

que efectivamente se trata de la región amplificada del gen de la membrana de *B. abortus*. Sin embargo, la prueba más contundente que demostraría la identidad del fragmento es la propia secuencia nucleotídica, por lo que actualmente se realizan experimentos de secuenciación del fragmento.

Debido a que en la primera prueba de amplificación no se observó ningún fragmento amplificado a partir de los ADNs de las otras especies de *Brucella*, existía la posibilidad de que el fragmento de 720 pb no fuera amplificado

debido a diferencias nucleotídicas en los iniciadores ya que la temperatura de anillamiento, en ese experimento, fué de 60°C. Para determinar lo anterior, las temperaturas de anillamiento fueron reducidas a 50 y 55°C en dos experimentos sucesivos con los mismos componentes, encontrándose que en ningún caso se logró la amplificación respectiva (datos no presentados). Esto demuestra que los iniciadores aquí diseñados son altamente específicos para la especie *B. abortus*.

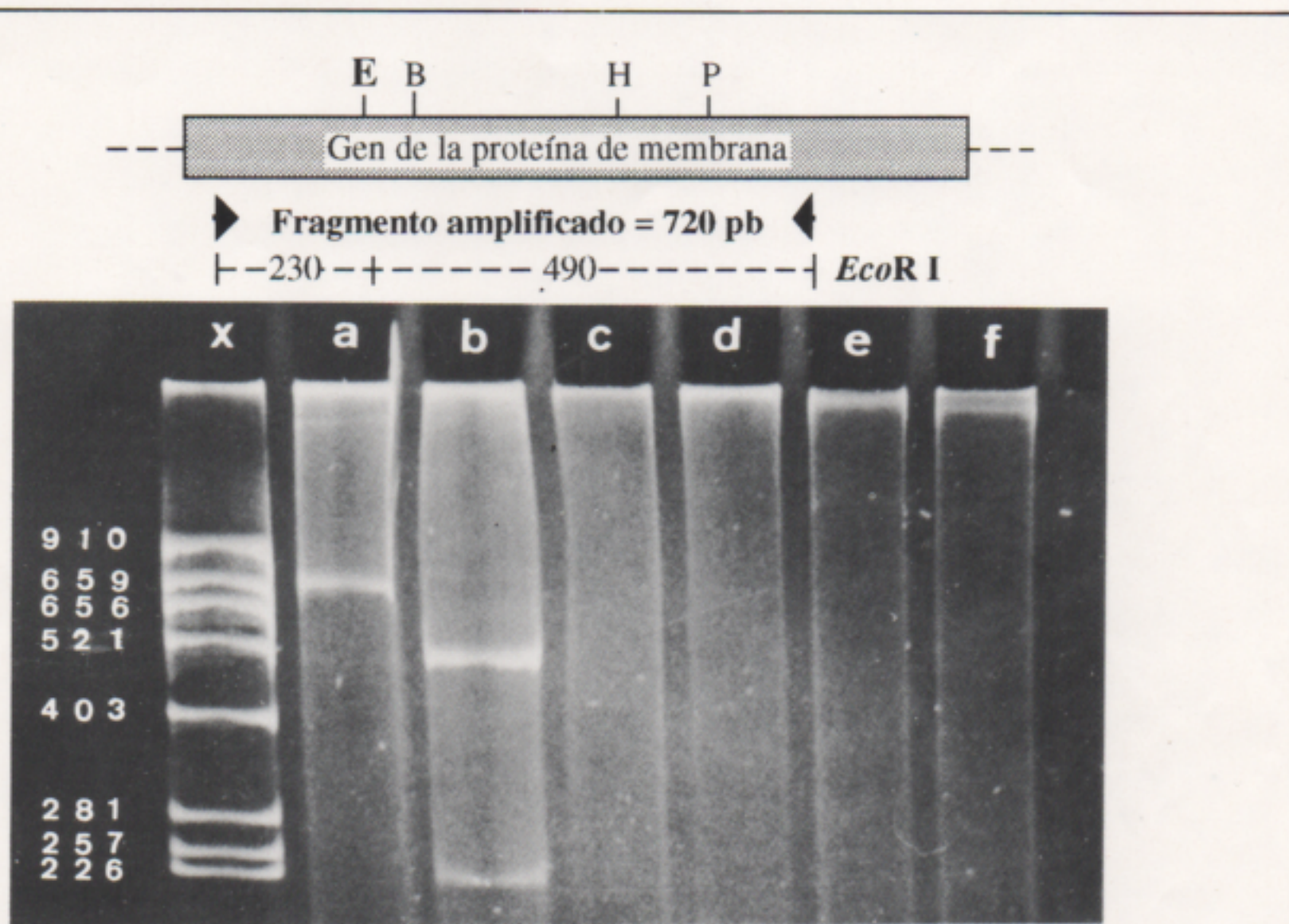


Figura 1. ADN de *Brucella* spp. amplificado por la RCP. **Panel A.** Representación esquemática del mapa de restricción del fragmento amplificado. Los triángulos representan la posición de **Panel B.** Fraccionamiento del fragmento amplificado y digerido con *EcoRI* en gel de poliacrilamida-urea al 8%. Carril X es el marcador de peso molecular (pBR322 digerido con *AluI*), **a** es el fragmento amplificado directamente de *B. abortus*, **b** es el fragmento amplificado y digerido con la enzima de restricción *EcoRI*, **c** es similar a **a** utilizando ADN de *B. melitensis* como molde, **d** es igual que **a** y **c** solo que el molde es ADN de *B. ovis*. **e** es el resultado de la RCP utilizando ADN de *E. coli* como molde, **f** es el resultado de la RCP utilizando ADN humano como molde.

Una vez que la RCP permitió la detección exitosa del fragmento específico de *B. abortus*, se procedió a su implementación con muestras de campo provenientes de bovinos diagnosticados por serología como positivos para brucelosis. El ADN de veinticinco muestras sanguíneas provenientes de un mismo hato de vacas raza Holstein radicadas en un rancho lechero del municipio de Saltillo

fueron analizadas por medio de la RCP utilizando los iniciadores específicos, previamente descritos, para *B. abortus*. Los resultados de la RCP permitieron determinar que 23 de las muestras mostraron claramente la presencia del fragmento amplificado de 720 pb. Esto permitió inferir la presencia de *B. abortus* en esos bovinos. Como puede observarse en la figura 2, algunos de los fragmen-