadores, diseñar otro par para otra región del mismo gen y así aumentar la sensibilidad del ensayo, o bien, desarrollar un PCR anidado con el mismo propósito.

Finalmente, se considera que la prueba de PCR utilizada es una buena alternativa, ya que es económica, rápida y segura para los técnicos, por lo que puede ser utilizada para detectar brucelosis en leche y cultivos puros, como una prueba rápida y confirmatoria en las campañas oficiales para erradicar la brucelosis.

bacteriology as a confirmatory test. These results are consistent with other reports, where the use of PCR in milk samples has been better than bacterial isolation in the detection of *Brucella* spp, since it can detect the DNA from non-viable organisms<sup>(5,8,9,16)</sup>.

Regarding the case of a reactor from which *B. abortus* biovar 1 was isolated but no amplification was obtained, we believe that this was due to a low bacterial concentration in the sample, since the limit of detection of PCR in milk was 1 nanogram of DNA, which is equivalent to approximately 300,000 cells of *B. abortus* (considering a size of 3.3 base mega-pairs from the *B. abortus* genome, using Avogadro's number for the determination). This situation of a low PCR detection limit has been mentioned for both cow and ewe milk<sup>(8,9)</sup>.

Given that the bacterial culture is hazardous for the laboratory technicians, trained staff and laboratories labs equipped with biosecurity measures are required<sup>(17)</sup>, PCR can be a good alternative for the detection of *Brucella* spp. *eryD* gene after screening the samples with CT and RIV tests. PCR confirmation would be convenient in low-prevalence herds where the possibility of non specific or *Yersinia enterocolitica* cross reactions need to be further clarified<sup>(4)</sup>.

When PCR was tried using the *wboA* gene in *Brucella* isolates from milk samples in an attempt to detect the RB51 vaccine strain, it was found that 100% of the strains corresponded to *B. abortus* field strains. This experiment was carried out in order to rule out the possibility of vaccine strain shedding. Even though RB51 vaccine shedding has not been documented, such risk exists in high prevalence herds where vaccination commonly results in placentitis and abortion among pregnant cows<sup>(18)</sup>. When *wboA* was tested in DNA extracts from milk samples, no amplification was obtained in any of the 51 milk samples analyzed. Therefore, we feel that it would be necessary to alter PCR parameters regarding this pair of primers, design a different pair for another region within the same gene (thus increasing the sensitivity of the assay), or develop a nested PCR with the same purpose.

## AGRADECIMIENTOS

Para la realización del presente proyecto se contó con el apoyo de la Universidad Autónoma de Baja California, el Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada y la Asociación Ganadera Local de Productores de Leche de Tijuana, B.C. Asimismo, agradecemos a la Sra. Bertha Licón de Badilla y al Sr. Gonzalo Badilla propietarios del “Establo Badilla”, y al MVZ Mario Muñoz Del Real por su esfuerzo en la erradicación de la brucelosis en dicho hato.

## LITERATURA CITADA

- Romero C, Pardo M, Grillo MJ, Diaz R, Blasco JM, Lopez-Goñi I. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *J Clin Microbiol* 1995;33(12):3198-3200.
- 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;39(4):661-1664.
- NOM-041-ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana para la Campaña Nacional para el control y erradicación de la brucelosis en los animales. SAGAR. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.1995.
- Mittal KR, Tizard IR. Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica* IX and *Brucella abortus* agglutinins in naturally infected animals. *Res Vet Sci* 1980;28(3):311-314.
- Diana SL, Martínez IO, Lopez A, Martínez JP. Single Step PCR for detection of *Brucella* spp from Blood and Milk of Infected Animals. *J Clin Microbiol* 1995;33(13):3087-3090.
- Brinker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* (biovar 1,2 and 4), *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* (biovar 1) by the polimerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1994;32:2660-2666.
- Betsy JB, Halling SM. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strain S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 1995;1640-642.
- Hamdy ME, Amin AS. Detection of *Brucella* Species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Veterinary J* 2002;163:299-305.
- Romero C, Gamazo C, Pardo M, López-Goñi I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33(4):615-617.
- Sangari FJ, García-Lobo JM, Agüero J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett* 1994;121:337-342.
- Félix JS, Agüero J, García-Lobo JM. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiology* 2000;146:487-495.
- Organes HC. Optimización del método PCR para la amplificación de los genes *ery A*, *ery B* y *ery D* del genoma de *Brucella*

Finally, the PCR used is considered to be a good alternative, since it is inexpensive, rapid, and safe for lab technicians. This PCR test can be used in the detection of brucellosis in both milk and pure cultures as a rapid confirmative test in government-driven campaigns aiming the eradication of brucellosis in Mexico.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Autonomous University of Baja California, The Ensenada's Center for Scientific Research and Superior Education, and the Tijuana's Local Milk Producers Association. We also want to express our gratitude to Mrs. Bertha Licón de Badilla and Mr. Gonzalo Badilla, owners of the “Establo Badilla” herd, as well as to Mario Muñoz del Real, DVM, for his efforts in the eradication of brucellosis from such dairy.

*End of english version*

- 
- 
- abortus* con potencial para diagnóstico [tesis licenciatura]. Tijuana, BC: Universidad Autónoma de Baja California; 2001.
  - Vemulapalli R, McQuiston JR, Schurig GG, Sriranganathan N, Halling SH, Boyle SM. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR Assay To Distinguish Strain RB51 from Other *Brucella* species and strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(5):760-764.
  - Payeur JB, Ewalt DR, Stevens DA, Teig DK. Laboratory procedures for isolating, identifying, and typing *Brucella*. National Veterinary Services Laboratories, Animal and Health Inspection Service, Department of Agriculture, Ames, Iowa, USA; 1993.
  - Epi info 6. A word processing database and statistical program for public health.(version 6.04). Center for Diseases Control & Prevention, USA. 2001.
  - Romero C, Lopez-Goñi I. Improved Method of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. By PCR. *Appl Environmental Microbiol* 1999;65(8):3735-3737.
  - Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques from the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France. 1988.
  - Palmer MV, Olsen SC, Cheville NF. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am J Vet Res* 1997;58(5):474-477.